



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE QUÍMICA

**BIOCATÁLISIS EN DISOLVENTES NEOTÉRICOS:
Nuevos desarrollos de la Química Verde para la producción de
biodiesel y aromas**

D^a Juana María Bernal Palazón
2014

Memoria presentada para acceder al Grado de Doctor por
la Universidad de Murcia por

Juana María Bernal Palazón

Murcia, Julio 2014



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 "BIOCATÁLISIS EN DISOLVENTES NEOTÉRICOS: Nuevos desarrollos de la Química Verde para la producción de biodiesel y aromas", realizada por D. Juana María Bernal Palazón, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 21 de MAYO de 2014

Mod:T-20



D. MANUEL HERNANDEZ CORDOBA, Catedrático de Universidad del Área de Química Analítica y **Presidente Comisión Académica programa doctorado *** en Química, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "BIOCATÁLISIS EN DISOLVENTES NEOTÉRICOS: Nuevos desarrollos de la Química Verde para la producción de biodiesel y aromas", realizada por D^a Juana María Bernal Palazón, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Pedro Lozano Rodríguez, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 23 de mayo de 2014, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 27 de mayo de 2014



Doctorando: D^a. Juana María Bernal Palazón

**Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

**Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*

Mod: T-40

Durante su doctorado, Juana María Bernal Palazón ha recibido un contrato asociado a los proyectos de investigación en los cuales durante su transcurso se desarrolló esta tesis, así como una beca de corta estancia en la Universidad de Burdeos 1-UMR 5255 CNRS, Talancé-Francia (MINECO Short Stay Fellowship).

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos MICIN CTQ2008-00877/PPQ, y MINECO CTQ2011-28903-C02-02 y Fundación SENECA Ref. 08616/PI/08

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

Artículos

P. Lozano, **J. M. Bernal**, R. Piamtongkam, D. Fetzter, M. Vaultier. 2010. One-Phase Ionic Liquid Reaction Medium for Biocatalytic Production of Biodiesel. *ChemSusChem*, **3**, 1359-1363.

Indicios de calidad Revista

Área de JCR: Chemistry Multidisciplinary

Impact Factor 2012: 7.457

Posición: 17 de 152

P. Lozano, **J.M. Bernal**, M. Vaultier. 2011. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Fuel*, **90**, 3461-3467.

Indicios de calidad Revista

Área de JCR: Engineering, Chemical

Impact Factor 2012: 3.357

Posición: 11 de 133

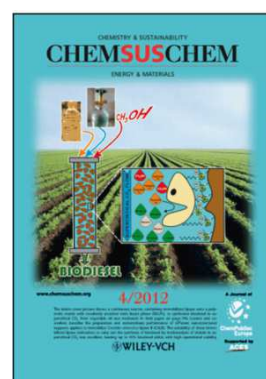
P. Lozano, E. García-Verdugo, **J. M. Bernal**, D. F. Izquierdo, M. I. Burguete, G. Sánchez-Gómez, S. V. Luis. 2012. Immobilized lipase onto structured supports containing covalently attached ionic liquids for continuous synthesis of biodiesel in scCO₂. *ChemSusChem*, **5**, 790-798.

Indicios de calidad Revista

Área de JCR: Chemistry Multidisciplinary

Impact Factor 2012: 7.457

Posición: 17 de 152



J.M. Bernal, P. Lozano, E. García-Verdugo, M. I. Burguete, G. Sánchez-Gómez, G. López-Lopez, M. Pucheault, M. Vaultier, S. V. Luis. 2010. Supercritical Synthesis of Biodiesel: A review. *Molecules*, **17**, 8696-8719.

Indicios de calidad Revista

Área de JCR: Chemistry Organic

Impact Factor 2012: 2.428

Posición: 24 de 57

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

Indicios de calidad Revista

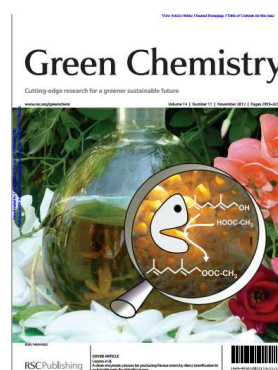
Área de JCR: Chemistry Multidisciplinary

Impact Factor 2012: 6.828

Posición: 18 de 152

Trabajo destacado por Stephen K Ritter, Editor of Chemistry & Engineering News, en su artículo de divulgación titulado: *Ionic Liquid Serves Up Natural Flavors*, published in: *Chemical & Engineering News*, **91**(4), January 28, 2013, 34-35

<http://cen.acs.org/articles/91/i4/Ionic-Liquid-Serves-Natural-Flavors.html>



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

Indicios de calidad Revista

Área de JCR: Chemistry Multidisciplinary

Impact Factor 2012: 11.653

Posición: 10 de 152

D. F Izquierdo, **J. M. Bernal**, M.I. Burguete, E. Garcia-Verdugo, P. Lozano and S. V. Luis. 2013. An efficient microwave-assisted enzymatic resolution of alcohols using a lipase immobilised on Supported Ionic Liquid-Like Phases (SILLPs). *RSC Advances*, **3**, 13123 – 13126.

Indicios de calidad Revista

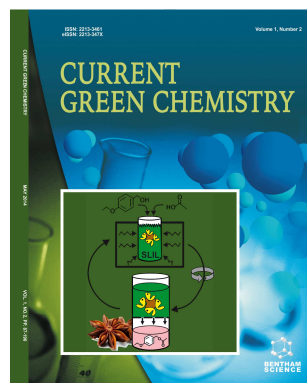
Área de JCR: Chemistry Multidisciplinary

Impact Factor 2012: 2.562

Posición: 46 de 152

P. Lozano, **J. M. Bernal**, A. Lajarin, D. Romera, E. Garcia-Verdugo, G. Sanchez-Gomez, M. Pucheault, M. Vaultier, M. I. Burguete and S. V. Luis. 2014. A Green Approach for Producing Solvent-free Anisyl Acetate by Enzyme catalyzed Direct Esterification in Sponge-like Ionic Liquids Under Conventional and Microwave Heating. *Current Green Chemistry*, **1**, 145 – 154.

Indicios de calidad Revista: Sin establecer



Comunicaciones orales en Congresos

Pedro Lozano, **Juana M. Bernal**, Michel Vaultier. Batch and continuous flow efficient enzymatic synthesis of biodiesel in mono and multiphase systems based on ILs and scCO₂. *Green Solvents Conference*. Berchtesgaden, Germany. October 10th-13rd, 2010

Juana M. Bernal, Pedro Lozano y Michael Vaultier. Enzymatic synthesis of biodiesel in mono- and multiphase systems based on ILs and scCO₂. *5th International Meeting on Biotechnology, Biotec2010*. Pamplona, España. September 29th- October 1st, 2010

Juana M. Bernal, P. Lozano, Eduardo García-Verdugo, M. I. Burguete, S. V. Luis, M. Vaultier. Síntesis enzimática de biodiesel en sistemas multifásicos basados en líquidos iónicos y scCO₂. *V Reunión de expertos en Tecnologías de Fluidos Comprimidos*. Burgos, Spain. 15-17 Mayo 2011.

Pedro Lozano, **Juana M. Bernal**, B. Bernal, G. Sánchez- Gómez, Eduardo García-Verdugo, S.V. Luis, M. I. Burguete, M. Pucheault, Michel Vaultier. Enzymatic processes in multiphasic neoteric systems: ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Frontiers in White Biotechnology*. Delft, The Netherlands. 21st-22^{sd} June, 2011

Diana F. Izquierdo, **Juana M. Bernal**, María I. Burguete, Eduardo García-Verdugo, Pedro Lozano, Santiago V. Luis. The use of Supported Ionic Liquid Phases (SILLPS) for the development of biocatalytic processes under nonconventional conditions. *9th Green Chemistry Conference*. Alcalá de Henares – España. 14th-16th September, 2011

Pedro Lozano, Eduardo García-Verdugo, **Juana M. Bernal**, Diana F. Izquierdo, M. Isabel Burguete, Gregorio Sánchez-Gómez, Santiago V. Luis. Continuous green biocatalytic synthesis of biodiesel in multiphasic neoteric systems. *15th International Congress on Catalysis*. Munich, Germany. 1st-6th July, 2012

Pedro Lozano, **Juana M. Bernal**, Alicia Navarro. Clean enzymatic process for natural flavor ester synthesis in switchable ionic liquid/solid phases. *GREEN SOLVENTS CONFERENCE*. Boppard/Rhine-Valley, Germany. 8th-10th October, 2012

Juana M. Bernal; Alicia Navarro; Gregorio Sanchez-Gomez; Gregorio Lopez-Lopez; Pedro Lozano. Ionic liquids or ionic sponges?: Clean enzymatic process for natural flavour ester synthesis in switchable ionic liquid/solid phases. *5th CONFERENCE ON IONIC LIQUIDS-COIL-5*. Algarve. Portugal April. 21-25, 2013

Juana M. Bernal, E. García-Verdugo, M. I. Burguete, G. Sánchez, M. Vaultier, S. V. Luis, P. Lozano. Green bioprocesses in sponge-like ionic liquids. *GPE 2014 – 4th International Congress on Green Process Engineering*. Sevilla, España. 7th-10th April, 2014

Posters presentados en Congresos

Juana M. Bernal, Pedro Lozano, Michel Vaultier. Enzymatic synthesis of biodiesel in mono- and multiphase systems based on ILs and scCO₂. *5th International Meeting on Biotechnology, Biotec-2010*. Pamplona, España. September 29th- October 1st, 2010

Pedro Lozano, Eduardo García-Verdugo, **Juana M. Bernal**, Mathieu Pucheault, Maria I Burguete, Santiago Luis, Michel Vaultier. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel in ILs/scCO₂ biphasic systems: The use of SILP as enzyme immobilization support. *GPE 2011 3th International Congress on Green Process Engineering Congress*. Kuala Lumpur, Malaysia. 6th-8th December, 2011

Juana M. Bernal, M. Isabel Burguete, Diana Flor Izquierdo, Eduardo García-Verdugo, Gregorio López-López, Pedro Lozano, Santiago V. Luis, Prof. Gregorio Sánchez-Gómez. Polymer-Supported Ionic Liquid-Like Phases (SILLPs): Developing materials for practical catalytic and biocatalytic applications. *ICGC4 - 4th International IUPAC Conference on Green Chemistry*. Foz do Iguacu/PR, Brazil. 25th-29th August, 2012.

Agradecimientos

“Nature is pleased with simplicity. And nature is no dummy”
Isaac Newton (1642-1727)

Creo que mi pasión por la ciencia comenzó aproximadamente a mis 16 años tras ver un documental de Isaac Newton, el fervor que vi en ese científico por desentrañar los misterios de la naturaleza me influirían en las decisiones que fui tomando en años posteriores; el estudiar una carrera de ciencias, el enfocar mi carrera profesional a la investigación,.. Esta tesis es el fruto de esa pasión, y la cual no hubiera sido posible sin el apoyo de un gran número de personas, a las que quisiera expresar mi más sincero agradecimiento;

En primer lugar, debo agradecer a mi director de tesis Don Pedro Lozano Rodríguez. Si ciertamente el hecho anterior fue el causante de despertar mi pasión por la ciencia, fuiste tú quien despertaste mi amor hacia la investigación. Me enseñaste a tener paciencia y a desenmarañar el puzle “paso a paso”, a ser extremadamente observadora, a disfrutar de cada paso del camino; al ponerte a mi lado en la poyata del laboratorio no sólo me enseñaste el saber hacer de la investigación para poder convertirme en *tus manos*, sino que también me transmitiste tu pasión por investigar. Son tantas las cosas que me gustaría agradecerte, tus consejos, tus frases célebres, tus enseñanzas, tu apoyo incondicional, que creo que estos agradecimientos se harían más extensos que el resto de la tesis.

A Don Gregorio Sánchez, por su apoyo en el camino de esta tesis.

A Michel Voultier y Mathieu Pucheu, por permitirme trabajar con ellos en sus laboratorios. Es gratificante aprender de los grandes, gracias por enseñarme *otra química*.

Al “Servicio de Instrumentación Científica”, gracias Diego y Ana (RMN), y Pepe (GC y HPLC-masas) por toda vuestra ayuda.

A mis compañeros y entrañables amigos del laboratorio; Bere siempre has sido más que una compañera y amiga, has sido como una hermana, gracias por estar siempre ahí, se que ni el tiempo ni la distancia borrará la amistad que en el 113 fue forjada. David, “Señor B o Banos”, cuantas cosas vividas, cuantos viales lavados, pese a

nuestros continuos choques fruto quizás de lo parecido de nuestro carácter, se ha creado una amistad que pese a nuestra dejadez seguro que durará como los “líquidos iónicos tipo esponja”. Sara, que decir de ti, creo de ti aprendí que el amor y la paciencia por la ciencia no tienen ni horas ni días, daba igual que se hicieran la 11, 12, la 1, las 2, las 3,... lunes o domingo, todo era poco cuando realmente había pasión por conocer y aprender. A Jose María y Vicente, que decir de vosotros, compañeros siempre dispuestos a ayudar y amigos. Creo que este apartado se queda pequeño para tanta gente a la que me gustaría mencionar y que han formado parte de mi vida todos estos años; Sergio Renilla, Sergio Fructuoso, Emilia, Narci, Laly, María José, ... A los Erasmus; Rosti, Jack, Kishore, Loredana,.. A los “críos” por enseñarme que también “enseñar” es divertido; Vanesa, Javi (“el “Abris”), Dani, Alicia, Almudena, Antonio... gracias por todos los momentos vividos.

Es aquí, donde me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que sin pedirme nada a cambio y con su apoyo incondicional, han hecho posible que me dedicara plenamente al desarrollo de esta tesis, gracias por ayudarme con Belén todos estos años y gracias mamá por ser nuestra madre, nunca lo olvidaré. A mi hermano mayor, por todas esas noches que perdía el autobús y a las 10 de la noche después de un duro día de trabajo tenía que recogerme y a mi “Salvica”, por hacer ambos, más que de tíos, de *hermanos mayores* de Belén, es por ello que os estaré siempre agradecida.

A mis patatas; Jose María, llegaste casi al final de esta etapa de mi vida pero me apoyaste de forma incondicional, admirándome en todo momento y era al mirarte cuando más orgullosa me sentía de hacer lo que hago y más motivación tenía de seguir. Gracias por ser como eres, tu ansia insaciable por el “saber por saber”, tu inconmensurable ternura y lo más importante, tu gran corazón, eres la persona con la que siempre soñé compartir mi vida, por todo esto y por muchas otras cosas más, te quiero. A mi “hijita” Danielica, por vivir el final de esta tesis y el principio de tu vida conmigo, llegaste para iluminar una nueva etapa de mi vida.

Por último, debo agradecer a una de las personas más importantes de mi vida y la cual ha caminado conmigo durante todo el transcurso de esta tesis, mi “hijita” Belén (mi patata pequeña). Gracias por compartirme todos estos años con “la química” como dices tú, que sepas que has sido tú quien me ha motivado todos estos años para superarme, quería que cuando crecieras te sintieras orgullosa de tu mami, a pesar del gran sacrificio que has tenido que hacer por estar a veces tan lejos de mí, pero que sepas que eso no es así, siempre has estado conmigo, en cada idea, en cada experimento,.. Siempre has sido tú. Además, gracias por ser como eres, por quererme, por decirme; -mamá, de mayor quiero ser como tú y hacer química,.. Esto hace que todo haya merecido la pena.

A mi hija Belencica

Índice

Summary.....	17
INTRODUCCIÓN.....	31
1. Hacia una química sostenible: disolventes neotéricos.....	33
2. Líquidos iónicos: Estructura y propiedades.....	41
3. Lipasas y líquidos iónicos.....	51
4. Líquidos Iónicos Soportados (SILPs y SILLPs)	61
5. Biotransformaciones asistidas por irradiación microondas	67
6. Síntesis de biodiesel	75
6.1. Composición química del biodiesel:.....	75
6.2. Reacción de transesterificación para la obtención de biodiesel:	78
6.3. Los líquidos iónicos en la síntesis de biodiesel.....	79
7. Líquidos iónicos en la síntesis enzimática de fragancias	91
8. Fluidos supercríticos y procesos biocatalíticos.	95
8.1. Propiedades de los fluidos supercríticos.....	95
8.2. Biotransformaciones en $scCO_2$, sistemas bifásicos ILs/ $scCO_2$ y SILLPs/ $scCO_2$	99
OBJETIVOS.....	109
Capítulo I. Síntesis enzimática de biodiesel en sistemas monofásicos basados en ILs hidrofóbicos	115
Capítulo II. Síntesis enzimática de biodiesel en sistemas monofásicos y en sistemas bifásicos ILs/ $scCO_2$	121
Capítulo III. Síntesis continua de biodiesel en $scCO_2$ empleando lipasa inmovilizada sobre soportes con ILs unidos covalentemente.....	129
Capítulo IV. Producción enzimática de ésteres de terpenos en SLILs, y su extracción por centrifugación	135

Capítulo V: Proceso de síntesis enzimática de biodiesel en SLILs, y su separación por de centrifugación	141
Capítulo VI: Efecto de la irradiación de microondas en la resolución cinética del rac-1-feniletanol catalizada por CALB-SILLPs.....	147
Capítulo VII: Efecto de la irradiación con microondas en la síntesis enzimática de acetato de anisilo mediante esterificación directa en SLILs, empleando sistemas de filtración para la separación del producto	153
Conclusions	159
Referencias	163
Anexo I	177
Anexo II.....	203
Anexo III	213
Anexo IV	223
Anexo V.....	235
Anexo VI.....	247
Anexo VII.....	261
Anexo VIII.....	267

Summary

The search for new environmentally benign non-aqueous solvents, which can easily be recovered/recycled, together with the use of robust, selective and efficient catalysts are two of the main goals for the development of green/sustainable chemical processes. Solvents are usually used as auxiliary materials in chemical synthesis, where they act as media for mass-transport, reaction and product separation. The vast majority of solvents used in academic and industrial laboratories are molecular liquids, belonging to the group of volatile organic compounds (VOCs). They are responsible for a large part of the environmental problems of processes in the chemical industry, and have a great impact on cost, safety and health (*e.g.* toxic, flammable and/or corrosive compounds). Furthermore, their recovery and reuse is often associated with energy-intensive distillation and sometimes cross contamination. The substitution and/or elimination of VOCs is not an easy task, because they are key elements for chemical processes (*e.g.* dilution of the reactants and/or the catalysts, to provide an environment where reactants meet, the assistance for the homogeneous distribution of the energy needed for the reaction activation, or the dissipation of the energy generated by an exothermal reaction, effects on performance of the catalysts, to facilitate product separation by changes in product solubility, etc).

Nowadays, ionic liquids (ILs) are the non-aqueous green solvents, also named neoteric solvents that receive most attention worldwide. They are a new class of liquid solvents that have led to a new green chemical revolution, because of their unique array of physical-chemical properties headed by their negligible vapour pressure, which makes them suitable for numerous industrial applications. However, the goal of green chemistry is much more than simply replacing hazardous solvents with environmentally benign ones. The selectivity of catalyzed

processes is just as important, because of the importance to avoid undesired reactions and/or by-products, and facilitate products recovery. The formation of waste is also linked to the traditional use of stoichiometric amounts of reagents. Switching from stoichiometric methodologies to catalytic processes is perceived as one major way to improve the efficiency of the synthetic toolbox. Thus, the greenness of chemical transformations is closely related to the use of both the catalytic and the engineering approaches. Catalysis can improve the efficiency of a reaction by lowering the energy input required, by avoiding the use of stoichiometric amount of reagents, and by greater product selectivity. In this regard, Nature has always been a source of inspiration for chemists. To transfer the exquisite efficiency shown by enzymes in Nature to chemical processes may constitute the most powerful toolbox for developing a clean and sustainable chemical industry. Enzymes, which are the catalysts of living systems with active sites designed to fit specific substrates, may well become the most suitable catalysts in chemistry since they are able to accelerate stereo-, chemo- and regioselectively different chemical transformations, under very mild experimental conditions (low pressure and temperature, aqueous medium, etc.). They offer significant advantages with respect to catalyzed reactions by other means. The large surface contact established between a typical enzyme and its substrate together with the well-defined active centre, offers high potential for regiocontrol, and for stereocontrol: only one area (regiocontrol) and face (stereocontrol) of the substrate is well positioned with respect to the catalytic centre, while the remainder of the molecule is excluded. As a result, a substrate molecule can often include multiple functions of similar reactivity, but only one of which will be the favoured target for enzyme-catalyzed transformation (chemoselectivity).

Great variety enzyme-catalyzed reactions have been successfully demonstrated at laboratory scale, offering clear advantages for the synthesis of enantiopure fine chemicals against any other kind of catalysts. Even the chemical industry is exploring the great potential of biocatalysis to manufacture both bulk and fine chemicals. Furthermore, by using enzymes in non-aqueous environments, rather than in their natural aqueous reaction media, their technological applications can be greatly enhanced because of the catalytic promiscuity that results in the expansion of the repertoire of biotransformations. Among the most used enzymes, lipases have gained a clear predominance, exhibiting a wide specificity to recognize very different substrates, and catalyzing different reactions used in pharmaceuticals and drugs production, biodiesel, or foods.

Over the past two decades, strategies based on engineering of reaction medium, substrate and biocatalysts have been developed to demonstrate the suitability of enzymes as catalysts for chemical processes in non-aqueous environments, being recently applied to both conventional organic solvents and new green non-aqueous solvents. Several key elements should be

considered for developing biocatalytic processes using ionic liquids, including downstream steps and/or continuous operation, to push towards fully green approaches for chemical processes.

Greenness in chemical processes begins with catalysts. Enzymes, as catalysts of living systems, clearly constitute an arsenal of green catalysts for chemical processes. Enzymes are proteins with a high level of architectonic organization. The structure-function relationships in enzymes are key for catalytic activity, because enzyme functions strongly depends on its native conformation, which is maintained by a high number of weak internal interactions (*e.g.* hydrogen bonds, van der Waals interactions, etc), as well as supramolecular interactions with other surrounding molecules, mainly water as natural solvent of cells. Enzymes are designed to function in aqueous solutions within a narrow range of environmental conditions (*e.g.* pH, temperature, pressure, etc), which in fact establish the limits of life on our planet. Out of these conditions, enzymes usually are deactivated as a consequence of a loss of native conformation through unfolding. Developments in genomics, directed evolution and our exploitation of the natural biodiversity have led to improvements in the activity, stability and specificity of enzymes, accompanied by a huge increase in the number and variety of their industrial applications. From the functional point of view, the potential of enzymes as practical catalysts cannot be doubted, since their activity and selectivity (stereo-, chemo- and regio- selectivity) for catalyzed reactions are far-ranging. In this context, the market for enantiopure fine chemicals is continuously growing, making enzymes the most suitable catalysts for green synthetic processes. However, the use of biocatalysts in aqueous media is limited because most chemicals of interest are insoluble in water. Furthermore, water is not chemically inert and usually gives rise to undesired side reactions. There are numerous potential advantages at employing enzymes in non-aqueous environments or reaction media with low water content (*i.e.* in the presence of organic solvents and/or additives). These advantages include the dramatically higher solubility that can be reached in the case of hydrophobic substrates, the insolubility of enzymes which makes them easy to reuse, and the elimination of microbial contamination in reactors. Probably the most interesting advantage of using non-aqueous environments for enzyme catalysis arises when hydrolytic enzymes (*e.g.* lipases, esterases, proteases, glycosidases, etc) are applied, because of the ability of these enzymes to catalyze synthetic reactions. For example, lipases have been used in synthetic organic chemistry to catalyze various kinds of reactions, such as hydrolysis, esterification, transesterification by acidolysis, transesterification by alcoholysis, inter-esterification and aminolysis. Because of the reversibility of equilibrium, these hydrolases accelerate both the forward and the reverse reaction to the same degree, changing the rate but not the equilibrium. The position of the equilibrium alone determines whether a particular bond (*e.g.* ester, amide, etc) is preferentially generated or destroyed in a given hydrolase-catalyzed reaction. The

synthetic mode of action needs the chemical equilibrium to be shifted towards the condensation product as a result of a drastic decrease in the water content of the reaction medium. The success of the approach is directly correlated with the reaction medium engineering used to eliminate the synthetic product or water molecules synthesized as by-products (*e.g.* by adding water adsorbents).

However, switching from water to non-aqueous solvents, as reaction medium for enzyme-catalyzed reactions, is not always a simple answer, because the native structure of the enzyme can easily be destroyed, resulting in deactivation. Nowadays, ILs are the non-aqueous green solvents that receive most attention worldwide for using as biocatalytic reaction media, because of the improvements obtained in enzyme catalytic performances and product recovery approaches. The use of these environmentally benign non-aqueous solvents combined with efficient biocatalysts for chemical processes is strongly encouraged for developing Green Chemistry at an industrial scale.

Ionic liquids (ILs), also named room temperature ionic liquids (RTILs), molten salts, liquid organic salts or fused salts, are a class of substances that are entirely composed of ions and which are liquid at temperatures lower than 100°C. Those liquid salts with low melting points are most desirable as solvents for reactions and processes. In contrast to conventional organic solvents, ILs have many favourable properties including extremely low vapour pressure, a wide liquid range, low flammability, high ionic conductivity, high thermal conductivity, good dissolution power towards many substrates, high thermal and chemical stability, and wide electrochemical potential windows. Typical IL cations applied in biocatalysis are N,N'-dialkylimidazolium, or tetraalkylammonium, or alkylpyrrolidinium, etc., paired with a variety of anions that have a strongly delocalized negative charge, *e.g.* [BF₄⁻], [PF₆⁻], [Tf₂N⁻], etc., resulting in colourless, low viscosity and easily handled materials.

Another interesting feature of ILs is the phase behaviour with molecular solvents, such as organic solvents and water, because ILs can be fully miscible, partially miscible or non-miscible with them as a function of ions involved. Since ILs are usually composed of poorly coordinating ions which makes them highly polar but non-coordinating solvents, they are non-miscible with most hydrophobic organic solvents (*e.g.* hexane, etc), thus providing a non-aqueous and polar media to develop two-phase systems. Also, they may be fully or partially miscible with polar organic solvents, such as ethanol, acetonitrile, etc., depending on the alkyl chains length of the cation. In the same way, most ILs are non-miscible with water and therefore can be used to develop biphasic systems with polar characteristics. This feature has usually been applied for developing liquid-liquid biphasic systems (*e.g.* organic solvent/IL or water/IL) to recover products after a catalytic transformation in ILs.

The phase behaviour of water/IL systems merits a special mention. By spectroscopic studies of ILs using several solvatochromic and fluorescent probes (*e.g.* Nile Red, Reichardt's betaine dye), it was reported how most usual ILs (*e.g.* [Bmim][NTf₂], [Bmim][PF₆], [Bmim][BF₄], etc) shows are in the same polarity region as polar water-miscible solvents like methanol or acetonitrile. Although ILs could be considered as polar solvents they cannot be considered to be similar to those polar molecular solvents with regards to their miscibility with water (*e.g.* ILs based on [NTf₂] or [PF₆] anions are non-miscible with water). The water-immiscible ILs shows a high hygroscopic character (*e.g.* [Bmim][NTf₂] is able to absorb up to 1.4% w/w water content) [1], and this feature could be regarded as an additional advantage for biocatalysis. Water is the key component of biocatalytic reaction media, because of the importance of enzyme-water interactions for the maintenance of the active conformation of the enzyme. The utility of water/IL biphasic systems to recover products is limited by the IL solubility into the aqueous phase. With respect to organic solvents, developing biphasic systems with ILs for products recovery is the most used approach, despite that it is a clear breakdown point with regards the overall greenness of the process. To overcome this problem, alternative strategies for a clean product recovery, based on the use of supercritical fluids, pervaporation membrane technology, and more recently sponge-like ILs, have successfully been applied.

Although research on enzyme-catalyzed reactions in ILs only began in 2000, the use of such neoteric solvents in biotransformations was increased exponentially to more than 2,000 published papers until today. Researchers have first focused their interest on the advantages of ILs as reaction media for enzymatic catalysis, then on understanding the exceptional behaviour of enzymes in some kinds of ILs, and finally on the development of integrated process for biotransformation and product separation. A large number of enzymes (*e.g.* lipases, proteases, peroxidases, dehydrogenases, glycosidases, etc.) and reactions (*e.g.* esterification, kinetic resolution, reductions, oxidations, hydrolysis, etc.) have successfully been tested in ILs, because of their ability to dissolve both polar and non-polar compounds. It is well documented from a large number of papers that an enzyme-catalyzed reaction in ILs provides better results to those obtained in conventional organic solvents: enhanced reaction rates and conversions, improved enantioselectivity and regioselectivity, etc. However, the relationships between the chemical structures of ILs and the activity, enantioselectivity and/or stability displayed by enzymes are still not clearly understood.

Enzymes in water-immiscible ILs have produced remarkable results at low water contents, all the assayed water immiscible ILs (*e.g.* [Bmim][NTf₂], [Bmim][PF₆], [Btma][NTf₂], etc.) have been shown to act as suitable reaction media for biotransformations, appearing as viable alternatives to molecular organic solvents for organic synthesis. Lipases are by far the most used biocatalysts in water-immiscible ILs. They are used for the synthesis of aliphatic and aromatic esters, chiral esters by (dynamic) kinetic resolution of *sec*-alcohols, carbohydrate esters, polymers, biodiesel

etc. The usual approach applied for biotransformations consists in the direct addition of biocatalysts in the IL medium containing substrates. Reaction products were extracted by liquid-liquid extraction with organic solvents (e.g. diethyl ether) in a biphasic system. As the enzyme remained anchored to the IL phase, this approach permits the reuse of the enzyme-IL systems by addition of fresh substrates, and without any loss in activity. However, this approach must be considered as a clear breakdown with regards to the greenness of the process, making it necessary to find out for alternative strategies for product recovery based on sustainable approaches to overcome this limitation.

In agreement with the Twelve Principles of Green Chemistry, the development of sustainable industrial processes combining the excellences of biocatalytic transformations with the unique properties of ILs necessitates appropriate reactor designs, where the full recovery and reuse of the enzyme/IL system should be demonstrated for long operation times. Three different technological approaches have been developed for carrying out products recovery by green/sustainable techniques and avoiding the use of volatile organic solvents, as follows: membrane reactors, IL/scCO₂ reactors, and more recently, sponge-like ILs systems.

A supercritical fluid (SCF) is defined as a state of matter at a pressure and temperature higher than its critical point, but below the pressure required to condense it into a solid. SCFs are characterized by gas like viscosities and solvating properties of a wide range of various organic solvents and derivatives. Physical properties of these solvents are unique because they may be tuned simply by adjusting the pressure and temperature, showing exceptional abilities for extraction, reaction, fractionation and analysis processes. The key feature of SCFs is the sensitivity of the fluid density to both pressure and temperature, especially in the critical point vicinity. Between all SCFs, the environmentally benign supercritical carbon dioxide (scCO₂) is the most popular. Its great potential to develop cleaner alternative processes has been demonstrated. Products can be easily freed from solvent traces, which is highly attractive as alternative reaction medium for food and pharmaceutical products. The scCO₂ is chemically inert, non-toxic, non-flammable, cheap, readily available, and shows relatively low critical parameters (e.g. $P_c = 73.8$ bar; $T_c = 31.0^\circ\text{C}$), remaining by far the most popular supercritical solvent for (bio)catalysis.

Biocatalytic processes in scCO₂ are usually performed in high pressure vessels by both discontinuous and continuous flow operations. Immobilized enzymes onto solid supports can be used in packed bed reactor leading to a simple continuous enzyme reuse analogous to consecutive cycles without depressurisation requirements. Reaction parameters, such as temperature, pressure, reaction dilution, flow rates, etc., are experimental variables used to optimise a synthetic transformation in a continuous biocatalytic processes in scCO₂. However, it is necessary to highlight how the classical advantages of scCO₂ to extract, dissolve and transport

chemicals are tarnished in enzymatic processes because of its denaturative effect on enzymes. The chemically inert character of CO₂ could be in doubt regarding its interaction with proteins. The CO₂ forms carbamates with ε-amino groups of lysine residues placed on the enzyme surface, and decreases the pH of the aqueous layer around the enzyme. Both phenomena have been directly related with the usual enzyme deactivation observed in scCO₂. In addition to these specific effects of CO₂ on proteins, the high pressure may also have a negative impact on enzyme conformation. The rapid release of CO₂ dissolved in the bound water of the enzyme during depressurization has been claimed to produce structural changes in the enzyme and to cause its inactivation.

In this context, the use of IL/scCO₂ biphasic systems, as reaction media for enzyme catalysis, has opened up new opportunities for integral green processes development of in non-aqueous environments, because it permits to combine the enzyme-protective effect of ILs and the classical advantages of scCO₂ to extract, dissolve and transports chemicals. Although scCO₂ is highly soluble in the IL phase and is able to extract previously dissolved hydrophobic compounds (*e.g.* naphthalene), the same IL is not measurably soluble in the scCO₂ phase. This discovery was crucial for further developments in multiphase green (bio)catalytic processes involving both chemical transformation and extraction steps.

Multiphase biocatalytic systems based on ILs and scCO₂ were originally described by our group in 2002, and were the first operational approach for the development of fully green chemical processes in non-aqueous environments. Using this approach, the scCO₂ flow can serve both to transport the substrate to the IL phase containing the biocatalyst, and to extract the product(s) from the IL phase. Subsequently, products are obtained free from IL and from other organic solvent residues by SCF decompression, whereas CO₂ can be recycled by re-compression. Additionally, if the reaction product does not require any further purification, the approach enhances the economic benefit of the process, because the system runs as a black-box able to transform pure substrates into pure products without waste generation. By using this approach, continuous green biphasic biocatalytic systems in non-aqueous environments have been designed by dissolving free enzymes into the IL then adsorbed onto a solid support, or by coating supported enzymes molecules with ILs. Biotransformations then occur into an IL phase (catalytic phase), while substrates and products remain largely in the SCF phase (extractive phase).

The development of covalently Supported Ionic Liquid-Like Phases (SILLPs) either by functionalization of the styrene-divinylbenzene (PS-DVB) surfaces with IL-like (imidazolium) moieties or by polymerisation of the corresponding functional monomers has open a new way to greatly reduce the amount of ILs used and to facilitate its full reuse/recovery in continuous green chemical processes. In this approach, ILs properties are transferred onto the solid phase leading to supported ionic liquid-like phase, either in particles or monoliths. A large diversity of SILLPs,

varying cation, anion, as well as support nature and loading, have been characterized, including their thermal stability and polarity. The immobilization of lipases onto SILLPs, containing imidazolium units with loadings ranging from *ca.* 55 to 40% wt IL per gram of polymer, resulted in highly efficient and robust heterogeneous biocatalysts for citronellyl propionate synthesis, kinetic resolution of 1-phenylethanol, and the synthesis of biodiesel in continuous flow.

Integrated multicatalytic processes, whereby one initial substrate is catalytically transformed into one final product by two or more consecutive catalytic steps in the same reaction system, is of great interest for developing future chemical industry. Dynamic kinetic resolution (DKR) processes can be taken as an example to illustrate a multicatalytic approach in IL/scCO₂ biphasic systems. A DKR process is based on the combination of an enzymatic kinetic resolution (KR) reaction with an *in situ* chemical racemisation of the undesired enantiomer, which theoretically should permit to reach up to 100% of one enantiomeric pure product.

The continuous DKR processes of *rac*-1-phenylethanol in IL/scCO₂ biphasic systems were first reported by combining immobilized CALB with silica modified with benzenesulfonic acid groups as catalysts in a packed bed reactor under scCO₂ at 50°C and 100 bar. However, the use of weaker solid acids, such as zeolites, as chemical catalyst clearly improved the efficiency of the continuous DKR of *rac*-1-phenylethanol in combination with immobilized CALB under scCO₂ flow. The best results (98% yield, 96% ee) were obtained for a heterogeneous mixture between faujasite-type zeolite (CBV400) particles coated with [Btma][NTf₂] and Novozym 435 particles coated with the same IL. By pushing forwards the interest of IL/scCO₂ biphasic systems, CALB-SILLPs (*Supported Ionic Liquid-like Phases*) derivatives were combined with zeolites (*i.e.* CP811E-150) for carrying out the DKR of the phenylethanol by using a single reactor in a continuous way. In this reactor, both the immobilized enzyme and zeolite were mixed together to perform a continuous “one-pot” catalytic minireactors in scCO₂. The selectivity of the chemical catalysts was improved by coating with a small amount of an hydrophobic IL (*i.e.* [BMIM][PF₆]). The efficient combination of CALB-SILLP and zeolites-IL resulted in increased yields of the desired R-product up to 92% with e.e. >99.9% for the continuous DKR of *rac*-phenylethanol with vinyl propionate in scCO₂.

Between all the arrays of unique properties of ILs as neoteric solvents, a new term has been coined in this Doctoral Thesis, *i.e.* the term *Sponge-Like Ionic Liquids* (SLILs). This refers to hydrophobic ILs with long alkyl side-chains that behave as temperature switchable ionic liquid/solid phases. These ILs have been shown as suitable reaction media for carrying out integrated clean biocatalytic approaches of synthesis and pure product separation. It was reported

how ILs based on cations with long alkyl side-chains, such as N-octadecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ($[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$), 1-octadecyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, ($[\text{C}_{18}\text{mim}][\text{NTf}_2]$), etc., having melting points higher than room temperature are able to dissolve hydrophobic compounds (i.e. triolein, geraniol, citronellol, etc) in the liquid phase, providing excellent monophasic reaction media for the lipase-catalyzed transesterification and/or esterification reactions with industrial interest, such as the enzymatic synthesis of flavour esters, and the biocatalytic synthesis of biodiesel.

Flavour esters of short-chain carboxylic acid (e.g. geranyl propionate, isoamyl acetate etc.) are important fragrance compounds used in food, cosmetic and pharmaceutical industries. They can be labelled as “natural” when prepared by physical processes (e.g. extraction from natural sources) or by biotransformation of precursors isolated from nature. Enzyme-catalyzed direct esterification of “natural” substrates in solvent-free and anhydrous media could be considered as the most straightforward way to produce natural flavour esters. However, moderate yields (e.g. maximum of 60% isoamyl acetate) and the deactivation of enzyme by direct contact with acids are severe drawbacks for industrial application. In this context, the biocatalytic synthesis of sixteen different flavour alkyl esters by direct esterification of a alkyl carboxylic acid (acetic, propionic, butyric or valeric) with a flavour alcohol (citronellol, geraniol, nerol or isoamyl alcohol) was reported in different ILs (e.g. $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, etc) as switchable ionic liquid/solid phases, reaching product yields near to 100% after 4 h at 50 °C. The catalytic activity of the enzyme/IL system was shown to be practically unchanged after reuse.

Furthermore, it was observed how these resulting fully clear monophasic reaction media, containing both the flavour product and the IL, became monophasic solid systems after cooling to room temperature. These solid phases could be separated into two phases, an upper liquid containing the flavour ester, and another bottom solid containing the IL by following an iterative centrifugation protocol and lowering the temperature to 4°C. The upper phase was an IL-free flavour ester up to 0.757 g/mL concentration, as determined by ^{19}F NMR studies. This unique feature was explained as a function of a sponge-like behaviour of these temperature switchable ionic liquid/solid phases, where flavour esters were considered as being included rather than dissolved in the liquid/solid IL phases. The decrease in free volume of the ionic net produced by cooling allowed compaction of the IL solid phase by centrifugation, and the consequent release of geranyl acetate molecules outside the net. Thus, the IL net could be considered as a nano-sponge with holes of variable volume, which are suitable for housing or releasing hydrophobic molecules as a function of their liquid or solid phase, respectively. These excellent results for the enzymatic synthesis of flavours (i.e. anisyl acetate) in SLILs were improved by using microwaves irradiation as heating source, reducing reaction times by 4-folds with respect classical heating by convection.

The production of biodiesel by biocatalytic approach is another example of clean process in sponge-like IL. Biodiesel is usually synthesized by transesterification of triacylglycerides with methanol, yielding fatty acid methyl esters (FAMEs), and glycerol as by-product. Three consecutive transesterification reactions are involved in the full conversion of triacylglyceride molecules to biodiesel using chemical or enzymatic catalysts and an excess of alcohol to shift the equilibrium towards the product side. Although biodiesel is produced on an industrial scale using alkaline catalysts like KOH, the undesired side reactions (*e.g.* soap formation), glycerol recovery and the removal of inorganic salts remain important economical and environmental problems. The use of enzymes as catalysts for biodiesel synthesis is regarded as the perfect solution to these problems because of their high catalytic activity and selectivity. However, the non-miscibility of the triglycerides and the methanol substrates is the key feature that limits the catalytic efficiency of any transesterification process to synthesize biodiesel. The resulting vegetable oil / methanol biphasic systems strongly reduce reaction rates and, for the case of biocatalysis, this also causes full and fast enzyme deactivation as a result of the direct interaction between the catalytic protein and the methanol phase. In this context, it was reported how ILs based on cations with long alkyl side-chains (*e.g.* [C₁₈mim][NTf₂], [C₁₈tma][NTf₂], etc.) were able to dissolve both triolein and methanol at any concentration, providing one-phase reaction media that showed excellent suitability for the biocatalytic synthesis of biodiesel, *i.e.* up to 96% yield in 6 h at 60°C. Furthermore, the excellent suitability of the enzyme/IL system for biodiesel synthesis was also demonstrated by the total preservation of the catalytic activity for subsequent reuse. Furthermore, it was also observed how the reaction mixture becomes solid by cooling, then allowing to easily be fractionated by iterative centrifugations at controlled temperature into three phases: solid IL, glycerol and pure biodiesel. The sponge-like ILs were able to “soak up” biodiesel as liquid phase, and then could be “wrung out” by centrifugation in solid phase. These results represent a straightforward and sustainable approach for producing biodiesel, allowing the full recovery and reuse of the biocatalyst/IL system for successive cycles and suitable for scaling-up, opening up a new way in green chemistry for separating products from reaction media based on ILs.

The transfer of the smart catalytic efficiency displayed by enzymes in living systems to chemical processes may constitute the most powerful toolbox for developing a clean and sustainable chemical industry in the near future. The technological applications of biocatalysts are enhanced in non-aqueous environments, because of the resulting expansion of the repertoire of enzyme-catalyzed transformations, where the selective synthesis of chiral products of high commercial value is of the highest interest. Furthermore, these exquisite catalytic properties of enzymes are improved by using ILs as reaction media. Because of their exceptional ability to over-stabilize enzymes even under extremely harsh

conditions, ILs bring an important added value to the construction of a sustainable chemical industry. Besides, the unique properties of ILs, which can be tailored at molecular level by an appropriate selection of the cation, the length and nature of the alkyl chain attached and/or the anion, has opened a new window on processing options not available using conventional organic solvents.

The unique properties of hydrophobic ILs, based on cations with long alkyl side chains (*e.g.* [C₁₈tma][NTf₂]), as switchable ionic liquid/solid phases can be extended to include a new feature: their behaviour as sponge-like systems. This facts open up a new way in green chemistry for separating products from reaction media based on “soak up” and “wrung out” phenomena of these sponge-like ILs. These ILs can “soak up” hydrophobic compounds as liquid phase, which became a single solid phase by cooling. Then, the solid phase behaves like a sponge from which the compounds of interest are recovered as a pure liquid phase by centrifugation of the solid, like a wrung out phenomenon. This opens up a new avenue in green chemistry for separating products from reaction media based on ILs. In the same context, scCO₂ seems to be the perfect companion of ILs for the development of downstream steps in green synthetic processes, which allows cleaning and recovering of ILs for reuse because of the unique phase behaviour of ILs/scCO₂ systems. By combining enzymes with ILs/scCO₂ biphasic systems, the chemical industry has another clear strategy for developing integral green synthetic processes.

The novelty of the experimental approaches described in this Doctoral Thesis should help at opening the door for developing the green chemical industry of the near future.

INTRODUCCIÓN

1. Hacia una química sostenible: disolventes neotéricos

La Química es una Ciencia que ha aportado una incuestionable contribución a la mejora de la calidad de vida y al bienestar del hombre, generando avances importantísimos en campos tan diferentes como la alimentación, la higiene o los nuevos materiales, pero sobre todo en la salud. A lo largo del siglo XX, las aplicaciones de la Química en el campo de la Medicina han crecido de un modo exponencial, aportando soluciones a una infinidad de problemas de salud, lo cual ha permitido incrementar la esperanza de vida, situada en los 35 años a principios del siglo XX, hasta los 80 años que hay en la actualidad (Foro Química y Sociedad, 2012).

Sin embargo, y a pesar de su papel protagonista en el desarrollo de nuestra sociedad durante el último siglo, la Química tiene una percepción social negativa, que está fundamentada en los importantes deterioros medioambientales provocados por el crecimiento incontrolado del sector industrial químico en los países desarrollados, así como en el enorme impacto social de algunos errores cometidos por la industria petrolquímica y/o químico-farmacéutica. En este último aspecto, es necesario destacar el caso de la Talidomida, fármaco que fue comercializado entre los años 1958 y 1963 para el tratamiento de la *hiperémesis gravídica*, que usualmente ocurre durante los tres primeros meses de embarazo. Este medicamento, producido por Chemie Grünenthal (Alemania), que tuvo un gran éxito popular dadas sus excelentes propiedades sedantes, provocó miles de nacimientos de bebés afectados de focomelia, la anomalía congénita que se caracteriza por la carencia o excesiva cortedad de las extremidades.

En 1848, el químico francés Louis Pasteur descubrió la quiralidad de las moléculas (propiedad de un objeto de no ser superponible con su imagen especular) mientras estaba realizando un trabajo sobre una sal (tartrato amónico-potásico) presente en los barriles de vino tras la fermentación, y observó que dicho compuesto existía como una mezcla de dos clases diferentes de cristales (isómeros ópticos), los cuales eran imágenes especulares entre sí. Utilizando unas pinzas y una lupa, separó cuidadosamente la mezcla en dos montones, uno de cristales “derechos” (isómero R) y

el otro de cristales “izquierdos” (isómero S). Así pudo comprobar que la mezcla original era ópticamente inactiva (no desviaba el plano de la luz polarizada), mientras que cada grupo de cristales por separado era ópticamente activo, desviando el plano de la luz polarizada hacia la derecha o izquierda, respectivamente. Igual que el tartrato amónico-potásico estudiado por Pasteur, la Talidomida producida comercialmente también presentaba dos isómeros ópticos (S-Talidomida y R-Talidomida), siendo el isómero R el principio farmacológicamente activo para la aplicación deseada, mientras que el S era el responsable de los efectos teratogénicos. La razón por la que ambos isómeros de la Talidomida presentan diferente actividad biológica se encuentra en que la mayoría de las moléculas que participan en la actividad vital son quirales (*i.e.* aminoácidos, azúcares, etc.), determinando así que la vida sea quiral. La catástrofe causada por la Talidomina planteó la necesidad de un cambio radical en la industria farmacéutica hacia la síntesis de productos quirales y/o enantioméricamente puros (Dunn *et al.*, 2010; Cirimina y Pagliaro, 2013). En este sentido, la incorporación de los sistemas catalíticos de los seres vivos, las enzimas, en los procesos de síntesis química abre nuevas oportunidades para la obtención de productos farmacéuticos con los máximos niveles de enantioselectividad (Dominguez *et al.*, 2006a, 2006b; Fernandez-Lafuente, 2010; Solano *et al.*, 2012; Rachwalski *et al.*, 2013).

Por otro lado, según reza en el código de conducta de la American Chemical Society, “*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*”. Este lema está en concordancia con el incremento de la concienciación social en relación a la necesidad de preservar el medio ambiente, así como con el papel relevante de las legislaciones nacionales e internacionales y de las agencias de control de los productos farmacéuticos y alimentarios, *i.e.* Food and Drug Administration FDA-USA, European Medicines Agency, etc., están determinando que la sostenibilidad sea el criterio global que determine los desarrollos de cualquier ámbito en este Siglo XXI.

La **Química Verde** es una filosofía química dirigida hacia el diseño de productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen el uso o la generación de sustancias peligrosas, tanto para los seres humanos como para el medio ambiente. Esto supone un

paso mucho más allá del adecuado tratamiento de los residuos potencialmente contaminantes que pueden generarse en cualquier desarrollo industrial, se trata simplemente de evitar la formación de desechos contaminantes, propiciando la economía de tiempo y recursos. La química verde se aplica en todo el ciclo de vida de un producto químico, incluyendo su diseño, la fabricación, uso y disposición final, siguiendo un criterio de sostenibilidad. En 1987, el informe de la Comisión Brundtland definió el desarrollo sostenible como "el desarrollo que satisface las necesidades de las generaciones actuales sin comprometer la capacidad de generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades" (Brundtland, 1987). Fue en 1998, cuando la *Química Verde* o *Química Sostenible* comenzó a fraguarse tras la publicación de los Doce Principios de la Química Verde (ver **Tabla 1.1**), enunciados por Paul T. Anastas y John C. Warner (Anastas y Warner, 1998), consolidándose posteriormente como disciplina científica con la aparición de revistas como Green Chemistry (RSC), ChemSusChem (VCH-Wiley), etc., así como con la creación de la plataforma europea SusChem, y con el papel relevante alcanzado por las agencias de control medioambiental en los países desarrollados (*i.e.* Environmental Protection Agency-USA, European Environmental Agency-UE, etc.). Se trata de una herramienta imprescindible cuando se hace necesario introducir mejoras en las tecnológicas, ya que se ocupa de estudiar y modificar todos los aspectos de los procesos químicos que generen impactos negativos tanto sobre la salud humana como sobre el medio ambiente. Los avances científicos y técnicos basados en la Química Verde, y su posterior implementación industrial, son pilares indiscutibles para la construcción de una sociedad sostenible (Poliakoff y Licence, 2007).

El diseño de productos y el desarrollo de procesos medioambientalmente benignos y productivos, requiere una aproximación multidisciplinar. Teniendo en cuenta que muchos desarrollos y aplicaciones de la Química están asociados al empleo de disolventes orgánicos volátiles, la utilización de sistemas alternativos que no generen emisiones incontroladas de contaminantes, se presenta como un objetivo del máximo interés (Dunn, 2012).

La búsqueda de nuevos disolventes no acuosos benignos para el medio ambiente, que puedan ser fácilmente recuperados y reciclados, junto con la utilización de catalizadores reutilizables y selectivamente eficientes, se han convertido en los dos principales ejes de desarrollo para la realización de procesos verdes y

medioambientalmente sostenibles (Anastas *et al.*, 2001; 2008; Reichardt, 2007; Sheldon, 2008, 2012).

Tabla 1. 1. Los Principios Química Verde (Anastas y Warner, 1998).

1	Prevención	Es preferible evitar la producción de un residuo que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado
2	Economía atómica	Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que incorporen al máximo, el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos
3	Uso de metodologías que generan productos con toxicidad reducida	Siempre que sea posible, los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente
4	Generan productos eficaces pero no tóxicos	Los productos químicos deberán ser diseñados de manera que mantengan la eficacia a la vez que reduzcan su toxicidad
5	Reducir el uso de sustancias auxiliares	Se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc.) y en el caso de que se utilicen que sean lo más inocuas posible
6	Disminuir el consumo energético	Los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible. Se intentará llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente
7	Utilización de materias primas renovables	La materia prima ha de ser preferiblemente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable
8	Evitar la derivatización innecesaria	Se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de propiedades físico/químicas)
9	Potenciación de la catálisis	Se emplearán catalizadores (lo más selectivos posibles) reutilizables en lo posible, en lugar de reactivos estequiométricos
10	Generar productos biodegradables	Los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente sino que se transformen en productos de degradación inocuos
11	Desarrollar metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real	Las metodologías analíticas serán desarrolladas posteriormente para permitir una monitorización y control en tiempo real de proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas
12	Minimizar el potencial de accidentes químicos	Se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de procesos químicos, incluidas las emanaciones, explosiones o incendios

Los disolventes que generalmente son utilizados como materiales auxiliares en la síntesis química, actuando como medios de transporte, reacción y separación de los productos. En la actualidad, la gran mayoría de ellos, que son utilizados tanto en los

laboratorios como en la industria, son líquidos moleculares, pertenecientes al grupo de los compuestos orgánicos volátiles (COV). Estos compuestos son los responsables en gran parte de la enorme problemática de los problemas ambientales que se vienen arrastrando en relación a los procesos que se llevan a cabo en la industria química, teniendo un gran impacto en el precio, la seguridad y la salud, ya que puede tratarse de compuestos tóxicos, inflamables y/o corrosivos. Por otra parte, su recuperación y reutilización está asociada a menudo con la destilación de alto consumo energético y con la consiguiente contaminación producida por la misma. La sustitución y/o eliminación de los COVs no es una tarea fácil, debido a que son elementos clave para los procesos químicos que se llevan a cabo en la actualidad (por ejemplo, diluyen los reactivos y/o catalizadores, permitir una distribución homogénea de los mismos en el medio de reacción, favorecen la disminución de la energía necesaria para la activación de la reacción, así como, son los responsables del aumento de la actividad catalítica, además de facilitar la separación del producto por simples cambios en su solubilidad, etc.) (Constable *et al.*, 2002).

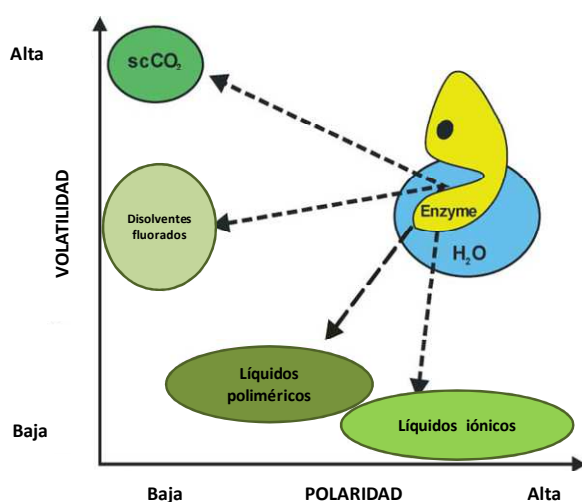


Figura 1.1. Representación esquemática de la relación entre la volatilidad y polaridad de disolventes y su adecuación para la biocatálisis (Lozano, 2010).

Debido a todo esto, el desarrollo de disolventes más benignos con el medio ambiente o incluso reacciones libres de disolvente, despiertan gran interés en el camino de conseguir una “Química Verde”. La creciente conciencia de la necesidad de crear una industria química fina y farmacéutica más respetuosas con el medio ambiente ha centrado la atención en el uso de medios de reacción alternativos, donde la alternativa

no significa necesariamente, disolventes nuevos o descubiertos recientemente, sino que también de nuevos procesos y nuevas estrategias sintéticas (*e.g.* síntesis de ácido adípico a partir de ciclohexeno en medios acuosos con surfactantes; Penate *et al.*, 2012). Entre estos disolventes alternativos, también llamados disolventes neotéricos, se encuentran los fluidos supercríticos, los disolventes perfluorados y los líquidos iónicos, que presentan como principal característica común la posibilidad de ser recuperarlos y reutilizarlos en su totalidad (Reichardt, 2007; Lozano, 2010).

Un fluido supercrítico se define como un estado de la materia a una presión y temperatura superior a su punto crítico, pero por debajo de la presión requerida para condensar en un sólido. La posibilidad de manipular las propiedades físicas de estos disolventes, simplemente cambiando la presión o la temperatura es una cualidad única en los sistemas supercríticos, que les permite mostrar habilidades excepcionales en procesos de extracción, reacción, fraccionamiento y análisis químico (Jessop y Leitner, 1999). Los fluidos supercríticos presentan difusividades similares a los gases, así como bajas viscosidades, hecho que facilita los fenómenos de transporte de masa, y mejora considerablemente la eficacia de los procesos catalíticos. Además, dado que los fluidos supercríticos son disolventes de baja polaridad, su utilización ha estado enfocada al procesamiento, extracción y transformación de compuestos hidrófobos. Donde tras liberar la presión del estado supercrítico, los compuestos transportados/disueltos se separan fácilmente por simple precipitación, obteniéndose libres de toda traza de fluido supercrítico, mientras que dicho solvente neotérico puede ser re-presurizado para su reutilización (Beckman, 2004; Li y Trost, 2008). El dióxido de carbono es el compuesto más popular utilizado como fluido supercrítico, no sólo por ser químicamente inerte, no tóxico, no inflamable, barato y fácilmente disponible, sino también por presentar parámetros críticos relativamente bajos (*i.e.* $P_c = 73.8$ bar; $T_c = 31.0$ °C) que son fácilmente accesibles con la tecnología industrial disponible, y es considerado como un disolvente verde (Leitner, 2002). Otros fluidos supercríticos son menos atractivos debido a su inflamabilidad (*i.e.* etano, propano), alto costo, (*i.e.* CHF_3) o pobre poder solvente (*i.e.* SF_6), habiendo sido utilizados por esta razón en muy unos pocos estudios (Lozano *et al.*, 2010).

El término de disolventes fluorados hace referencia a disolventes orgánicos perfluoro-sustituídos (*i.e.* alcanos, éteres de dialquilo, trialquilaminas, etc.), que además de su carácter no polar e hidrofóbico, también son disolventes químicamente inertes,

fácilmente reciclables, no tóxicos, y con una densidad superior a los correspondientes no fluorados (Horvath y Rábai, 1994). Desde el punto de vista de la química sintética, el interés en dichos disolventes se encuentra en que presentan una miscibilidad dependiente de la temperatura con los disolventes orgánicos clásicos, lo que permite el desarrollo de sistemas bifásicos no acuosos. Así, en base a las diferencias de solubilidad entre los sustratos y productos, tales mezclas de disolventes bifásicos fluorados/orgánicos se pueden utilizar para convertir un medio de reacción heterogéneo en uno homogéneo con la mejora de las velocidades de transferencia de masa, y finalmente reconvertirlo en un medio heterogéneo para facilitar la separación del producto en la fase orgánica, mediante simples cambios de temperatura (Horvath, 1998). No obstante, el empleo de disolventes orgánicos volátiles como sistema de extracción de los productos es un importante punto débil para la adecuación integral de estos sistemas en el ámbito de la Química Verde. Es por ello que han sido propuestas estrategias sintéticas alternativas basadas en el uso de sistemas bifásicos que combinan disolventes perfluorados (*i.e.* Krytox) y fluidos supercríticos con resultados muy interesantes (Hobbs y Thomas, 2007).

Tanto los fluidos supercríticos, como los disolventes fluorados pertenecen al grupo de los disolventes moleculares (ver **Figura 1.1**). Por el contrario, los líquidos iónicos representan un grupo diferente de disolventes neotéricos, constituido por sustancias orgánicas de naturaleza exclusivamente iónica. El criterio comúnmente usado para definirlos es que son sales con puntos de fusión inferior a 100°C, aunque es un criterio que resulta arbitrario y de escaso interés, ya que carece de significado físico real en la actualidad. Sin embargo, ha llegado a ser ampliamente popular debido a que representa la condición de que es más fácil trabajar con ellos que con sales cuyos puntos de fusión son mucho más elevados, existiendo ILs con puntos de fusión por debajo de la temperatura ambiente. La baja presión de vapor que presentan estos disolventes neotéricos, haciendo que prácticamente no se evaporen nunca, es la cualidad más importante que poseen, y que ha generado un enorme interés en su estudio y aplicación desde principios de este siglo XXI (Wasserscheid y Welton, 2008).

En la actualidad los líquidos iónicos son sustancias sujetas a una enorme actividad de investigación y estando su introducción en aplicaciones industriales es marcha, gran parte de este interés se ha centrado en su designación como "disolventes de diseño", ya que sus propiedades físico-químicas pueden ser moduladas mediante la selección

adecuada del catión y el anión (algunas estimaciones realizadas indican hasta un trillón de posibilidades) para ser el disolvente óptimo para una aplicación dada. En este sentido, la aplicación de programas computacionales para el diseño de un líquido iónico con unas propiedades dadas está abriendo enormes posibilidades (Bhargava *et al.*, 2008). Este concepto de disolvente de diseño a abierto un intenso estudio de cómo el cambio de los iones en los líquidos iónicos puede afectar a sus propiedades físico-químicas, así como a otras cualidades más allá de sus propiedades solventes (Dominguez, 2008; Niedermeyer *et al.*, 2012). No obstante, los posibles efectos negativos que podrían generarse en el medio ambiente por la utilización a gran escala de dichos líquidos iónicos también es objeto de interés (Bubalo *et al.*, 2014).

Sin embargo, el objetivo de la “Química Verde” va más allá de una simple sustitución de disolventes peligrosos por otros ambientalmente benignos. El incremento de la selectividad de los procesos de síntesis química es otro de sus grandes objetivos, con objeto de evitar reacciones no deseadas y/o subproductos, así como la facilidad de recuperación de los productos. La formación de residuos también está estrechamente relacionada con el uso tradicional de cantidades estequiométricas de los reactivos (Sheldon, 2008; Anastas *et al.*, 2000; Sheldon, 2012). El cambio de metodologías estequiométricas por procesos catalíticos se percibe como una vía importante en la mejora de la eficiencia sintética. Por lo tanto, la sostenibilidad de las transformaciones químicas está estrechamente relacionado tanto con el uso de catalizadores estereoespecíficos, como de enfoques ingenieriles (Lozano *et al.*, 2011; Sheldon, 2012).

Teniendo en cuenta que muchos desarrollos y aplicaciones de la Química están asociados al empleo de disolventes orgánicos volátiles, la utilización de sistemas alternativos que no generen emisiones incontroladas de contaminantes, se presenta como una alternativa de máximo interés. Es por ello que la explotación de los líquidos iónicos como alternativa a los disolventes orgánicos está, hoy en día, en máxima vanguardia. La incorporación de biocatalizadores en estos disolventes neotéricos ha proporcionado nuevas oportunidades para el desarrollo de procesos verdes de síntesis química (Lozano, 2010; Lozano *et al.*, 2006, 2009, 2011; Perez *et al.*, 2010, Domínguez y Maugeri, 2011).

2. Líquidos iónicos: Estructura y propiedades

Los líquidos iónicos (ILs) son sales que funden a temperaturas inferiores a 100°C (Wasserscheid y Welton, 2008). A diferencia de los disolventes moleculares tradicionales, los líquidos iónicos se encuentran constituidos exclusivamente por pares de iones, a saber un catión de naturaleza orgánica y un anión orgánico o inorgánico. El catión y anión de los líquidos iónicos pueden ser diseñados de tal forma que las sales resultantes no se pueden empaquetar de forma compacta y como consecuencia, dichas sustancias no pueden cristalizar fácilmente y permanecen en estado líquido dentro de un amplio rango de temperaturas, incluso a temperatura ambiente (RTILs, room temperature ionic liquids) (Bonhote *et al.*, 1996; Dupont, 2004). En base a sus propiedades, los ILs han sido aplicados en procesos de separación industrial, catálisis química, fotoquímica, bioquímica, lubricantes y aditivos de lubricación, electrolitos de baterías, captura de gases ácidos, células de combustible, recuperación de combustible nuclear, neutralización de gases tóxicos, etc. (Dupont, 2002, 2011; Rogers y Seddon, 2003).

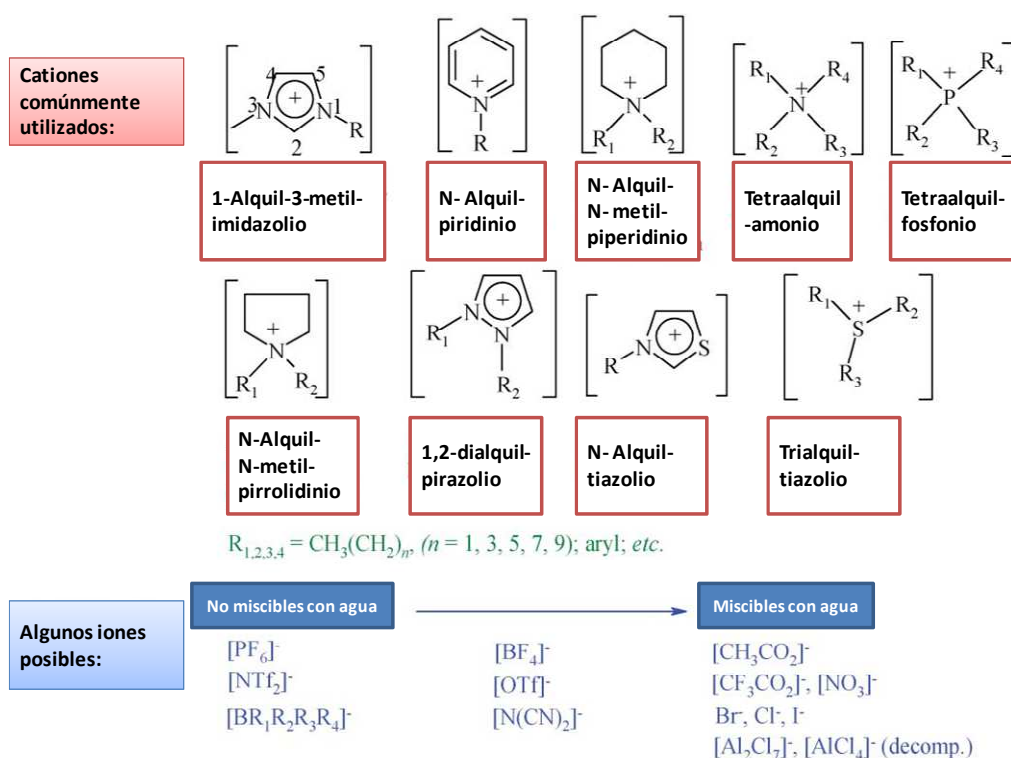


Figura 1.2. Algunas combinaciones comunes de ILs (Plechkova y Seddon, 2008).

Las propiedades físicas y químicas (polaridad, hidrofobicidad, miscibilidad con otros disolventes) de un líquido iónico pueden ser modulables dependiendo del catión y anión que lo conforman, existiendo numerosas combinaciones posibles (hasta 10^{18} combinaciones posibles). Entre los cationes más comunes se encuentran los de imidazolio, piridinio, amonio, pirrolidinio y fosfonio, mientras que los aniones más comunes son bis[(trifluorometil)sulfonil]imida (NTf_2^-), hexafluorofosfato, (PF_6^-), trifluorometilsulfonato (CF_3SO_3^-) y haluros, tal como se refleja en la **Figura 1.2** (Plechkova y Seddon, 2008).

Los ILs, como se ha comentado anteriormente, son un grupo de sales clásicas fundidas usadas en varios campos de la ciencia. En este contexto, conocer el universo nanoestructural es la mejor herramienta para conocer y comprender las propiedades genuinas de estos nuevos disolventes y sus posibles aplicaciones en los diversos campos de la ciencia (Marsh *et al.*, 2004; Dupont, 2011).

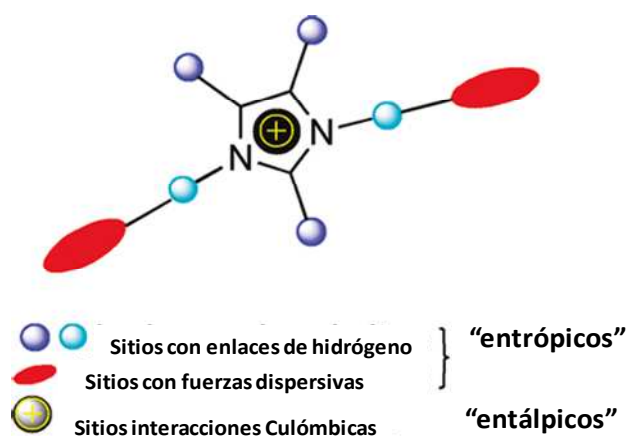


Figura 1.3. Interacciones representativas en un catión imidazolio típico contenido en un IL (Dupont, 2011).

En relación a la estructura de los ILs, aunque presentan el mismo tipo de interacciones iónicas que las sales fundidas, una de las principales diferencias entre ellos es la gran estructura asimétrica de al menos uno de los iones que conforman los ILs. Esta asimetría opuesta al elevado ordenamiento causado por la fuerte carga entre las interacciones iónicas que causa la cristalización en el caso de las sales fundidas, es la principal responsable de su estado líquido o bajo punto de fusión.

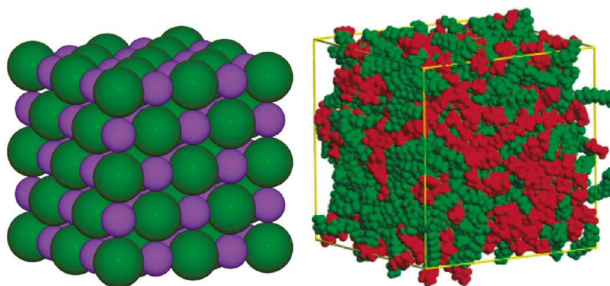


Figura 1.4. Representación de los agregados estructurales en 3-D de un cristal iónico dispuesto mediante el ordenamiento clásico basado en la carga (izquierda) y un IL basado en cationes 1-alkil-3-metilimidazolio (derecha), que presentan dominios polares (rojos) y no polares (verdes) (Dupont, 2011).

Otra característica estructural de los ILs es la presencia de una red en la que interaccionan cationes, donde los ILs poseen estructuras pre-organizadas principalmente, a través de enlaces de hidrógeno que inducen la direccionalidad estructural (“efectos entrópicos”), en contraste con los agregados de las sales clásicas que están formados únicamente por enlaces iónicos (*i.e.* estructuras ordenadas en base a la carga). En apoyo de este modelo, una revisión de los estudios de rayos-X de los últimos años en la estructura de las sales de 1,3-dialquilimidazolio han relevado una tendencia común: en el estado sólido, estas sales forman una red cooperativa extendida de los cationes y los aniones, conectados por interacciones iónicas. Las unidades monoméricas siempre consisten en un catión de imidazolio rodeado al menos de 3 aniones, y sucesivamente, cada anión está rodeado al menos de 3 cationes. Especialmente, los ILs con cationes imidazolio forman dos grandes disposiciones en 3D: (1) formando a través de las cadenas de los anillos imidazolio apilamientos tipo π , (**Figura 1.5-derecha**) con aniones acomodados en forma de cadenas; y (2) formando columnas consistentes en cationes alternados con aniones (**Figura 1.5-izquierda**) (Dupont, 2011).

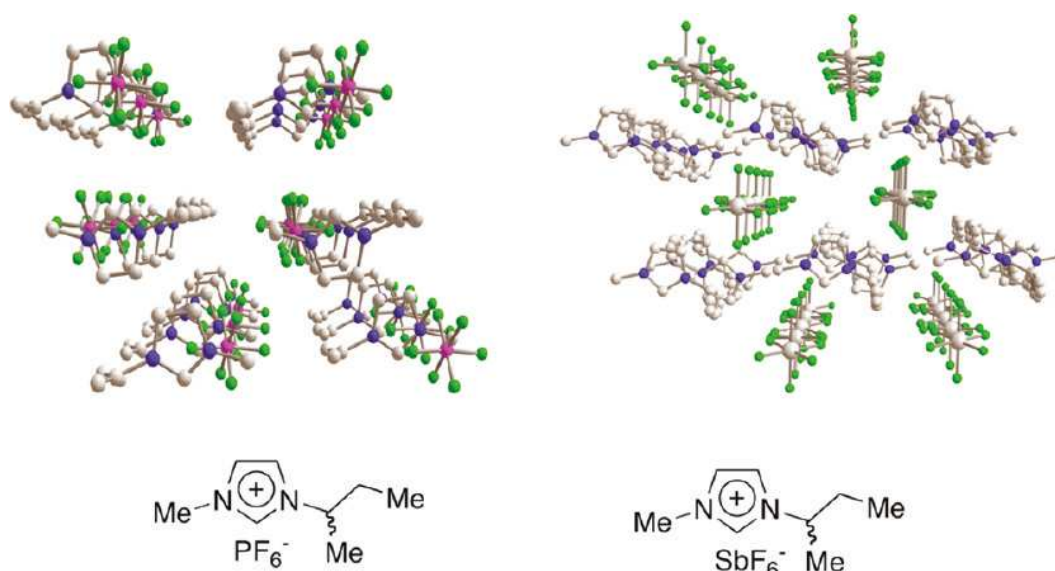


Figura 1.5. Ilustración de dos de las mayores disposiciones en 3D de ILs de base catiónica imidazolio: una red cooperativa de enlaces de hidrógeno generando canales “libres” en ambos casos (Dupont, 2011).

En ambos casos, los volúmenes “libres” están formados por estas estructuras que también están compuestas por “nano” regiones polares y no polares (i.e., regiones hidrofóbicas e hidrofílicas) con un alto grado de direccionalidad: similar a la observada en medios surfactantes altamente concentrados. La mejor forma de representar los ILs de base catiónica imidazolio es $[(DAI)_m(X)_{m-n}]^{n+}[(DAI)_{m-n}(X)_n]^{n-}$, donde DAI es el catión 1,3-dialquilimidazolio, X es el anión y $n \geq 3$. Las interacciones débiles como las de van der Waals, también comienzan a jugar un rol importante en la organización de estas sales con el aumento de la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión. En realidad, los ILs con catión imidazolio y longitud de cadena con 12 o más átomos de carbono muestran las propiedades de los cristales líquidos (Binnemans, 2005; Machado *et al.*, 2007). Además, la mayor parte de la organización estructural de los ILs se puede considerar como una aproximación entre líquidos clásicos y cristales líquidos.

Un ejemplo de ello se ha visto con las sales de tetrafluoroborato de 1-alkil-3-metilimidazolio, estables al aire y al agua con la fórmula general $[C_n\text{mim}][\text{BF}_4]$ ($n = 2-18$). Las sales caracterizadas previamente por espectroscopia de RMN e IR, microanálisis, microscopía óptica de polarización y calorimetría diferencial de barrido, y que contenían cortas cadenas alquílicas ($n = 2-10$), se comportaron como líquidos iónicos isotrópicos a temperatura ambiente, y exhibieron un amplio rango en estado líquido, mientras que los análogos de cadena más larga se comportaron como sólidos

crystalinos mesomórficos con relativos bajos puntos de fusión, los cuales mostraron una enantiotropía esméctica en la mesofase (ver **Figura 1.6**). El rango térmico de la mesofase aumentó con el incremento de la longitud de cadena y en el caso de la sal de cadena más larga, $[\text{C}_{18}\text{mim}][\text{BF}_4]$, el rango de la mesofase fue cercano a 150°C (Holbrey y Seddon, 1999).

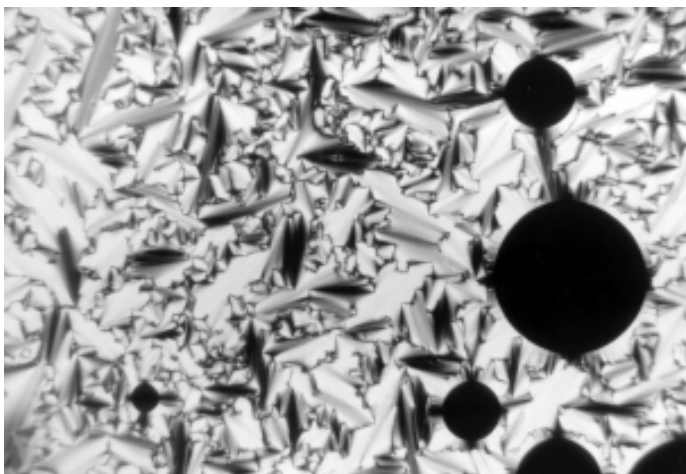


Figura 1.6. La textura en forma de abanico de la mesofase del $[\text{C}_{14}\text{mim}][\text{BF}_4]$ bajo polarizadores cruzados a 126°C (Holbrey y Seddon, 1999).

Teniendo en cuenta la amplia gama de líquidos iónicos y sus aplicaciones, es difícil generalizar sus propiedades y descubrir las tendencias generales (Majewski *et al.*, 2003), por esta razón diversos autores hacen más hincapié en sus diferencias que en sus similitudes. Además, algunas de las propiedades descritas hace unos años, están ahora sujetas a controversia. Estas propiedades incluyen, por ejemplo, el comportamiento electroquímico, la estabilidad térmica a largo plazo (la cual se sobreestimó en el pasado), la polaridad, la volatilidad (algunos ILs son destilables bajo ciertas condiciones) (Earle *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2012).

No obstante, es necesario hacer una mención especial a la incorporación de otras moléculas en la red del IL, fenómeno que ocurre cuando dichos ILs actúan como disolventes de sustancias moleculares, y que causa cambios en sus propiedades químicas y físicas, incluso la formación de regiones polares y no polares. En este sentido, Dupont (2004) describe a los ILs como materiales nanoestructurados, que permiten residir a moléculas neutras en las regiones menos polares, mientras que las especies iónicas o polares experimentan una difusión más rápida en las regiones polares,

tal como se ha observado en ILs basados en 1-butil-3-metilimidazolio mediante técnicas espectroscópicas (Yu *et al.*, 2012). Este trabajo analiza tanto los volúmenes ocupados y libres de iones para cuatro líquidos iónicos diferentes en fases amorfas y cristalinas, así como la fase correspondiente a las transiciones, y concluye que el volumen libre aumenta con la temperatura debido a que las moléculas requieren más espacio para moverse. Otros autores (Zang *et al.*, 2012) estudiaron el comportamiento tribológico del IL-tetrafluoroborato de 1-metil-3-hexadecilimidazolio $[C_{16}mim][BF_4]$ como un aditivo de aceite de parafina, observando cómo dicho IL (mp 49°C) cambia de estado sólido a una fase cristalina líquida a 80°C, donde las moléculas de IL se disponen en capas ubicando sus largos ejes moleculares de modo paralelos entre sí, lo que se traduce en unas excelentes propiedades tribológicas. En el mismo contexto, los estudios estructurales realizados con nitrato de propilamonio muestran que dicho IL se comporta como una nanoestructura bicontinua autoensamble, que se asemeja a una esponja anfifílica (Hayes *et al.*, 2011). En el caso de los ILs basados en el catión pirrolidinio, se ha podido observar que los iones están organizados como una red nanoestructurada. Cuando dichos cationes poseen sustituyentes alquílicos de corta longitud de cadena, estos se ordenan en estructuras monocapa catión-anión confinadas a modo de una película delgada, mientras que cuando el cation posee sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena, el sistema se organiza estructuralmente mediante la formación de bicapas (Smith *et al.*, 2013).

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

“Muy baja volatilidad”. La temperatura de ebullición de los ILs no puede determinarse experimentalmente a presión atmosférica, ya que éstos descomponen a temperaturas más bajas. Sin embargo, se ha descrito que los ILs pueden ser destilados entre 200-300°C pero a una presión significativamente reducida, y a una muy baja velocidad de destilación (ver **Tabla 1.2**) (Earle *et al.*, 2006; Neto *et al.*, 2012).

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

Tabla 1. 2. Efecto de la presión en la destilación de $[C_6mim][NTf_2]$ obtenidos en un aparato de sublimación (Earle *et al.*, 2006).

p (mbar)	t_{máx} (°C)	t donde el destilado fue observado (°C)	Velocidad de destilación (mg/h)	Pureza del destilado (%)
830	250 ± 5	250 ± 5	< 1	250
0.07	200 ± 5	170 ± 5	3	>99
≤0.001	200 ± 5	155 ± 5	15	>99

Aunque recientemente, se ha planteado la idea de utilizar los líquidos iónicos como combustibles, hay que tener en cuenta que el punto de inflamación es una de las variables más importantes que se utilizan para caracterizar los riesgos de incendio y explosión de líquidos y debido a la presión de vapor extremadamente baja y la descomposición a temperaturas tan elevadas, la razón por la cual los líquidos iónicos pueden llegar a ser combustibles debe de ser diferente de la de los líquidos combustibles definidos tradicionalmente. Para ello se ha estudiado el punto de inflamación de los líquidos iónicos en relación con su descomposición, con el objetivo de poder estimar su presión de vapor y su punto de inflamación. Los resultados revelaron que la inflamabilidad de los líquidos iónicos se atribuyó principalmente a la descomposición de los mismos que generaron sustancias inflamables en lugar de su vaporización, como ha venido ocurriendo con los líquidos combustibles/inflamables tradicionales (Changgen *et al.*, 2012).

“Alta Polaridad”. Esta propiedad es una de las más genuinas de los líquidos iónicos (van Rantwijk y Sheldon, 2007; Jessop *et al.*, 2012). La polaridad de un disolvente suele determinarse mediante los desplazamientos de los máximos de emisión de fluorescencia de un colorante solvatocrómico (*i.e.* rojo Nilo). Las medidas solvatocrómicas indican que los líquidos iónicos poseen una polaridad similar a la observada en disolventes moleculares polares (*i.e.*, etanol, formamida, etc.) (Poole, 2004). Hasta ahora, el concepto de polaridad se ha aplicado a disolventes moleculares, para predecir sus propiedades físicas y químicas, así como su capacidad solvente. Sin embargo, con los líquidos iónicos es difícil de utilizar este concepto para predecir su influencia en la solubilidad o en la velocidad de reacción. En este sentido, ha sido descrito que las interacciones entre soluto-disolvente obedecen a un modelo de interacción dual. Así, los líquidos iónicos pueden comportarse como disolventes apolares con solutos apolares, o

pueden manifestar un comportamiento polar con solutos polares (van Rantwijk y Sheldon, 2007; Chiappe *et al.*, 2009), ya que, los líquidos iónicos pueden considerarse materiales nanoestructurados con regiones polares y apolares (Dupont, 2004).

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

“Punto de Fusión”. Los datos deben ser considerados con precaución, ya que el punto de fusión de muchos líquidos iónicos puede ser incierto ya que algunos pueden experimentar un superenfriamiento y la presencia de impurezas puede tener una gran influencia. En términos generales, los ILs tienen bajos puntos de fusión, normalmente por debajo de la temperatura ambiente, pudiendo en algunos casos ser de -100°C. El punto de fusión de este tipo de sustancias depende enormemente del tamaño de líquido iónico, de su carga y de la distribución de la misma. Así, al aumentar el tamaño del anión y del catión disminuye el punto de fusión. Del mismo modo, un incremento en la simetría de los iones, supone un aumento en el punto de fusión ya que permite un mayor empaquetamiento de los mismos. Además, las diferentes conformaciones en el catión pueden frustrar la cristalinidad, permitiendo la formación de cristales o/y polimorfos. El efecto de la simetría en el punto de fusión también se refleja en los altos puntos de fusión de las sales de 1, 3-dimetilimidazolio y 1,3-dietilimidazolio, en comparación con los cationes análogos de las sales más asimétricas 1-etil-3-metil-imidazolio o 1-butil-3-metilimidazolio (Poole, 2004; Wasserscheid y Welton, 2008).

En el caso de cationes imidazolio con sustituyentes alquilo, un incremento en la longitud de cadena supone una disminución en el punto de fusión por cuestiones de empaquetamiento, llegando a una situación de mínimo sobre los 6-8 átomos de carbono, donde la tendencia se invierte debido a la importancia de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de los sustituyentes. En relación a la dependencia del punto de fusión con la carga se puede decir, de forma general, que la existencia de puentes de hidrógeno y la deslocalización de la carga, conducen a un aumento del punto de fusión (Plechkova y Seddon, 2008).

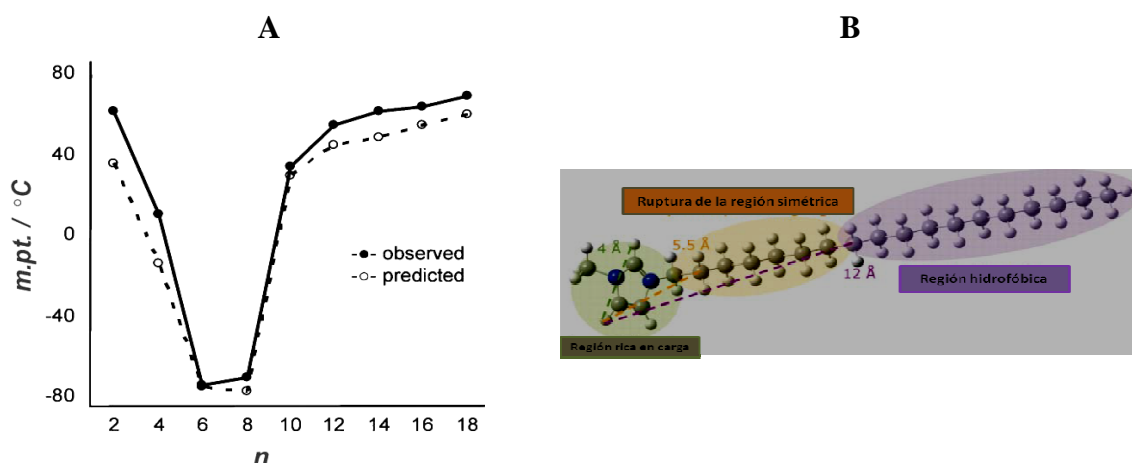


Figura 1.7. **A)** Puntos de fusión de líquidos iónicos, previstos y observados para una serie de sales de hexafluorofosfato de 1-alkil-3-metilimidazolio, $[C_n\text{mim}][\text{PF}_6]$. **B)** Estructura optimizada de un catión 1-metil-octadecil-imidazolio mostrando las regiones estructurales que son importantes para la determinación del punto de fusión. Desde la izquierda: a 4 Å la región rica en carga está localizada dentro del anillo imidazolio; a 5.5 Å la región de ruptura de la simetría, que disminuye el punto de fusión; desde 12 Å en adelante, la región hidrofóbica que aumenta el punto de fusión (Plechkova y Seddon, 2008).

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

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

“Viscosidad”. Desde el punto de vista de la ingeniería, la viscosidad de los ILs puede afectar a las propiedades de transporte (transferencia de masa, difusión...), lo que puede generar problemas en algunas aplicaciones catalíticas, por ejemplo en las operaciones de mezclado y bombeo. La viscosidad de la mayoría de ILs es relativamente alta en comparación con la de los disolventes convencionales. En la literatura se describe, para una variedad de ILs, que el rango de viscosidad varía desde 66 hasta 1110 cP a 20-25°C, para dar idea del orden de la magnitud, la viscosidad del agua a temperatura ambiente es de 0.890 cP (Wasserscheid, 2007). La viscosidad de los ILs presenta una fuerte dependencia con la temperatura (Baker *et al.*, 2001) y se ve afectada por la presencia de impurezas. Para el mismo catión, se ha observado como el cambio de anión afecta de manera muy significativa a la viscosidad de estas sales, disminuyendo su valor en la serie como consecuencia del tamaño y la deslocalización de la carga; $\text{Cl}^- > \text{PF}_6^- >$

$\text{BF}_4^- > \text{NTf}_2^-$ (Bonhôte *et al.*, 1997). En estos casos, los parámetros determinantes de la viscosidad son el tamaño del anión y la basicidad del mismo. Así, la disminución en el tamaño del anión disminuye las interacciones de van der Waals, incrementando la interacción electrostática a través de puentes de hidrógeno. Los valores de viscosidad en los ILs también se ven afectados por la naturaleza del catión orgánico. Esta tendencia no está correlacionada con el tamaño del anión, ya que le afectan otros fenómenos como el establecimiento de puentes de hidrógeno con el catión. Aunque la influencia del catión en la viscosidad es menor, se ha observado que un aumento en la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión imidazolio supone un aumento en los valores de viscosidad, pudiendo ser ésta disminuida por el uso de cadenas muy ramificadas.

“Toxicidad y biodegradabilidad”. Debido a las genuinas propiedades de los ILs, éstos se muestran como excelentes candidatos medioambientalmente “benignos” para sustituir a los disolventes moleculares convencionales. Pero su carácter verde ha sido ampliamente cuestionado debido principalmente al riesgo que sobre los ecosistemas podrían plantear y que debería ser evaluado (Bubalo *et al.*, 2014). Por esta razón muchos estudios y modelos se han planteado para evaluar este posible daño medioambiental. Alvarez-Guerra e Irabien (2011) han desarrollado un modelo con la intención de minimizar la consecuente consumición de tiempo y de recursos cada vez que haya que analizar dicho riesgo en ecosistemas acuáticos. Este modelo está basado en la estimación de la ecotoxicidad de los ILs, y consiste en ensayos estandarizados con la bacteria *Vibrio fischeri* y la aplicación de un modelo discriminante de mínimos cuadrados. También ha sido ampliamente objeto de estudio la toxicidad de ILs basados en cationes imidazolio, donde se ha visto como el incremento de la longitud de cadena de los sustituyentes alquílicos en el catión imidazolio aumentó el valor de toxicidad (EC_{50}), mientras que la naturaleza aniónica del IL tuvo un menor efecto. Tras diferentes ensayos se ha visto como estos nuevos disolventes son mucho más tóxicos que los disolventes convencionales, por esta razón es altamente importante tener en cuenta su velocidad de degradación y su persistencia en el medio ambiente, así como su completa eliminación de la fase acuosa (Romero *et al.*, 2008).

3. Lipasas y líquidos iónicos

Las **lipasas** pertenecen a la clase de enzimas hidrolasas (EC 3) y actúan sobre los enlaces éster (E.C.3.1) de ésteres carboxílicos (E.C.3.1.1). También se las conoce como glicerol éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.3.). Las hidrolasas son las enzimas más utilizadas en biocatálisis por su elevada actividad, regioselectividad y enantioselectividad, entre ellas destacan las lipasas. La mayoría de las lipasas que se utilizan son de origen microbiano, los tipos más comunes proceden de bacterias (*i.e.* *P. auruginosa*, *Alcaligenes*, *S. marcescens*, *etc.*) y de hongos (*C. antártica*, *C. rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*, *etc*) (Dominguez *et al.*, 2006b; Fernandez-Lafuente, 2010; Perez *et al.*, 2010). El interés de las lipasas radica en su carácter polivalente a la hora de catalizar reacciones, siendo capaces de catalizar muchas de ellas en sistemas con baja o nula concentración de agua.

En concreto, la lipasa B de *Candida antartica* es un catalizador eficiente para la hidrólisis en agua y esterificación en medios no acuosos. Su uso en numerosas aplicaciones industriales ha sido posible gracias a su enorme enantioselectividad, amplia tolerancia a diferentes sustratos, elevada estabilidad térmica y frente a otros tipos de disolventes no acuosos. Entre todas las lipasas, la lipasa B de *Candida antarctica* es una de las más utilizadas y se han descrito numerosas aplicaciones (Anderson *et al.*, 1998). La levadura de *Candida antarctica* fue originalmente aislada en la Antártida y se encontró que producía dos variantes de lipasa (CaLA y CaLB) (Kirk y Christensen, 2002).

Su estructura fue resuelta por Uppenberg *et al.* (1994), donde se vio que todas las lipasas tienen una estructura básica común, compuesta por una lámina β central formada por más de 8 hebras β paralelas y unidas entre sí por más de 6 hélices α (Lawson *et al.*, 1994). La CALB pertenece a la familia de las α/β hidrolasas-plegadas y se compone de 317 aminoácidos con un peso molecular de 33 kDa.

En ciertas proteínas como en las lipasas, el centro activo está constituido por dos clases de residuos relevantes; i) una triada catalítica de aminoácidos, responsables de llevar a cabo la reacción, ii) y de otros aminoácidos que presentan propiedades especiales para configurar la arquitectura del centro catalítico. La orientación de los átomos de nitrógeno de los aminoácidos en la proteína; dirigen la carga negativa del átomo de oxígeno del sustrato, así el sustrato es posicionado convenientemente al ser

encajado; a esta parte de la proteína se le conoce con el término de hueco oxígeno-aniónico.

Los aminoácidos que componen el centro activo son una triada catalítica, Ser105-His224-Asp187, común a todas las serinas hidrolasas. El residuo nucleofílico de la Ser se localiza en el carbono terminal de la hebra β_5 en un pentapéptido -Gly-X-Ser-X-Gly- donde X1 y X2 pueden ser reemplazados por una enorme variedad de aminoácidos, el hueco oxígeno-aniónico producido por el residuo X2 y la serina (ver **Figura 1.8**) representan el centro nucleofílico del sitio catalítico, altamente protegido, formando un característico motivo tipo β -giro- α , llamado “codo nucleofílico”.

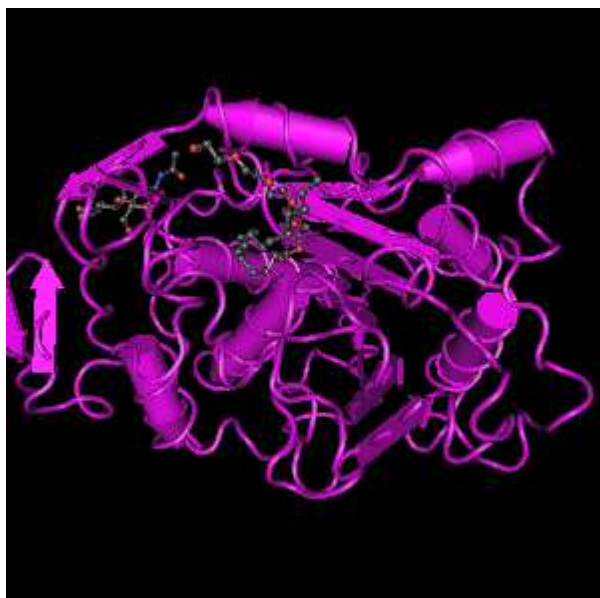


Figura 1.8. Unidad monomérica tridimensional de la estructura de lipasa B de *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1995).

El hecho de que la actividad de las lipasas sea mayor con sustratos insolubles en agua que forman emulsiones se conoce como “activación interfacial”. Esto consiste en que durante el contacto con la interfase lípido/agua, el bucle sigue un reordenamiento conformacional, descubriendo el centro activo. Las lipasas son las únicas enzimas que requieren esta activación conformacional para un pleno rendimiento catalítico. La presencia de este bucle no siempre está relacionada con la activación interfacial, ya que las lipasas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* y una lipasa pancreática no presentan este fenómeno a pesar de estar provistas de este bucle. Esto hace que, por

ejemplo, *Candida antarctica* esté mejor adaptada a los medios orgánicos que una lipasa *Thermomyces lanuginosa*, ya que la primera no presenta este bucle convencional, sino que posee una hélice de gran movilidad que actúa como tal, y la estructura parece estar en una conformación abierta con el centro activo accesible (Fernandez-Lafuente, 2010; Rodrigues y Fernandez-Lafuente, 2010a,b; Dominguez *et al.*, 2006b; Perez *et al.*, 2010).

El mecanismo descrito para las reacciones de transferencia de acilo catalizadas por CALB es el mecanismo de ping-pong bi bi que se ilustra en la **Figura 1.9**.

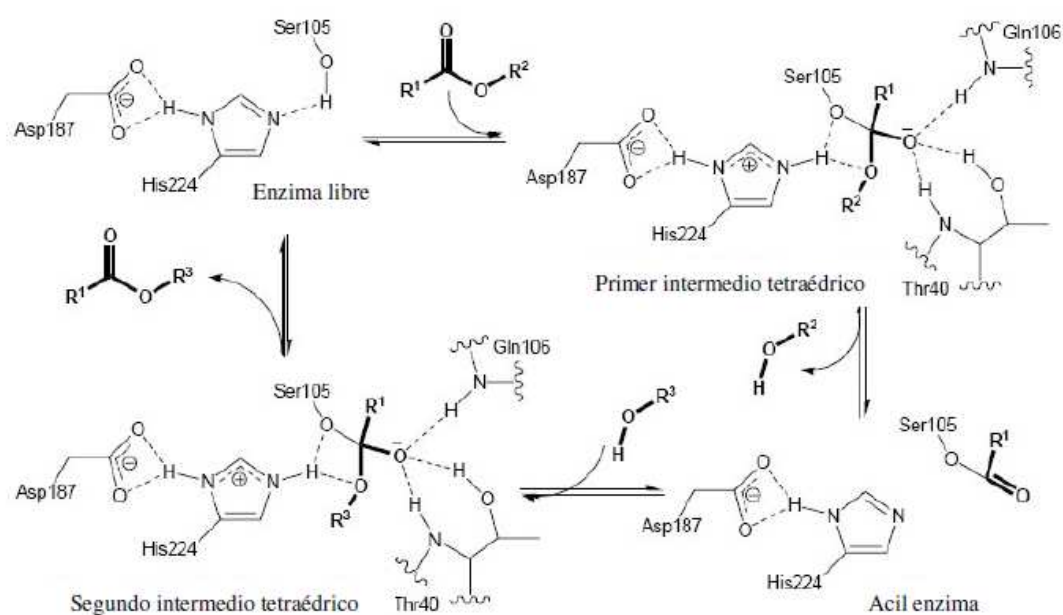


Figura 1.9. Reacciones catalizadas por CaLB siguiendo el mecanismo ping-pong bi bi.

El mecanismo consiste en que el primer sustrato entra en el centro activo de la enzima y se forma el primer intermedio tetraédrico. A continuación, el primer producto sale del centro activo de la enzima y se forma el complejo acil-enzima. Después entra el segundo sustrato de la reacción al centro activo y se forma el segundo intermedio tetraédrico. Finalmente, el segundo producto formado sale del centro activo y la enzima queda libre para comenzar otro ciclo catalítico.

Como se puede observar en la **Figura 1.10**, las lipasas pueden catalizar reacciones de transferencia de acilo entre varios compuestos. Así, dependiendo de los grupos R la reacción que puede darse va desde la hidrólisis de un éster, hasta diferentes reacciones de síntesis por esterificación, aminación, transesterificación, etc. La triada catalítica (asparagina 187, histidina 224 y serina 105) promueve la catálisis básica, mientras que

la catálisis ácida es promovida por el hueco oxígeno-aniónico (Hui, 2002). Hay que denotar que durante el mecanismo se presentan dos estados de transición, pero sólo el estado de transición del segundo paso es el realmente importante para la resolución cinética de mezclas racémicas de alcoholes, ya que éste no forma parte del primer paso del mecanismo (Dominguez *et al.*, 2006b; Rodrigues y Fernández-Lafuente, 2010a,b).

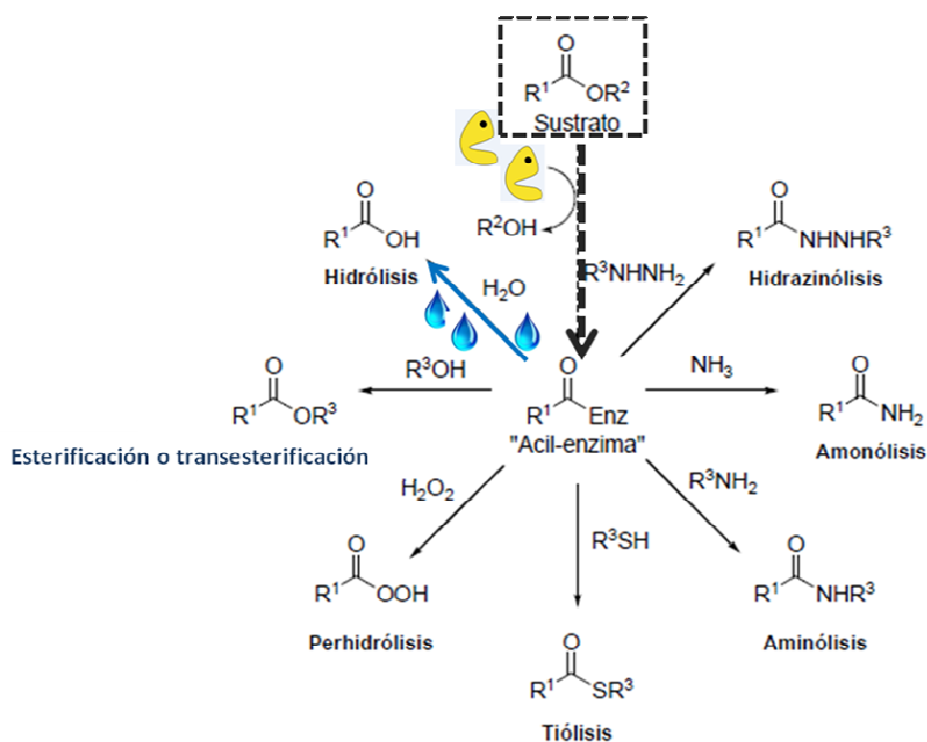


Figura 1.10. Biotransformaciones más comunes catalizadas por lipasas.

La catálisis enzimática en solventes orgánicos es notablemente más eficiente que la biocatálisis convencional en solución acuosa, esto se debe principalmente a que el agua es mejor nucleófilo que por ejemplo, alcoholes, tioles o aminas, por esta razón, en presencia de la misma se favorecerá la hidrólisis frente a cualquier reacción de síntesis (Ghanem *et al.*, 2004, Perez *et al.*, 2010). La alta estabilidad de las lipasas en medios no acuosos se debe principalmente a que en presencia de sustratos hidrofóbicos, la lipasa puede adsorberlos en su interface hidrofóbica promoviendo cambios drásticos en la estructura de la enzima, que desencadenan su forma “abierta”, permitiendo la posibilidad de acceso del sustrato al centro activo (Fernandez-Lafuente, 2010).

Debido a la necesidad de buscar medios no acuosos para llevar a cabo reacciones de síntesis catalizadas por lipasas, desde el 2000, los ILs han emergido como

excepcionales medios no acuosos para llevar a cabo este tipo de biotransformaciones debido a su excepcional capacidad para mantener las enzimas activas en un estado conformacional estable (Roosen *et al.*, 2008; van Rantwijk y Sheldon, 2007; Perez *et al.*, 2010; Dominguez y Muger, 2011). El carácter polar de los ILs contrasta con la no miscibilidad en agua de algunos de ellos, lo cual es una interesante propiedad para los catalizadores enzimáticos, ya que una concentración crítica de agua es esencial para mantenerlos activos en ambientes no acuosos (Hudson *et al.*, 2005; Hult y Berglund, 2003; Kazlauskas, 2005; Klibanov, 2001). La relación entre la estructura y la estabilidad de las enzimas frente a la desactivación en medios no acuosos como son los ILs fue objeto de amplio estudio por nuestro grupo, que haciendo uso de diversas técnicas espectroscópicas (*i.e.* fluorescencia, CD, o FTIT) analizaron los cambios conformacionales responsables de la estabilización o desactivación de las mismas en función del microambiente que la rodease (*i.e.*, medios convencionales y ILs hidrofóbicos) (De Diego *et al.*, 2004, 2005; Lozano *et al.*, 2005). Los estudios se realizaron sobre lipasa B de *Candida antártica* y α -quimiotripsina en dos ILs hidrofóbicos (*i.e.*, [Emim][NTf₂] y [Btma][NTf₂]) además de dos disolventes orgánicos (*i.e.*, 1-propanol y hexano) con objeto de tener un patrón representativo de comparación con disolventes no acuosos en las reacciones biocatalíticas objeto de estudio (*i.e.* la hidrólisis de ésteres de aminoácidos y la síntesis de ésteres alifáticos, respectivamente). La hidrólisis del éster etílico de N-acetil-L-tirosina fue catalizado por α -quimiotripsina y la síntesis de butirato de butilo lo fue por CALB, ambas fueron usadas como test de actividad, mientras que la fluorescencia y el espectro de dicromismo circular (CD) fueron utilizados para analizar los cambios conformacionales de las proteínas en los diferentes medios tras las reacciones biocatalíticas. El perfil de desactivación de la α -quimiotripsina se representó junto con los cambios de la $I_{\text{máx}}$ de fluorescencia y $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión (ver **Figura 1.11**), donde se obtuvieron que los valores de vida media para la enzima en agua, 1-propanol y [Emim][NTf₂] fueron, 110.2, 7.0 y 676.5 min, respectivamente. En agua, el perfil del parámetro $I_{\text{máx}}$ fue similar al de caída de actividad mientras que el $\lambda_{\text{máx}}$ mostró un desplazamiento hacia el rojo de 328 a 340 nm, mientras que en 1-butanol no hubieron cambios apreciables de estos parámetros, lo que pudo atribuirse probablemente a cambios en la estructura nativa que pasó a un estado inactivo con una conformación rígida replegada.

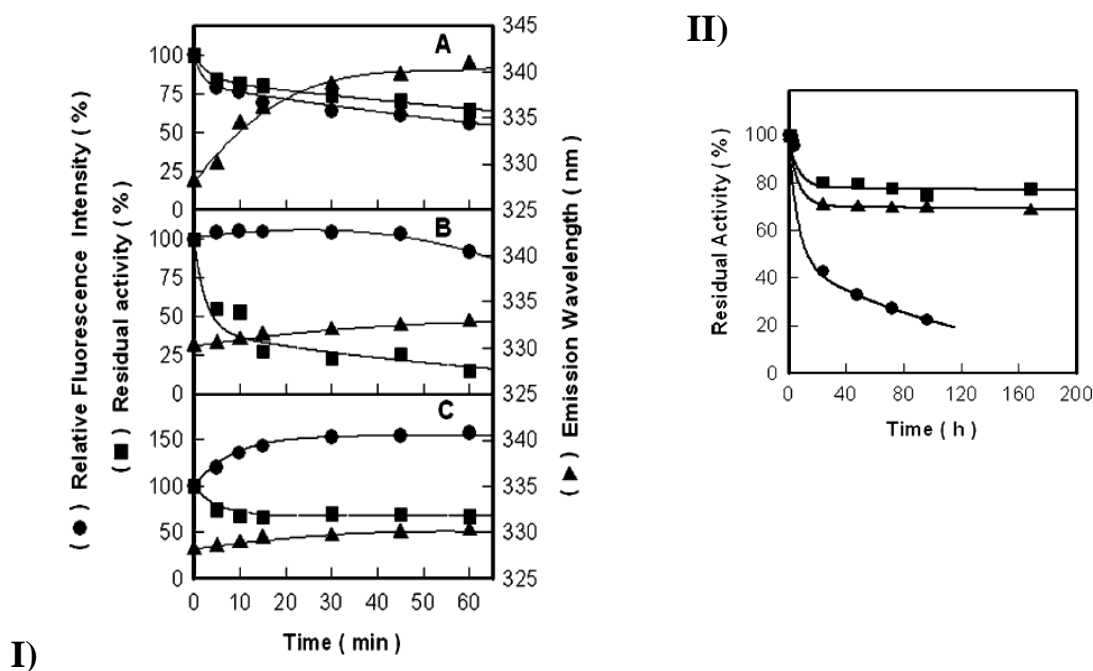


Figura 1.11. I) Perfiles de actividad residual (■), intensidad máxima normalizada (●) y longitud de onda de emisión (▲) de fluorescencia de α -quimiotripsina con el tiempo en (A) agua, (B) 1-propanol y (C) [Emim][NTf₂] a 30°C. II) Perfiles de desactivación de lipasa B de *Candida antártica* (CALB) en hexano (●), [Emim][NTf₂] (▲) y [Btma][NTf₂] (■) con el tiempo a 50°C (Lozano *et al.*, 2005).

En contraste, la capacidad del [Emim][NTf₂] para proteger la actividad enzimática en contra de la desactivación podría ser consecuencia de la preservación de la microcapa de agua alrededor de la enzima, en la **Figura 1.11** pudo verse como en lo referente a los parámetros de fluorescencia, $\lambda_{\text{máx}}$ a penas sufrió cambios, mientras que el $I_{\text{máx}}$ aumentó su valor 1.5 veces comparado con su nivel basal y después se mantuvo constante, similar al perfil obtenido para la caída de actividad. Por otro lado, en CALB se observó un perfil semejante de caída de actividad en los medios IL de estudio, con una disminución inicial de actividad y luego una preservación de la misma, cosa que no ocurrió en hexano donde la caída fue más brusca e ininterrumpida (ver **Figura 1.11**, II) (Lozano *et al.*, 2005).

Para la determinación de los cambios en la estructura de la proteína, se emplearon como técnica el dicromismo circular (CD), ya que esta técnica permite cuantificar los cambios conformacionales en la estructura tridimensional de la proteína mediante cambios observados en el espectro de CD. En particular, el análisis de la forma de la línea de los espectros de CD de UV-lejano (longitudes de onda comprendida entre 190-240 nm) puede ser usado para estimar el contenido de los elementos de la estructura secundaria en las proteínas. Los datos de la estructura cristalina para la α -quimiotripsina

muestran que este tipo de proteínas consisten en láminas β plegadas antiparalelas, las cuales están muy desordenadas o formando zonas muy irregulares (ver **Figura 1.12, I**). El 1-butanol fue responsable de un mayor cambio en el espectro de la enzima, mostrando un nuevo máximo a 195 nm, correspondiente a un aumento en su carácter helicoidal, al cual se le atribuyó pérdidas importantes en la actividad. En el caso en el que empleó el IL [Emim][NTf₂], se observó que el espectro de CD fue similar al obtenido en agua, pero con un claro aumento en el contenido de lámina β (47% con respecto al contenido de la enzima nativa). Los cambios en las vueltas de la cadena principal del polipéptido de la lámina β parecen estar involucrados en la mayor estabilidad de la enzima, probablemente debido a la ligeramente estructura tridimensional de la proteína más compacta producida por la presencia del IL. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los obtenidos por fluorescencia, lo que sugiere que la estabilidad de la enzima en este medio fue mejorada por la formación de una conformación más compacta, pero flexible, similar a la nativa en la α -quimotripsina capaz de exhibir un alto nivel de actividad. CALB por otro lado (ver **Figura 1.12, II**), en agua muestra la típica estructura secundaria de hélice α , con el característico doble mínimo a 208 y 222 nm, y una banda negativa entre 205 y 230 nm (34% de la estructura α -hélice). En el caso del hexano, observaron como el espectro de CD mostró un mayor cambio, señalado un incremento en la lámina β y en la estructura secundaria desordenada, lo cual puede estar claramente relacionado con la pérdida de actividad tras 24h en las mismas condiciones. En los casos en los cuales se emplearon ILs como medios de reacción (*i.e.*, [Emim][NTf₂] y [Btma][NTf₂]), los espectros de CD fueron muy semejantes a los obtenidos en medio acuoso, pero se observó una ligera disminución de la cantidad de hélice α y un ligero aumento con la cantidad de lámina β , mientras la cantidad de estructura desordenada permaneció prácticamente constante a la obtenida en medio acuoso. Esencialmente, ambos ILs fueron capaces de mantener la conformación flexible y activa de la enzima, mientras que los ligeros cambios en la estructura secundaria pudieron haber sido los responsables de la pequeña caída inicial de actividad (ver **Figura 1.11, II**) (De Diego *et al.*, 2004; Lozano *et al.*, 2005).

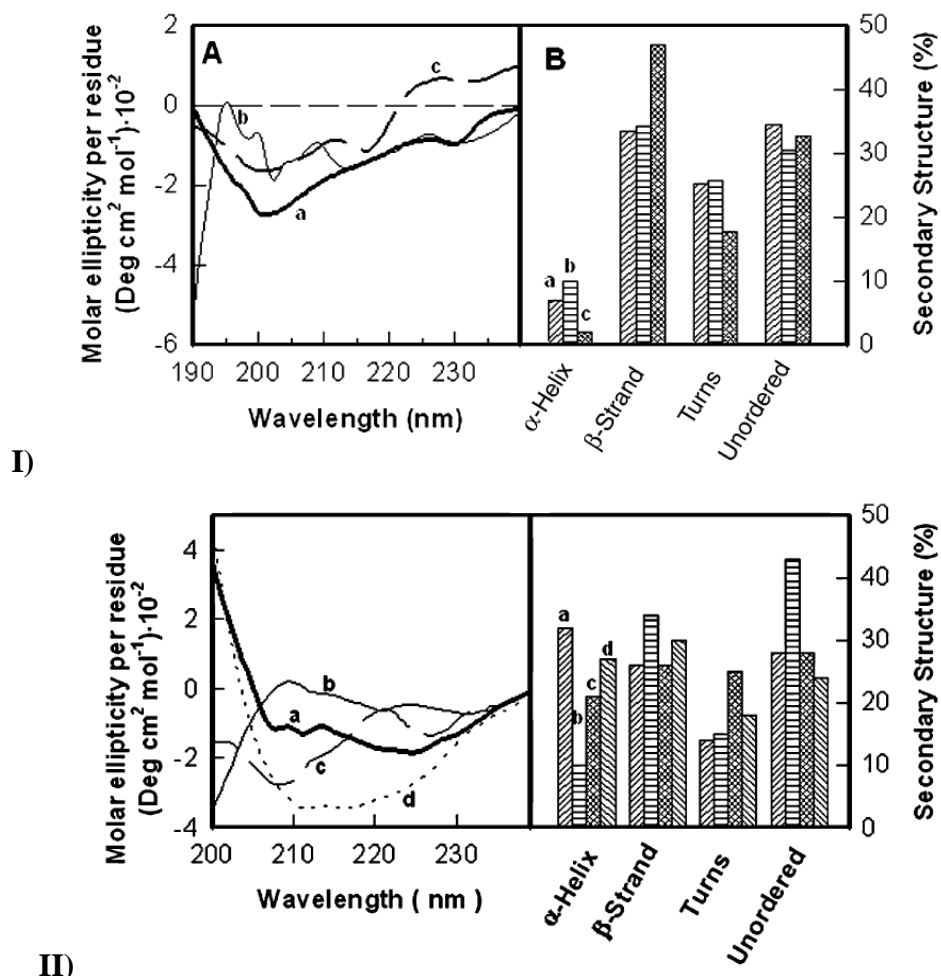


Figura 1.12. **I)** **A** Espectros de CD de UV lejano para la α -quimiotripsina en agua (a), 1-propanol (b) y [Emim][NTf₂] (c) después de 15 min de incubación a 30°C. **B** Composición de la estructura secundaria de la α -quimiotripsina, determinada a partir del espectro de CD de UV lejano en diferentes medios. **II)** **A** Espectros de CD de UV lejano para CALB en agua (a), 1-propanol hexano (b), [Emim][NTf₂] (c) y [Btma][NTf₂] (d) después de 24h de incubación a 50°C. **B** Composición de la estructura secundaria de la CALB, determinada a partir del espectro de CD de UV lejano en diferentes medios (Lozano *et al.*, 2005).

En este contexto, una solución acuosa de enzima libre adicionada a una fase de IL podría considerarse que está incluida pero no disuelta en el medio, permitiéndole conservar su microcapa de agua esencial para su actividad y estabilidad (Lozano *et al.*, 2005). En realidad, los sistemas CALB libre-IL podrían considerarse como derivados enzimáticos inmovilizados, ya que la actividad de la fase IL no se reduce por extracciones líquido-líquido, sino que es necesario llevar a cabo ultrafiltraciones con membranas de tamaño de exclusión como mínimo de 5000 Da para eliminar la actividad de la fase. Por esta razón, el IL podría ser considerado como soporte y medio de reacción (ver **Figura 1.13**) porque se pueden dar múltiples interacciones entre la enzima-IL (iónicas, enlaces de hidrógeno, van der Waals, etc.), resultando en una red

supramolecular capaz de mantener la conformación activa de la proteína (De Diego *et al.*, 2004, 2005; Lozano *et al.*, 2005).

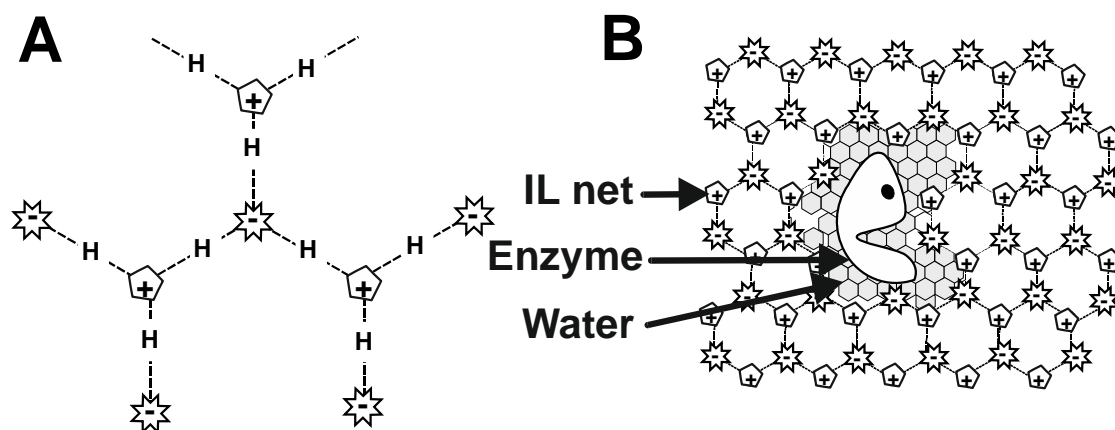


Figura 1.13. (a) Modelo simplificado bidimensional de la estructura supramolecular de los ILs con cationes imidazolio basados en interacciones de hidrógeno. (b) Descripción del esquema de la "inclusión" de la enzima en regiones húmedas dentro de la red de IL (Lozano *et al.*, 2005).

Además, los ILs no miscibles con la mayoría de los disolventes orgánicos, permiten una alternativa polar no acuosa para llevar a cabo extracciones de los productos de la mezcla de reacción mediante la formación de dos fases inmiscibles (Poole, 2004). Este hecho ha permitido desarrollar estrategias experimentales para realizar procesos biocatalíticos en líquidos iónicos, con posterior extracción de los productos con disolventes orgánicos mediante sistemas bifásicos líquido-líquido (ver **Figura 1.14**) (Madeira-Lau *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 2001, 2002; Lozano *et al.*, 2001, 2003a, 2006, 2007a; Schofer *et al.*, 2001), así como con sistemas bifásicos líquido iónico – fluido supercrítico, descritos posteriormente con más detalle (Lozano *et al.*, 2002a, 2003b, 2004a,c, 2007a,b; Reetz *et al.*, 2002).

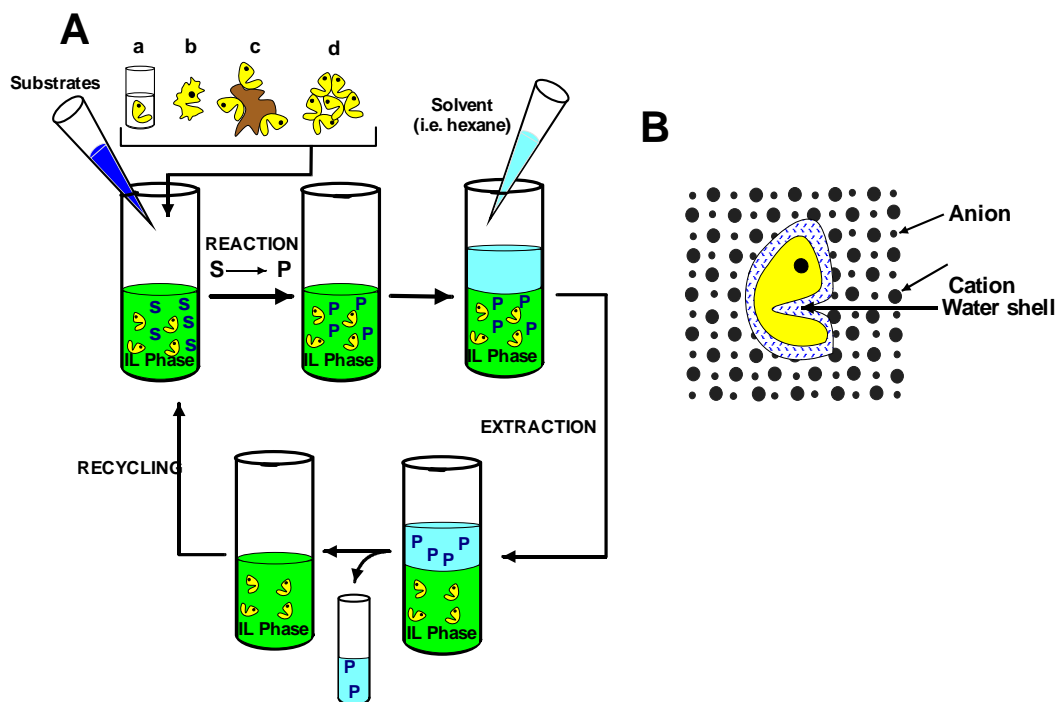


Figura 1.14. A. Estrategia para llevar a cabo reacciones en sistemas monofásicos basados en ILs catalizadas por enzimas, incluido el reciclaje y la separación del producto: (a) enzima en disolución acuosa; (b) enzima libre liofilizada; (c) enzima inmovilizada en soportes sólidos y (d) agregados de enzimas. B. Representación de la molécula de enzima en ILs inmiscibles en agua (Lozano, 2010).

La biocatálisis en ILs ha producido resultados notables bajo condiciones anhidras. Un gran número de enzimas (*ie.* lipasas, proteasas, peroxidasa, deshidrogenasas, glicoxidasas, etc.) y reacciones (*ie.* esterificación, resoluciones cinéticas, reducciones, oxidaciones, etc.) han sido probadas y llevadas a cabo en sistemas monofásicos basados en ILs, debido a la gran habilidad de éstos para disolver compuestos polares y no polares (Roosen *et al.*, 2008; van Rantwijk y Sheldon, 2007; Perez *et al.*, 2010).

Se ha podido observar que la mayor parte de las ILs miscibles en agua provocan desactivaciones enzimáticas, mientras que los ILs no miscibles han mostrado ser excelentes medios no acuosos para llevar a cabo biotransformaciones (*ie.* [Bmim][NTf₂], [Bmim][PF₆], etc.) en las mismas condiciones (Itoh *et al.*, 2001, 2002; Lozano *et al.*, 2001, 2003a, 2006, 2007a; Schofer *et al.*, 2001). Además, el carácter higroscópico de los ILs inmiscibles en agua (*ie.*, [Bmim][NTf₂]) es capaz de adsorber hasta un 1.4% w/w de agua, (Bonhôte *et al.*, 1996)), hecho que puede ser considerado como una ventaja adicional de este tipo de disolventes, ya que las enzimas necesitan un cierto grado de hidratación para llegar a ser activas (Klibanov, 2001; Mateo *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2010). La adición directa de las enzimas (*ie.* disoluciones acuosas, polvo

de enzima libre liofilizada, enzima inmovilizada en soportes sólidos, o agregados entrecruzados) en el medio IL que contenga los sustratos es el enfoque más usual realizado para llevar a cabo biotransformaciones (ver **Figura 1.14**). En estos sistemas, la reacción catalítica ocurre como consecuencia de la actividad y enantioselectividad mostrada por las enzimas, donde se ha podido demostrar la gran capacidad de las lipasas de llevar a cabo un gran número de reacciones biocatalíticas en ILs hidrofóbicos con bajo contenido en agua (*i.e.* síntesis de ésteres aromáticos y alifáticos, ésteres quirales por resolución de alcoholes racémicos, ésteres de carbohidratos, polímeros, etc.) (van Rantwijk y Sheldon, 2007; Roosen *et al.*, 2008; Lozano, 2010). En este sentido, también se ha podido demostrar la idoneidad de dichos ILs para la realización de reacciones quimio-enzimáticas, en las que mediante la combinación de un catalizador químico y una enzima, se han podido realizar reacciones acopladas sobre un mismo sustrato (*i.e.* resolución cinéticas dinámicas de *sec*-alcoholes) (Lozano *et al.*, 2009a,b, 2010a,b,c).

4. Líquidos Iónicos Soportados (SILPs y SILLPs)

Los ILs son muy eficientes debido a sus propiedades como “disolventes de diseño”. Sin embargo, son relativamente caros y cuando se utilizan como medios de reacción se requieren en grandes cantidades, con lo que al final de su vida útil se podría generar un volumen importante de residuos, pudiendo ser, por ello, poco atractivos desde el punto de vista económico y ecológico en su aplicación industrial (Sans *et al.*, 2011; Selvam *et al.*, 2012).

Una alternativa para solventar estos problemas consiste en inmovilizar los ILs en soportes sólidos. De este modo, es posible combinar las ventajas de los ILs y la de los soportes heterogéneos. Al inmovilizar, se mejora la difusión y se reduce la pérdida de IL empleado durante el proceso, obteniéndose así, un material de fácil utilización, recuperación y reutilización, y en el que se reduce drásticamente la cantidad de IL empleado (Burguete *et al.*, 2007).

Los ILs pueden ser inmovilizados en muchos tipos de materiales, tales como superficies porosas de silicato y/o alúmina, zeolitas, carbón activo, resinas de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB), polímeros monolíticos y una gran variedad de matrices poliméricas sintetizadas y naturales, tanto mediante adsorción física (Lozano *et*

al., 2002a), como por enlace covalente (Karbass *et al.*, 2006; Burguete *et al.*, 2007; Selvam *et al.*, 2012).

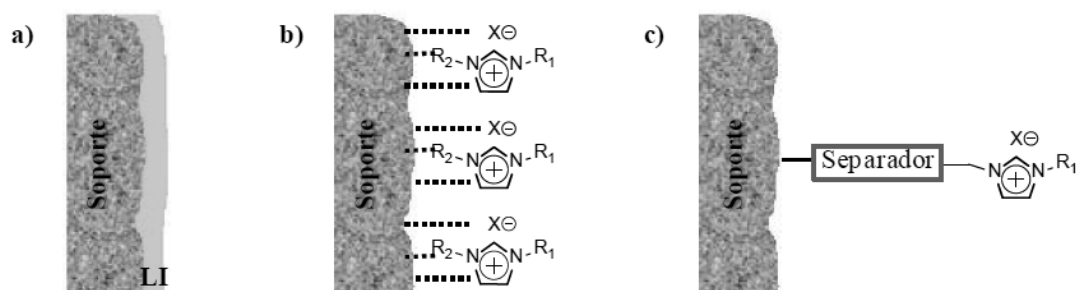


Figura 1.15. Diferentes aproximaciones para la inmovilización de ILs; a) impregnación (capa de líquido iónico sobre el soporte), b) adsorción (enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, etc.) y c) anclaje mediante enlace covalente del catión (Burguete *et al.*, 2007).

La inmovilización de los ILs en un soporte de material estructurado, puede realizarse por diferentes métodos (ver **Figura 1.15**): impregnación, adsorción, unión covalente, unión sol-gel, etc. En términos generales, los líquidos iónicos soportados en fase sólida, son comúnmente denominados SILPs (“*Supported Ionic Liquid Phases*”) (Parvin *et al.*, 2012; Selvam *et al.*, 2012). Pero los líquidos iónicos soportados (ver **Figura 1.16**) mediante enlace covalente en superficies poliméricas, reciben el nombre de SILLPs (“*Supported Ionic Liquid Like-Phases*”) (Kim y Chi, 2004; Kim *et al.*, 2008; Karbass *et al.*, 2006).

El desarrollo de diferentes matrices poliméricas para su posterior aplicación como soportes ha sido de amplio objeto de estudio (Bergbreiter *et al.*, 2009; Frost y Mutton, 2010; Lu *et al.*, 2009). La estructura polimérica y los grupos funcionales que la conforman, así como la morfología resultante, son de vital importancia para su uso como soportes catalíticos, pues se ha demostrado que las propiedades del catalizador varían en función del tipo de soporte polimérico (Bringué *et al.*, 2013; Jadhav *et al.*, 2013; Liang, 2013). Para esclarecer las diferencias entre los polímeros existentes y los empleados en este trabajo, a continuación, se clasifican algunos tipos de soportes poliméricos de interés en catálisis.

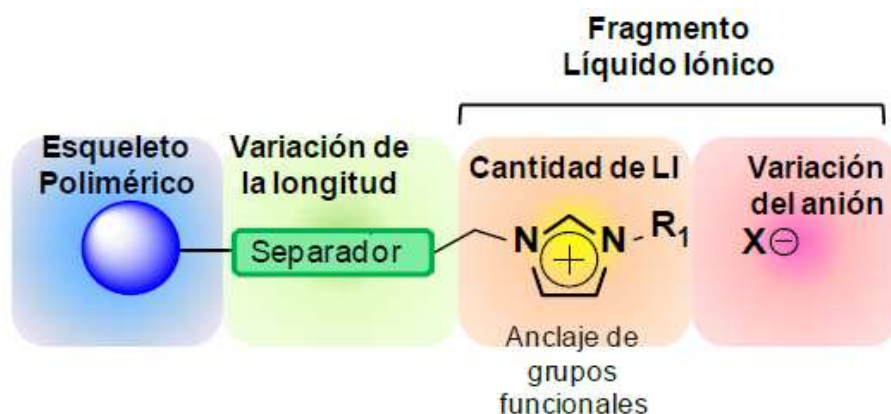


Figura 1.16. Esquema de Líquido Iónico Soportado mediante enlace covalente en una matriz polimérica (SILLP).

Tipos de soportes poliméricos

Según la *naturaleza* del polímero, se pueden clasificar en:

- **Polímeros solubles:** por lo general, son polímeros lineales de bajo peso molecular, solubles en disolventes compatibles con su estructura química. Son muy importantes los grupos funcionales que los conforman, ya que de éstos depende la solubilidad en ciertos disolventes. Su separación de un medio líquido de reacción se realiza bien por extracción o por precipitación. Los ejemplos más típicos son los poliestirenos y el polietilenglicol (PEG) (Bergbreiter *et al.*, 2009).
- **Polímeros insolubles:** Por lo general, estos polímeros poseen un alto peso molecular. En su mayor parte se trata de polímeros entrecruzados. Dependiendo del grado de entrecruzamiento pueden clasificarse como microporosos o macroporosos. Se mantienen en el estado sólido en presencia de cualquier disolvente. Los más comunes son los polímeros de poliestireno que utilizan divinilbenceno como agente de entrecruzamiento, pudiendo contener clorometilestireno o distintos acrilatos como co-monómeros. Al ser sólidos, su separación de un medio de reacción es fácil y eficiente.
- **Soportes inorgánicos:** generalmente poseen estructuras porosas con una gran área superficial. Los más comunes son la sílice y en menor medida la alúmina, óxidos de zinc, arcillas, zeolitas, etc.

- Dendrímeros: son los más recientes y fácilmente funcionalizables (en especial los que poseen grupo arilo), son solubles en algunos disolventes con lo que se favorece la movilidad del catalizador inmovilizado sobre ellos.

Según su *estructura*, los polímeros pueden ser (Odian, 2004):

- Lineales: los monómeros se unen por dos sitios (cabeza y cola).
- Ramificados: estos polímeros incluyen más de dos sitios de unión por molécula en relación a la cadena creciente del polímero. Cuando son altamente ramificados, pueden llegar a tener una estructura hiperramificada de tipo dendrítico, en el cual las cadenas secundarias están a la vez ramificadas.
- Entrecruzados: se introducen los monómeros que pueden participar en el crecimiento de dos cadenas poliméricas diferentes, lo que permite el entrecruzamiento de dichas cadenas. Se utilizan por lo tanto monómeros con al menos dos grupos/unidades polimerizables diferentes.
- Estrella: las cadenas del polímero, lineales o ramificadas, parten todas ellas de un centro común, de un único punto de ramificación.

Se pueden clasificar también de acuerdo con el tipo de polimerización, según el mecanismo de reacción que produce la elongación de la cadena polimérica:

- *Polimerización por radicales libres (PR)*: la polimerización por radicales libres es el método más extendido para la síntesis de polímeros, por la posibilidad de llevarla a cabo bajo condiciones suaves, por su compatibilidad con una amplia variedad de monómeros (acrilato, estireno, butadieno, etc.) y porque es también tolerante con un amplio rango de grupos funcionales (OH, NR₂, COOH, CONR₂) y condiciones de reacción (en masa, disolución, suspensión, etc.) (Odian, 2004). Actualmente, el 50 % de los polímeros sintéticos se preparan por procesos de polimerización radicalaria. La formación del polímero por este método implica la adición sucesiva de los monómeros que forman cadenas de gran tamaño, gracias a la gran reactividad de los radicales libres. Éstos pueden formarse por diferentes mecanismos que implican generalmente la utilización de moléculas iniciadoras. Después de la generación de los primeros radicales a partir de los monómeros (iniciación), en las etapas de propagación se añaden nuevas unidades de monómero, de modo que el crecimiento de la cadena

polimérica es constante. Los iniciadores más comunes son los que producen radicales por descomposición térmica (peróxidos orgánicos y azoderivados) (Odian, 2004).

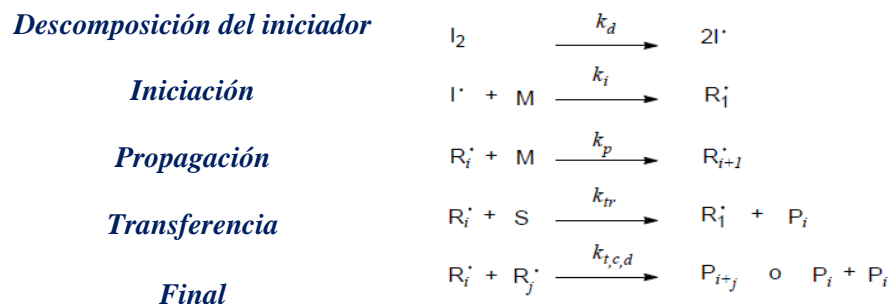


Figura 1.17. Mecanismo general de polimerización por radicales libres. R_i radical de cadena larga i , I_2 iniciador, M monómero, S agente de transferencia y P polímero.

Sin embargo, la polimerización radicalaria tiene algunas limitaciones con respecto al grado de control en la estructura macromolecular, en particular, en la distribución de pesos moleculares, la composición y la estructura de los polímeros formados.

- *Polimerización radicalaria controlada (PRC)*: es por ello que a lo largo de la última década se han desarrollado distintas técnicas de Polimerización Radicalaria Controlada (PRC) proporcionando nuevas técnicas y metodologías que permiten un control preciso de los procesos de polimerización, manteniendo la versatilidad de la polimerización radicalaria convencional (Moad *et al.*, 2005). Así pues, con el empleo de estas técnicas se han podido sintetizar una amplia variedad de macromoléculas con estructuras, composiciones, funcionalidades y propiedades bien definidas.

Entre estas técnicas se pueden destacar dos métodos revolucionarios; **RAFT** (“Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer”) y **ATRP** (“Atom-Transfer Radical Polymerization”). Estos métodos se basan en una rápida evolución de un equilibrio dinámico entre especies activas e inactivas. La amplia aplicabilidad, el alto grado de control sobre el peso molecular, la disminución de la polidispersidad, y la posibilidad de emplear catalizadores y reactivos con diversas funcionalidades hace que su aplicación en la industria sea muy prometedora.

En este trabajo se utilizó fundamentalmente los SILLPs compuestos de líquidos iónicos soportados sobre resinas preformadas (Merrifield).

Líquidos Iónicos Soportados sobre resinas Merrifield

La obtención de los líquidos iónicos soportados (SILLPs) sobre resinas comerciales de tipo Merrifield es un método rápido para llevar a cabo su inmovilización, mediante la modificación de la superficie de estas resinas (Karbass *et al.*, 2006). Este método permite conocer la influencia de las características estructurales del soporte (grado de entrecruzamiento, porosidad, superficie activa, entre otras) en el SILLP. Las características de partida de las resinas Merrifield no se modificarán significativamente por el anclaje de las unidades del líquido iónico y de este modo, se pueden obtener múltiples variantes de los SILLPs, modificando diversos factores básicos.

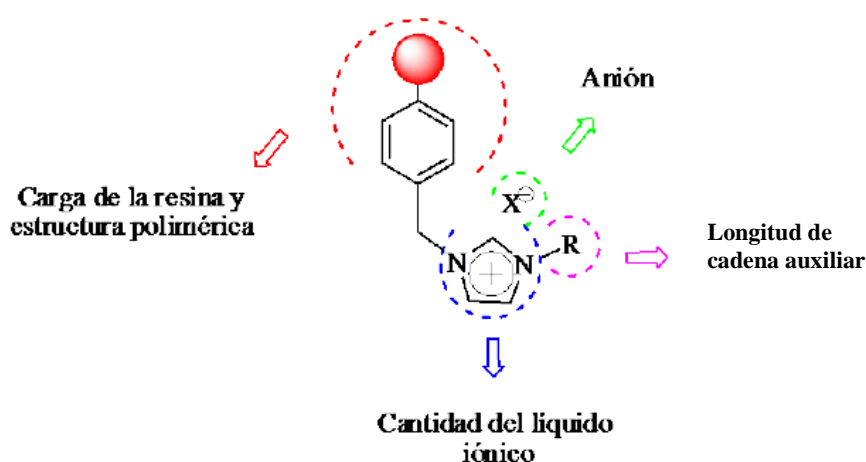


Figura 1.18. Posibles modificaciones estructurales de los SILLPs en un soporte de resina Merrifield.

Una de las variables es la carga de los grupos clorometilo en las resinas, pues al seleccionar un tipo de resina Merrifield de alta carga, se podrá soportar mayor cantidad de IL en la superficie que al emplear una resina de menor carga. Sin embargo, el que se tenga mayor carga de IL soportado no quiere decir que las propiedades del catalizador final sean necesariamente mejores.

Los SILLPs con soporte polimérico de resina Merrifield, se preparan de forma muy sencilla. El imidazol correspondiente reacciona nucleófilamente con los grupos clorometilo como agentes alquilantes y el átomo de cloro es sustituido por el grupo imidazolio deseado. En estas condiciones, el cloruro se convierte en el contra-anión, que, posteriormente, se puede intercambiar por el contra-anión deseado. El radical R unido originalmente al nitrógeno del imidazol puede variarse (longitud de cadena alquílica u otro grupo funcional alternativo) para modificar las propiedades del SILLP resultante.

5. Biotransformaciones asistidas por irradiación microondas

El calentamiento por microondas se basa en la capacidad de las moléculas o sustancias para absorber y transmitir la irradiación de microondas. La irradiación por MW es una irradiación electromagnética en la gama de frecuencias de 0.3 a 300GHz. Para evitar interferencias con las telecomunicaciones y las frecuencias de telefonía móvil, las aplicaciones para calefacción deben usar bandas ISM (Industrial Scientific and Medical frequencies) las cuales son 27.12 MHz, 915 MHz ó 2.45 GHz. Todos los hornos microondas domésticos de "cocina" y reactores de microondas de laboratorio operan a una frecuencia de 2.45GHz. El fotón de microondas correspondiente a esta frecuencia particular tiene una energía cercana a 0.0016 eV. Esta cantidad de energía es demasiado baja para romper enlaces químicos y la radiación por MW no puede, por lo tanto, inducir reacciones químicas. Esta frecuencia asignada, es tal que permite que los dipolos o iones puedan alinearse en el campo pero no puedan seguir el campo alterno completamente. La capacidad de un material específico o disolvente para convertir la energía de microondas en calor a una frecuencia y temperatura dada se determina por el "factor de pérdida de tangente" ($\tan\delta$), el cual se expresa como la relación de la pérdida dieléctrica (ϵ'') para la constante dieléctrica (ϵ'). Se requiere de un medio de reacción, por lo general el disolvente, con una alta $\tan\delta$ para poder tener una buena absorción y por lo tanto, una calefacción eficaz (Lidström *et al.*, 2001; De la Hoz *et al.*, 2005).

El origen del "calentamiento dieléctrico por microondas" se basa fundamentalmente en generar calor por dos mecanismos principalmente: polarización dipolar y conducción iónica. El mecanismo de actuación de la radiación de microondas consiste en provocar la rotación de los dipolos dentro del líquido lo que causa que las

moléculas polares se alineen y luego relajen en el campo oscilante de la radiación electromagnética. Cuando la energía de la rotación de esos dipolos se disipa se produce el calentamiento del líquido, por eso, al producirse el calentamiento en el interior del líquido y no transferirse desde el vaso es por lo que el líquido está a mayor temperatura que el recipiente. La capacidad de la muestra para alinearse con la frecuencia dada (del campo aplicado) está directamente relacionada con la cantidad de calor generado. No hay calentamiento si el dipolo o ion no tiene tiempo suficiente para volver a alinearse con el campo o si se reorienta demasiado rápido (ver **Figura 1.19**).



Figura 1.19. Moléculas dipolares las cuales intentan alinearse con un campo eléctrico oscilante (Lidström *et al.*, 2001).

En general, los disolventes se pueden clasificar de acuerdo a lo bien que absorben la radiación microondas: alta ($\tan\delta > 0.5$), media ($\tan\delta 0.1-0.5$) y baja absorción de MW ($\tan\delta < 0.1$). Los ejemplos representativos de disolventes tradicionales, con sus valores $\tan\delta$ se recogen en la **Tabla 1.3**.

En la actualidad, los valores de $\tan\delta$ en líquidos iónicos no se han estudiado, a pesar de conocerse las constantes dieléctricas (ϵ) de algunos de ellos. Aunque los ILs suelen ser entendidos como compuestos de absorción media, esto no ha sido confirmado científicamente con el valor $\tan\delta$. Sin embargo, los líquidos iónicos de uso más frecuente, por ejemplo, [bmim][BF₄] y [bmim][PF₆], poseen propiedades disolventes ideales para microondas. Además de la buena estabilidad térmica y química que se ha mencionado anteriormente, los ILs también cuentan con un carácter polar e iónico lo que les permite interactuar a través de ambos mecanismos de transferencia de energía en MW (polarización dipolar y conducción iónica) (Lidström *et al.*, 2001; De la Hoz *et al.*, 2005).

Tabla 1.3. Capacidad de adsorción de MW para diferentes disolventes. a) La constante dieléctrica ϵ' , a igual permitividad relativa, ϵ'' , a temperatura ambiente y bajo influencia de un campo eléctrico estáticos. b) Valores determinados a 2.45GHz y a temperatura ambiente (Lidström *et al.*, 2001).

Disolvente	Constante Dieléctrica (ϵ')	Pérdida de tangente ($\tan\delta$)
Hexano	1.9	
Benceno	2.3	
CCl ₄	2.2	
CHCl ₃	4.8	
CH ₃ COOH	6.1	0.09
CH ₃ COOCH ₂ CH ₃	6.2	0.174
THF	7.6	0.059
CH ₂ Cl ₂	9.1	0.047
Acetona	20.6	0.042
Etanol	24.6	0.054
Metanol	32.7	0.941
Acetonitrilo	36	0.659
Dimetilformamida	36.7	0.062
DMSO	47	0.161
Ácido Fórmico	58	0.722
Agua	80.4	0.123

La combinación de los ILs como disolventes neotéricos y la irradiación de microondas como fuente de energía alternativa se están convirtiendo en dos herramientas de enorme potencial para muchas reacciones enzimáticas. En este sentido, el conocer el papel de los ILs para estabilizar las enzimas y como la radiación por microondas podría activarlas, es clave para el desarrollo de futuras estrategias, en las cuales la combinación de ambas podría permitir o mejorar un elevado número de procesos enzimáticos. En esta línea, la irradiación de microondas se ha convertido en un dispositivo de calentamiento rutinario empleado en diversas reacciones químicas, resultando un método de calefacción de alta eficiencia energética. Sin embargo, sus aplicaciones como fuente de energía para la síntesis enzimática son bastante limitadas. La mayor controversia en el campo de las reacciones asistidas por microondas es la causa del aumento de la velocidad de reacción, generalmente atribuidos a efectos no

térmicos. Esta controversia se debe en parte al hecho de que muchas de las reacciones conocidas y llevadas a cabo por calentamiento bajo irradiación por microondas, fueron realizadas en hornos de microondas domésticos sin un control preciso de la temperatura, por esta razón muchos investigadores argumentaron que el aumento de la velocidad de reacción fue causado por el sobrecalentamiento de disolventes más allá de sus puntos de ebullición normales. Otros investigadores, sin embargo, propusieron la existencia de efectos no-térmicos basados en la argumentación de que los grupos funcionales polares exhiben mayor reactividad con reactivos adyacentes bajo radiación por microondas que bajo calentamiento conductivo a la misma temperatura. Hoy en día, están disponibles los reactores de microondas especializados equipados con controladores de temperatura y presión “*in situ*”. Con la disposición de esta tecnología, algunos investigadores han visto como las enzimas han mostrado mayores actividades y selectividades en disolventes orgánicos bajo radiación por microondas. Así, Mazubert *et al.*, (2014) han cuantificado los efectos de la irradiación microondas en la producción de biodiésel a partir de aceites residuales de cocina mediante reacciones de transesterificación y esterificación catalizadas por ácidos y álcalis, poniendo de manifiesto la importancia del control de temperatura mediante sensores de fibra óptica, que son más precisos que los sensores infrarrojos.

A pesar de la controversia, la utilización de líquidos iónicos como medios para reacciones asistidas por microondas ofrece muchas ventajas. Los disolventes orgánicos son normalmente inflamables y volátiles, lo cual es un riesgo de seguridad al trabajar a altas temperaturas y en recipientes cerrados, como son las circunstancias que se dan al trabajar con irradiación por microondas. En contraste, los ILs son disolventes ideales para reacciones de microondas debido a sus altos puntos de ebullición, bajas presiones de vapor y altas estabilidades térmicas. Además, los ILs típicos tienen constantes dieléctricas moderadamente altas (en el rango de 10-15), y capacidades caloríficas relativamente altas. Esta combinación única permite a los ILs poder absorber las ondas microondas de forma eficiente y que se calienten más fácilmente. Debido a estas ventajas, los ILs se han empleado como disolventes en una amplia gama de reacciones asistidas por microondas (Hoffmann *et al.*, 2003; Leadbeater *et al.*, 2004; Leadbeater y Torenus, 2002; Lévêque y Cravotto, 2006). Sin embargo, el uso de irradiación por microondas para la catálisis enzimática en ILs ha sido muy poco estudiado.

Por esta razón, el grupo de Zhao *et al.* (2009), examinaron la actividad sintética del derivado inmovilizado de lipasa B de *Candida antarctica* (Novozyme 435) en más de veinte ILs con moderadamente altas constantes dieléctricas (entre 10-15), valores próximos al *tert*-BuOH (12.47 a 25°C) mediante calentamiento convencional y por microondas. El estudio comparativo entre ambas condiciones lo hicieron para los disolventes; diclorometano y acetonitrilo, y el IL-[Bmim][NTf₂], y mientras que los sustratos se secaron intensamente, la lipasa permaneció con un contenido moderadamente bajo de agua entorno al 3% en peso. En los resultados se observó mayores velocidades de reacción en los ensayos llevados a cabo mediante irradiación por microondas que aquellos realizados en baño María. Sin embargo, cuando la enzima también se secó (sobre P₂O₅), las diferencias en las velocidades de reacción se volvieron insignificantes. Por otro lado, cuando se añadió un 1% (v/v) de agua en el disolvente a granel ([bmim][NTf₂]) y la enzima no se secó, tal diferencia también disminuyó. Este fenómeno tan interesante, ya fue visto y explicado por otros autores. Cuando los sustratos y/o enzima (s) no se secaron completamente o cuando una pequeña cantidad de agua se añadió en las reacciones (es decir, la enzima estaba rodeada por al menos una capa de agua), las velocidades de reacción fueron bastante superiores bajo irradiación por microondas que a través de calentamiento térmico convencional (Zhao *et al.*, 2009).

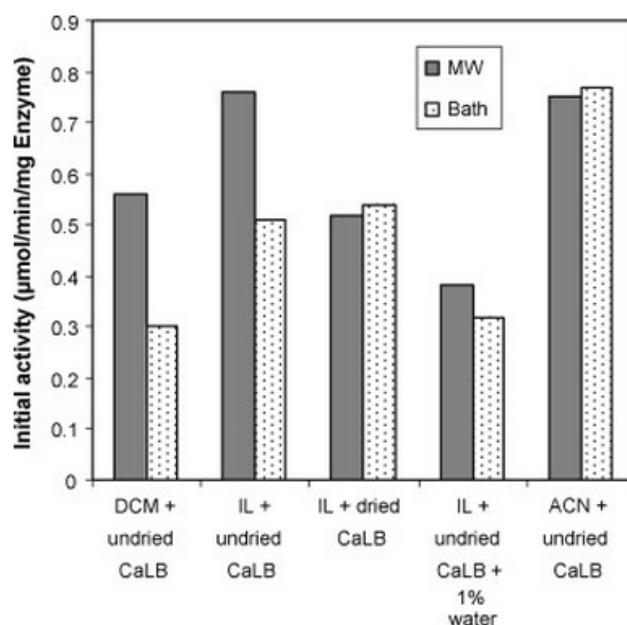


Figura 1.20. Influencia de la irradiación por microondas (MW) y el contenido en agua en la actividad enzimática (temperatura 40°C; DCM es diclorometano; IL es [Bmim][NTf₂]; ACN es acetonitrilo) (Zhao *et al.*, 2009).

Este fenómeno fascinante fue explicado por este grupo suponiendo un sobrecalentamiento de la capa de agua que rodea a la enzima, en lugar de un efecto no térmico, como se ilustra en la **Figura 1.21** (a), en un entorno de disolvente y sustratos hidrofóbicos bastante secos, donde la partícula de enzima está rodeado por (al menos) una capa de moléculas de agua. En este microambiente, la capa de agua cerca de la superficie de la enzima tiene una constante dieléctrica mucho mayor (80.1 a 20°C) que el disolvente orgánico o el IL, en el rango de 7-40, principalmente 7-20, teniendo en cuenta como la constante dieléctrica estática de la proteína en polvo seco era de aproximadamente 4 y el soporte de inmovilización (resina acrílica) tiene un valor ϵ_r en el rango de 2.7 a 4.5 (la mayoría de los plásticos están en el rango de 2-4). Por lo tanto, bajo irradiación de microondas, la superficie de la enzima pudo probablemente alcanzar una temperatura mayor que el disolvente a granel debido al sobrecalentamiento de la capa de agua. Esto podría explicar las velocidades de reacción más altas observadas bajo microondas cuando la enzima no se secó pero el disolvente y los sustratos sí. Cuando la enzima también se secó intensamente, se esperaba que esta capa de agua desapareciera. Pero lo que ocurrió fue que pese al secado intensivo sobre P_2O_5 , la enzima perdió la capa superficial de "agua esencial", pero conservó de 3-4 y 14-16 moléculas de agua por molécula de enzima encerradas en su estructura. Esto permitió explicar los resultados obtenidos, donde no hubo ningún sobrecalentamiento de la superficie de la enzima, por esta razón, las actividades en ambos casos fueron muy similares (Zhao *et al.*, 2009).

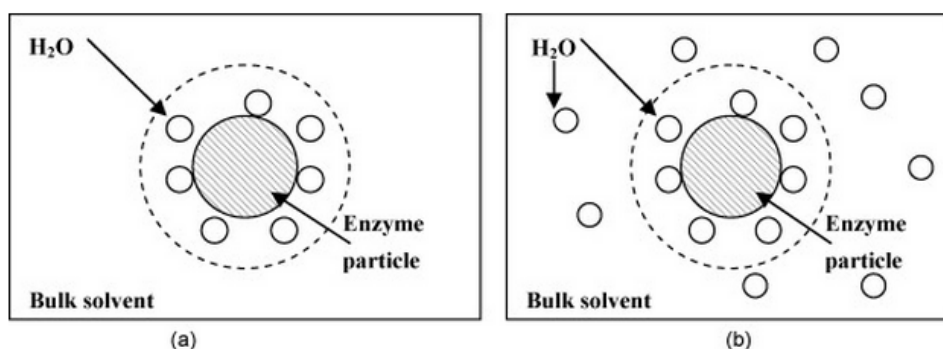


Figura 1.21. Ilustraciones del sobrecalentamiento por causa del agua: (a) la partícula de enzima libre o inmovilizada está rodeado por una capa de moléculas de agua mientras que el disolvente hidrofóbico está mayoritariamente seco; (b) la partícula de enzima está rodeada por una capa de moléculas de agua, mientras que la mayor parte de disolvente contiene una pequeña cantidad de agua dispersada (Zhao *et al.*, 2009).

Cundo se añadió agua adicional y se dispersó (a través de agitación vigorosa) en el disolvente (**Figura 1.21 b**), la constante dieléctrica global del medio se incrementó y el efecto del sobrecalentamiento en la superficie de la enzima se redujo. En acetonitrilo, el disolvente hidrofóbico tendió a dispersar las moléculas de agua fuera de la superficie de la enzima en todo el sistema de reacción. Como resultado, no se produjo sobrecalentamiento de la superficie de la enzima y por lo tanto no se incremento la velocidad de reacción (ver **Figura 1.20**).

Sin embargo, es interesante mencionar que en soluciones acuosas el efecto no térmico se ha observado para las enzimas termófilas (Porcelli *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2008). El grupo de Porcelli estudió la exposición a irradiación por microondas de dos enzimas termófilas y termoestables, aisladas de *Sulfolobus solfataricus*, hidrolasa S-adenosil y la 5'-fosforilasa metiltioadenosina, ambas se sometieron a una radiación de 10.4GHz con el objeto de discriminar entre efectos térmicos y no térmicos. Las causas de exposición no térmicas, fueron irreversibles y dependientes del tiempo de exposición en ambas enzimas, la velocidad de inactivación se relacionó con la energía absorbida y fue independiente de la concentración de enzima (Porcelli *et al.*, 1997). También se estudió la influencia de sales en la inactivación de las enzimas. Los cambios conformacionales de la hidrolasa 5-adenosilhomocisteina se detectaron por fluorescencia y dicromismo circular, sugiriéndose que las ondas microondas inducen cambios estructurales en la proteína que no estuvieron relacionados con la temperatura. Por otro lado, Young *et al.*, (2008) consideraron que las proteínas y los péptidos al tener momentos dipolares significativos, podían ser especialmente susceptibles a irradiación por microondas, aunque los efectos específicos del microondas en la biocatálisis no eran del todo claros. Estos efectos son difíciles de medir debido al calentamiento rápido de soluciones acuosas en virtud de la alta potencia de irradiación de microondas que puede desencadenar en la desnaturalización de la proteína y por lo tanto, en su inactivación. Por otra parte, la capacidad catalítica intrínseca de las enzimas a una temperatura relativamente baja puede ocultar el aumento de la velocidad de reacción por medio de la irradiación de microondas.

Los efectos específicos de la irradiación por microondas en la catálisis enzimática podrían ser observados si, a altos niveles de irradiación de microondas, la actividad catalítica fuese mínima y surgiese del calentamiento térmico del disolvente. Esto puede lograrse en un entorno acuoso, si se tiene cuidado para (1) enfriar eficazmente la mezcla

de reacción durante la irradiación utilizando un recipiente de reacción con camisa y enfriamiento criogénico, y (2) si se utilizan enzimas hipertermófilas que tienen actividad catalítica mínima a temperaturas inferiores a 40°C y sus temperaturas de desnaturalización son mucho más altas que sus homólogas mesófilas (Young *et al.*, 2008).

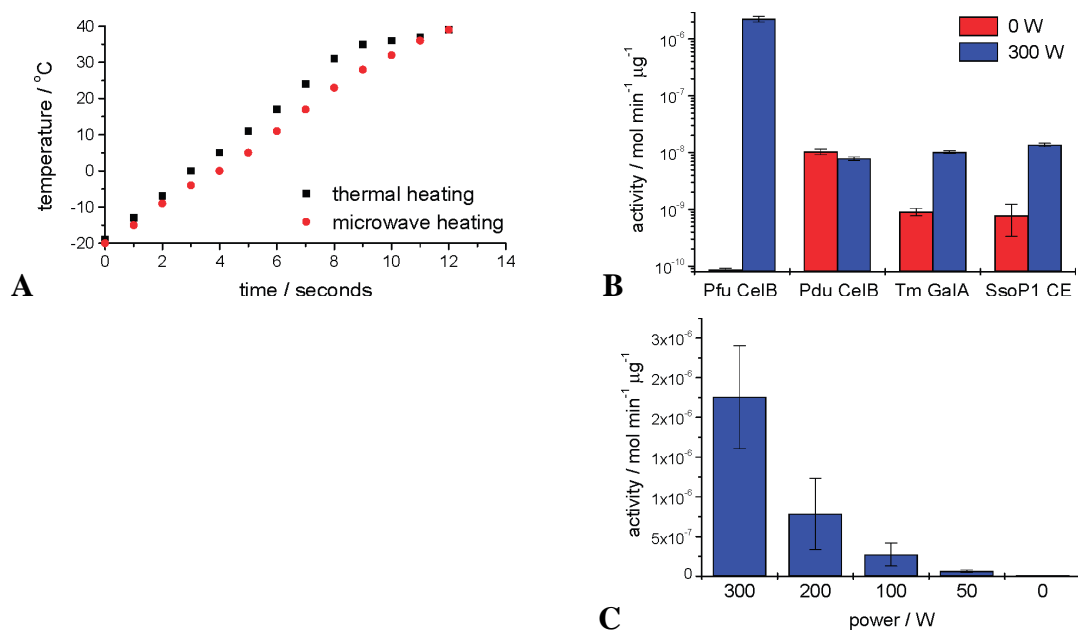


Figura 1.22. **A)** Perfiles térmicos de las reacciones a 300W y en ausencia de irradiación de microondas. **B)** Efecto de la irradiación por microondas en la actividad de CE Pfu CelB (enzima termófila con $T_{\text{ópt}}$ de 110°C), Pdu CelB (homóloga mesófila de CE Pfu CelB), Tm GalA (enzima termófila con $T_{\text{ópt}}$ entorno a los 90°C), y SsoP1 (enzima termófila con $T_{\text{ópt}}$ entorno a los 90°C). **C)** Actividad enzimática de Pfu CelB dependiente de la portencia microondas (Young *et al.*, 2008).

Sus resultados mostraron como, los extractos de células de *E. coli* con β -glucosidasa recombinante (CelB) mostraron una enorme actividad al ser sometidas a 300W de irradiación por microondas (70°C por debajo de su temperatura óptima), mientras que en las mismas condiciones térmicas la actividad fue despreciable. Sus homólogas mesófilas no mostraron tal influencia bajo este tipo de irradiación, esto se explicó en base a que su temperatura óptima era mucho más cercana al gradiente de temperaturas con el que se trabajó, por lo tanto este efecto no fue relevante en la actividad. El ensayo también se probó con otras dos enzimas termófilas, pero con más baja temperatura óptima, mostrándose al igual que en el caso anterior, una mejora en la actividad al irradiarse con microondas, pero menos acentuada, debido a como se ha mencionado antes, el menor incremento de temperatura entre la óptima y la de reacción

(ver **Figura 1.22, B**). También mostraron en su estudio, la influencia de la potencia en la actividad (ver **Figura 1.22, C**), observándose una clara mejoría de la misma con el aumento de la potencia (Young *et al.*, 2008).

6. Síntesis de biodiesel

La crisis energética se muestra inevitable como consecuencia de la gran demanda global de energía que va en aumento como consecuencia del desarrollo industrial y el crecimiento de la población en todo el mundo (Fan y Burton, 2009; Borugadda y Goud, 2012). El aumento del consumo del petróleo en las actividades diarias ha generado la alarma entre los consumidores debido a la actual enorme dependencia del mismo y de sus derivados. Si la tendencia continúa así en los próximos años, podrían haber muchas posibilidades de que se disparase aun más su precio e incluso se acabaran sus existencias (Vyas *et al.*, 2010). Aparte de la posibilidad de disminución de las reservas de combustibles fósiles, el efecto perjudicial de los gases de escape de los combustibles derivados del petróleo en el medio ambiente es también preocupante. La combustión de estos combustibles libera sustancias nocivas y peligrosas en la atmósfera, siendo el producto de la combustión del motor, dióxido de carbono, uno de los mayores causantes del efecto invernadero y que contribuyen al calentamiento global (Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013). A medida que se incrementa la producción de dióxido de carbono y se confina en la atmósfera, el calor del sol también es atrapado, aumentando la temperatura superficial de la Tierra, lo que resulta en el aumento del nivel del mar debido al derretimiento de las capas de hielo. Las reservas de crudo limitadas y los gases de escape que se emiten al medio ambiente son dos de las amenazas que han reiterado la importancia de sustituir el petróleo crudo por biodiesel, que se presenta como su alternativa más prometedora y con mayor potencial.

6.1. Composición química del biodiesel

Los aceites naturales y las grasas son ésteres de glicerol y ácidos grasos, comúnmente llamados glicéridos o triacilglicéridos. Hay dos tipos de ácidos grasos; saturados que contienen sólo enlaces sencillos carbono-carbono e insaturados que poseen al menos un enlace doble carbono-carbono. Ejemplos comunes de ácidos grasos son; esteárico, oleico, palmítico y linoleico (ver **Tabla 1.4**). La **Tabla 1.5** muestra la

estructura de triacilglicéridos que incluyen, diglicéridos y monoglicéridos, mientras que en la **Tabla 1.6** se pueden ver la composición de ácidos grasos en diferentes aceites (Talebian-Kiobalaieh *et al.*, 2013). El biodiesel puede ser producido mediante la reacción química de transesterificación entre un material de alimentación, ya sea aceite vegetal o grasa animal, y un alcohol primario (metanol, etanol, etc.), cuyos productos de reacción son ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) o etílicos (FAEEs) en función del alcohol primario empleado (Boehman y Gerpen, 2005).

Tabla 1. 4. Estructura química de los ácidos grasos.

Ácido graso (Nombre común/nombre funcional)	Estructura	Acronismo Común	Ésteres metílicos de ácidos grasos (Nombre común/nombre funcional)
Ácido palmítico/Ácido hexadecanoico	$R-(CH_2)_{14}-CH_3$	C16:0	Palmitato de metilo/hexadecanoato de metilo
Ácido esteárico/Ácido octadecanoico	$R-(CH_2)_{16}-CH_3$	C18:0	Estearato de metilo/octadecanoato de metilo
Ácido oleico/Ácido (Z)-octadecenoico	$R-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-CH_3$	C18:1	Oleato de metilo/9(Z)-octadecenoato de metilo
Ácido linoleico/ Ácido 9(Z),12(Z)-octadecadienoico	$R-(CH_2)_7-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_4-CH_3$	C18:2	Linoleato de metilo/9(Z),12(Z)-octadecadienoato de metilo
Ácido linolénico/ Ácido 9(Z),12(Z),15(Z)-octadecatrienoico	$R-(CH_2)_7-(CH=CH-CH_2)_3-CH_3$	C18:3	Linolenato de metilo/9(Z),12(Z),15(Z)-octadecatrienoato de metilo

Tabla 1. 5. Estructura típica de las moléculas de acilglicéridos.

Triglicéridos	Diglicéridos	Monoglicéridos

Tabla 1. 6. Composición típica de diferentes aceites vegetales empleados en la producción de biodiesel (Talebian-Kiobalaieh *et al.*, 2013).

Tipo de aceite	Especie	Composición mayoritaria de ácidos grasos
Aceites comestibles	Soja	C16:0, C18:1, C18:2
	Colza	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2
	Girasol	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2
	Palma	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2
	Cacahuete	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:0, C22:0
	Maíz	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3
	Camelina	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:1, C20:3
	Colza	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3
	Algodón	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2
	Calabaza	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2
Aceites no comestibles	<i>jatropha curcas</i>	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2
	Pangamina pinata	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3
	Mango	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2
	Palanga	C16:0, C18:0, C18:1, C18:2
	Sebo	C14:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2
	la tilapia del Nilo,	C16:0, C18:1, C20:5, C22:6, otros.
	aves de corral	C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3
Otros	WCO (aceite de cocina gastado)	Dependiente del tipo de aceite fresco empleado

Las principales ventajas que presenta el uso de biodiesel en comparación con el combustible diesel son que, principalmente, el biodiesel es renovable, emite menos sustancias peligrosas en los gases de escape, y su uso también reduce la dependencia de los combustibles a base de petróleo, con influencias significativas en la reducción de emisiones de los motores, como los hidrocarburos inquemados (68%), materia particulada (40%), monóxido de carbono (44%), óxido de azufre (100%), e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (80-90%). Mientras tanto, es más seguro para almacenar y manipular, y puede ser producido fácilmente en cantidades domésticos. Se han realizado estudios que afirman como el uso de biodiesel 100% puro (B100) es capaz de reducir las emisiones netas de dióxido de carbono en un 78,45% en comparación con el diesel del petróleo. Además, del biodiesel se dice que parte es recuperable si se tiene en cuenta el ciclo del carbono, ya que las plantas absorben parte del dióxido de carbono para el proceso de la fotosíntesis, reduciendo así la cantidad del mismo en la atmósfera (Atadashi *et al.*, 2010; Wu y Leung, 2011).

6.2. Reacción de transesterificación para la obtención de biodiesel

Hay varios métodos disponibles para obtener biodiesel a partir de aceites vegetales, mediante su uso directo sólo o mezclado, microemulsiones, craqueo térmico (pirólisis) o mediante reacciones de transesterificación (Borugadda y Goud, 2012). La reacción de transesterificación se define como una reacción de transferencia de acilo entre los triacilglicéridos que pueden contener ácidos grasos saturados e insaturados y un alcohol primario que puede ser; metanol, etanol, propanol o butanol, en presencia de un catalizador que puede ser de naturaleza química o enzimática, para producir mezclas de ésteres de ácidos grasos como producto principal y glicerol como subproducto (Leung *et al.*, 2010; Rodrigues y Fernández-Lafuente, 2010a; Poppe *et al.*, 2013; Gog *et al.*, 2012; Mazubert *et al.*, 2014). Según la estequiometría de la reacción, son necesarios 3 moles de alcohol por cada mol de triacilglicérido. La reacción entre los triglicéridos y el alcohol para producir ésteres de ácidos grasos se muestra en la **Figura 1.23**. Este proceso se lleva a cabo principalmente para reducir la viscosidad de la materia prima, que a veces puede tener valores muy elevados, no resultando adecuado su uso directo en motores diesel.

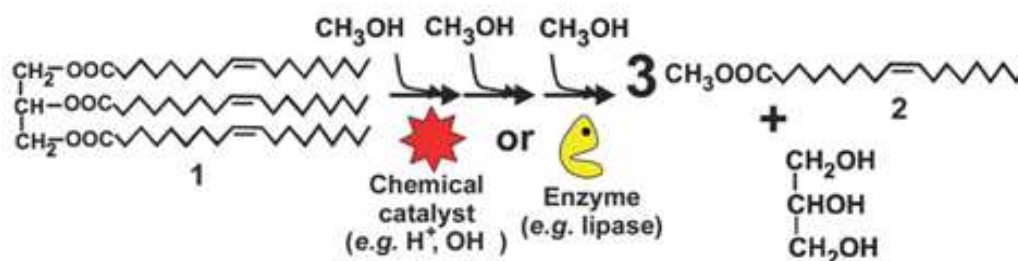


Figura 1.23. Síntesis de biodiesel por transesterificación a partir de triacilglicéridos.

Durante el proceso, las moléculas de alcohol (generalmente primario) van reemplazando en la cadena principal de glicerol a los ácidos grasos, produciendo de este modo los ésteres de alquilo de los respectivos ácidos grasos. Esta reacción química puede verse influenciada por diversos parámetros, incluyendo el contenido de ácidos grasos libres y el contenido de agua, la relación molar entre el alcohol y el aceite, el tipo de catalizador y su carga, la temperatura de reacción, la velocidad de agitación (Sharma y Singh, 2009), así como el tipo de catalizador empleado en la reacción, que pueden ser tanto de naturaleza orgánicas como inorgánica (los más comúnmente utilizados) (Leung

et al., 2010; Miao y Wu, 2006; Borugadda y Goud, 2012), y enzimas, donde la ingeniería del medio de reacción juega un papel decisivo (Fu y Vasudevan, 2009; Lu *et al.*, 2008, Rodrigues y Fernandez-Lafuente, 2010b; Gog *et al.*, 2012).

6.3. Los líquidos iónicos en la síntesis de biodiesel

Desde el punto de vista técnico, la mayor dificultad asociada a la síntesis biocatalítica de biodiesel está asociada a inmiscibilidad mutua tanto de los sustratos (triglicéridos y metanol), como de los productos (ésteres metílicos de los ácidos grasos y glicerol) de la reacción. Este hecho determina que el medio de reacción tenga una naturaleza bifásica durante todo el curso de la reacción, donde la presencia indeseada de agua, no sólo puede afectar a la selectividad y rendimiento de las reacciones catalizadas (i.e. hidrólisis, saponificación), sino también al comportamiento de fases del sistema por la aparición de emulsiones indeseadas (i.e. jabones, espumas, etc), que limitan la viabilidad del proceso, dificultando enormemente la separación entre los productos. Además, en el caso de los procesos biocatalíticos de síntesis de biodiesel, la inmiscibilidad del metanol con los aceites vegetales favorece un contacto directo de dicho alcohol con las enzimas, lo que produce una rápida e irreversible desnaturalización de dichos biocatalizadores. Es por todo ello que, la realización de los procesos catalíticos de síntesis de biodiesel en sistemas monofásicos de reacción es determinante para garantizar los máximos niveles de eficacia catalítica y de obtención de producto, habiendo sido estudiados diversos tipos de disolventes no acuosos (i.e. hexano, *t*-butanol, líquidos iónicos, $scCO_2$, etc) (Lozano *et al.*, 2011).

El tipo de disolvente también juega un papel decisivo como agente de extracción de lípidos antes de la conversión en biodiesel (Dufreche *et al.*, 2007; Johnson y Wen, 2009). Aunque los disolventes están ampliamente disponibles y se pueden obtener a un precio razonable, las cuestiones relativas a la volatilidad, toxicidad, los peligros físicos y la posibilidad de contaminación del medio ambiente hace que se pretenda reducir su uso en el futuro. A medida que la conciencia sobre el riesgo de su uso aumenta, la búsqueda de alternativas se convierte en una prioridad, es aquí donde los líquidos iónicos se presentan como alternativa más prometedora para solventar todos estos problemas. La capacidad de modular sus propiedades en función de la naturaleza de sus iones, hace que se puedan tener ILs específicos para cada tarea (TSILs) y para

diferentes aplicaciones. Las aplicaciones incluyen la sustitución de disolventes de mayor volatilidad, la purificación de gases, catálisis homogénea y heterogénea, medios de reacción biológica, y la eliminación de iones metálicos. Los ILs también están involucrados en el pretratamiento de la biomasa y la disolución de celulosa (Tadesse y Luque, 2011). Más recientemente, existe una tendencia creciente en la utilización de estos disolventes para la síntesis de biodiesel a partir de aceites vegetales y grasas animales, donde se pueden utilizar como catalizadores y/o disolventes (Ghiaci *et al.*, 2011).

El propósito de este apartado es poner de relieve la perspectiva de los líquidos iónicos como disolventes verdes en la síntesis de biodiesel. Sus propiedades se presentan para dilucidar sus ventajas sobre los disolventes orgánicos e inorgánicos convencionales. Además, también se discuten el reciclaje y la reutilización de los mismos.

La conversión de materias primas renovables se lleva a cabo a través de una reacción química para producir biodiesel, donde comúnmente se suelen emplear disolventes convencionales tanto orgánicos como inorgánicos. A pesar de que suelen ser utilizados debido a su amplia disponibilidad y bajo costo, este tipo de disolventes pueden ser una amenaza sobre el medio ambiente, especialmente por su toxicidad e inflamabilidad. Por otra parte, la disposición inadecuada de residuos que contengan estos solventes también puede dar lugar a la contaminación del medio ambiente, por esta razón los líquidos iónicos ofrecen varias ventajas sobre ellos.

La **Figura 1.24** representa varias aplicaciones de los líquidos iónicos en la producción de biodiesel.

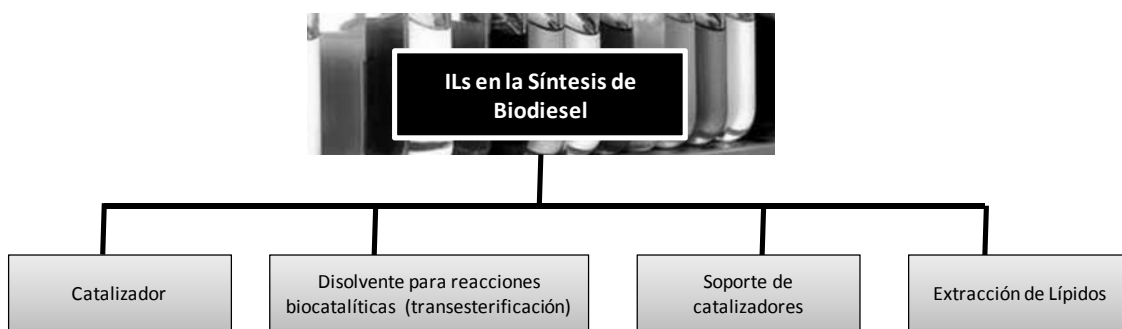


Figura 1.24. Aplicaciones de los ILs en la síntesis de biodiesel

i) ILs como catalizadores para la síntesis de biodiesel

Hay varios tipos de catalizadores que se pueden utilizar para el proceso de transesterificación, estos pueden ser catalizadores básicos (*i.e.* KOH, etc), ácidos (*i.e.* H₂SO₄, etc.) y enzimas (*i.e.* lipasas, etc), aunque son los catalizadores básicos los más preferidos debido a que el proceso puede llevarse a cabo con mayor velocidad de reacción y están disponibles a un precio más barato en comparación con los otros dos catalizadores (Atabani *et al.*, 2012). Si bien, los catalizadores homogéneos conllevan dificultades asociadas a la separación de mezclas líquidas, también es cierto que los catalizadores heterogéneos presentan los inconvenientes de que requieren condiciones más severas de operación (es decir, tiempos y temperaturas de reacción más elevados). La perspectiva de los líquidos iónicos como catalizadores en la síntesis de biodiesel parece ser prometedora. Éstos se consideran catalizadores homogéneos, porque están en la misma fase que los reactivos, y por lo tanto poseen las ventajas de los catalizadores homogéneos sobre los heterogéneos, mientras que también presentan la ventaja al igual que los catalizadores heterogéneos, de la fácil separación del producto tras acabar la reacción. Por lo tanto, mediante la combinación de estas ventajas, la aplicación de los líquidos iónicos como catalizadores en la síntesis de biodiesel ha comenzado a ganar popularidad. Además de esto, hay que sumarle las ventajas que presentan debido a su alta actividad catalítica, excelente estabilidad, fácil aislamiento del producto y los beneficios ambientales que presentan (Wu *et al.*, 2007).

La mayoría de los líquidos iónicos utilizados para la producción de biodiesel son del tipo ácidos de Brønsted (Guo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011). Aparte de esto, también se han utilizado ILs básicos (Liang *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012). Los ILs tipo ácidos de Brønsted se prefieren sobre los básicos, ya que pueden ser utilizados para el proceso de transesterificación independientemente del contenido en ácidos grasos libres de la alimentaciones, ya que no generan problemas relacionados con la formación de jabón como ocurre cuando se utilizan catalizadores básicos. Estos catalizadores requieren temperaturas de reacción moderadas para lograr considerablemente altos rendimientos de biodiesel. En cuanto a su síntesis, se ha visto como la utilización de irradiación de microondas permite la preparación de líquidos iónicos en menor tiempo y en condiciones libres de solventes, mientras que los métodos convencionales de calefacción son mucho más pesados y requieren temperaturas relativamente más altas (Martínez-Palou, 2010). Entre los métodos que se utilizan para

la caracterización de líquidos iónicos son; infrarrojos (IR), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), análisis termogravimétricos (TGA) y espectrometría de masas de ionización por electrospray (Jessop *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2010; Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010). El espectro obtenido por infrarrojos (representa la absorción molecular) y la transmisión de la radiación infrarroja, se pueden utilizar para identificar materiales desconocidos en una muestra. El método de la transformada de Fourier infrarroja (FTIR) fue utilizado por Qureshi *et al.* (2009), para determinar la acidez de Brønsted de los ILs sintetizados, para ello se recurrió a un test con piridina. El test permitió conocer los sitios ácidos de Brønsted presentes en el IL debido a la generación de una nueva banda en el espectro FTIR, simplemente debido a la formación de iones de piridinio. La prueba supuso mezclar inicialmente los ILs con la piridina, para posteriormente evaluar los cambios en las bandas del espectro de IR, observándose que los cambios producidos eran consecuencia de la coordinación entre los grupos ácidos de los ILs y la piridina. El estudio se probó para 4 ILs ácidos distintos, donde se observó para todos ellos la misma fuerza ácida de Lewis, ya que todos mostraron el mismo cambio en la banda de piridina. El test de espectroscopía de RMN puede ser utilizado no sólo para evaluar la estructura de los ILs, sino que también para conocer su reactividad. Wu *et al.* (2007) emplearon este método para verificar si los métodos de síntesis y purificación eran adecuados. La pureza determinada por el espectro de RMN- H^1 mostró purezas superiores al 95%. Joseph *et al.* (2005) caracterizaron la síntesis de un IL empleando esta técnica, y observaron que el IL podría ser ácido debido a la resonancia entre los dos nitrógenos en el anillo imidazolio. La determinación de la temperatura de descomposición mediante análisis termogravimétrico de los líquidos iónicos, es muy útil, especialmente durante su purificación, ya que esta etapa puede implicar el uso de altas temperaturas. Wu *et al.* (2007) estudiaron la temperatura de descomposición de 5 ILs, observando como en todos los casos, esta temperatura fue superior a 300°C. Stefan *et al.* (2010) utilizaron el análisis termogravimétrico para observar el comportamiento térmico de los líquidos iónicos mediante la determinación de la temperatura de la masa perdida (T_{ml}) de una serie de ILs bis(trifluorometanosulfonil)imida de N-alquil-N-alquil-pirrolidinio, las temperaturas oscilaron en un rango comprendido entre 305 a 321°C. Otros métodos han sido usados para la caracterización de ILs, entre ellos caben destacar la espectroscopía de UV-visible (Duan *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011), la cual les permitió la determinación de

la función ácida de Hammett, y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para llevar a cabo análisis térmicos (Duan *et al.*, 2006; Stefan *et al.*, 2010).

En uno de los primeros estudios en los cuales se emplearon ILs catalíticos para realizar la transformación de aceite de semilla de algodón en biodiesel, se utilizó un IL ácido de Brønsted como catalizador de la reacción (Wu *et al.*, 2007). En este trabajo se sintetizaron 5 líquidos iónicos con 3 cationes diferentes, piridinio, N-metilimidazolio y trietilamina con diferente acidez de Brønsted, y donde todos ellos presentaron en su estructura un grupo alcano con un sulfonilo, caracterizándose mediante; RMN, FTIR, ESI-MS y TGA. En la reacción de síntesis de biodiesel se obtuvieron elevados rendimientos en ésteres metílicos de ácidos grasos, siendo el que presentó un valor más alto de conversión (alrededor del 92%) el hidrogenosulfato de 1-(4-sulfonil)butilpiridinio. Esto se debió a que los ILs basados en piridinio se disocian generando el protón H^+ más fácilmente que los basados en imidazolio y en trietilamonio, lo cual se tradujo en una mayor acidez de Brønsted. Estos ILs se utilizaron en las mismas condiciones en las que se empleó H_2SO_4 concentrado, obteniéndose tras 3 horas de reacción valores muy similares. Probándose así la habilidad de estos ILs para llevar a cabo este tipo de reacciones.

Fang *et al.*, (2011) estudiaron la esterificación de ácidos grasos libres (FFA) para la producción de biodiesel empleando para ello ILs mono- y dicatiónicos (DAILs), anteriormente sintetizados y caracterizados. El análisis de acidez de Hammett, mostró como la acidez aumentó ligeramente con el incremento de la longitud de cadena entre los dicationes. Los resultados mostraron que las conversiones más altas se obtuvieron para los ILs dicatiónicos (DAILs), del 95–96% comparados con los monocatiónicos, cuyas conversiones fueros del orden 85–87%.

Lian y Yang (2010) utilizaron ILs funcionalizados con grupos $-SO_3H$ como catalizadores para la síntesis de biodiesel a partir de aceite de colza. Estos ILs ácidos, mostraron una gran acidez de Brønsted y una gran polaridad debido a los múltiples grupos funcionales de su estructura. La alta acidez condujo a una alta actividad catalítica a $70^\circ C$ (conversión entorno al 98.3% tras 7h), mientras que la elevada polaridad del IL permitió una fácil recuperación tras finalizar la reacción. Otra consideración de estos nuevos catalizadores fue, la buena estabilidad frente al agua que presentaron. Ya que al incrementarse el contenido en la misma (0.3–2.0%) decreció la actividad sólo de un 98.3 a un 95.3%.

Otra forma de utilizar estos ILs ácidos (ácidos de Brønsted), fue combinándolos con haluros de metales, donde se observó un aumento enorme en la velocidad de reacción tanto en la transesterificación como en la esterificación de ácidos grasos libres con aceite de jatrofa para la producción de biodiesel (Guo *et al.*, 2011). Para ello, se emplearon iones divalentes (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+}) y trivalentes (Fe^{3+} y Al^{3+}) en $[\text{Bmim}][\text{CH}_3\text{SO}_3]$ para favorecer la reacción de esterificación. La temperatura y la carga del catalizador se redujeron enormemente cuando se combinaron ambos ácidos (Brønsted y Lewis). La reacción de transesterificación que se llevó a cabo empleando únicamente $[\text{Bmim}][\text{CH}_3\text{SO}_3]$ sólo alcanzó el 12% de rendimiento, mientras que al emplearse este IL con Fe^{3+} este valor se incrementó en un 99.7%. Mostrándose en todo momento, mejores resultados para los iones trivalentes que divalentes debido a su mayor carácter ácido de Lewis y al mayor radio atómico del elemento.

Aunque la mayor parte de la síntesis de biodiesel se lleva a cabo empleando ácidos de Brønsted como catalizadores, los ILs básicos también pueden utilizarse como alternativa a éstos, así como ILs dicatiónicos, con excelentes resultados para la producción de biodiesel (Liang *et al.*, 2010).

ii) ILs como medios de reacción para síntesis enzimática de biodiesel

El uso de ILs en biocatálisis ofrece una mejor alternativa a los disolventes orgánicos, especialmente en la síntesis de biodiesel cuando se emplea una enzima como catalizador (Yang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011a; Zhao *et al.*, 2011). La no desactivación de las enzimas y el aumento de su estabilidad en los ILs, son dos de las principales razones por las que se prefieren estos disolventes a los orgánicos para reacciones en las que se involucran enzimas (Park y Kazlauskas, 2003).

En la **Tabla 1.7** se muestra un pequeño resumen de algunos ejemplos en los cuales se han empleado ILs como medios de reacción en la síntesis enzimática de biodiesel. A parte de tener una muy baja volatilidad que previene su vaporización a temperatura ambiente, la enzima puede también ser reciclada cuando se remplazan los disolventes orgánicos por estos nuevos disolventes.

Tabla 1. 7. ILs utilizados como disolventes en la síntesis enzimática de biodiesel.

ILs	Materia prima	Enzima	Aceptor de acilo	Ref.
[Bmim][PF ₆]	Aceite de maíz	Lipasa <i>Penicilium expansum</i> , Novozym 435, Lipozyme TLIM	Metanol	(Zhang <i>et al.</i> , 2011b)
[Bmim][NTf ₂], [Me(OEt) ₃ -Et ₃ N][NTf ₂], [Me(OEt) ₃ -Et-Im][NTf ₂], [Me(OEt) ₃ -Me-Im][NTf ₂]	Aceite Miglyol® 812	Lipasa B de <i>Candida antartica</i>	Metanol	(Zhao <i>et al.</i> , 2011)
[Bmim][PF ₆]	Aceite de maíz	Lipasa <i>Penicilium expansum</i>	Metanol	(Yang <i>et al.</i> , 2010)
[Bmim][PF ₆]	Aceite de microalgas (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>)	Lipasa B de <i>Candida antartica</i>	Metanol	(Yang <i>et al.</i> , 2010)
[Bmim][BF ₄], [Emim][TfO], [Bmp][BF ₄], [Bmp][BF ₄], [Bmp][PF ₆], [Bmim][TfO], [Bmim][NTf ₂], [Bdmim][NTf ₂], [Emim][NTf ₂], [Omim][NTf ₂], [Omim][PF ₆]	Aceite de girasol, aceite de cocina usado	Lipasa <i>Penicilium expansum</i>	Metanol	(De los Ríos <i>et al.</i> , 2011)
[Bmim][PF ₆], [Emim][PF ₆], [Hmim][BF ₄], [Bmim][BF ₄]	Aceite de girasol	Lipasa B de <i>Candida antartica</i>	Metanol	(Sunitha <i>et al.</i> , 2007)
[Bmim][PF ₆]	Trioleína	Lipasa B de <i>Candida antartica</i>	Metanol	(Ruzich y Bassi, 2010)

Ha *et al.* (2007) realizaron un estudio con 23 ILs diferentes como medios de reacción para la producción de biodiesel a partir de aceite de soja usando como catalizador lipasa B de *Candida antartica*. En sus resultados, los rendimientos más altos se obtuvieron para el IL-[Emim][TfO] (80% de rendimiento en FAMEs tras 12h de reacción). Los rendimientos fueron bastante más altos que los obtenidos para el medio libre de disolvente y para el caso en el que se empleó un disolvente común como fue el *tert*-butanol. Además, la conversión en FAMEs se mantuvo constante hasta las 24h en este IL, mientras que en el caso en el que se empleó *tert*-butanol el decrecimiento en la conversión se dio antes, tras sólo 12h de reacción. La diferencia en la actividad inicial en estos dos casos, se debió a la mayor viscosidad del IL, lo que provocó mayores limitaciones difusionales (ver **Figura 1.25**).

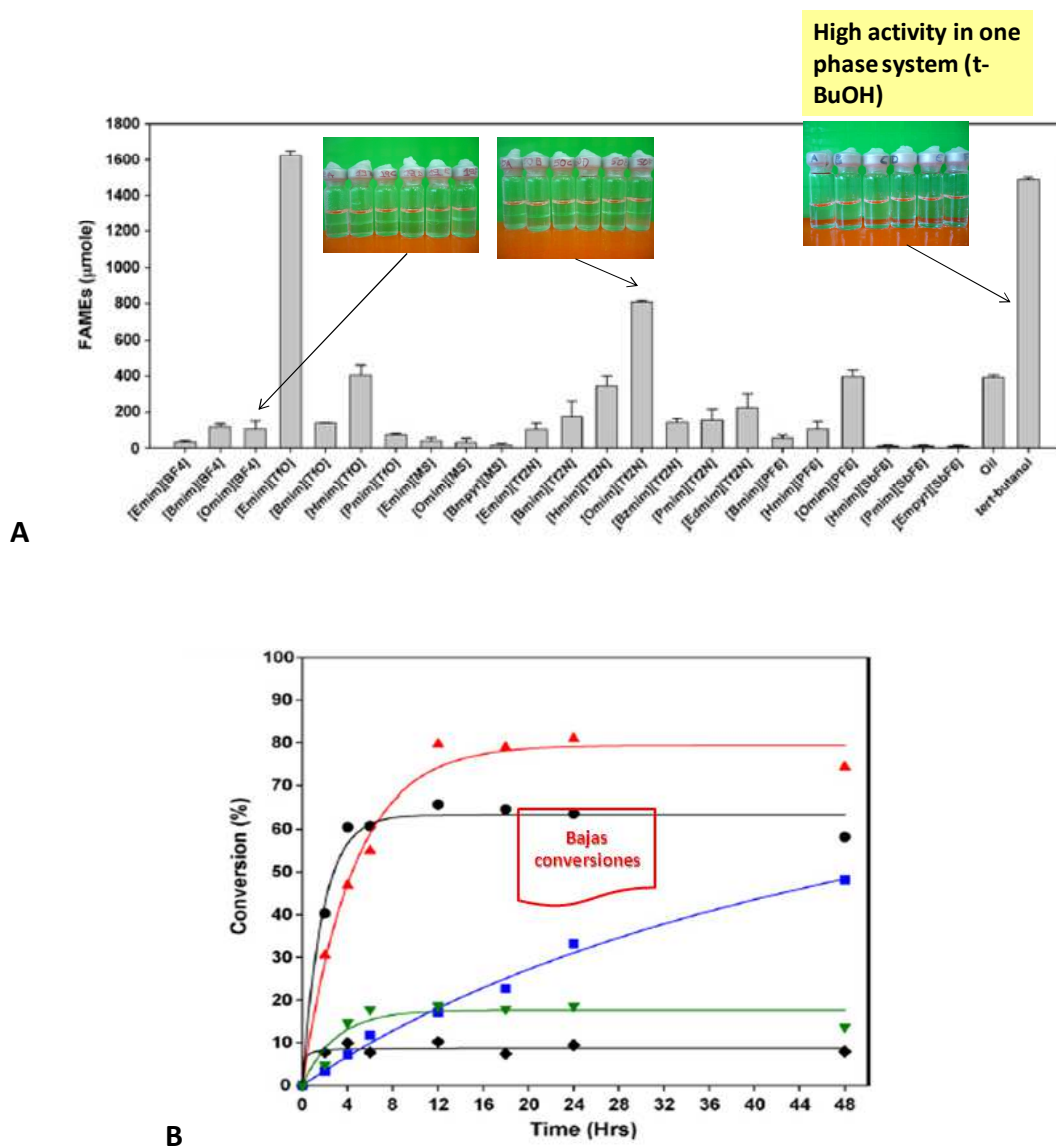


Figura 1.25. A Comparación de la producción de FAMES en 23 tipos de ILs, *tert*-butanol y sistema libre de disolvente tras 24 horas de reacción, B los perfiles de reacción para los sistemas más destacados: Sistema libre de disolvente \blacklozenge , [Emim] [MS] \blacktriangledown , [Omim] [NTf₂] \blacksquare , *tert*-butanol \bullet y [Emim] [TfO] \blacktriangle (Ha *et al.*, 2007).

Para probar la efectividad de 19 RTIL con diferentes cationes (la mayoría basados en cationes imidazolio) y aniones como disolventes en el proceso de transesterificación enzimática usando lipasa *Burkholderia cepacia* (LBS), Liu *et al.* (2013), llevaron a cabo la síntesis de biodiesel, donde se vio como el incremento en la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión (aumento de la hidrofobicidad) incrementó el rendimiento en biodiesel, lo contrario que ocurrió con el aumento de la hidrofiliidad del anión. De los RTILs ensayados, el [Ompy][BF₄] fue el que presentó mayor

rendimiento en biodiesel tras 12h de reacción ($82.2 \pm 1.2 \%$), aunque tras 3 ciclos de operación, la actividad catalítica de la lipasa disminuyó hasta un 58%. El rendimiento en este IL fue mayor que el obtenido en otros disolventes orgánicos, como el n-hexano y el *tert*-butanol, además se observó como los ultrasonidos mejoraron el proceso biocatalítico.

Sunitha *et al.* (2007) emplearon 4 ILs para llevar a cabo la síntesis de biodiesel a partir de aceite de girasol, catalizado por la lipasa B de *Candida antarctica*. Dos de ellos fueron hidrofóbicos, mientras que los otros dos fueron hidrofílicos. Las reacciones en los ILs hidrofóbicos permitieron obtener conversiones del orden del 98 % en [Bmim][PF₆] y [Emim][PF₆]. Por otro lado, los ILs hidrofílicos resultaron no ser disolventes adecuados para llevar a cabo esta reacción, en el caso en el que se empleó [Hmim][BF₄] la conversión fue tan sólo del 10 %, mientras que en el caso [Bmim][BF₄] no se detectó FAMEs. Esto se explicó teniendo en cuenta la capacidad de los ILs hidrofóbicos de proteger a las enzimas frente al metanol, pudiendo mantener la actividad catalítica de la enzima en este proceso. La incapacidad de los ILs hidrofílicos de proteger a la enzima frente a la desactivación de la lipasa por el metanol fue la razón por la que se observó tan bajo rendimiento en biodiesel.

Ruzich y Bassi (2010) utilizaron ILs hidrofóbicos ([Bmim][PF₆]) como agentes de inmovilización de enzimas (lipasa) para la producción de biodiesel. En lugar de utilizar metanol, emplearon como donador de acilo acetato de metilo, para evitar la posible inhibición de la enzima por metanol y glicerol. El IL [Bmim][PF₆] se empleó como agente de inmovilización para preservar la cantidad de agua necesaria para mantener la actividad catalítica de la enzima frente a ILs hidrofílicos. Se logró obtener un rendimiento en biodiesel entorno al 80% en presencia del IL, esto se debió a que éste fue capaz de proporcionar una gran área de contacto entre la matriz de la lipasa inmovilizada y el aceite, aumentando así la actividad catalítica. Además, la separación del producto resultó ser muy sencilla, debido a la naturaleza bifásica del sistema.

iii) ILs como soportes para catalizadores de la síntesis de biodiesel

Los ILs han demostrado ser excelentes soportes para catalizadores en la síntesis de biodiesel. Generalmente, los catalizadores están unidos dentro del soporte, el cual les

proporciona sitios específicos para que tenga lugar la reacción. La reacción puede incrementar su velocidad debido a la mayor área de contacto, sobre todo cuando se utilizan materiales porosos. El catalizador debe de ser inerte en las reacciones catalíticas. Existen muchos ejemplos de catalizadores sólidos usando como soportes en la producción de biodiesel por ej., sílice (Samart *et al.*, 2010) y zeolitas (Suppes, 2004). Estos soportes a parte de las ventajas anteriormente mencionas hacen posibles el reciclaje del catalizador para sucesivos utilizadores.

Abreu *et al.* (2005) compararon la efectividad de los ILs como soportes frente a fases sólidas orgánicas para complejos de estaño en la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales. El IL utilizado fue [Bmim][PF₆], mientras que el anclaje de los complejos de estaño se realizó previamente a los procesos de transesterificación. Tras finalizar la reacción, se formaron sistemas trifásicos en los cuales la capa superior fue el biodiesel, la capa intermedia contenía agua y compuestos hidroxilados, y la capa inferior contenía el IL. La actividad catalítica del catalizador bajó drásticamente después del segundo ciclo de 58 % a casi no presentar actividad después del segundo ciclo. El anclaje del catalizador de la fase líquida fue la causa de la bajada tan drástica de la actividad catalítica.

Lapis *et al.* (2008) estudiaron la producción biodiesel a partir de aceite de soja mediante catalizadores ácidos y básicos soportados en ILs. Probaron diferentes ILs, resultando ser el más eficiente el [Bmim][NTf₂] dando un rendimiento en biodiesel del 99% tras sólo 0.5h, usando catalizadores básicos. La descomposición de los ILs [Bmim][PF₆] y [Bmim][BF₄] fue detectada tras 2-3 horas. La reacción de transesterificación a partir de aceite de soja también fue desarrollada con éxito cuando se empleó ácido sulfúrico como catalizador. El uso de n-butanol y alcohol isoamílico lograron conversiones de biodiesel comparables con las obtenidas usando metanol. El uso de ácidos de Lewis para procesos de transesterificación también produjo rendimientos próximos al 99 %, pero fueron necesarias 13h de reacción.

iv. Extracción de lípidos con ILs

La extracción líquido-líquido (ELL) es un proceso importante en química analítica, el cual involucra la separación de compuestos basados en su solubilidad relativa. Los disolventes orgánicos convencionales usados en procesos de ELL generan

grandes desventajas, como son la inmiscibilidad con agua, bajos puntos de ebullición e inflamación, y alta toxicidad. El potencial de los ILs como sustituyentes de los disolventes orgánicos en química analítica está siendo exhaustivamente investigado, debido a su baja inflamabilidad y casi nula volatilidad, así como a sus genuinas propiedades como son, su polaridad e hidrofobicidad modulables con el cambio de cationes y aniones. La extracción de lípidos es esencial para la producción de biodiesel a partir de microalgas. El aceite es extraído comúnmente de biomásas de microalgas utilizando extracción mediante Soxhlet con hexano antes de producir biodiesel (Ahmad *et al.*, 2011). Otros disolventes adecuados para la extracción de aceite son; el éter de petróleo, etanol o mezclas de etanol-hexano. El problema de la utilización de etanol es que también extrae otros componentes que son indeseables para el propósito de la reacción, como azúcares, proteínas y pigmentos (Mata *et al.*, 2010). Por lo tanto, la capacidad de los ILs como medio de extracción ha sido objeto de amplio estudio con la finalidad de aumentar la eficiencia del proceso.

Young *et al.* (2010) estudiaron la capacidad del metil-sulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim][CH₃SO₄]) para la extracción de lípidos a partir de diversas biomásas. En su estudio, se emplearon diversas mezclas de [Emim][CH₃SO₄] con diferentes moléculas covalentes polares (MCP) para la extracción de lípidos a través de biomásas de microalgas (*Chlorella sp.* y *Dunaliella sp.*). El IL se seleccionó por su baja viscosidad, inmiscibilidad con lípidos y solubilidad con las MCPs. El rendimiento en extracción de lípidos en los diferentes tipos de biomásas se encontró dentro de los valores encontrados en la literatura y contractado en diferentes laboratorios independientes, donde el rendimiento más elevado se obtuvo con el aceite de semillas de jatrofa (49.9% lípidos extraídos). La polaridad dual de los ILs (hidrofobicidad e hidrofiliidad) sugieren que los lípidos pueden difundirse a través de los ILs lo que permite la extracción de los mismos de las muestras de biomásas. Kim *et al.* (2012) usaron diversos ILs para la extracción de lípidos de microalgas de *Chlorella vulgaris*. La efectividad de los ILs para la extracción de lípidos fue comparada con la tradicional. El [Bmim][CF₃SO₃] permitió obtener la mayor cantidad de lípidos, incluso mayor que la obtenida con el “Método de extracción de lípidos de Bligh y Dyer”. Sugiriéndose que la estructura del anión, y la hidrofobicidad o hidrofiliidad de los ILs influyen en la eficiencia de la extracción de lípidos.

v. Recuperación y reutilización de líquidos iónicos

El reciclaje de los ILs es uno de los factores más importantes que pueden influir en su utilización en las industrias, especialmente cuando se llevan a cabo aplicaciones a gran escala. Uno de los principales inconvenientes para hacer esto posible es el precio de los ILs, los cuales son muy costosos si los comparamos con los disolventes tradicionales, estos suelen ser de 2-100 veces más caros (Plechkova y Seddon, 2008). Aunque esto suponga una brecha muy grande en el uso de los ILs en comparación con los disolventes orgánicos, una opción para compensar este inconveniente, es poder garantizar que es posible la reutilización de los mismos después de su uso, garantizando además la reducción de su impacto medioambiental. Por ejemplo, la producción de biodiesel actualmente se lleva a cabo descartando el catalizador tras su uso, especialmente cuando se usa en fase homogénea (*i.e.* KOH). Debido a la extensa producción de biodiesel a escala industrial, el catalizador es raramente reutilizado debido al elevado coste de este proceso. Los catalizadores homogéneos, como la sosa o el ácido sulfúrico son eliminados del biodiesel usando grandes volúmenes de agua de lavado durante el proceso, lo que supone un deterioro medioambiental si éstas no son depuradas, o un incremento en el coste de producción del biodiesel, cuando se realiza dicha depuración.

La naturaleza de los ILs empleados afecta enormemente al reciclaje del proceso. Wu *et al.* (2009) enfatizaron que la recuperación de ILs hidrofílicos es más difícil que la de los ILs hidrofóbicos, ya que con el uso de la tecnología de membranas, su recuperación resulta sencilla, habiendo sido ya empleada a escala industrial. Los ILs hidrofóbicos son preferidos en síntesis química por su capacidad de formar diferentes fases tras finalizar las reacciones. Según Ruzich y Bassi (2010), en la síntesis de biodiesel empleando unos determinados ILs, éstos formaron dos fases tras finalizar la reacción, donde la fase superior contenía el biodiesel y los sustratos no reaccionados. La adición de agua creó otra fase entre las dos fases ya existentes, permitiendo una separación más sencilla de los productos. Por otro lado, al emplearse ILs miscibles en agua, no se pudo separar la fase acuosa, lo cual hizo de la separación una operación más difícil. La adición en estos casos de sales de potasio, pudo inducir la formación de sistemas bifásicos, permitiendo una separación de los productos más sencilla (Gutowski *et al.*, 2003). Por otro lado, la adición de sacarosa también permitió la generación de dos fases, lo que permitió un reciclaje más sencillo del IL (Wu *et al.*, 2008).

7. Líquidos iónicos en la síntesis enzimática de fragancias

La síntesis de compuestos aromáticos y de fragancias de elevado valor añadido es una de las mayores aplicaciones de los procesos de esterificación catalizados por lipasas o reacciones de transesterificación (**Figura 1.26**).

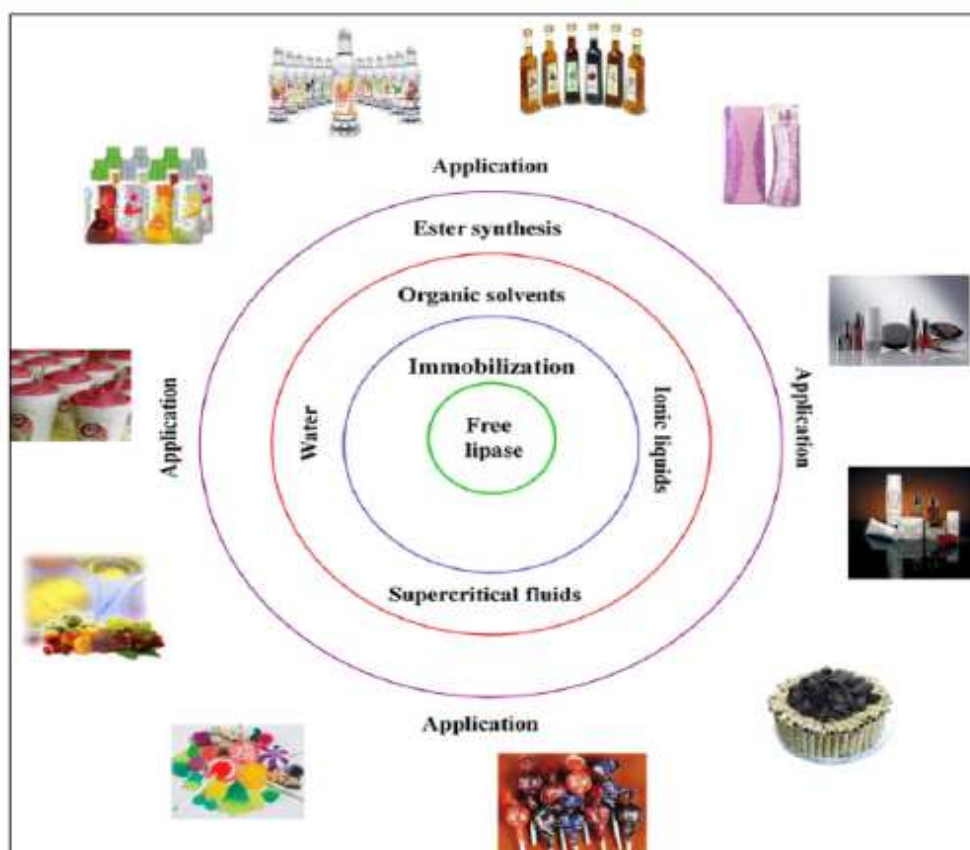


Figura 1.26. Aplicaciones industriales de los ésteres aromáticos y de las fragancias (Dhake *et al.*, 2013).

Las esencias y perfumes son de los aditivos más utilizados para los alimentos, bebidas, industria farmacéutica y el cuidado personal (Bansal y Roth, 2000; Jaeger y Eggert, 2002; Lozano, 2010; Wohlgemuth, 2010). La demanda mundial de aromas y fragancias, incluyendo sus mezclas, así como aceites esenciales, excepto los extractos naturales y productos químicos aromáticos, se espera que aumente a \$ 23,5 mil millones en este año 2014. Aunque la mayoría de los aromas, sabores y fragancias se pueden obtener por síntesis química, el mercado de estos productos obtenidos a partir de fuentes naturales presenta una incrementada demanda año a año, y su valor añadido es muy

superior al de los productos de síntesis (Serra *et al.*, 2005; Athawale *et al.*, 2003; Claon y Akoh, 1994). Por esta razón la catálisis enzimática se presenta como una metodología que puede resultar útil para la síntesis de estos aromas o de fragancia quirales que sería difícil obtenerlas utilizando las rutas químicas sintéticas convencionales. Debido al carácter quimio-, regio- y estereoselectivo de las enzimas, éstas proporcionan una posible vía para la síntesis *in vitro* de enantiómeros individuales existentes en la naturaleza. Además, la síntesis de estos ésteres aromáticos mediante lipasas proporciona un producto que es "verde", ya que los procedimientos biocatalíticos resultan benignos para el medio ambiente. Mediante esta vía, varias nuevas moléculas aromáticas han sido sintetizadas mediante el diseño racional basado en la forma y el grupo funcional (Wolfson, 2005).

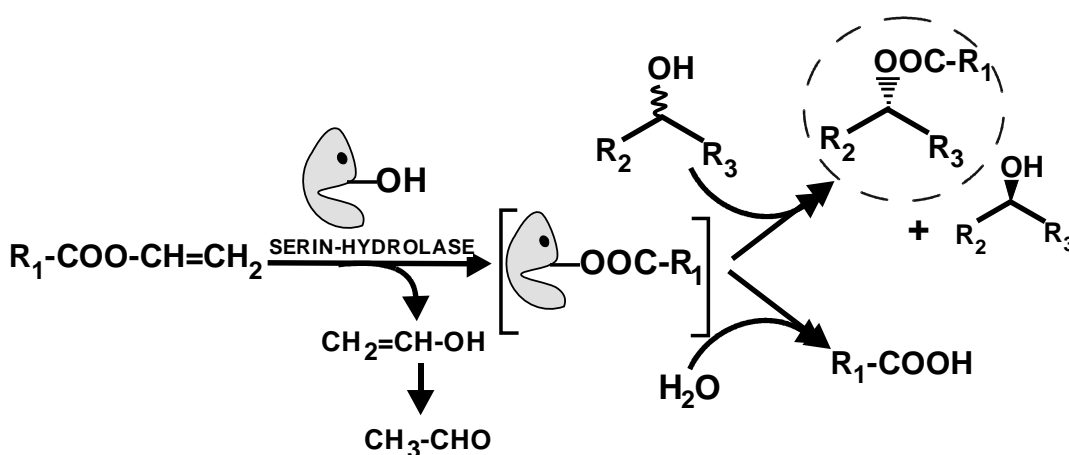


Figura 1.27. Resolución cinética de alcoholes secundarios catalizada por serin-hidrolasas, utilizando ésteres de vinilo como donadores de acilo.

La síntesis de ésteres catalizada por lipasas generalmente se puede realizar por esterificación o por transesterificación. En relación a la reacción de esterificación, hay que tener en cuenta que la molécula de agua que se libera como producto secundario, tiene un alto potencial para revertir la reacción. Por lo tanto, la eliminación de la misma de la mezcla de reacción se convierte en un factor crucial. Varios enfoques tales como el uso de agentes deshidratantes, tamices moleculares, membranas especializadas, y zeolitas han sido propuestos en la literatura (Fehér *et al.*, 2009; Fonteyn *et al.*, 1994). Por otro lado, en lo referente a la reacción de transesterificación catalizada por lipasas, el donador de acilo más comúnmente utilizado es acetato de vinilo (Lozano, 2010). Durante la reacción, el alcohol vinílico se libera como producto secundario y se

tautomeriza para formar acetaldehído, desplazándose el equilibrio de la reacción hacia la formación de productos (**Figura 1.27**). Pero se ha encontrado que, el acetaldehído es un potente inhibidor para algunas lipasas, tales como la lipasa de *Candida rugosa* (CRL), porque forma una base de Schiff con los grupos amino de la superficie de la misma (Weber *et al.*, 1997). Sin embargo, esta limitación se puede subsanar mediante el empleo de diferentes estrategias, tales como la inmovilización, el control de la actividad de agua, el uso de diferentes medios de reacción, etc., en exclusiva o en combinación. La resolución cinética y la resolución cinética dinámica catalizada por lipasas o lipasas y catalizadores químicos para la obtención de aromas/fragancias, esta vez quirales, es la tercera vía más utilizada.

En este marco, los líquidos iónicos (ILs) tienen varias ventajas en comparación con los medios de reacción convencionales. En lo referente a las reacciones orgánicas se ha visto como proporcionan rutas sintéticas más benignas para el medio ambiente (Lozano, 2010; Marsh *et al.*, 2004). Por sus características, los ILs han demostrado ser excelentes medios no acuosos para llevar a cabo reacciones biocatalíticas, siendo el principal problema o reto para ambas reacciones en estos nuevos medios de reacción el aislamiento de los productos de la mezcla de reacción, tema que actualmente está siendo considerado por varios grupos de investigación, siendo una de las soluciones planteadas la extracción con disolventes. El grupo de Sheldon estudió la síntesis de ésteres no enantioselectiva utilizando CALB en medio líquido iónico ([C₄mim][PF₆] y [C₄mim][BF₄]), donde se vio como aumentó la actividad de la lipasa en presencia de líquidos iónicos en comparación con disolventes orgánicos (Madeira Lau *et al.*, 2000). En 2001, Itoh *et al.* (2001, 2002) y Schofer *et al.* (2001) publicaron de forma independiente sobre la primera reacción enantioselectiva catalizada por lipasa en líquidos iónicos. Más tarde, Lozano *et al.* (2003a) estudiaron la síntesis biocatalítica de diferentes ésteres alifáticos por CALB en distintos ILs.

El contenido en agua se ha visto como desempeña un papel vital en la actividad de la lipasa con independencia de si el medio de reacción es un disolvente orgánico o líquido iónicos (Ma *et al.*, 2002). Barahona *et al.* (2006) investigaron la influencia de la actividad de agua en la esterificación de geraniol con ácido acético catalizada por CALB en [C₄mim][PF₆]-IL donde fue bastante necesaria la eliminación de agua para obtener el máximo rendimiento. Además, para los ILs, la naturaleza del catión/anión se ha visto también como desempeñó un papel crucial en la actividad de la enzima y por lo

tanto, en última instancia influyó en el rendimiento del producto deseado (Itoh *et al.*, 2001; Lozano *et al.*, 2003; Schöfer *et al.*, 2001).

Para obtener algunas mejoras en el rendimiento y en la separación de los ésteres, se planteó un nuevo enfoque planteando un sistema bifásico usando un alcohol o un disolvente y un IL hidrofóbico. Feher *et al.* (2008) estudiaron la producción enzimática en un sistema bifásico para la producción de acetato de isoamilo en $[C_4mim][PF_6]$ catalizada por la lipasa CALB inmovilizada en un micro-reactor en forma- ψ que funcionaba en modo continuo donde el sistema bifásico empleado fue; dicianamida de 1-butil-3-metilpiridinio – *n*-heptano. Pero fueron Pohar *et al.* (2009) los que demostraron como la zona interfacial líquido iónico- *n*-heptano resultó ser altamente eficiente para la esterificación simultánea y retirada del producto. Los rendimientos fueron tres veces mayores debido a la dinámica de reacción-difusión altamente eficientes en el sistema de micro-canales y a la extracción de productos simultánea (que minimizó la inhibición del producto final). Otro enfoque empleado para la síntesis de acetato de isoamilo fue un reactor semi-continuo empleando también un sistema bifásico líquido iónico-alcohol, donde se utilizaron zeolitas de adsorción para la eliminación de agua y per-evaporación a través de membranas que se utilizó para la eliminación selectiva del alcohol isoamílico (Fehér *et al.*, 2009). Por lo tanto, la estrategia aplicada del sistema bifásico, el uso de zeolitas y el uso de membranas ha hecho del proceso enzimático un proceso más eficiente. Además del sistema bifásico, se ha estudiado la utilización de una pequeña cantidad de líquido iónico para el recubrimiento de CaLB con el objetivo de mejorar tanto la actividad enzimática, como la estabilidad durante la síntesis de ésteres de citronelilo (Lozano *et al.*, 2007).

Además, en lo referente a la síntesis de fragancias, la esterificación enantioselectiva de (\pm)-mentol usando CRL en líquidos iónicos ($[C_4mim][PF_6]$ y $[C_4mim][BF_4]$) se ha logrado desarrollar con éxito empleando anhídrido propiónico como agente de acilación (Zhang *et al.*, 2008). La alta conversión de (\pm)-mentol (47,5%) y una mejor selectividad enantiomérica del propionato de (-)-mentilo (86%), se obtuvo incluso a una baja concentración de ácido anhídrido en medio líquido iónico. Por otra parte, durante la incubación en el líquido iónico, la actividad de CRL se incrementó 2,5 veces más que su valor inicial, reciclándose también de manera más eficiente. Además de estos ejemplos, existen varios artículos sobre el desarrollo de nuevas metodologías, del diseño de nuevos líquidos iónicos, y el uso de diferentes

lipasas para la síntesis de ésteres aquirales y quirales en ILs (Moniruzzaman *et al.*, 2010; Sureshkumar y Lee, 2009). Sin embargo, la preocupación actual reside en la separación de los reactivos y productos del ILs, ya que, sobre todo, porque el empleo de disolventes orgánicos empaña el carácter verde de la utilización de estos medios.

8. Fluidos supercríticos y procesos biocatalíticos

8.1. Propiedades de los fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico (SCF) es un componente, mezcla, o elemento que se encuentra por encima de su temperatura (T_c) y presión críticas (P_c), donde los fluidos se comportan como híbridos entre un líquido y un gas, es decir, puede difundir como un gas, y con valores de viscosidad y propiedades de solvatación similares a los de una amplia gama de disolventes orgánicos. El punto crítico representa los valores de temperatura y presión más elevados en los que una sustancia puede existir en forma de vapor y de líquido en equilibrio. Los SCF se caracterizan por el amplio rango de densidades que pueden adoptar, ya que por encima del punto crítico, pequeños cambios en la presión o la temperatura provocan grandes cambios en su densidad. La posibilidad de manipular las propiedades físicas de estos disolventes por simple cambio en su presión o temperatura, es genuina para estos fluidos, lo cual demuestra el enorme abanico que se abre en el campo de la extracción, reacción, fraccionamiento y procesos analíticos. Además, a esto se junta la característica de ser medioambientalmente benignos, debido a la facilidad por la que pueden ser recuperados y reutilizados, desarrollo de procesos alternativos más limpios, permitiendo así la sustitución total o parcial de los disolventes COV más comúnmente usados (Beckman, 2004; Keskin *et al.*, 2007; Domínguez, 2012). En la **Tabla 1.8** se muestran los parámetros críticos de algunos fluidos comúnmente usados en condiciones supercríticas.

Varios criterios se deben considerar antes de seleccionar un SCF dado como medio para una biotransformación, incluyendo los parámetros críticos, la seguridad y las ventajas de costos. El dióxido de carbono supercrítico ($scCO_2$) es el SCF más popular debido a sus parámetros críticos relativamente bajos, baja toxicidad y no inflamabilidad, por otro lado, es químicamente inerte en la mayoría de las condiciones, tiene excelentes propiedades solventes para solutos no polares, y se considera como un disolvente verde. El dióxido de carbono es claramente un "gas de efecto invernadero",

sin embargo, es producido masivamente como subproducto a escala industrial (por ejemplo, plantas de amoníaco), y por lo tanto es barato.

Tabla 1. 8. Fluidos usados en condiciones cercanas a las supercríticas o supercríticas para biocatálisis y sus parámetros críticos.

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

Por otra parte, a la presión atmosférica, el CO₂ es gaseoso, lo que significa que es muy sencilla la despresurización para separar los solutos del scCO₂, después de lo cual se puede presurizar para su reutilización como un disolvente. El poder disolvente del scCO₂ se puede modificar mediante el aumento de la densidad a granel o mediante la adición de un modificador (*i.e.* metanol, acetona, etc.). Por lo tanto, la adición de codisolventes se puede utilizar para aumentar o reducir la polaridad, o para mejorar la afinidad de las sustancias aromáticas, aunque, por supuesto, el uso de los mismos, disminuye el carácter verdaderamente verde del scCO₂. La limitación más importante para la aplicación de los FSC a cualquier escala de procesos es el hecho de que el equipo de alta presión que se necesita es bastante costoso (Keskin, 2007; Lozano, 2010).

La alta eficacia catalítica de los catalizadores porosos químicos (por ejemplo zeolitas) en FSC ha sido ampliamente estudiada, principalmente se ha visto que cuando los sitios activos estaban colocados dentro de la estructura interna del catalizador, debido a la mayor transferencia de masa de reactivos dentro de la estructura porosa. Además, muchos de los avances hechos en este campo muestran como la catálisis en

FSC ha mejorado la vida media del catalizador debido a la eliminación de sustancias no deseadas que provocaban su envenenamiento. Por ejemplo, la alquilación de benceno con eteno en zeolitas de tipo Y (250 a 285 °C, 7-8 MPa) en scCO₂ reveló una desactivación del catalizador mucho menor, mayores velocidades de reacción, y una mayor selectividad. La baja desactivación del catalizador se atribuyó a la eliminación de compuestos poliaromáticos, considerados como precursores del coque, de la superficie por un aumento en la solubilidad y difusión de los sustratos.. Además de la posibilidad que permiten estos medios de reacción de mantener el sistema catalítico por más tiempo, también proporcionan un importante beneficio económico (Beckman, 2004). De esta manera, y debido a su baja viscosidad y alta difusividad, el scCO₂ proporciona un modo de trabajo limpio, eficaz y continuo dentro de las estructuras del catalizador poroso. El excelente rendimiento del catalizador químico heterogéneo en condiciones supercríticas se ha observado en muchas reacciones catalíticas, por ejemplo, en la Fisher-Tropsh, hidroformilación, hidrogenación, reacciones de Heck, reacciones de Suzuki, oxidaciones y reacciones de alquilación), e incluso en forma continua (Jessop y Leitner, 1999).

En cuanto a la biocatálisis, es conocido que las proteínas son insolubles en todos los FSC, lo que permite su sencilla recuperación y reutilización, mientras que la alta difusividad de gas y las bajas viscosidades de los FSC, mejoran las difusividades de los reactivos al sitio activo de las enzimas. Las lipasas y esterasas en scCO₂ son los sistemas más ampliamente estudiados, debido a la alta promiscuidad catalítica de estas enzimas por sustratos hidrófobos y la capacidad de estos FSCs en la disolución y transporte de los mismos. La síntesis de ésteres alifáticos de diferentes longitudes de cadena alquílica mediante esterificación y/o transesterificación (*i.e.*, mediante alcoholólisis, acidólisis o interesterificación) son enfoques habituales aplicados a la producción de compuestos terpénicos destinados a saborizantes (*i.e.*, acetato de geranilo), la modificación y/o de valorización de aceites y grasas (es decir, enriquecimiento de acilglicéridos con ácidos grasos poliinsaturados, etc.). Actualmente, el uso de lipasas para la síntesis asimétrica de ésteres es una de las herramientas más importantes para los químicos orgánicos, donde la combinación de las propiedades únicas del scCO₂ con la excelencia catalítica de las lipasas ha permitido la resolución cinética (dinámica) de un gran número de racematos (*ie*, *rac*-1 - feniletanol, etc.). Sin embargo, el carácter químicamente inerte del CO₂ podría ser puesto en duda en cuanto a

su interacción con las proteínas., ya que el CO₂ en forma de carbamatos puede reaccionar con los grupos ε-amino de residuos de lisina colocados en la superficie de la enzima disminuyendo el pH de la capa acuosa alrededor de la enzima, lo que puede traducirse en una disminución significativa en la actividad de la misma (Kamat *et al.*, 1995; Lozano *et al.*, 2004a,b,c).

Los fluidos supercríticos se han usado ampliamente como disolventes en la extracción de productos naturales y en la síntesis y procesamiento de materiales (Cansell y Aymonier, 2009; Kendall *et al.*, 1999). En general, las propiedades que presentan estos disolventes hacen de ellos un medio extremadamente atractivo para llevar a cabo reacciones químico o/y biocatalíticas y son:

- *Reducción de transferencia de masa*; la alta difusividad y la baja tensión superficial hace que disminuyan las limitaciones de transferencia de masa interna para los catalizadores heterogéneos químicos y bioquímicos (Baiker, 1999; Ciriminna *et al.*, 2008).
- *Propiedades modulables con la presión y la temperatura*; el poder de solvatación de un FSC depende fuertemente de la densidad. Mediante la presión y la temperatura es posible controlar este parámetro, lo que permite una manipulación selectiva del poder solvatante del mismo. Es posible, por tanto, diseñar condiciones de modo que el fluido pueda extraer un soluto en particular, incluso de una mezcla, simplemente, modificando el poder solvatante, produciendo así *beneficios al proceso* (Bourne *et al.*, 2007). Igualmente, los parámetros típicos de los disolventes tales, como la constante dieléctrica, la densidad, la difusividad o la viscosidad del FSC pueden causar un considerable efecto modular sobre la quimio-, regio- y estereoselectividad de la química aportando *beneficios químicos* a las reacciones (Nunes Da Ponte, 2009; Pereda *et al.*, 2009).
- *Parámetros supercríticos moderados*; Tanto los valores de las presiones críticas como de las temperaturas críticas de la mayoría de los SCFs utilizados, *i.e.* CO₂ (31 °C, 73.8 bar), etano (32 °C, 48.8 bar), propano (97 °C, 42.4 bar) y fluoroforno (25.9 °C, 46.9 bar), no son de una magnitud suficiente como para dañar los biopolímeros o biomoléculas “lábilés”.

- *Productos exentos de trazas de disolvente*; el uso de FSCs no presenta el problema de la eliminación de los residuos de disolvente del producto de reacción, debido a que éstos son generalmente gases en condiciones atmosféricas. En particular, su baja toxicidad los hace atractivos como medios de reacción alternativa tanto para productos alimenticios como para los farmacéuticos.

De acuerdo con sus propiedades modulables excepcionales, los FSCs han surgido como sustitutos de los disolventes tradicionales en el desarrollo de procesos químicos más benignos con el medio ambiente. Las reacciones con FSCs ofrecen oportunidades únicas, no sólo reemplazando a los disolventes orgánicos convencionales peligrosos, sino también porque permiten optimizar y controlar el medio de reacción modificando las propiedades del disolvente (temperatura, presión y densidad). Esto permite una fácil manipulación de la velocidad de reacción, la eliminación o disminución de las limitaciones difusionales, y la facilidad en la separación de reactivos y los productos. Es por ello que se han desarrollado un gran número de procesos químicos, tanto en el laboratorio como a nivel industrial, utilizando los FSCs como medio de reacción (Beckman, 2004; Rayner, 2007).

8.2. Biotransformaciones en scCO₂, sistemas bifásicos ILs/scCO₂ y SIILPs/scCO₂ (ver Anexo I)

Desde 1985, el uso de fluidos supercríticos como medios de reacción no acuosos para la catálisis enzimática ha sido un área activa de investigación (Habulin *et al.*, 2007; Hobbs y Thomas, 2007; Knez, 2009; Mesiano *et al.*, 1999). A pesar de que muchas enzimas (por ejemplo, lipasas, tripsina, quimotripsina, penicilina acilasa, colesterol oxidasa, etc.) son capaces de catalizar muchas transformaciones químicas (por ejemplo, esterificación, hidrólisis, alcoholólisis, etc.), se ha demostrado cómo la actividad de la enzima está ampliamente afectada por la naturaleza del FSC. Por ejemplo, se observó como la actividad de la lipasa en la síntesis de butirato de etilo por esterificación fue mayor en propano cerca del punto crítico que en scCO₂, lo que se atribuyó a la capacidad del CO₂ para despojar a las moléculas de agua esenciales del microambiente de la enzima (Habulin y Knez, 2001). Además, el carácter químicamente inerte del CO₂ podría ser puesto en duda en lo referente a su interacción con las proteínas. El CO₂

puede formar carbamatos con los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina colocados en la superficie de la enzima, provocando la disminución del pH de la capa acuosa alrededor de ella. En un estudio reciente, se vio la influencia de la temperatura, el tiempo de exposición y la presión del CO₂ y del propano en la estructura secundaria de la peroxidasa de rábano picante (HRP) mediante dicromismo circular en UV (Fricks *et al.*, 2009). En este trabajo se mostró como en disoluciones acuosas de enzimas con propano no se indujeron cambios en el contenido de la estructura secundaria de la HRP, resultando en una buena estabilidad. Lo contrario ocurrió cuando la incubación se llevó a cabo con CO₂, donde tuvo lugar una significativa pérdida de actividad. Sin embargo, estudios realizados con el derivado sólido comercial HRP mostraron como la actividad no decreció al tratarla con CO₂ o propano presurizado, aunque el tratamiento en ambos disolventes provocó la pérdida de estructura secundaria. Todos estos hechos permitieron dar paso a la frase final de la revisión realizada por Beckman y Russel en 1999, “...las ventajas de remplazar los disolventes orgánicos convencionales con fluidos supercríticos todavía no ha sido completamente demostrada” (Mesiano *et al.*, 1999).

Desde el 2000, muchas han sido las estrategias que se han planteado para proteger las enzimas de los efectos adversos del scCO₂, por ejemplo, uniones covalentes de polímeros hidrofóbicos al soporte (Lozano *et al.*, 2002b), el recubrimiento de enzimas libres con silicatos hidrofóbicos mediante un enfoque sol-gel (Kawakami *et al.*, 2009), el atrapamiento de las enzimas en gel de sílice y el uso de agregados enzimáticos reticulados (Hobbs *et al.*, 2006).

Tabla 1. 9. Algunos ejemplos de productos sintéticos obtenidos por acción de lipasas en scCO₂.

Productos	Condiciones de reacción	Rendimiento (%)	Ref.
Butirato de etilo	40 °C, 100 bares, 24h	30	(Habulin y Knez, 2001)
Butirato de (R)-2-fenil-1-propilo	40 °C, 100 bares	-	(Vidinha <i>et al.</i> , 2006)
Acetato de (R)-1-feniletilo	50 °C, 100 bares	44 (>97 %ee)	(Hobbs <i>et al.</i> , 2006)
Oleato de etilo	40 °C, 100 bares, 3h	95	(Habulin y Knez, 2001)
Butirato de butilo	40 °C, 90 bares, 3h	100	(Lozano <i>et al.</i> , 2004)
Ésteres etílicos de ácidos grasos	30-70 °C, 50-150 bares	80	(Dalla Rosa <i>et al.</i> , 2009)
Acetato de (R)-1-deniletilo	42 °C, 130 bares	48 (> 99 %ee)	(Matsuda <i>et al.</i> , 2004)
Acetato de (R)-1-deniletilo	50 °C, 200 bares, 6h	48 (> 99 %ee)	(Celia <i>et al.</i> , 2005)

Las lipasas en scCO_2 son los sistemas más ampliamente estudiados, debido a su promiscuidad catalítica hacia sustratos hidrofóbicos, añadida la capacidad de estos fluidos supercríticos de disolver y transportar estos sustratos (Hobbs y Thomas, 2007; Knez, 2009; Mesiano *et al.*, 1999). En consecuencia, la síntesis de ésteres por esterificación o transesterificación (*i.e.* alcoholólisis, acidólisis o transesterificación) son los procesos enzimáticos en scCO_2 más comunes (ver **Tabla 1.5**), habiendo sido aplicado a la modificación de aceites y grasas, incluida la producción de biodiesel.

El scCO_2 tiene efectos adversos sobre la actividad enzimática debido a la modificación química de los grupos amino libres, los cambios locales de pH causados por el CO_2 , o los cambios conformacionales producidos durante las etapas de presurización/despresurización, haciendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias de estabilización de la enzima (Kamat *et al.*, 1995). La combinación de líquidos iónicos y scCO_2 podría resolver los problemas suscitados por el scCO_2 como medio de reacción debido a esta propiedad de los ILs de estabilizar la actividad de la lipasa. Algunos ILs han demostrado ser, con diferencia, el mejor medio no acuoso para llevar a cabo reacciones catalizadas por enzimas, no sólo porque las enzimas muestran un alto nivel de actividad y estereoselectividad para muchas transformaciones químicas diferentes, como por ejemplo, la síntesis de ésteres alifáticos (Lozano *et al.*, 2003a y 2008), la resolución cinética de alcoholes racémicos (Bogel-Lukasik *et al.*, 2008), la síntesis de ésteres de hidratos de carbono (Park y Kazlauskas, 2008), etc., sino que por su enorme efecto sobreestabilizador en los biocatalizadores (tiempo de vida media entorno a 2.300 veces superior a los disolventes orgánicos clásicos) (Lozano *et al.*, 2001; Persson y Bornscheuer, 2003). En estos sistemas, las lipasas se suspenden principalmente en la fase IL, lo que les permite mantenerse estables durante la etapa catalítica. Lozano *et al.* (2003) descubrieron como las lipasas permanecían activas incluso en condiciones extremadamente duras (*i.e.* 150°C y 10MPa). Sin embargo, también se ha visto que la actividad de las lipasas en la síntesis de propionato (R)-1-feniletilo en sistemas ILs/ scCO_2 fue de 9 a 10 veces superior que la observada en scCO_2 , así como también fue bastante mayor la vida media del biocatalizador (Lozano *et al.*, 2002). En un trabajo reciente realizado por Monhemi *et al.* (2012) sobre simulación dinámica molecular de un sistema compuesto por 3 componentes; enzima, IL y scCO_2 , se vio como sus resultados estuvieron de acuerdo con las observaciones experimentales obtenidas sobre la estabilidad de las enzimas en sistemas bifásicos IL/ scCO_2 . Por otra parte,

concluyeron que la enzima posee una conformación más compacta y activa (ver **Figura 1.28**) en este tipo de sistemas. A pesar de que se observó que el contenido de la enzima en hélice α y lámina β fue reducido en cierta medida, se mantuvo a penas sin cambios. A nivel molecular, los resultados de esta investigación razonablemente confirmaron que el uso de ILs es un método eficaz para la estabilización de enzimas en CO_2 supercrítico.

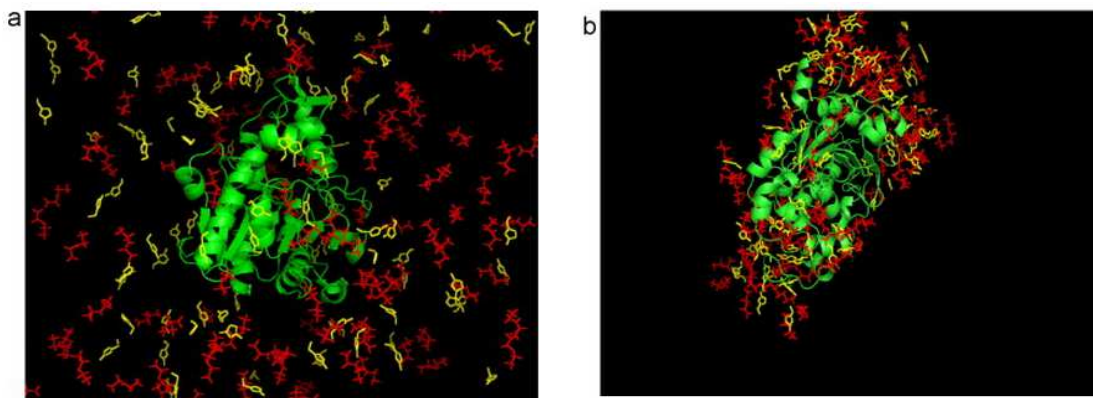


Figura 1.28. Las instantáneas de las microestructuras de CALB en el sistema scCO_2/ILs (a) configuración inicial, y (b) después de 20 ns simulación en MD; Combinación de colores; Rojo-aniones, amarillo-cationes (CO_2 se omite para mayor claridad) y verde-CALB (Monhemi *et al.*, 2012).

La segunda ventaja de la catálisis enzimática en sistemas bifásicos ILs/scCO_2 es que la combinación de ambos solventes permite solventar los problemas de los líquidos iónicos utilizados solos, como son la separación de los productos y el reciclaje del IL. La extracción con disolventes inmiscibles en ILs, dando sistemas bifásicos, es uno de los métodos más simples para separar los productos de la fase IL. Los mayores inconvenientes son la extracción de pequeñas cantidades de IL y por lo tanto, la gradual pérdida del mismo, así como del catalizador, si está implicada una reacción catalítica (Gordon, 2001). También, la partición de los solutos entre las fases limita la extensión de la extracción de solutos, y el uso de disolventes orgánicos volátiles es obviamente un punto de ruptura para el diseño integral del proceso verde (Blanchard y Brennecke, 2001a,b; Bogel-Lukasik *et al.*, 2008). Por otra parte, los fluidos supercríticos, tales como scCO_2 , son disolventes medioambientalmente benignos que permiten un aislamiento ecológicamente eficaz de los productos. El scCO_2 ha sido descrito como un excelente disolvente para el transporte de compuestos hidrófobos, ya que debido a sus propiedades modulables como disolvente, éstas se pueden ajustar mediante el cambio o bien de la presión o la temperatura, empleándose por ello en una amplia gama de

procesos industriales de extracción (Mesiano *et al.*, 1999). Brennecke y col., descubrieron que el scCO₂ no pudo disolver más de 0.6 en fracción molar de [Bmim][PF₆], mientras que no se detectó ningún contenido del IL en la fase de vapor (Blanchard y Brennecke, 2001a; Blanchard *et al.*, 2001b). En otro de sus estudios, también estudiaron la capacidad excepcional del scCO₂ para extraer una amplia variedad de compuestos hidrófobos mediante líquidos iónicos. Estas son algunas de las principales razones que están suscitando, un interés continuo en el desarrollo de nuevos sistemas de separación para la catálisis bifásica o trifásica, en los cuales un catalizador homogéneo estará inmovilizado en la fase del IL y los reactivos y/o productos residirán en gran medida en la fase de scCO₂ (Dzyuba y Bartsch, 2003; Lozano *et al.*, 2002; Reetz *et al.*, 2002).

Una vez vista la bondad de los ILs para estabilizar a las enzimas frente al scCO₂, otra alternativa que se ha planteado al uso de sistemas bifásicos ILs/ scCO₂, es utilizar CALB en ILs soportados sobre matrices poliméricas, en los cuales estos soportes pueden ser considerados como "disolventes iónicos sólidos" o materiales nanoestructurados con microambientes de polaridad ajustable similares a los proporcionados por los ILs (ver **Figura 1.29**). El carácter sólido de los SILLPs facilita su fácil separación, permitiendo el desarrollo de procesos de flujo continuo y evitando derrames accidentales. Esto es importante a la luz de los problemas toxicológicos y ecotoxicológicos recientemente planteadas por algunos ILs. Además, reducen el coste del proceso, debido a la menor cantidad de líquido iónico involucrado (Gu y Li, 2009; Riisagera *et al.*, 2006).

Lozano *et al.* (2007) demostraron la eficiencia de estos sistemas en scCO₂ para llevar a cabo la síntesis de propionato de citronelilo comparados con los tradicionales de recubrimiento de la enzima con IL. Para ello prepararon columnas de monolitos (ILs soportados) en las cuales inmovilizaron a CALB. Estos biorreactores se diseñaron para trabajar en sistemas de miniflujo para la síntesis continua en scCO₂ de este aroma mediante transesterificación. La actividad catalítica de estos mini-reactores de flujo permaneció prácticamente constante durante 7 ciclos operacionales de 5h cada uno, en diferentes condiciones supercríticas.

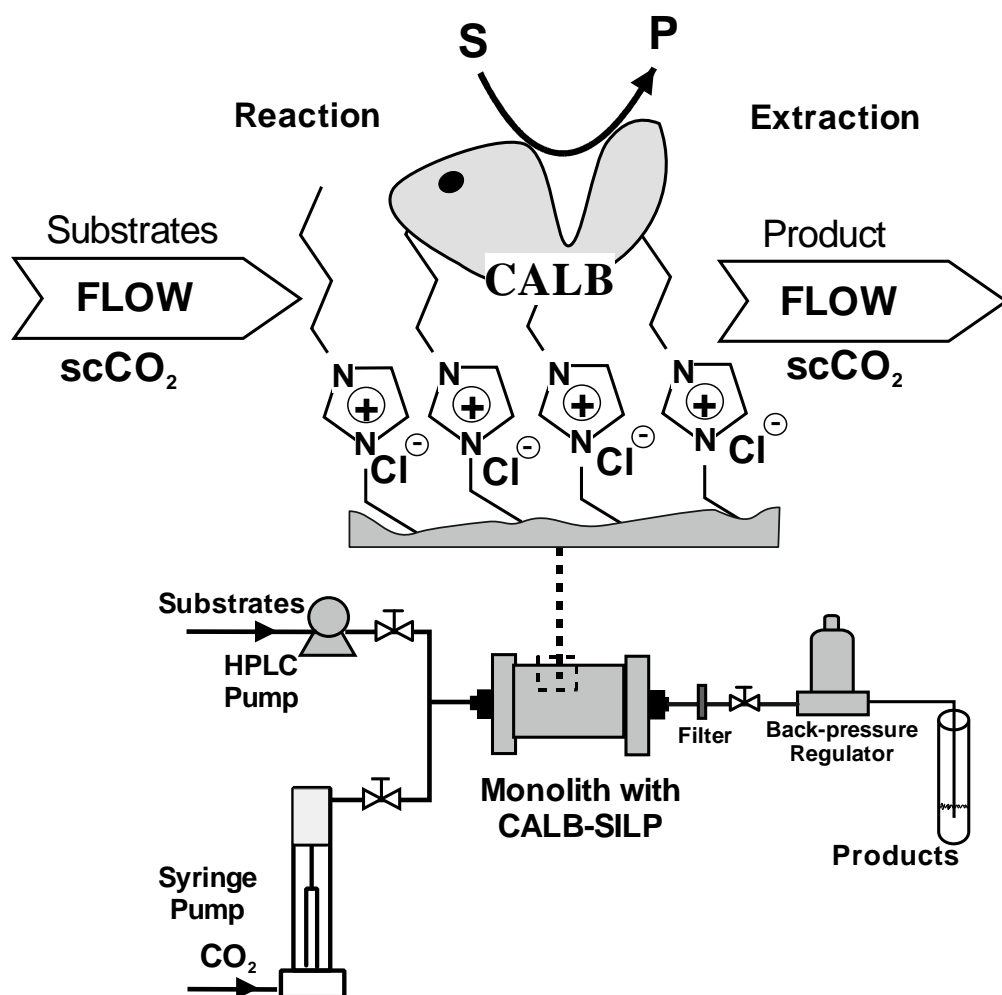


Figura 1.29. Esquema de un reactor con CALB inmovilizada sobre una columna monolítica conteniendo ILs covalentemente unidos para la síntesis continua de propionato de citronelilo en condiciones de scCO₂ (Lozano *et al.*, 2007).

Este mismo grupo demostró nuevamente la bondad de estos sistemas, pero esta vez utilizando CALB inmovilizada en diferentes resinas poliméricas en las cuales el IL estuvo unido covalentemente al soporte, para llevar a cabo una reacción estereoespecífica, como es la resolución cinética (KR) del *rac*-1-feniletanol por lotes y de forma continua. Los biocatalizadores mostraron unos buenos rendimientos en un disolvente orgánico convencional (hexano) y en dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) (ver **Figura 1.30**) (Lozano *et al.*, 2010).

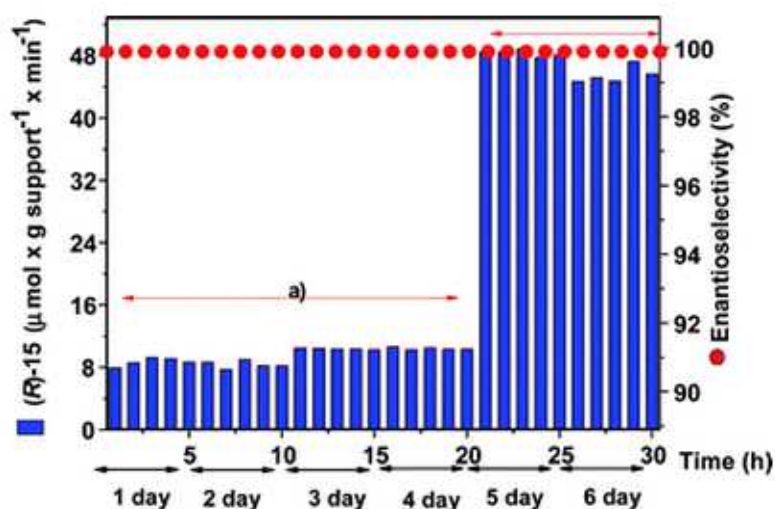


Figura 1.30. Perfiles de productividad y de ee para el propionato de (R)-1-feniletano vs tiempo en la KR continua del rac-1-feniletanol en scCO₂ a 50°C y 10 MPa: con flujos de rac-1-feniletanol a) 3 μmol min⁻¹, b) 15 μmol min⁻¹ (Lozano *et al.*, 2010).

La DKR en "one-pot", utilizando una combinación de CALB-SILLP y zeolita (CP811E-150) en el mismo reactor produjo un proceso no selectivo (63 % ee), donde se produjeron ambos enantiómeros del éster. La baja selectividad se puede atribuir a la transesterificación del (S)-1-feniletanol por la zeolita. Por esta razón, al recubrir la zeolita β (ver **Figura 1.31**) con un IL hidrófobo se logró reducir significativamente su actividad racemizante y la reacción secundaria (acilación). Esto fue debido al hecho de que la monocapa del IL aumentó la transferencia de masa de los reactivos a los sitios activos y también aisló de los sitios ácidos la eventual presencia de agua en el sistema. Se observaron buenos rendimientos (alrededor del 70 %). Además, el proceso se llevó a cabo con un aumento significativo de la enantioselectividad. De hecho, sólo se detectó el R - éster (> 99,9 % de ee). Por último, se probó a reducir el flujo del sistema con el fin de aumentar el rendimiento del proceso, obteniéndose rendimientos del (R)-éster de hasta 92% con una excelente enantioselectividad > 99,9% (Lozano *et al.*, 2010).

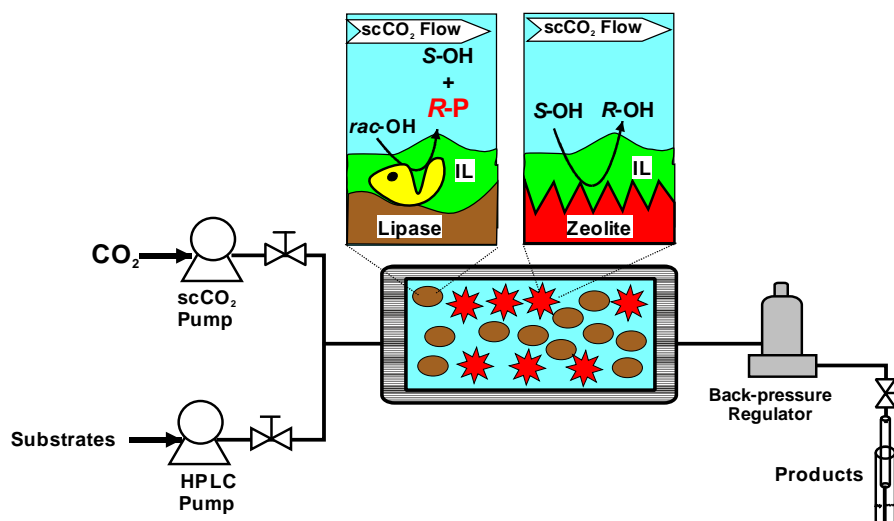


Figura 1.31. Esquema de reactor multicutalítico para realizar la DKR quimioenzimática continua del *rac*-1-feniletanol en sistemas IL/scCO₂ (Lozano *et al.*, 2009).

En el caso de la producción de biodiesel en sistemas de reacción basados en los fluidos supercríticos (ver Anexo I), se han realizado diversas aproximaciones experimentales con resultados dispares. Así, Jackson y King (1996) demostraron la aplicabilidad de scCO₂ en continuo para llevar a cabo la metanólisis de aceites de soja y de maíz usando Novozym 435, con conversiones >98% y seguido por un fraccionamiento completo de la mezcla de reacción. Para lograr este tipo de conversiones tan altas, se suelen emplear flujos de CO₂ bajos entorno a 1 mL/min (y este grupo en particular emplearon un flujo de aceite de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$), en un reactor de 5 ml (Rodrigues *et al.*, 2011). En un proceso continuo en scCO₂, la concentración de metanol suele ser más alta que en disolventes orgánicos o sistemas sin disolventes, ya que la solubilidad del aceite en scCO₂ es bastante limitada, lo que se traduce en menores productividades. Sin embargo, debido al hecho de que los productos se recuperan fácilmente a través de una etapa de descompresión y el disolvente se puede reciclar, la menor concentración de productos formados no representa un grave problema.

El impacto económico de la biocatálisis es al parecer una desventaja, cuando se considera como alternativa más barata los catalizadores alcalinos. Además de la alta carga enzimática, el diseño de procesos de síntesis biocatalítica de biodiesel en fluidos supercríticos debe tener en cuenta, no sólo la usual desactivación de las enzimas en dichos fluidos, sino también la desactivación por “envenenamiento” del biocatalizador al tener limitada la salida del subproducto hidrofílico glicerol. Pero tal vez no lo sea si

se considera el proceso integrado de reacción/separación basado en $scCO_2$, en la cual la etapa catalítica tiene lugar en un biorreactor para la conversión de los triacilglicéridos en biodiesel, seguido por un proceso de separación aguas abajo facilitado por el uso de $scCO_2$, así como con la presencia de algún cosolvente que facilite la salida del glicerol. El $scCO_2$ puede extraer selectivamente y recuperar los ésteres de alquilo a partir de la mezcla de reacción ya que la solubilidad de los ésteres en $scCO_2$ es varios órdenes de magnitud más alta que la solubilidad de los triglicéridos y el glicerol. Por ejemplo, a $60^\circ C$ y 14 MPa, las solubilidades del palmitato de metilo y del oleato de metilo en $scCO_2$ son 41 y 20 g/kg CO_2 respectivamente (Inomata *et al.*, 1989), mientras que las solubilidades de trioleina y glicerol son, respectivamente, 1.0 y 0.06 g/kg CO_2 (Sovová *et al.*, 1997). Esto muestra que el $scCO_2$ puede extraer selectivamente los ésteres de alquilo de la triacilglicéridos no convertidos y del subproducto glicerol. Por otra parte, el uso de enzimas tiene la ventaja económica de alto grado de pureza obtenida, a diferencia del proceso alcalino. Además cabe reseñar, que el proceso enzimático opera a temperaturas más bajas (entre 20 y $50^\circ C$; $60-80^\circ C$ para el proceso alcalino), lo que se traduce en un ahorro energético considerable. Además, el proceso alcalino requiere un intensivo tratamiento de aguas residuales, lo que conlleva un alto impacto ambiental, una situación que no se produce en el proceso enzimático (Rodrigues *et al.*, 2011).

Los principales desafíos para la producción de biodiesel son el costo y la limitada disponibilidad de grasas y de aceites. El costo de las materias primas representa el 60-75% del coste total de combustible final en relación al 40-25% de los costos de procesamiento. El uso de aceite de cocina usado (WCO), que es un residuo sin valor comercial y cuya disposición resulta un tanto problemática (Kulkarni y Dalai, 2006), puede tener un efecto significativo en la economía y el impacto ambiental de la producción de biodiesel. Suponiendo que el transporte y el tratamiento previo de la WCO son los únicos costos adicionales involucrados en la producción de biodiesel a partir de esta materia prima, el efecto del precio de la producción de biodiesel pueden reducirse hasta en un 50% (Demirbas, 2009). En cualquier caso, la aplicación de la tecnología supercrítica para la obtención de biodiesel tiene como principal hándicap el bajo coste de producción que debe conllevar dicho producto para ser competitivo en el mercado de los biocombustibles.

OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo ha sido el diseño de nuevos protocolos operacionales integrados de reacción y separación, que permitan la síntesis y purificación directa de productos de alto valor añadido, mediante el empleo de tecnologías limpias y sostenibles, y demostrando la recuperación y la reutilización de los sistemas catalíticos y de reacción. Para el desarrollo de este objetivo, se ensayaron por primera vez determinados ILs hidrofóbicos con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena, que por su naturaleza son sólidos a temperatura ambiente pero con temperaturas de fusión inferiores a 100°C y que presentaron un comportamiento tipo esponja (SLILs, del inglés “*Sponge-Like Ionic Liquids*”), así como líquidos iónicos soportados sobre matrices porosas (SILLPs, del inglés “*Supported Ionic Liquids-Like Phases*”) en el desarrollo de procesos biocatalíticos para la obtención de fragancias y aromas (*i.e.* ésteres de terpenos) y de biodiesel.

Por su naturaleza hidrofóbica, los ILs con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena pueden resultar excelentes medios de reacción en sistemas que involucren el trabajar con sustratos hidrofóbicos debido a su alta solubilidad de los mismos. Por otra parte, la modificación del medio de reacción para reducir el papel del agua en reacciones catalizadas por enzimas hidrolíticas, permite un claro desplazamiento del equilibrio termodinámico hacia las reacciones de síntesis, además de disminuir posibles reacciones secundarias como la hidrólisis del producto, o modificar la estabilidad térmica y estructural de la enzima, fomentando un alto interés para una posible aplicación industrial de estos medios no convencionales en reacciones de transesterificación, esterificación, resoluciones cinéticas, amidaciones, etc.

El interés suscitado por el desarrollo de nuevos procesos limpios de **síntesis de biodiesel** que sean sostenibles económica y medioambientalmente es consecuencia de los inconvenientes que los procesos actuales acarrear, entre los que cabe destacar la generación de un gran volumen de agua residuales, la baja selectividad de las reacciones catalizadas y los costes de los procesos de purificación de los productos. En este contexto, las enzimas son biocatalizadores que permiten llevar a cabo la reacción de síntesis de biodiesel con la máxima selectividad, permitiendo una fácil recuperación de los productos y sin generar ningún tipo de contaminante. Los principales inconvenientes que presenta esta reacción son la baja actividad y estabilidad del biocatalizador, provocados principalmente por la inmiscibilidad entre sí de los sustratos, el alto carácter desactivante de uno de ellos (el metanol), y la acumulación del subproducto (glicerol)

sobre la superficie del mismo, haciendo de la ingeniería del medio de reacción, una herramienta clave para solventar estos problemas. Es aquí donde los ILs hidrofóbicos juegan un papel crucial, ya que debido a su carácter “*protector*” permiten estabilizar a las enzimas frente a la desactivación del metanol, pero en ningún caso los ILs estudiados por los diversos autores consiguieron disolver los sustratos (aceites y metanol) para generar sistemas monofásicos de reacción, que permitan incrementar la actividad catalítica y disminuyan la desactivación enzimática. En concordancia con los principios de la Química Verde, y habida cuenta de los elevados costes de los ILs y del biocatalizador, el diseño del proceso requerirá del desarrollo de procedimientos sencillos y adecuados para la recuperación y reutilización de ambos componentes del sistema. Es aquí, donde los fluidos supercríticos jugaran su papel más relevante, ya que al trabajar con sistemas bifásicos ILs/scCO₂ se podrán combinar las propiedades más genuinas de ambos sistemas, el carácter protector de los ILs y la alta solubilidad de sustratos y productos en el scCO₂, permitiendo una sencilla separación por simple cambio de presión y temperatura. La síntesis de oleato de metilo a partir de trioleína y metanol fue el sistema de reacción modelo estudiado en la presente Tesis Doctoral.

La síntesis de **fragancias y aromas** (*i.e.* ésteres de terpenos) mediante esterificación directa entre el ácido y el alcohol pertinente catalizada por enzimas es una de las estrategias más atractivas que se presentan para la obtención de productos que puedan ser clasificados como “productos naturales”, característica muy apreciada para productos destinados a uso alimenticio, cosmético y farmacéutico. Los principales problemas que acompañan a esta reacción, son parecidos a los anteriormente citados, por un lado está el carácter desactivante de los ácidos empleados como sustratos (*i.e.* ácido acético), y por otro la necesidad de eliminar el subproducto (agua), y conseguir desplazar el equilibrio hacia los productos de síntesis. Para ambos problemas, la incorporación de medios “verdes” como son los ILs hidrofóbicos permitirían solventar parte de ellos, ya que disminuyen la concentración del ácido del medio de reacción, aumentando el carácter hidrofóbico del mismo y por lo tanto, aumentando el carácter estabilizador sobre la enzima. Además al tratarse de medios hidrofóbicos, disminuyen la solubilidad del “agua” de reacción producida en los mismos. La síntesis de éstetes alifáticos de terpenos (*i.e.* geraniol, citronelol, nerol) y de alcoholes aromáticos (*i.e.* 1-feniletanol y alcohol anisílico) mediante esterificación directa con ácidos carboxílicos

de diferente longitud de cadena fueron las reacciones modelo estudiadas en la presente Tesis Doctoral.

En este contexto, se ensayaron ILs hidrofóbicos de larga longitud de cadena, evaluándose la distinta solubilidad de los sustratos y productos de interés involucrados, y su eficacia en diversos procesos biocatalíticos, optimizando los parámetros de relevancia de las reacciones, y finalmente, diseñando los protocolos sencillos y eficaces de separación de los productos de cada uno de los sistemas. De la misma forma, también se ensayaron sistemas bifásicos ILs/scCO₂, y SILLPs/scCO₂ con objeto de desarrollar procesos continuos de síntesis biocatalítica de las diferentes reacciones modelo planteadas.

Como objetivos más específicos en este trabajo, se pueden describir los siguientes:

- Estudiar las propiedades de diferentes ILs hidrofóbicos conteniendo sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena, con objeto de encontrar aquellos capaces de disolver tanto el metanol como la trioleína y generando un medio homogéneo donde llevar a cabo la biocatálisis, y además aportar al derivado enzimático inmovilizado una alta actividad y estabilidad operacional. Conocer sus propiedades físicas, y de esta forma poder diseñar procesos sostenibles de separación con la recuperación integral y reutilización de los biocatalizadores y de los ILs. Para llevar a cabo este objetivo, este trabajo analizó por primera vez la capacidad de diferentes ILs hidrofóbicos para disolver mezclas de trioleína/metanol en función de la temperatura, y que fueron seleccionados en concordancia con el axioma de la química “semejante disuelve a semejante”, permitiendo el desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos de separación entre el “solvente” (*i.e.* ILs o SLILs) y los “solutos” (*i.e.* sustratos y/o productos).

- Desarrollar reactores biocatalíticos continuos capaces de verificar la síntesis de biodiesel en condiciones supercríticas. Con objeto de mejorar las limitaciones difusionales impuestas por la baja solubilidad de los aceites vegetales en scCO₂, se ensayaron dos tipos de estrategias para favorecer la eficacia catalítica de los sistemas. Dichas estrategias estaban basadas en la incorporación de ILs hidrofóbicos sobre los biocatalizadores inmoviliados, bien mediante recubrimiento directo de las partículas o bien mediante la inmovilización de las enzimas sobre diferentes tipos de soportes (*i.e.*

resinas Merrifield) que contenían ILs hidrofóbicos covalentemente unidos (SILLPs). Los SILLPs utilizados se obtuvieron por modificación de diferentes tipos de soportes poliméricos orgánicos, mediante la introducción de grupos funcionales del tipo imidazolio. Así, se consideró mantener el imidazol como grupo funcional, pero variando tanto la cantidad de IL soportado, la morfología del polímero de partida (polímeros tipo gel y macroporosos con distintas porosidades y polímeros tipo RASTA), el grado de entrecruzamiento de los polímeros (baja y alta carga de las resinas), y la naturaleza del contraíón, permitiendo con esto obtener SILLPs de diferente naturaleza.

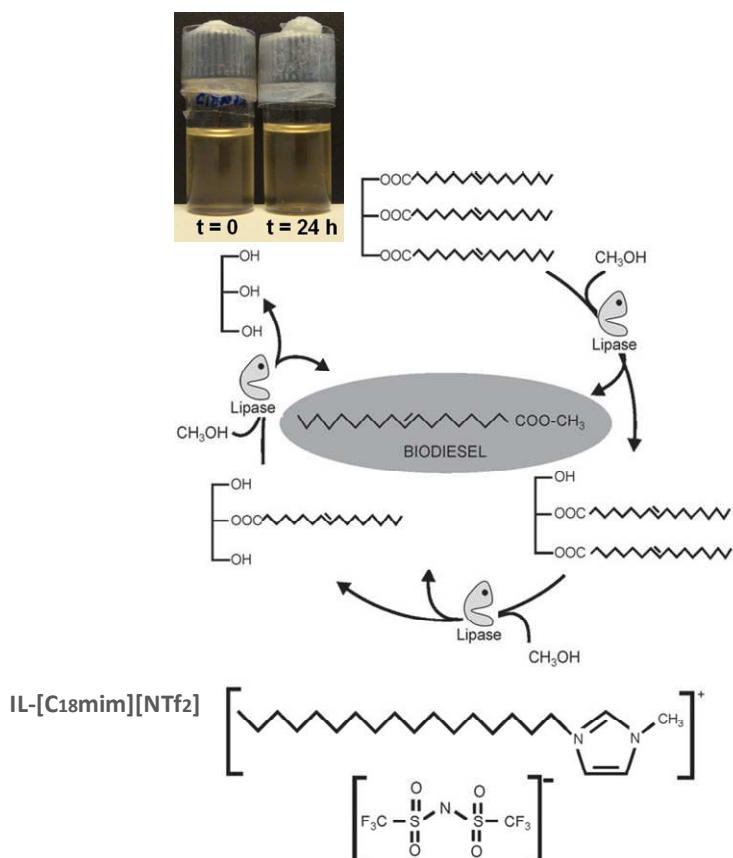
- Estudiar la eficacia y adecuación de los ILs con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena en la síntesis biocatalítica de diferentes ésteres de terpenos mediante reacciones de esterificación directa entre los ácidos carboxílicos correspondientes y los alcoholes, sí como para la síntesis de biodiesel mediante metanólisis de trioleína, proponiendo protocolos sencillos y eficientes para la separación de los productos, y la recuperación integral de los diferentes ILs, demostrando la idoneidad del proceso en cuanto a la reutilización del sistema ILs/biotatalizador, y a la preservación de la eficacia catalítica de los procesos.

- Evaluar la eficacia de la irradiación por microondas en la eficiencia de la diferentes reacciones biocatalíticas (*i.e.* resolución cinética del *rac*-1-feniletanol, síntesis de acetato de anisilo por esterificación directa) utilizando derivados de lipasa inmovilizada sobre diferentes tipos de resinas Merrifield conteniendo ILs covalentemente unidos (SILLPs), y/o derivados comerciales de lipasa inmovilizada en ILs con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena (SLILs). El desarrollo y aplicación de nuevos protocolos sencillos y eficaces para separación de los productos, y de recuperación y reutilización integral de los sistemas ILs/biocatalizador ha sido de la máxima prioridad en el desarrollo de este objetivo.

Capítulo I

Síntesis enzimática de biodiesel en sistemas monofásicos basados en ILs hidrofóbicos

(Ver Anexo II)



Los resultados presentados en este Capítulo se encuentran recogidos en la siguiente publicación:
 Pedro Lozano, **Juana María Bernal**, Rungtiwa Piamtongkam, Dirk Fetzer, and Michel Vaultier
 "One-Phase Ionic Liquid Reaction Medium for Biocatalytic Production of Biodiesel"
ChemSusChem **2010**; 3(12): 1359–1363

La ingeniería del medio de reacción ha jugado un papel fundamental para reducir el papel del agua en reacciones catalizadas por enzimas hidrolíticas, permitiendo así un claro desplazamiento del equilibrio termodinámico hacia las reacciones de síntesis, además de disminuir posibles reacciones secundarias como la hidrólisis de los productos, o la modificación de la estabilidad térmica y estructural de la enzima. Todo esto ha fomentado un enorme interés en la posible aplicación industrial de los medios no convencionales en procesos de síntesis catalizados por enzimas hidrolíticas, en especial en los líquidos iónicos (ILs).

El empleo de disolventes orgánicos como el *t*-BuOH, ha permitido llevar a cabo la síntesis enzimática de biodiesel, mediante transesterificación de triacilglicéridos (ej., trioleína,..) con alcoholes primarios alifáticos (ej. metanol que originan FAMES, etanol que dan lugar a FAEEs,...) en un medio homogéneo, proporcionando una mayor actividad al biocatalizador pero en ningún caso proporcionándole una estabilidad relevante a la enzima. En este contexto, el empleo de los ILs como disolventes han conseguido aportar a los enzimas cierta estabilidad pero en ningún caso se lograron obtener velocidades de reacción ni rendimientos relevantes en periodos de tiempo razonables (menos de 12h) debido a la incapacidad de estos ILs de disolver los sustratos del medio de reacción (Ha *et al.*, 2007; Y. Liu *et al.*, 2011).

Por esta razón, el presente trabajo pretende no sólo encontrar ILs hidrofóbicos capaces de aportar al derivado enzimático inmovilizado, alta actividad y estabilidad operacional, sino que además también sean capaces de disolver los sustratos presentes en el medio de reacción, generando un sistema homogéneo y monofásico capaz de permitir mayores velocidades de reacción. De este modo, la adecuación de los sistemas biocatalíticos en los procesos de síntesis de biodiesel sería sensiblemente mejorada.

Para llevar a cabo este objetivo, este trabajo analizó por primera vez la capacidad de tres ILs hidrofóbicos, para disolver mezclas de trioleína/metanol en función de la temperatura. Siguiendo un viejo axioma de la química “semejante disuelve a semejante” se seleccionaron tres ILs hidrofóbicos: bis[(trifluoro)metilsulfonilimida] de metil-trioctilamonio [Troma][NTf₂], hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil-imidazolio [Omim][PF₆] y bis[(trifluoro)metilsulfonilimida] de 1-metil-3-octadecilimidazolio [C₁₈mim][NTf₂], basados en aniones hidrofóbicos y sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena.

Para el estudio del comportamiento de fases se seleccionó una razón molar de trioleína: metanol de 1:6, siendo objeto de estudio seis mezclas diferentes de IL/trioleína/metanol a diferentes temperaturas. A la vista de los resultados, se observó como solamente en el caso en el que se empleó [C₁₈mim][NTf₂] (IL sólido a temperatura ambiente con m.p. 54°C) se consiguió disolver completamente ambos sustratos, empleando eso sí, porcentajes de IL superiores al 30% (w/w) y temperaturas por encima de los 40 °C.

Una vez vistas las propiedades genuinas del IL-[C₁₈mim][NTf₂], se estudió también la capacidad de estos tres ILs hidrofóbicos para llevar a cabo la síntesis enzimática de biodiesel catalizada por lipasa CALB inmovilizada (Novozym 435) a 60°C, eligiéndose como razón másica IL: (TO + MeOH), 63.8:36.2. El perfil de reacción frente al tiempo para el caso en el que empleó [C₁₈mim][NTf₂], mostró una elevada velocidad de reacción lográndose una producción por encima del 96% en biodiesel tras sólo 6 horas de reacción, además se observó como el sistema final resultó claramente monofásico tras 24h donde ya, todos los triacilglicéridos fueron transformados en biodiesel. En el caso del glicerol, se observó su inmiscibilidad en todos los casos y para cualquier temperatura de ensayo, depositándose éste en el fondo en forma de pequeñas gotas. En éste y en los demás casos, se estudió la producción de biodiesel a 6h de reacción para diferentes temperaturas, así como en sistema libre de disolvente. La lipasa fue prácticamente inactiva en este último caso, mostrando de igual modo muy escasa actividad en medio [Omim][PF₆]. En los otros dos casos en los cuales se emplearon como ILs [Troma][NTf₂] y [C₁₈mim][NTf₂], al tratarse de ILs más hidrofóbicos, la solubilidad de los triacilglicéridos fue mayor, permitiendo así una mayor velocidad de reacción en todos los casos y por lo tanto, una mayor producción en biodiesel. Siendo en ambos casos la temperatura óptima de reacción 60°C y encontrándose los valores más altos de producción, en todos los casos para el [C₁₈mim][NTf₂], debido a su capacidad para disolver completamente los sustratos del medio de reacción y también debido a su menor viscosidad.

Aunque cabe destacar que, el IL-[C₁₈mim][NTf₂] es sólido a temperatura ambiente, dicho IL presenta una viscosidad a 60°C inferior a la mostrada por el [Omim][PF₆] y el [Troma][NTf₂] (85, 152 y 186 mPa.s, respectivamente), lo que favorece los fenómenos de transferencia de masa, hecho que se corroboró con las

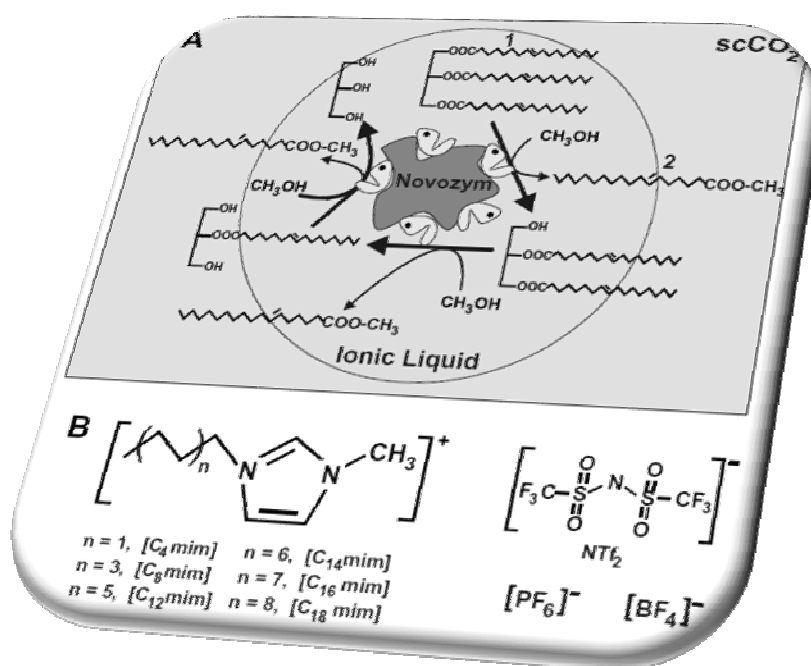
superiores actividades catalíticas observadas, y por lo tanto su posible aplicación en el proceso de síntesis de biodiesel.

Sin embargo, el criterio real para poder hacer escalable un proceso biocatalítico, es la estabilidad operacional de la enzima y la recuperación y reutilización del IL. Para poder llevar a cabo este propósito, se diseñó un protocolo cíclico, en el cual se tuvo en cuenta la solubilidad de los productos en el nuevo medio de reacción. En el caso del biodiesel, se observó cómo fue siempre miscible en el mismo, resultando un medio líquido monofásico por encima de los 40°C y sólido por debajo de 30°C, mientras que el glicerol en ninguno de los casos resultó soluble en este medio. Por lo tanto y a la vista de los resultados, el protocolo cíclico establecido fue el siguiente: en primer lugar, la etapa biocatalítica se llevo a cabo a 60°C durante 6h, seguida por dos etapas consecutivas de extracción de los diferentes productos de reacción; la primera con agua para extraer el glicerol y el metanol, y la segunda con octano, para la extracción del biodiesel y restos de compuestos más hidrofóbicos (triacilglicéridos, dialcilglicéridos y monoacilglicéridos), permitiendo de esta forma una total recuperación del IL- $[C_{18}mim][NTf_2]$ tras su posterior solidificación. Al poner en marcha este protocolo, se pudo ver que tras 7 ciclos de operación, la producción de biodiesel permaneció prácticamente constante, mostrándose así la adecuación de este IL para llevar a cabo la síntesis de biodiesel.

Capítulo II:

Síntesis enzimática de biodiesel en sistemas monofásicos basados en ILs hidrofóbicos y en sistemas bifásicos ILs hidrofóbico/scCO₂

(Ver Anexo III)



Los resultados presentados en este Capítulo se encuentran recogidos en la siguiente publicación:

Pedro Lozano, **Juana M. Bernal**, Michel Vaultier

“Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems”

Fuel **2011**; 90 (11): 3461–3467

En el trabajo anterior se demostró la idoneidad del IL-[C₁₈mim][NTf₂], un IL basado en un catión con un sustituyente alquílico de larga longitud de cadena, para disolver la trioleína y el metanol (sustratos involucrados en la síntesis de biodiesel), proporcionando además un medio homogéneo y monofásico, un excelente sistema capaz de llevar a cabo la síntesis enzimática de biodiesel, con rendimientos superiores al 96% tras sólo 6h de reacción a 60°C. Además, se estableció un protocolo cíclico en el cual se utilizaron disolventes orgánicos para la recuperación de los productos y el sistema enzima/IL fue reutilizado 7 veces sin prácticamente sin pérdida de actividad.

Si se tiene en cuenta que el futuro más interesante para los procesos biocatalíticos en ILs es la posibilidad de diseñar sistemas de reacción continuos que permitieran una sencilla recuperación de los productos, la biocatálisis en sistemas bifásicos en ILs/scCO₂ emerge como un enfoque excepcionalmente interesante para el diseño de procesos limpios continuos. La combinación de los biocatalizadores con los sistemas ILs/scCO₂ tiene sinérgias interesantes ya que la alta eficiencia biocatalítica de las enzimas en los ILs, se combina con las ventajas del scCO₂ para llevar a cabo el transporte de masa proporcionando directamente los productos puros.

En este capítulo se planteó por primera vez, la síntesis biocatalítica de biodiesel en sistemas bifásicos ILs/scCO₂. Además de esto, se estudió el comportamiento de fases de los sustratos y productos involucrados en la síntesis de biodiesel (IL/trioleína/MeOH y IL/oleato de metilo) en diferentes ILs hidrofóbicos con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena. En base a esto se seleccionaron 12 ILs diferentes, basados en cationes del tipo 1-alkil-3-metilimidazolio con longitudes de cadena alquílica; 12, 14, 16 y 18 ([C_nmim]), y combinados con los aniones: BF₄⁻, PF₆⁻ o NTf₂⁻.

En primer lugar se estudió la capacidad de disolver por parte de estos nuevos medios de reacción, 12 ILs basados en cationes imidazolio con larga longitud de cadena de C12 a C18, los sustratos involucrados en la síntesis de biodiesel, trioleína y metanol. El estudio del comportamiento de fases de las mezclas ternarias, IL/trioleína/MeOH se realizó a 60 y a 85°C, debido a la naturaleza sólida o semisólida de algunas de ellas. En todos los casos, la razón molar trioleína/MeOH fue de 1/6, relación considerada como óptima para la síntesis enzimática de biodiesel. Los resultados mostraron como la solubilidad de las mezclas trioleína/MeOH fueron claramente dependientes de la naturaleza de los iones y del porcentaje del IL. Así, los ILs con anión NTf₂⁻ fueron los que mostraron mejor capacidad para disolverlos, observándose un claro aumento de la

solubilidad con el incremento de la longitud de cadena y del porcentaje del IL. En este sentido, sólo los ILs $[C_{14}mim][NTf_2]$, $[C_{16}mim][NTf_2]$ y $[C_{18}mim][NTf_2]$ fueron capaces de disolver todo el medio de reacción. También se observó como al aumentar la longitud de cadena del sustituyente alquílico, y por lo tanto la hidrofobicidad del ILs, la cantidad de IL mínima necesaria para disolver el medio de reacción fue cada vez menor (*i.e.*, $IL_{mín} = [C_{14}mim][NTf_2]$ -63.8%, $[C_{16}mim][NTf_2]$ -31% y $[C_{18}mim][NTf_2]$ -18%). En los demás casos en los que se emplearon ILs con anión NTf_2^- , no se observó en ningún caso la solubilidad total de los sustratos, sólo un claro aumento de la misma con el aumento de la longitud de cadena y de la concentración de IL. Para los demás ILs con aniones PF_6^- y BF_4^- , se observó en primer lugar, un mayor punto de fusión de las mezclas heterogéneas, siendo las mezclas con IL de naturaleza aniónica PF_6^- las que mayores puntos de fusión presentaron, de aquí la razón de estudiar el comportamiento de fases a 85°C, con el objeto de llegar a obtener la mayor fracción de mezclas líquidas. Al observar el compendio de resultados, podemos decir que la solubilidad de las mezclas de trioleína/MeOH en medio IL aumentó conforme lo hizo la hidrofobicidad del anión ($[NTf_2] > [PF_6] > [BF_4]$). También se observó cómo, al aumentar el porcentaje de IL en el medio de reacción, el punto de fusión también aumentó debido a la mayor contribución de este componente en la mezcla. En el caso del glicerol, en todos los medios resultó inmiscible con el medio de reacción, probablemente debido a su alto carácter hidrofílico y polar.

Una vez vista la capacidad de estos ILs para disolver los sustratos involucrados en la síntesis de biodiesel, el siguiente paso fue realizar la biocatálisis en ellos. Para ello se fijó como porcentaje de IL, 47.7%, y se estudió la evolución del perfil de conversión frente al tiempo de los ILs con anión $[NTf_2]$ a 60°C, ya que fueron éstos los que mayores solubilidades de los sustratos presentaron, además de mantener rangos de temperatura más amplios en los cuales se observaron sistemas en estado líquido. En todos los casos se observó como con el paso del tiempo la conversión iba incrementándose, siendo la velocidad de reacción y las producciones alcanzadas, mayores conforme fue aumentando la longitud de cadena ($[C_{18}mim][NTf_2] > [C_{16}mim][NTf_2] > [C_{14}mim][NTf_2] > [C_{12}mim][NTf_2] > [C_4mim][NTf_2]$) hasta un máximo del 95% tras 8h de reacción para el caso en el cual se empleó $[C_{18}mim][NTf_2]$. Estos hechos podrían estar claramente relacionados con la miscibilidad de ambos sustratos en el medio de reacción, ya que sólo se partió de sistemas

monofásicos para el primer caso $[C_{18}mim][NTf_2]$. Además de esto, se estudió también para estos ILs, el efecto del porcentaje del IL sobre la producción de biodiesel tras 8h de reacción, debido a su enorme influencia en la solubilidad de los sustratos en el medio. Los resultados mostraron una enorme dependencia de este parámetro sobre la producción de biodiesel, viéndose unos incrementos muy pronunciados al pasar de $[C_8mim][NTf_2]$ a $[C_{12}mim][NTf_2]$, debido a la mayor solubilidad de los sustratos en estos nuevos medios de reacción. Es para estos ILs más hidrofóbicos ($[C_{12}mim][NTf_2]$, $[C_{14}mim][NTf_2]$, $[C_{16}mim][NTf_2]$ y $[C_{18}mim][NTf_2]$) donde se vio una clara dependencia del porcentaje de IL tanto en la solubilidad como en la producción, demostrándose de igual modo la capacidad de estos ILs hidrofóbicos como estructuras supramoleculares en fase líquida para actuar como “molde”, estabilizando la estructura tridimensional de las enzimas en medios no acuosos.

También fue objeto de estudio, la influencia de la naturaleza de los aniones (NTf_2^- , PF_6^- y BF_4^-) de estos ILs hidrofóbicos en la capacidad por parte de la enzima de catalizar la síntesis de biodiesel. Para poder tener un compendio de resultados comparativos y representativos, además de poder tener un mayor abanico de mezclas líquidas posibles, la reacción biocatalítica se realizó a $85^\circ C$. Al igual que en los casos anteriores, se ensayaron para cada uno de los ILs, tres porcentajes de IL (16.4, 47.7 y 73.9 w/w) y se evaluó la producción de biodiesel en cada uno de ellos. Como puede verse, el rendimiento en biodiesel para los casos en los que se emplearon ILs basados en iones PF_6^- y BF_4^- , fue notablemente menor que los obtenidos con los iones NTf_2^- . Así, mientras la enzima mostró un bajo nivel de actividad para los ILs con anión PF_6^- , en el caso en el que se emplearon ILs con aniones BF_4^- , la actividad mostrada fue casi nula. Esto pudo deberse en primer lugar, al alto punto de fusión de las mezclas y en el segundo lugar, al mayor carácter hidrofílico de los aniones BF_4^- , que pudo ser una de las principales causas de la pérdida de la microcapa de agua encargada de estabilizar la enzima frente a agentes externos (temperatura, MeOH, etc...).

Una vez vista la bondad de estos ILs hidrofóbicos con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena, se decidió probarlos en sistemas bifásicos ILs/scCO₂ con el objetivo de diseñar procesos químicamente verdes y de posible aplicación industrial. En este contexto, se diseñó un reactor de lecho fijo conteniendo partículas de lipasa inmovilizada recubierta con ILs para llevar a cabo la síntesis continua de biodiesel en fase scCO₂. El sistema operó en forma bifásica, donde los sustratos fueron transportados

por la fase scCO₂ hacia el microambiente biocatalítico a través de la capa de IL, y finalmente devueltos de nuevo a la fase scCO₂, con el objetivo de producir el biodiesel completamente puro. Para probar este nuevo sistema, se ensayaron 5 ILs de diferente naturaleza ([C₁₈mim][NTf₂], [C₁₈mim][PF₆], [C₁₈mim][BF₄], [C₁₄mim][NTf₂] y [C₁₄mim][PF₆]) durante ciclos operacionales de 8h. Se seleccionaron como condiciones operacionales, 60°C, 180 bares, 5.1 y 10.2 μmoles trioleína/min, y 244 μmoles MeOH/min para garantizar una completa solubilidad de los sustratos en el interior del reactor. Los resultados fueron excelentes en todos los casos en los que se empleó el flujo más bajo de trioleína, 5.1 μmoles trioleína/min, demostrando la bondad de este sistema continuo para la síntesis enzimática de biodiesel. Al emplearse [C₁₈mim][BF₄] como recubrimiento del derivado enzimático Novozym 435 se obtuvieron los peores resultados, el rendimiento en la producción de biodiesel se redujo a un 31% tras sólo 3 ciclos operacionales, probablemente por el carácter hidrofílico del anión BF₄⁻, el cual no sólo resultó un mal medio para transportar la trioleína y el biodiesel, sino que pudo ser causante de la desactivación del derivado enzimático debido principalmente a la pérdida de la capa protectora de agua que recubría a la enzima, a todo esto se le sumó el aumento de las limitaciones difusionales debido a la acumulación de compuestos hidrofílicos como el glicerol, sobre la superficie del biocatalizador que al resultar más soluble en este IL que en los demás que se ensayaron, la capa “protectora” que rodeaba el derivado inmovilizado fue aumentando su grosor y dificultando la solubilidad tanto de la trioleína, como del biodiesel. El uso de la enzima inmovilizada sin recubrimiento mostró conversión total durante los 3 primeros ciclos operacionales, pero tras esto se produjo una reducción continua y paulatina, que pudo ser debida al efecto desnaturalizante sobre las enzimas provocado por el scCO₂, y/o por la menor eficiencia al transporte de la fase scCO₂ a través de compuestos hidrofílicos como el glicerol que se va produciendo durante la síntesis de biodiesel y se va quedando adherido sobre la superficie del biocatalizador, provocando el aumento de las limitaciones difusionales y por lo tanto la desactivación del mismo.

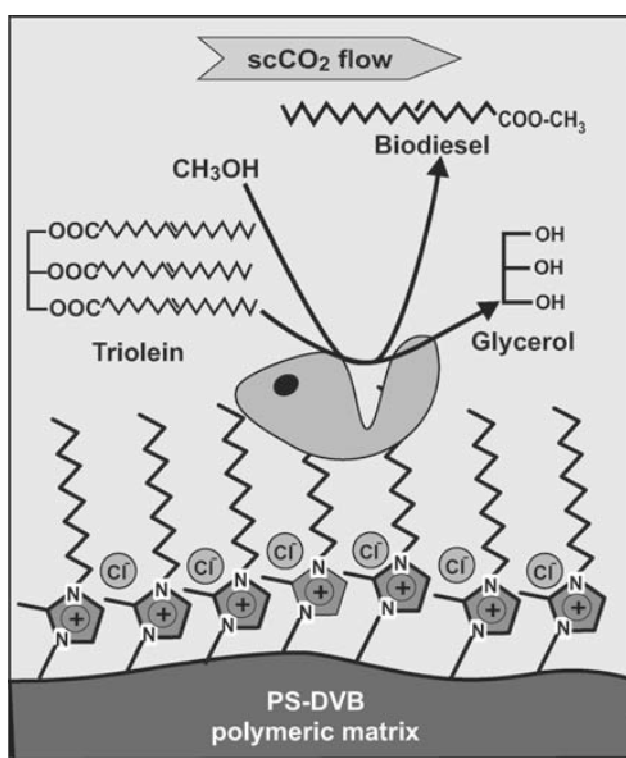
Sin embargo, al duplicarse el caudal de 5.1 a 10.2 μmoles/min, el rendimiento en biodiesel cayó en todos los casos. Los mejores resultados fueron obtenidos para el sistema Novozym 435-[C₁₈mim][PF₆], donde se consiguió un rendimiento del 82% tras 12 ciclos operacionales. Estos resultados se explicaron atendiendo a diferentes razones, a las sumadas en el caso anterior, tuvo que tenerse cuenta el comportamiento de fases de

sustratos y productos en los diferentes ILs, ya que al duplicarse el caudal de sustrato tratado, también se duplicó el de biodiesel producido. En este contexto, la excelente capacidad del IL-[C₁₈mim][NTf₂] hizo posible obtener las mayores producciones en biodiesel, pero al duplicar el caudal de éste disuelto en el scCO₂, pudo ser el causante de disolver la capa protectora de la enzima, eliminando ésta con el paso de los ciclos. La menor solubilidad tanto de sustratos como de productos en el IL-[C₁₈mim][PF₆] en las condiciones de operación, permitió conservar la capa protectora de IL durante más tiempo alrededor de las partículas de biocatalizador, a pesar de no ser la capa protectora más eficiente. En el caso en el que se emplearon los ILs [C₁₄mim][PF₆], [C₁₄mim][NTf₂] y [C₁₄mim][BF₄], lo que se observó fue como la eficiencia de los sistemas fue: [C₁₄mim][NTf₂] > [C₁₄mim][PF₆] > [C₁₄mim][BF₄], debido principalmente al mayor carácter protector de las capas más hidrofóbicas. Al duplicarse el caudal de trioleína, lo que se vio siguió la misma tendencia, ya que en las condiciones de reacción, la capa protectora de IL fue soluble en el biodiesel en todos los casos, eliminándose gradualmente ésta con el paso de los ciclos y provocando la desactivación del biocatalizador por las causas anteriormente citadas.

Capítulo III:

Síntesis continua de biodiesel en $scCO_2$ empleando lipasa inmovilizada en soportes que contienen ILs unidos covalentemente

(Ver Anexo IV)



Los resultados presentados en este Capítulo se encuentran recogidos en la siguiente publicación:
 Pedro Lozano, Eduardo García-Verdugo, **Juana M. Bernal**, Diana F. Izquierdo, M. Isabel Burguete,
 Gregorio Sánchez-Gómez, Santiago V. Luis
 “Immobilized lipase onto structured supports containing covalently attached ionic liquids for continuous
 synthesis of biodiesel in $scCO_2$ ”
ChemSusChem **2012**: 5(4), 790 – 798

El objetivo de este capítulo fue diseñar un nuevo proceso continuo de síntesis enzimática de biodiesel acoplado las estrategias vistas anteriormente de ILs hidrofóbicos y $scCO_2$, pero solventando los inconvenientes que en el capítulo anterior se encontramos, como fueron la disminución de la actividad del biocatalizador debido a la pérdida de la capa protectora de IL (causada por la alta solubilidad en sustratos y productos en el $scCO_2$) y a la acumulación de compuestos más polares como el glicerol, debido a su baja insolubilidad en la fase móvil de $scCO_2$, causante del aumento de las limitaciones difusionales del sistema Novozym 435-IL vistas anteriormente.

Así, con el objetivo de diseñar sistemas más eficientes enzima-IL en $scCO_2$, se diseñaron una serie de biocatalizadores soportados sobre materiales avanzados funcionalizados con fragmentos análogos a los líquidos iónicos (SILLPs). Las superficies internas de estos soportes se pueden considerar espacios restringidos donde la reactividad y selectividad de los procesos que allí tienen lugar pueden modularse mediante el diseño tanto del centro catalítico como de la matriz polimérica y de la distribución, concentración, naturaleza y orientación de los diferentes fragmentos presentes. Los resultados obtenidos en estudios anteriores (Lozano *et al.*, 2007b, 2010c) permitieron establecer que es posible mejorar parámetros como quimio- regio-, y estereoselectividad, rendimiento o la velocidad de la reacción cuando se utilizan biocatalizadores soportados en SILLPs empleando condiciones de flujo y disolventes medioambientalmente benignos.

Para este trabajo se desarrollaron diversos SILLPs considerando diversas alternativas que incluyen tanto la polimerización de monómeros funcionales como la modificación estructural de polímeros preformados, habiéndose seleccionado finalmente el llevar a cabo la post-modificación química de resinas tipo Merrifield. Esta modificación tiene lugar preferentemente en las superficies accesibles de las resinas dando lugar a superficies funcionales. Se eligieron SILLPs de decil-2-metilimidazolio unidos covalentemente a matrices porosas de PS-DVB como soportes adecuados para inmovilizar el biocatalizador, la enzima CALB. Como variables estructurales en el desarrollo de SILLP se consideraron la naturaleza del anión (Cl^- o NTf_2^-), la carga de los restos con estructura de líquido iónico y, por último, la naturaleza y morfología del soporte: resinas tipo gel convencionales o Rasta y resinas macroporosas. Estos materiales se caracterizaron con diferentes técnicas (*i.e.* RAMAN, TGA, DSC, ATRIR, etc.), con objeto de profundizar en el conocimiento de las relaciones estructura/función

de los mismos, analizando la influencia de las características del microentorno catalítico.

Para evaluar todos estos parámetros, se inmovilizó la enzima CALB en los diversos SILLPs sintetizados, y se realizó un primer cribado con todos ellos en disolvente orgánico convencional, en este caso se seleccionó como disolvente t-BuOH en unas condiciones estándar fijadas previamente en la bibliografía, debido a la capacidad de éste de disolver todos los sustratos involucrados en la síntesis de biodiesel. Finalmente, se pasó a probar los SILLPs que mejores resultados habían proporcionado en medio scCO₂.

La enzima fue inmovilizada por simple adsorción con una disolución de CALB en contacto con los SILLPs. El primer efecto que se observó en la inmovilización fue que los SILLPs derivados de resinas de PS-DVB con grupos [C₁₀mim] en la cadena polimérica principal inmovilizaron casi el doble de enzima que en el soporte de PS-DVB sin modificar. Esto sugiere que ambas interacciones Coulómbicas e hidrofóbicas estuvieron involucradas en el mecanismo de inmovilización. Sin embargo, el aumento en la carga de IL en el soporte, disminuyó notablemente la carga enzimática, mientras que el aumento en la hidrofobicidad del soporte no la varió, sin embargo la estructura del esqueleto del SILLPs tuvo una importancia bastante significativa. Los SILLPs derivados de resinas tipo *Rasta* adsorbieron menos proteína que los derivados de resinas macroporosas de alta carga, los cuales tuvieron valores semejantes a los obtenidos en el soporte comercial de PS-DVB sin modificar, esto pudo deberse a que la alta carga iónica de las cadenas salientes de la cadena principal de PS-DVB y su flexibilidad pudieron producir la encapsulación de la enzima, fenómeno que no es comparable con la reticulación covalente de las cadenas, lo cual estorbó para la incorporación de unidades adicionales de enzima. A todo esto se le sumó la menor área específica de estos SILLPs fruto de la estructura de los derivados.

Al probar todos estos soportes en la reacción de síntesis de biodiesel en medio convencional (*tert*-butanol), se vio que las resinas macroporosas Merrifield resultaron ser excelentes para llevar a cabo esta reacción, con producciones comprendidas entre 81-95 % tras 24h de reacción, con relación al derivado inmovilizado en la resina de PS-DVB sin modificar (CALB-Amberlite XAD4) cuya producción fue del 52%, siendo la actividad de 3 a 4 veces inferior. El aumento de la carga de IL en el SILLPs, igual que ocurrió con el rendimiento de inmovilización, disminuyó ligeramente la producción de

biodiesel tras 24h de reacción, lo contrario que ocurrió con la hidrofobicidad del SILLPs, que favoreció notablemente esta reacción, debido posiblemente a la mayor estabilidad de la enzima en microambientes más hidrofóbicos, demostrándose nuevamente el rol que juega este parámetro en la actividad enzimática. La menor actividad de la enzima, se observó para los SILLPs con resinas Merrifield tipo *Rasta*, posiblemente por el bajo rendimiento obtenido en su inmovilización y al menor grado de protección frente al MeOH debido al menor grado de puntos de anclaje para la misma carga de grupos de IL en el soporte de inmovilización. Todo esto refleja nuevamente la importancia de la estructura formada por el soporte con unidades de IL para formar las propiedades finales de los derivados de CALB-SILLPs.

El interés de trabajar con sistemas catalíticos bifásicos basados en la combinación de ILs y scCO_2 con enzimas podrían representar un importante arsenal de herramientas verdes para desarrollar procesos químicamente verdes de interés industrial. Por esta razón, el interés de desarrollar un proceso continuo de síntesis de biodiesel en reactores continuos de lecho fijo con partículas de derivado inmovilizado CALB-SILLPs como lecho fijo. Para probar la eficiencia de este sistema, se eligieron como condiciones de reacción: 300 mg de derivado inmovilizado CALB-SILLPs, 10.2 μmoles de trioleína/min, 244.4 μmoles de metanol/min, bajo condiciones de scCO_2 (45 °C y 18 MPa), probándose en primer lugar el derivado inmovilizado en la resina macroporosa Merrifield de anión Cl^- con carga nominal de IL de 1.2 meq/g. El sistema resultó ser eficiente para la síntesis de biodiesel, mostrando tras el primer ciclo operacional de 6h, una producción de biodiesel entre el 78-95 %. No se detectó actividad enzimática fuera del reactor debido a la insolubilidad de la enzima en el scCO_2 . Sin embargo, tras 10 ciclos operacionales, la producción media del ciclo llegó a bajar hasta un 30%. Para probar que esta desactivación pudo deberse única y exclusivamente al envenenamiento del derivado CALB-SILLPs por el glicerol (subproducto de la reacción), que debido a su mayor carácter hidrofílico es muy poco soluble en la fase scCO_2 , se decidió lavar éste con *tert*-BuOH. Una vez liberados los centros activos del derivado CALB-SILLPs, se probó nuevamente (ciclo 11) obteniéndose una producción del 98%, pero tras nueve ciclos más, la producción volvió a caer, en menor medida que en los 10 primeros ciclos debido a las trazas residuales de *tert*-BuOH todavía presentes tras el lavado. Tras un segundo lavado, y vistos los inconvenientes de este sistema de transportar los compuestos más hidrofílicos producidos durante la reacción y causantes del

envenenamiento del biocatalizador, se decidió adicionar el cosolvente (*tert*-BuOH) en línea con los sustratos de la reacción. Para ello se seleccionó una razón molar 1: 1 con respecto al caudal de trioleína, observándose una producción prácticamente constante durante los adicionales 20 ciclos operacionales. Estos resultados indicaron la importancia de solventar las limitaciones difusionales para poder diseñar sistemas estables continuos para la síntesis de biodiesel.

Para estudiar los diferentes derivados de CALB-SILLPs sintetizados, en condiciones de $scCO_2$ y bajo la alimentación continua del cosolvente elegido (*tert*-BuOH), se comparó la producción media tras un ciclo operacional de 6h. Los resultados mostraron una tendencia ligeramente diferente a la obtenida en medio líquido homogéneo *tert*-BuOH visto anteriormente. Al igual que en el caso anterior, las mayores producciones se obtuvieron para los biocatalizadores CALB-SILLPs derivados de las resinas macroporosas Merrifield, con respecto a los derivados de las resinas sin tratar y las tipo *Rasta*. La influencia de la hidrofobicidad fue diferente en $scCO_2$, pudo traducirse en cambios de polaridad y organización estructural de las capas de IL, debido al mayor tamaño molecular y deslocalización de la carga para el ion NTf_2^- con respecto al ion Cl^- , la organización de la capa de $[C_{10}mim]$ no pudo mejorar la envoltura o el carácter protector de la enzima. Además de todo esto, las limitaciones difusionales involucran tanto la fase IL como la supercrítica por lo que un anión más grande e hidrofóbico pudo ser el causante de desfavorecer la salida del glicerol hacia la fase supercrítica, y por lo tanto, el responsable del aumento de las mismas.

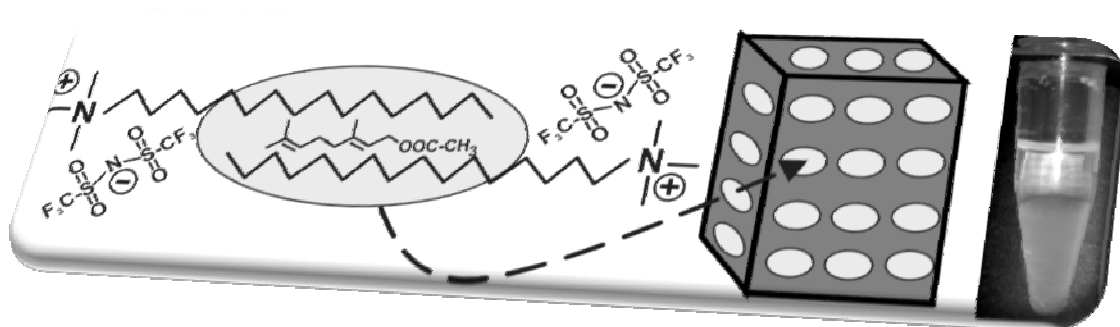
Por último, también se estudió la estabilidad operacional para los biocatalizadores CALB-SILLPs derivados de las resinas macroporosas, observándose como las mayores producciones y el menor envenenamiento de los biocatalizadores se produjo para los derivados con menor carga de IL e iones Cl^- .

Finalmente, podemos concluir el gran potencial que presentan la combinación de de estos nuevos materiales basados en el acoplamiento covalente de los ILs (SILLPs), combinados con los biocatalizadores y utilizados en sistemas continuos con disolventes verdes, como es el $scCO_2$, para la producción continua de biodiesel mediante una metodología totalmente respetuosa con el medio ambiente.

Capítulo IV:

Producción enzimática de ésteres de terpenos en SLILs, y su extracción mediante protocolos de centrifugación a temperatura controlada

(Ver Anexo V)



Los resultados presentados en este Capítulo se encuentran recogidos en la siguiente publicación:
Pedro Lozano, **Juana M. Bernal**, Alicia Navarro
“A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases”
Green Chemistry **2012**, 14(11):3026-3033

El objetivo de este capítulo fue el diseño de un nuevo enfoque limpio y sostenible medioambientalmente para llevar a cabo la síntesis biocatalítica de ésteres de terpenos en ILs sólidos e hidrofóbicos, objeto de interés en capítulos anterior, en los cuales se vio la bondad de estos nuevos medios de reacción para llevar a cabo reacciones enzimáticas debido principalmente al fuerte carácter hidrofóbico que presentaron debido al larga longitud de cadena del sustituyente alquílico de los ILs bis[(trifluorometil)sulfonilimida] de 1-alkuil-3-metilimidazolio. En este estudio, se decidieron probar por primera vez estos ILs sólidos hidrofóbicos (semejantes a los anteriores) pero del tipo bis[(trifluorometil)sulfonilimida] de N,N,N,N-alkuiltrimetilamonio o SLILs (“Sponge Like Ionic Liquids”) debido a las peculiaridades en su comportamiento.

Una vez determinado el punto de fusión del IL-[C₁₆tma][NTf₂] (pf = 64 °C) que se utilizó como modelo para los diversos ensayos, se procedió a realizar el estudio del comportamiento de fases tanto de sustratos como de productos, para ello se seleccionaron tres porcentajes de SLIL diferentes (50, 60 y 70%, w/w). Los resultados mostraron que tanto sustratos como productos formaron sistemas líquidos monofásicos a 50 °C, mientras que se formaban sistemas sólidos monofásicos a temperatura ambiente a pesar del punto de fusión de este IL (64°C). Tras conocer el comportamiento de los ésteres terpénicos en este nuevo medio de reacción, se pasó a diseñar un protocolo iterativo de centrifugación a temperatura controlada, con el objeto de extraer el producto puro mediante un protocolo sencillo y limpio. Mediante RMN de ¹⁹F se pudo observar como, el contenido en IL fue disminuyendo con las sucesivas etapas de centrifugación hasta desaparecer tras la última etapa. En lo referido a los rendimientos de extracción, se vio como este parámetro fue dependiente de la naturaleza del éster aromático (*i.e.* 51% para el acetato de geranilo, 82% para el acetato de isoamilo, 59% para el acetato de citronelilo, o 60% para el acetato de nerilo). Estos resultados se explicaron en función a la organización nano-estructurada del IL-[C₁₆tma][NTf₂], donde las largas longitudes de cadena del catión podrían interactuar formando “huecos” hidrofóbicos capaces de alojar los ésteres terpénicos. La disminución del volumen libre de éstos como consecuencia del descenso de temperatura y la compactación del SLIL-[C₁₆tma][NTf₂] como consecuencia de la centrifugación pudieron ser las principales causas de la extracción de los productos.

Una vez vista la posibilidades del SLIL-[C₁₆tma][NTf₂] como medio para la “disolución” de sustratos y a su vez, visto la capacidad del mismo para poder realizar la extracción de los productos “disueltos” en él mediante un protocolo sencillo y limpio debido a su carácter de matriz sólida con carácter tipo esponja (SLILs) en el que los compuestos terpénicos se encuentran “incluidos”, el siguiente paso fue evaluar su adecuación como medio de reacción para llevar a cabo la síntesis enzimática de los diversos ésteres terpénicos de interés industrial. Para ello se fijaron como condiciones de reacción, 50°C, 50% IL (w: w) y una razón molar de los sustratos de 2:3 (ácido acético: alcohol isoamílico, nerol, citronelol o geraniol), donde las producciones y actividades obtenidas dependieron de la naturaleza del alcohol empleado en la síntesis (citronelol > geraniol > nerol > alcohol isoamílico), obteniéndose un rendimiento de acetato de citronelilo del 89% (en base al ácido acético inicial) mientras que en el caso del acetato de isoamilo sólo se obtuvo un 14% tras 2 horas de operación y una actividad 12.5 veces mayor en un caso que en el otro.

Con objeto de aumentar la producción de acetato de isoamilo y de evaluar la influencia del medio SLIL-[C₁₆tma][NTf₂], se adicionó 4 veces más cantidad de enzima y se diseñaron cuatro experimentos bajo las mismas condiciones, dos de ellos en medio libre de disolvente (con y sin agente desecante MS13X) y los otros dos en medio [C₁₆tma][NTf₂]. En ambas situaciones, con y sin IL, se observó la clara mejora en la producción por la presencia del agente desecante en el medio. Esto se debió a que al tratarse de una reacción reversible, al eliminar el agua de la reacción se pudo desplazar el equilibrio hacia la formación del acetato de isoamilo. Sin embargo, el rendimiento mejoró realmente en medio SLIL-[C₁₆tma][NTf₂], obteniéndose rendimientos cercanos al 100% tras 4 horas de reacción en el caso en el que se empleó conjuntamente con el agente desecante. Esto se debió a la excelente capacidad de los ILs hidrofóbicos con comportamiento tipo “*esponja*” (SLILs) como medios de reacción para llevara a cabo reacciones de transesterificación y esterificación catalizadas por lipasas.

El efecto de la longitud de cadena de los cationes de los SLILs tipo [N,N,N,N-alquiltrimetilamonio][NTf₂] también fue estudiado para la síntesis de acetato de isoamilo. Se pudo ver que, la producción aumentó conforme lo hizo este parámetro (*i.e.*, [C₁₂tma][NTf₂] < [C₁₄tma][NTf₂] < [C₁₆tma][NTf₂] < [C₁₈tma][NTf₂]) obteniéndose rendimientos próximos al 100% para los casos en los cuales se emplearon [C₁₆tma][NTf₂] y [C₁₈tma][NTf₂].

Otro parámetro de enorme relevancia en reacciones de equilibrio es la adición de uno de los sustratos en exceso con la finalidad de desplazar la reacción hacia la formación de productos. Por esta razón se estudiaron tres razones molares de ácido acético: alcohol isoamílico, 3:3, 2:3 y 1:3, manteniéndose constante los demás parámetros (cantidad de enzima/mmol de ácido acético, cantidad de MS13X/mmol de ácido acético y temperatura de reacción, 50°C) y variándose conjuntamente el %IL-[C₁₆tma][NTf₂] (50, 60 y 70% IL). Como cabía esperar, el aumento de la cantidad del alcohol isoamílico desde las condiciones equimolares hasta un exceso del doble del alcohol requerido para la síntesis, logró desplazar el equilibrio hacia la formación del éster deseado, obteniéndose producciones cercanas al 100% independientemente del porcentaje de IL para los tres casos ensayados, tanto para la razón molar 1:3 como para la 2:3. El caso más desfavorable se dio para la condición equimolar, observándose en este caso un papel fundamental la cantidad de SLIL-[C₁₆tma][NTf₂] en el medio de reacción y por lo tanto, de la dilución de los sustratos. Esto pudo explicarse en base a la elevada concentración de ácido acético y el rol que tuvo que jugar el SLIL hidrofóbico como medio diluyente y estabilizante de la enzima.

La adecuada metodología propuesta para la síntesis de acetato de isoamilo se probó para la obtención de otros 15 ésteres de terpenos, evaluándose en todos ellos el efecto de la razón molar para un porcentaje de IL-[C₁₆tma][NTf₂] fijo, en este caso fue del 60%. Para llevar a cabo estas reacciones, se seleccionaron cuatro ácidos carboxílicos (*i.e.*, ácido acético, propiónico, butírico y valérico) y los cuatro alcoholes que han sido objeto de estudio en este trabajo (*i.e.*, alcohol isoamílico, nerol, geraniol o citronelol). En todos los casos y para las tres razones molares estudiadas, se obtuvieron rendimientos superiores al 90%, mostrándose así, una vez más la idoneidad de estos ILs hidrofóbicos con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena para llevar a cabo la síntesis enzimática de ésteres de terpenos, alcanzándose concentraciones finales de producto de hasta 0.757 g/mL, libres de IL.

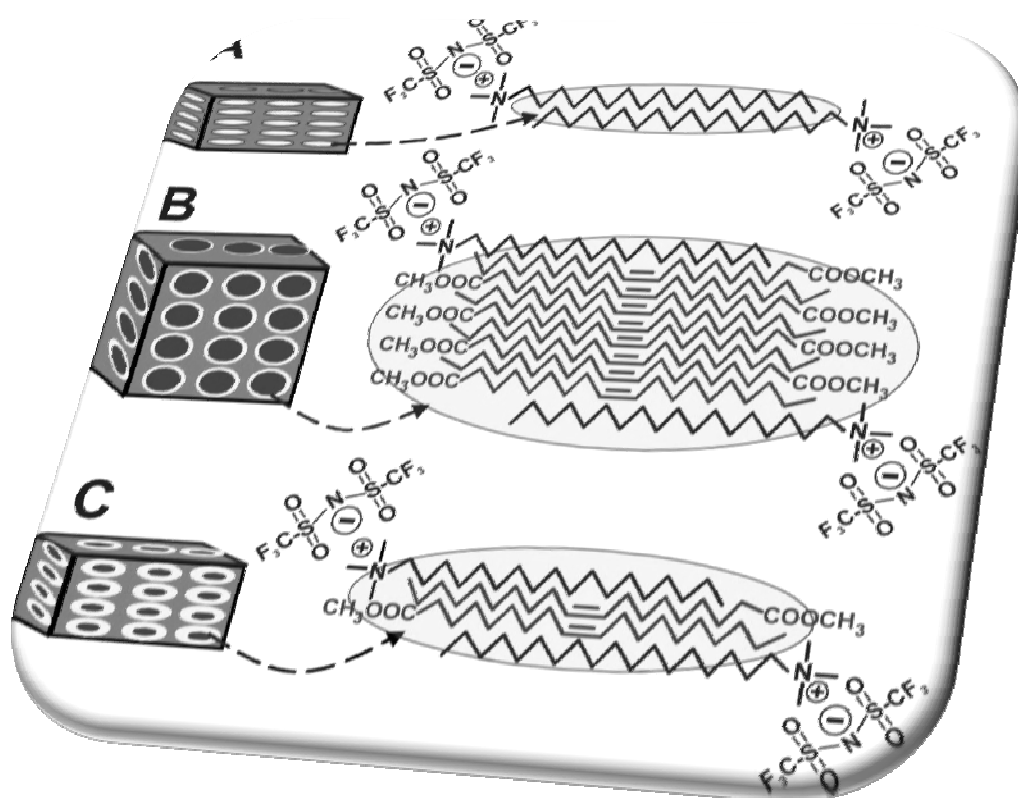
Una vez visto esto, el criterio clave para poder escalar un proceso biocatalítico a escala industrial (como se dijo anteriormente), es poder llevar a cabo tanto el reciclaje del IL como la recuperación de la enzima. Por esta razón, se propuso un protocolo cíclico a escala de laboratorio para la síntesis de diferentes ésteres de terpénicos (*i.e.*, acetato de isoamilo, propionato de isoamilo, butirato de isoamilo, acetato de citronelilo y acetato de geraniol). Las condiciones de reacción que se seleccionaron fueron: 60%

IL-[C₁₆tma][NTf₂] en peso, una razón molar de ácido acético: alcohol de 2:3, 40 mg del derivado enzimático inmovilizado Novozym 435 por mmol de ácido acético y 50°C. Para simplificar el protocolo, no se utilizó agente desecante y con el fin de subsanar el efecto de éste, se aumentó el tiempo de operación de 4 a 14 horas. La etapa catalítica fue seguida de una etapa de enfriamiento a temperatura ambiente, tras la cual se procedió a aplicar el protocolo de centrifugación a temperatura controlada diseñado para tal fin (4 etapas de 15 min cada una a 14000 rpm bajo las siguientes temperaturas; 25, 21, 10 y 4 °C). Tras finalizar esta etapa, se incubaron los medios SLIL-[C₁₆tma][NTf₂] con el derivado inmovilizado a presión reducida durante 2 horas a 50°C, con el objetivo de eliminar el agua producida y las trazas de sustratos y productos presentes en el medio. Los resultados mostraron como la producción se mantuvo prácticamente constante tras 7 ciclos de operación, mostrándose así la bondad de estos SLILs no sólo como medios de reacción para la síntesis enzimática de ésteres de terpenos vía esterificación directa, sino que también resultaron excelentes medios para la separación de los productos. Este trabajo ha permitido demostrar que es posible llevar a cabo el diseño de un proceso integral verde de producción biocatalítica de ésteres de terpenos, obteniendo concentraciones de producto de hasta 0.757 g/mL, que podría ser fácilmente escalable a nivel industrial, y que con la adecuada selección de los sustratos, los productos obtenidos podrían ser clasificados como productos naturales.

Capítulo V:

Proceso de síntesis enzimática de biodiesel en SLILs, empleando como métodos de separación protocolos de centrifugación a temperatura controlada acoplados a extracciones líquido-líquido

(Ver Anexo VI)



Los resultados presentados en este Capítulo se encuentran recogidos en la siguiente publicación:
 Pedro Lozano, **Juana M. Bernal**, Gregorio Sánchez, Gregorio López, Michel Vaultier
 “How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids”
Energy & Environmental Science, **2013**; 6(4): 1328-1338

Los ILs basados en cationes con sustituyentes alquílicos de larga longitud de cadena (i.e. $[C_{16}tma][NTf_2]$, $[C_{18}mim][NTf_2]$,...) han demostrado ser excelentes medios líquidos monofásicos para llevar a cabo la síntesis enzimática catalizada por lipasa tanto de ésteres de terpenos, como de biodiesel. El carácter conmutable sólido/líquido de estos nuevos medios de reacción con comportamiento tipo esponja-SLILs (pueden pasar de sólidos a líquidos en función de la temperatura o *viceversa* modificando su capacidad para disolver solutos) visto en el Capítulo IV, y que fue aplicado con éxito para el diseño de un protocolo sencillo y limpio para la obtención de ésteres de terpenos, fue objeto de estudio para el diseño de un nuevo protocolo de obtención de biodiesel mediante síntesis enzimática catalizada por el derivado enzimático inmovilizado Novozym 435 a partir de triacilglicéridos (trioleína) y metanol.

En primer lugar, se determinaron los puntos de fusión de tres de los cuatro ILs empleados en este estudio ($[C_{12}tma][NTf_2]$, $[C_{14}tma][NTf_2]$, $[C_{16}tma][NTf_2]$ y $[C_{18}tma][NTf_2]$), observándose igual que ocurrió en el caso anterior con los ILs de naturaleza 1-alkil-3-metilimidazolio (ver *Anexo III*) como el incremento de la longitud de la longitud de cadena del sustituyente alquílico fue el causante del aumento de las interacciones de van der Waals y por lo tanto, de este parámetro.

Los estudios de solubilidad de los sustratos (trioleína y metanol, a una razón molar 1:6) en los 4 nuevos SLILs del tipo $[C_i tma][NTf_2]$ para $i = 12, 14, 16$ y 18 , y para el IL- $[C_4 tma][NTf_2]$, se realizaron a $60^\circ C$. Los resultados mostraron como para los casos $[C_4 tma][NTf_2]$ y $[C_{12} tma][NTf_2]$, los sistemas resultaron ser siempre claramente bifásicos. La capacidad de disolver los sustratos por parte de los SLILs más hidrofóbicos se observó para longitudes de cadena superiores a los 12 átomos de carbono, observándose como al aumentar el carácter hidrofóbico la cantidad de estos SLIL requerida para disolver los sustratos fue menor.

Una vez visto el poder solvente de la mayoría de estos SLILs, se evaluaron estos nuevos medios para la síntesis enzimática de biodiesel catalizada por Novozym 435. Los resultados mostraron una mejora abismal en la actividad enzimática al pasar de ILs con sustituyentes alquílicos en el catión de 4 a 12 átomos de carbono, y de aquí en adelante la mejora fue menos acentuada, observándose en los SLILs conversiones cercanas al 100% tras sólo 4 horas de reacción. Esto pudo explicarse en base a la alta solubilidad de los sustratos en estos nuevos medios de reacción, aunque en las condiciones de estudio no todos los SLILs consiguieron inicialmente disolver los

sustratos del medio de reacción en su totalidad, pero debido a las altas actividades enzimáticas (del orden de 30 veces superior en los SLILs que en el IL-[C₄tma][NTf₂]) en ellos la concentración de los mismos disminuyó rápidamente generándose prácticamente a las 2 horas medios homogéneos.

Otro parámetro de enorme relevancia visto en capítulos anteriores, fue el porcentaje de IL en el medio de reacción. Aquí, se vio como fue necesaria una cantidad mínima de SLIL para obtener producciones de biodiesel cercanas al 100% tras 8 horas de operación. Esto se explicó, por un lado en base a la solubilidad de los sustratos, que como se vio anteriormente, el porcentaje de SLIL en el medio fue determinante para lograr medios monofásicos, y por otro lado, jugó un papel decisivo en la protección del microentorno óptimo de la enzima.

Una vez visto las bondades de los SLILs como medios de reacción para la reacción de síntesis enzimática de biodiesel, se estudió la estabilidad térmica a 60°C del derivado enzimático inmovilizado en medio SLILs-trioleína para los casos [C₁₄tma][NTf₂], [C₁₆tma][NTf₂] y [C₁₈tma][NTf₂], con el objeto de evaluar la vida media del biocatalizador ya que a escala industrial es básico no sólo garantizar la reciclabilidad del mismo, sino que también su estabilidad frente al tiempo de uso. Las estabildades fueron excelentes en los tres casos, manteniéndose una actividad residual alrededor del 90% tras 100 días de incubación y una *vida media* entorno a los 1370 días, obtenida para una aproximación cinética de primer orden. Mostrándose una vez más la habilidad de los ILs hidrofóbicos para estabilizar la enzima.

Como se ha venido diciendo en capítulos anteriores, las claves para el desarrollo de un proceso industrial de síntesis enzimática de biodiesel además del reciclado de la enzima es, desarrollar un protocolo de extracción de los productos y reactivos sin reaccionar, con la finalidad de poder reciclar el SLIL para sucesivos ciclos operacionales. Teniendo en cuenta los puntos de fusión de los SLILs-[C₁₂₋₁₈tma][NTf₂] y el comportamiento de fases de los productos, se desarrolló un protocolo sencillo de extracción del biodiesel en base al comportamiento conmutables de los SLILs. Para el diseño del protocolo, se ensayaron mezclas de los SLILs-([C₁₂tma][NTf₂], [C₁₄tma][NTf₂], [C₁₆tma][NTf₂] y [C₁₈tma][NTf₂]) y del biodiesel para una razón másica 55/45, w/w, que resultaron líquidas monofásicas a 60°C y sólidas monofásicas a temperatura ambiente, excepto la muestra con SLIL-[C₁₂tma][NTf₂]. A todos los medios se les aplicó el mismo protocolo de centrifugación consistente en tres etapas

consecutivas; **etapa 1**- 50 min y 15000 rpm a temperatura ambiente (no controlada), **etapa 2**-50 min y 15000 rpm a 23 °C y finalmente, **etapa 3**-50 min y 15000 rpm a 15°C, obteniéndose los SLILs y el biodiesel como sobrenadante. Los rendimientos de extracción fueron decreciendo conforme aumentó la longitud de cadena del SLILs (59.8 a 39.8%), mientras que la pureza fue incrementándose, traduciéndose este hecho en un menor contenido residual de SLILs en el biodiesel extraído (0.64 a 0.06%). Este experimento se repitió con la salvedad de que a las mezclas líquidas se les adicionó 500 µL de agua a 60°C y fueron vigorosamente agitadas, con una doble finalidad, aumentar los rendimientos de extracción favoreciendo la ruptura de la dispersión sólido-líquido y extraer en la misma etapa, el glicerol producido y el metanol residual. Lo primero que se observó fue que la disposición de las fases fue; agua en la interfase, biodiesel como sobrenadante y el IL en la parte interior, la separación estuvo acorde con las densidades (IL<agua<oleato de metilo). La principal diferencia que se observó con respecto al caso anterior fue que aquí sí que se consiguió separar el biodiesel del SLIL-[C₁₂tma][NTf₂], mientras que la tendencia observada en los rendimientos de extracción fue la misma (59.8 a 39.8%) aunque con rendimientos de extracción ligeramente superiores, lo mismo ocurrió con la pureza del biodiesel (3.45% - n.d.) donde se llegó a observar mediante RMN de ¹⁹F cómo el biodiesel extraído del SLIL- [C₁₈tma][NTf₂] estaba prácticamente exento del mismo. Los ensayos se repitieron adicionando agua deuterada en lugar de agua normal, para evaluar mediante ¹³C-RMN si todo el glicerol y el metanol presente en la mezcla se quedaban en la fase acuosa, y efectivamente así fue.

A pesar del excelente enfoque que ofrecían los SLILs para la separación tanto del biodiesel como del metanol, el bajo rendimiento de extracción (*i.e.*, 51.8% para [C₁₆tma][NTf₂] y 48.9% [C₁₈tma][NTf₂]) resultó una clara limitación para su posible explotación industrial. Para evaluar realmente la naturaleza del problema, se estudió la capacidad de ambos SLILs, [C₁₆tma][NTf₂] y [C₁₈tma][NTf₂], para disolver y desorber el biodiesel durante 5 ciclos mediante el protocolo de centrifugación a temperatura controlada propuesto, incluyendo la etapa de adición de agua, y adicionando en cada etapa biodiesel nuevo. Los resultados mostraron como el rendimiento de extracción fue aumentando durante los tres primeros ciclos y luego permaneció constante para los siguientes ciclos con la totalidad del oleato de metilo extraído, manifestándose nuevamente como los SLILs se comportaban como “esponjas mojadas” hasta un límite de saturación a partir del cual eran capaces de extraer todo el biodiesel disuelto.

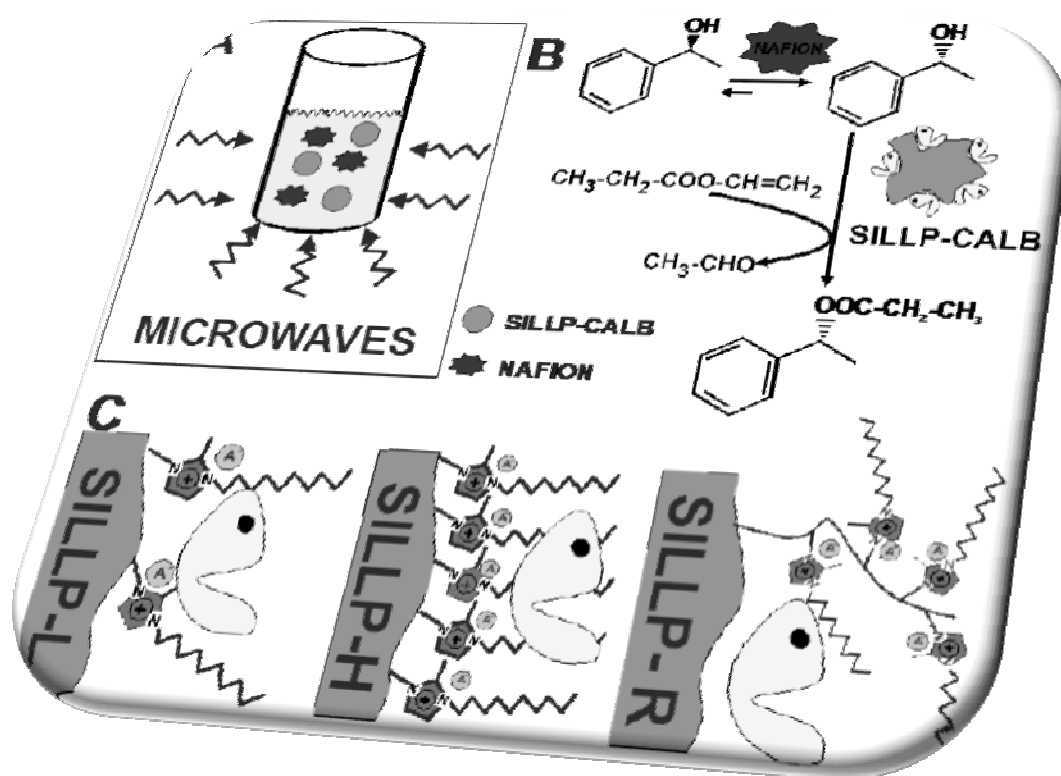
Una vez vista la estabilidad térmica del biocatalizador y la posibilidad de establecer un proceso de recuperación y reutilización sencillo de los SLILs, el siguiente paso fue evaluar esto en un protocolo cíclico de reutilización de ambos. A pesar de lo visto anteriormente, se observó cómo tras el primer ciclo la producción en biodiesel cayó bruscamente y así gradualmente hasta el tercer ciclo. Esto se debió al diseño del protocolo, ya que en sí no se garantizaba la total eliminación del glicerol producido durante el proceso, debido a que una parte importante se iba depositando sobre el biocatalizador aumentando las limitaciones difusionales en ciclos sucesivos. Con objeto de poder solventar este problema, a partir del tercer ciclo y tras separar el medio de reacción del biocatalizador, este último se lavó con *tert*-butanol recuperándose totalmente la actividad enzimática y volviéndose a obtener producciones en biodiesel en torno al 100% durante 15 ciclos operacionales, demostrándose así la adecuación de estos SLILs como excelentes medios de reacción para llevar a cabo la síntesis de biodiesel, y de separación del mismo.

Las propiedades únicas de líquidos iónicos hidrófobos, basados en cationes con largas cadenas laterales de alquilo (*i.e.* [C₁₈tma][NTf₂]), con fases conmutables líquidas/sólidas permiten incluir una nueva característica entre su amplio abanico de propiedades, que es su comportamiento como sistemas de tipo esponja. La capacidad de los SLILs de "empapar" el biodiesel como una fase líquida, el cual puede ser "escurrido" por centrifugación en una fase sólida, es una propiedad única de estos ILs. Este trabajo pone de manifiesto una vez más, la idoneidad de los SLILs para llevar a cabo procesos verdes integrales de transformación biocatalítica de interés para la industria, demostrándose la sostenibilidad del proceso en base a la recuperación y reutilización total de los sistemas empleados en el proceso.

Capítulo VI:

Efecto de la irradiación de microondas en la resolución cinética del rac-1-feniletanol catalizada por CALB-SILLPs

(Ver Anexo VII)



Los resultados presentados en este Capítulo se encuentran recogidos en la siguiente publicación:

Diana F. Izquierdo, **Juana M. Bernal**, M. Isabel Burguete, Eduardo García-Verdugo, Pedro Lozano and Santiago V. Luis
 “An efficient microwave-assisted enzymatic resolution of alcohols using a lipase immobilised on supported ionic liquid-like phases (SILLPs)”
RSC Advances, **2013**, 3(32), 13123-13126

La resolución cinética de mezclas racémicas mediante la utilización de enzimas es una ruta común y barata para la producción de productos químicos enantioméricamente puros a escala industrial. Sin embargo, el rendimiento químico de esta reacción enzimática se limita al 50%, y esto ha estimulado el acoplamiento de la resolución cinética con la racemización in situ. La resolución cinética dinámica (DKR) permite obtener un alto rendimiento del producto enantioméricamente puro (hasta el 100%) a partir de una mezcla racémica.

La modificación del medio de reacción con objeto de reducir el papel del agua en reacciones catalizadas por enzimas hidrolíticas, permitió un claro desplazamiento del equilibrio termodinámico hacia las reacciones de síntesis, además de disminuir posibles reacciones secundarias como la hidrólisis del producto, o la modificación de la estabilidad térmica y estructural de la enzima. Todo esto, acoplado a las ventajas que ofrecen los ILs inmovilizados en soportes porosos los cuales se ha demostrado, permiten la mejora de la difusión y solventan la posible pérdida de IL empleado durante el proceso, obteniéndose así, un material de fácil utilización, recuperación y reutilización, han sido las claves para el desarrollo de un nuevo proceso de resolución cinética dinámica del *rac*-1-feniletanol.

Actualmente, el uso de la radiación de microondas (MW) se está expandiendo de forma considerable en el campo de la química orgánica, ya que constituye una fuente de energía eficaz y más limpia que el calentamiento convencional por convección. Demostrándose también, como el empleo de esta radiación es capaz de acelerar el proceso enzimático debido, principalmente a los cambios conformacionales que se producen en la propia enzima.

Por otro lado, los ILs han emergido como nuevos medios de reacción para procesos enzimáticos, e igualmente se ha explorado su potencial para síntesis asistidas por microondas, debido a su carácter polar que los hace muy adecuados para captar dicha radiación. En este contexto, los SILLPs que se pueden definir como matrices poliméricas modificadas con unidades de ILs pueden considerarse como “disolventes iónicos sólidos” o como materiales nanoestructurados con microentornos de polaridad modulable con comportamiento similar.

Por esta razón, se decidió acoplar por primera vez las sinergias asociadas al empleo de enzimas inmovilizadas sobre SILLPs junto con la radiación de MW, con el objetivo

de mejorar y desarrollar un proceso más eficiente de resolución enzimática de alcoholes secundarios.

Para la preparación de los SILLPs, se utilizaron distintos tipos de resinas de tipo poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB): resinas macroporosas con bajo (SILLPs-L) y alto grado de funcionalización (SILLPs-H) y resinas tipo rasta (SILLPs-R), altamente funcionalizadas. La reacción de los grupos clorometilo de las mismas con 1-dodecil-2-metilimidazol condujo a los SILLPs correspondientes.

La inmovilización de la enzima (CALB) sobre un SILLP, con Cl^- ó NTf_2^- como contraión, se consiguió por adsorción desde una solución acuosa de la misma. Para poder comparar, también se inmovilizó la CALB sobre amberlita XAD-4 comercial, resina también basada en PS-DVB, pero sin fragmentos de ILs.

En primer lugar, se llevó a cabo la resolución cinética (KR) del *rac*-feniletanol con propionato de vinilo como dador de acilo catalizada por estos CALB_SILLPs, para evaluar los efectos de la radiación MW sobre los parámetros de reacción tales como la esteresoselectividad y actividad, utilizándose en todos los casos ciclohexano como disolvente (disolvente transparente a la radiación MW) y ciclos de 10 min.

Alternativamente, estos catalizadores se ensayaron también en un sistema de calentamiento convencional. En ambos casos, se alcanzó la temperatura deseada (40°C) en cuatro minutos. Todas las enzimas soportadas catalizaron la reacción de formación de propionato de (*R*)-1-feniletilo con excelente *e.e.* (>99%).

Los resultados obtenidos para las enzimas inmovilizadas mostraron una clara dependencia tanto de las características de los SILLPs como de la fuente de calor aplicada. Así, mientras que la CALB-XAD4 mostró una enantioselectividad y actividad independiente de la fuente de calor utilizada, el uso de los SILLPs como soporte condujo a una mejora importante en cuanto a la actividad cuando se empleó CALB-SILLP-L, radiación MW, SILLPs con anión NTf_2^- , etc. Igualmente, se pudo observar que, independientemente del contraión, la CALB-SILLP-L fue del orden de 6-8 veces más activa bajo radiación de MW que utilizando una fuente de calor convencional. El uso de SILLPs tipo *Rasta* con una distribución no homogénea del IL mostró una baja actividad con el uso de ambas fuentes de calor, lo que sugirió que la presencia de regiones con una alta concentración de fragmentos de IL probablemente condujo a la

formación de dominios o regiones altamente hidrofóbicos que pudieron afectar a los procesos de transferencia de masa de los reactivos y productos hacia los centros activos, además de que adsorbieron menos proteína que los derivados de resinas macroporosas de alta carga, los cuales tuvieron valores semejantes a los obtenidos en el soporte comercial de PS-DVB sin modificar, esto pudo deberse a que la alta carga iónica de las cadenas salientes de la cadena principal de PS-DVB y su flexibilidad pudieron producir la encapsulación de la enzima, fenómeno que no fue comparable con la reticulación covalente de las cadenas, lo cual estorbó para la incorporación de unidades adicionales de enzima. Por otro lado, los resultados obtenidos con CALB-SILLP-H, en una alta concentración de grupos ILs distribuidos homogéneamente, también mostraron una baja eficiencia catalítica con ambas aproximaciones de calentamiento. Lo que si se observó en todos los casos en los cuales se emplearon SILLPs, fue que la naturaleza más hidrofóbica del contraión NTf_2^- con respecto al Cl^- , fue responsable de mejoras bastante significativas en la actividad.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se pudo concluir que el efecto del calentamiento por MW sobre los materiales que contienen SILLPs depende fuertemente de distintos factores como son: la carga de IL, la naturaleza del contraión y la naturaleza de la arquitectura del polímero.

Igualmente, se estudió la actividad residual de estos sistemas en distintos ciclos, bajo calentamiento por MW, observándose que la actividad de ambos derivados de CALB-SILLP-L (*i.e.*, contraiones Cl^- y NTf_2^-) no se modificaron durante su reutilización, lo que sugirió que el microentorno proporcionado por las unidades de IL fue capaz de mantener la actividad de la enzima frente a su desactivación por un supercalentamiento debido a la radiación de MW. Sin embargo, esto no ocurrió ni con soportes libres de fragmentos de ILs, ni con aquellos con una alta concentración de los mismos, ya que en estos casos, se produjo una rápida desactivación de los mismos cuando se utilizó la radiación de MW.

Estos resultados permitieron concluir que un diseño adecuado del soporte de los SILLPs no sólo contribuye a mejorar la actividad de la enzima sino también su estabilidad. Finalmente, se llevó a cabo la resolución cinética dinámica (DKR) del *rac*-1-feniletanol mediante la combinación del Nafion-SAC13 y la CALB-SILLP-L bajo radiación por MW (rendimientos del 70-80% y e.e. 94-99% para el correspondiente *R*-

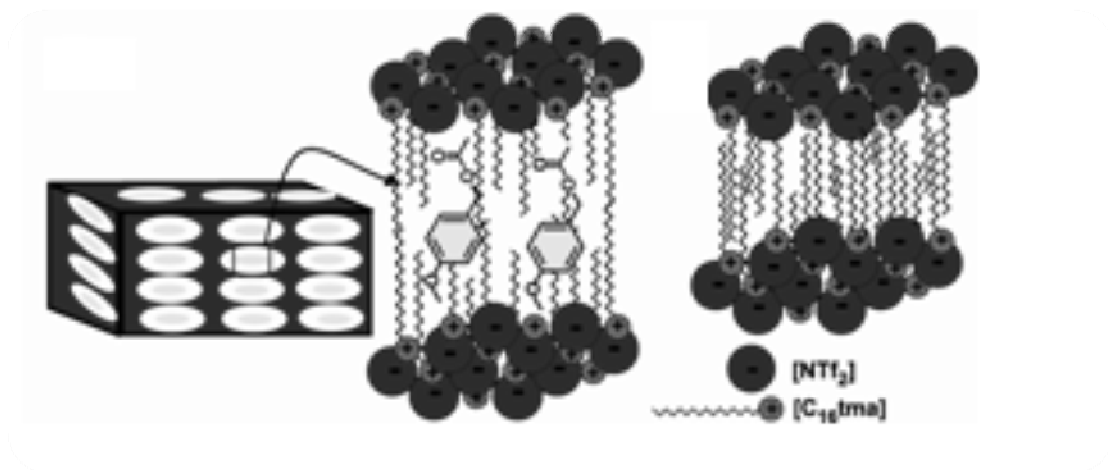
éster). Estos resultados fueron claramente mejores que los descritos cuando que los obtenidos en condiciones de calentamiento convencional (e.e. 71%), mostrándose nuevamente la eficacia de este tipo de calentamiento, esta vez para reacciones quimioenzimáticas.

Los resultados aquí presentados ilustran por primera vez el efecto intrínseco de la irradiación de microondas en biocatálisis con líquidos iónicos soportados en fases sólidas. Además, los SILLPs pueden contribuir a la estabilidad a largo plazo de los biocatalizadores, lo que permite su uso prolongado bajo irradiación de microondas. Estos resultados abren la puerta para el empleo de microondas en procesos multienzimáticos y/o multicatalíticos en procesos químicos verdes.

Capítulo VII:

Efecto de la irradiación con microondas en la síntesis enzimática de acetato de anisilo mediante esterificación directa en SLILs, empleando sistemas de filtración para la separación del producto.

(Ver Anexo VIII)



Los resultados presentados en este Capítulo se encuentran recogidos en la siguiente publicación:
 Pedro Lozano, **Juana M. Bernal**, Almudena Lajarin, Daniel Romera, Eduardo García-Verdugo, Gregorio Sánchez-Gomez, Mathieu Pucheault, Michel Vaultier, M. Isabel Burguete and Santiago 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”
Current Green Chemistry, **2014**; 90: 3461–3467

El acetato de anisilo es un ingrediente de fragancias usado en cosmética y en productos de perfumería fina con una consumición mundial entre 1-10 toneladas por año. A pesar de su alta demanda, la síntesis enzimática de acetato de anisilo nunca ha sido publicada, siendo la esterificación directa de ácido acético con alcohol anisílico en medio libre de disolvente la estrategia más atractiva para obtener el éster de interés. Por esta razón se eligió como fragancia idónea para ser sintetizada con ILs hidrofóbicos con longitudes de cadena larga o SLILs (“*Sponge Like Ionic Liquids*”), debido a sus genuinas propiedades ya demostradas anteriormente. Para llevar a cabo la síntesis, se decidió probar por primera vez los SLILs empleando calentamiento convencional, e irradiación por microondas, debido a las mejoras catalíticas sobre los SLLIPs vistas en el capítulo anterior.

Para garantizar que los SLILs-[C_ntma][NTf₂] (n = 12, 14, 16 o 18) podían resultar medios adecuados para la reacción biocatalítica y para la posterior separación del producto, se realizaron los pertinentes estudios de solubilidad para cada uno de ellos a diferentes porcentajes; 50, 60, 70 y 80%, disolviendo mezclas equimolares de los sustratos ácido acético y alcohol anisílico, y por otra parte el producto (acetato de anisilo) en ellos, y estudiándose el comportamiento de fases en un rango de temperaturas comprendido entre (30 y 60°C). En todos los casos se observó cómo tanto sustratos como productos resultaron miscibles en ellos, bajo todas las condiciones ensayadas, siendo la naturaleza del sistema sólida, semisólida o líquida en función de la naturaleza del SLIL, el porcentaje del mismo en el medio y de la temperatura. En particular, a 50°C resultaron todos los sistemas líquidos monofásicos, a excepción del [C₁₈tma][NTf₂] que necesitó de más temperatura para lograrlo (60°C), mientras que a 30°C, sólo los SLILs-[C₁₆tma][NTf₂] y [C₁₈tma][NTf₂] resultaron sólidos monofásicos.

Para llevar a cabo la síntesis enzimática de acetato de anisilo en condiciones equimolares de sustratos y con la presencia de agente desecante MS-13X en SLILs-[C₁₆tma][NTf₂] se decidió realizar la reacción mediante calentamiento convencional y asistida por microondas, para evaluar realmente el efecto de la radiación en el perfil de conversión frente al tiempo. Los resultados mostraron una actividad enzimática ligeramente superior en el caso en el cual se llevó a cabo la reacción bajo una potencia microondas de 4W frente al calentamiento convencional llevado a cabo a 50°C. Otro fenómeno que se observó fue que a las 4 horas, la producción alcanzada ya estaba estabilizada en la reacción bajo irradiación por microondas (mismo valor que el

alcanzado prácticamente a los 45 min) y por el que fue necesario ese periodo de tiempo para alcanzar el mismo valor en la reacción por calentamiento convencional. Esto se explicó en base al sinergismo entre los efectos térmicos y no térmicos que se dan en este tipo de irradiación. En lo referente a los efectos no térmicos, hay que tener en cuenta que pueden llegar a inducir cambios selectivos en la conformación de la proteína, estimulando movimientos certeros del biocatalizador.

Para evaluar la influencia del SLIL-[C₁₆tma][NTf₂] como medio en esta reacción enzimática asistida por MW frente a la reacción libre de disolvente, en ambos casos en presencia y ausencia de agente desecante MS-13X, se eligieron condiciones equimolares de los sustratos. Los resultados mostraron como en ausencia del SLIL la producción en acetato de anisilo fue despreciable, aunque al adicionar el agente desecante este valor aumentó prácticamente al doble. Esto pudo deberse a la elevada concentración de ácido acético presente en el medio de reacción (5.42 M) que pudo provocar la desactivación del biocatalizador. Sin embargo, el rendimiento fue mejorado enormemente cuando la reacción de esterificación fue llevada a cabo en medio SLIL-[C₁₆tma][NTf₂] al 70% (w/w) en presencia de agente desecante, obteniéndose una producción en acetato de anisilo del 81% tras 1 hora de reacción.

Otro parámetro a evaluar fue la carga óptima del biocatalizador para la reacción en medio SLIL-[C₁₆tma][NTf₂] en calentamiento convencional y bajo irradiación por MW. La cantidad de enzima óptima fue 40 mg/mmol de derivado inmovilizado Novozym 435, aplicándose este parámetro para el resto de experimentos llevados a cabo en los siguientes estudios.

Tras ver la enorme importancia de la temperatura en el comportamiento de fases de los sustratos y productos en los SLILs-[C_ntma][NTf₂] (n = 12, 14, 16 y 18), se decidió estudiar este efecto en la reacción con calentamiento convencional y bajo irradiación por MW. Por esta razón se evaluó el efecto de la temperatura en un rango comprendido entre 40-60 °C sobre la producción tras 4 horas de reacción en un caso y la potencia de irradiación 3-6W (con temperaturas equivalentes) para la producción tras 1 hora de reacción en el otro. Los resultados en ambos casos mostraron la misma tendencia, hubo un incremento en la producción hasta llegar a un máximo dependiente a su vez del SLIL (al aumentar la longitud de cadena el máximo se fue desplazando a temperaturas superiores, ya que a pesar de que todos los medios fueron líquidos en las

condiciones ensayadas, el aumento de la longitud de cadena, favoreció también el incremento de la viscosidad) y luego la producción disminuyó de forma gradual con aumentos de temperatura o potencia, fenómeno que se atribuyó a la posible desactivación enzimática y que fue menos acentuado al aumentar la longitud de cadena debido al mayor carácter hidrofóbico del mismo y por lo tanto al mayor carácter protector del SLIL. Este parámetro también tuvo enorme importancia en la naturaleza de las fases para los distintos porcentajes de SLIL-[C₁₆tma][NTf₂] (SLIL que mejores resultados mostró). Por esta razón, se evaluó para su temperatura (50 °C) y potencia de irradiación de MW (4W) óptimas, la producción a 4 y 1 horas para cuatro porcentajes de SLIL-[C₁₆tma][NTf₂] (50, 60, 70 y 80%), viéndose que existió una cantidad mínima de SLIL a partir de la cual la producción aumentó enormemente (70 y 80%). Esto se debió a que la enorme concentración de ácido presente en el medio generaba un fuerte poder desactivante sobre la enzima, y al diluir el mismo con un agente altamente hidrofóbico, la estabilidad de la misma aumentó, permitiendo así obtener producciones de acetato de anisilo más elevadas.

Pese a la optimización de todos los parámetros anteriores no se consiguió superar un máximo de producción del 82%, esto se debió al carácter reversible de la reacción que no permitió superar este límite, por esta razón se decidieron probar excesos de alcohol anisílico superiores al requerido por la estequiometría de la reacción, ensayándose tres razones molares de ácido acético:alcohol anisílico; 1:3, 2:3 y 3:3, manteniendo todos los demás parámetros de estudio constantes. Los resultados mostraron un incremento de la producción al aumentar el exceso de alcohol en el medio de reacción, con valores por encima del 95% para la razón molar 1:3. Esto se debió principalmente, a que se consiguió desplazar el equilibrio hacia la formación de productos al aumentar la cantidad de alcohol (Principio de Le Châtelier).

Una vez evaluado todo esto, para realmente proponer una metodología viable para la producción de acetato de anisilo a escala industrial fue necesario establecer un protocolo sencillo tanto de recuperación del SLIL hidrofóbico como del biocatalizador. Por esta razón se seleccionaron los SLILs que mejores resultados habían proporcionado ([C₁₂tma][NTf₂], [C₁₄tma][NTf₂] y [C₁₆tma][NTf₂]) y atendiendo al comportamiento de fases ofrecido a temperatura ambiente en el cual todos los medios solidificaron menos el [C₁₂tma][NTf₂] que permaneció líquido, se decidió establecer un nuevo protocolo de separación del éster aromático disperso en la matriz sólida del SLIL. El protocolo

consistió en enfriar las muestras a 0 °C y mediante el uso de filtros de nylon (con tamaño de poro de 0.2 μm) y una etapa de centrifugación (16000 rpm, 10 min, 0°C), se consiguió obtener la fragancia libre del SLIL. La pureza del éster aromático dependió de la longitud de cadena del SLIL, ya que la consistencia de la dispersión sólido líquido estuvo muy ligada a la temperatura de fusión del SLIL, al igual que los rendimientos de extracción que fueron decreciendo con forme aumentó la longitud de cadena debido al mayor número de interacciones entre el producto y el IL hidrofóbico, a pesar de esto los valores estuvieron por encima del 90%.

Una vez diseñada una metodología eficiente de separación del aroma, y con objeto de simplificar el proceso y no tener que utilizar agente desecante en el medio de reacción se decidió estudiar las cinéticas con y sin agente desecante para la razón molar ácido acético:alcohol anisílico 1:3. Se observó como la reacción fue más lenta en el segundo caso, pero se consiguieron conversiones del 100% tras dos horas de operación. Visto esto, el protocolo para evaluar la estabilidad operacional del derivado inmovilizado empleando un sistema de filtración para la extracción del aroma y recuperación del SLIL-[C₁₆tma][NTf₂], que se estableció para llevar a cabo la síntesis de acetato de anisilo fue; 2 horas bajo irradiación por MW a 4W, enfriamiento de las muestras durante 2 horas para la posterior extracción del aroma mediante sistemas de microfiltración y por último, llevar el ILs a vacío para la eliminación del agua producida. Los resultados mostraron como la producción de acetato de anisilo se mantuvo al 100% durante 10 ciclos. La metodología propuesta para llevar a cabo la síntesis de acetato de anisilo resultó totalmente verde, sostenible y aplicable a nivel industrial.

Este trabajo permite demostrar nuevamente el comportamiento similar a una esponja hidrofóbica de estos ILs basados en cationes con largas cadenas alquílicas laterales de (*i.e.* [C₁₆tma] [NTf₂]) se demuestra claramente. Así, estos SLILs son capaces de “empapar” el acetato anisilo como fase líquida, y luego esta fragancia puede ser “escurrida” por centrifugación de la fase sólida. Estos resultados abundan en esta nueva estrategia de la química verde para preparar fragancias “naturales”, utilizando sustratos obtenidos de fuentes “naturales”, lo que supone un claro avance en las metodologías/estrategias para el desarrollo de procesos verdes en la industria química.

Conclusions

The general conclusions obtained in this *Doctoral Thesis* can be divided in the following specific conclusions:

1. The hydrophobic ionic liquid [C₁₈mim][NTf₂] has been described as the first IL able for dissolving the substrates involved in biodiesel synthesis, *i.e.* vegetable oils and methanol, resulting a fully clear and monophasic liquid medium at 60°C. This IL showed an excellent suitability as reaction medium for biocatalytic synthesis of biodiesel, obtaining a product yield higher than 96% after only 6 hours. Finally, it was possible to design a cyclic protocol for reusing both the biocatalyst and the IL, in which biodiesel production remained almost constant for 7 consecutive operating cycles.

2. Having verified all the excellences of [C₁₈mim][NTf₂] IL, it was studied the effect of the alkyl chain length in the cation and the hydrophobicity of the anion (*i.e.*, [NTf₂⁻] [PF₆⁻] and [BF₄⁻]) in different ILs based on 1-alkyl-3-methylimidazolium, for both the solubility of substrates and products, and their suitability as reaction media for the biocatalytic synthesis of biodiesel. The obtained results showed that only ILs based the anion bis(trifluoromethylsulfonyl)imide and having alkyl chains of 14 carbon atoms, or higher, were suitable for enzymatic synthesis of biodiesel as monophasic systems.

3. The enzymatic biodiesel synthesis in scCO₂ can be carried out in flow reactors containing either the commercial immobilized biocatalysts (Novozym 435) coated SLILs, or the *C. antarctica* lipase B (CALB) immobilized onto polymer resins having covalently attached hydrophobic ILs (SILPs). The continuous production of biodiesel was negatively affected by the leaching of the protective hydrophobic IL for the first case, and by the "poisoning" of the CALB-SILPs particles by the adsorption of glycerol by-product for the second case. The presence of small amounts of the cosolvent *t*-butanol into the scCO₂ flow allowed for a continuous production of biodiesel in the CALB-SILPs systems with high operational stability.

4. Hydrophobic ionic liquids based on cations with long alkyl side chains and hydrophobic anion (*i.e.* [C₁₆tma] [NTf₂]) are solid / liquid temperature switchable systems, which shows a sponge-like behaviour able for dissolving ("soaking") hydrophobic solutes as a liquid phase, and then their separation from the resulting solid phase after cooling under room temperature ("wringing") by simple physical techniques (*e.g.* centrifugation). This feature allowed us to coin the term "Sponge-Like Ionic

Liquids" (SLILs) as a new property thereof applicable to the development of sustainable processes of synthesis and / or separation.

5. The SLILs are excellent media for biocatalytic synthesis of esters by esterification reaction from carboxylic acids and primary alcohols. This quality was demonstrated by studying the synthesis of 16 terpene esters, where yields close to 100% product were reached, and being preserved the catalytic activity of the enzyme against reuse. Additionally, SLIL-free products at concentrations up to 0.757 g/mL were easily obtained by centrifugation ("wringing up") of resulting the solid phase after cooling reaction media.

6. The SLILs were shown as exceptional reaction systems for the biocatalytic synthesis of biodiesel by methanolysis of vegetable oils (*i.e.* triolein), allowing to observe high activity (*i.e.* 100% biodiesel yield after 6 hours of reaction), and full preservation of the enzyme activity during operation and/or storage at 60°C (*i.e.* 260 day half-life time). The intrinsic features of these SLILs allowed us to design a simple protocol for the biocatalytic synthesis and subsequent products separation (biodiesel and glycerol) into different phases, with the complete recovery and reuse of the SLIL for successive processes.

7. The application of microwave irradiation to the biocatalytic systems immobilized onto hydrophobic SLILs, or suspended into SLILs, constituted a significant improvement in enzyme activity, which it was observed for both DKR and the synthesis of fragrances by direct esterification reactions. The use of centrifugal filters at the product separation step by centrifugation allowed us to improve the product extraction yield by "wringing up" of the SLIL.

Referencias

- Abreu F.R., Alves M.B., Macêdo C.C.S., Zara L.F., Suarez P.A.Z. **2005**. New multi-phase catalytic systems based on tin compounds active for vegetable oil transesterification reaction. *J. Mol. Catal. A Chem.* 227, 263–267.
- Ahmad A.L., Yasin N.H.M., Derek C.J.C., Lim J.K. **2011**. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 584–593.
- Alvarez-Guerra M., Irabien A., **2011**. Design of ionic liquids: an ecotoxicity (*Vibrio fischeri*) discrimination approach. *Green Chem.* 13, 1507.
- Anastas P.T.; Warner J.C. **1998**. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, p 30.
- Anastas P.T., Kirchoff M.M., Williamson T.C., **2001**. Catalysis as a foundational pillar of green chemistry. *Appl. Catal. A Gen.* 221, 3–13.
- Anderson E. M., Larsson K. M., Kirk O. **1998**. One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotransform.* 16, 181–204.
- Atabani A.E., Silitonga A.S., Badruddin I.A., Mahlia T.M.I., Masjuki H.H., Mekhilef S., **2012**. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 2070–2093.
- Atadashi I.M., Aroua M.K., Aziz A.A., **2010**. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 1999–2008.
- Athawale V., Manjrekar N., Athawale M., **2003**. Effect of Reaction Parameters on Synthesis of Citronellyl Methacrylate by Lipase-Catalyzed Transesterification. *Biotechnol. Prog.* 19, 298–302.
- Bhargava B. L.; Balasubramanian S. Klein M. L. **2008**. Modelling room temperature ionic liquids. *Chem. Commun.*, 3339–335.
- Baiker A., **1999**. Supercritical Fluids in Heterogeneous Catalysis. *Chem. Rev.* 99, 453–474.
- Bansal P., Roth K., **2000**. Why companies go green: a model of ecological responsiveness. *Acad. Manag. J.* 43, 717–736.
- Barahona D., Pfromm P.H., Rezac M.E., **2006**. Effect of water activity on the lipase catalyzed esterification of geraniol in ionic liquid [bmim]PF₆. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 318–324.
- Beckman E.J., **2004**. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. *J. Supercrit. Fluids* 28, 121–191.
- Bergbreiter D.E., Tian J., Hongfa C., **2009**. Using soluble polymer supports to facilitate homogeneous catalysis. *Chem. Rev.* 109, 530–582.
- Binnemans K., **2005**. Ionic liquid crystals. *Chem Rev.* 105, 4148–4204.
- Blanchard L. A. & Brennecke J. F., **2001a**. Recovery of Organic Products from Ionic Liquids Using Supercritical Carbon Dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40, 287–292.
- Blanchard, L. A., Gu, Z., & Brennecke, J. F., **2001b**. High-Pressure Phase Behavior of Ionic Liquid/CO₂ Systems. *J. Phys. Chem. B*, 105, 2437–2444.
- Boehman A.L., Gerpen J. Van, **2005**. Biodiesel processing and production. *Fuel Process. Technol.* 86, 1097–1107.
- Bogel-Lukasik R., Lourenço N.M.T., Vidinha P., da Silva M.D.R.G., Afonso C.A.M., da Ponte M.N. Barreiros S., **2008**. Lipase catalysed mono and di-acylation of secondary alcohols with succinic anhydride in organic media and ionic liquids. *Green Chem.*, 10, 243–252
- Bogel-Lukasik R., Najdanovic-Visak V., Barreiros S. & Nunes da Ponte M., **2008**. Distribution Ratios of Lipase-Catalyzed Reaction Products in Ionic Liquid Supercritical CO₂ Systems: Resolution of 2-Octanol Enantiomers. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 47, 4473–4480.
- Bonhôte P., Dias A.P., Papageorgiou N., Kalyanasundaram K., Grätzel M., **1996**. Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorg. Chem.* 35, 1168–1178.
- Borugadda, V. B.; Goud. V.V. **2012** Biodiesel production from renewable feedstocks: Status and opportunities. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16, 4763–4784

- Bourne R.A., Stevens J.G., Ke J., Poliakoff M., **2007**. Maximising opportunities in supercritical chemistry: the continuous conversion of levulinic acid to gamma-valerolactone in CO₂. *Chem. Commun.* 4632–4634.
- Bringué R., Ramírez E., Iborra M., Tejero J., Cunill F., **2013**. Influence of acid ion-exchange resins morphology in a swollen state on the synthesis of ethyl octyl ether from ethanol and 1-octanol. *J. Catal.* 304, 7–21.
- Brundtland. **1987**. United Nations. Report of the World Commission on Environment and Development, *General Assembly UN Resolution 42/187*, 11 December 1987.
- Bubalo M.C., Radosevic K.; Redovnikovic I.R.; Halambek J.; Sreck V.G., **2014**. A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicol. Env. Safety.* 99, 1-12.
- Burguete M.I., Galindo F., Garcia-Verdugo E., Karbass N.; Luis S.V., **2007**. Polymer supported ionic liquid phases (SILPs) versus ionic liquids (ILs): How much do they look alike. *Chem. Commun.*, 3086-3088
- Cansell F., Aymonier C., **2009**. Design of functional nanostructured materials using supercritical fluids. *J. Supercrit. Fluids* 47, 508–516.
- Celia E., Cernia E., Palocci C., Soro S., Turchet T., **2005**. Tuning Pseudomonas cepacea lipase (PCL) activity in supercritical fluids. *J. Supercrit. Fluids* 33, 193–199.
- Chiappe C., Malvaldi M., Pomelli C.S., **2009**. Ionic liquids: Solvation ability and polarity. *Pure Appl. Chem.* 81, 767–776.
- Ciriminna R., Carraro M.L., Campestrini S., Pagliaro M., **2008**. Heterogeneous Catalysis for Fine Chemicals in Dense Phase Carbon Dioxide. *Adv. Synth. Catal.* 350, 221–226.
- Ciriminna R., Pagliaro M., **2013**. Green Chemistry in the Fine Chemicals and Pharmaceutical Industries. *Org. Process. Res. Develop.*, 17, 1479-1484
- Claon P.A., Akoh C.C., **1994**. Effect of reaction parameters on SP435 lipase-catalyzed synthesis of citronellyl acetate in organic solvent. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 835–838.
- Constable D.J.C., Curzons A.D., Cunningham V.L., **2002**. Metrics to green chemistry: which are the best? *Green. Chem.* 4, 521–527.
- Dalla Rosa C., Morandim M.B., Ninow J.L., Oliveira D., Treichel H., Oliveira J.V., **2009**. Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids. *Bioresour. Technol.* 100, 5818–26.
- De Diego, T.; Lozano, P.; Gmöh, S.; Vaultier, M.; J. L. Iborra. 2004. Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the alpha-chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 916 – 928
- De Diego, T.; Lozano, P.; Gmöh, S.; Vaultier, M.; J. L. Iborra. **2005**. Understanding Structure-Stability Relationship of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules.* 6, 1457-1464.
- De la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A. **2005**. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effect. *Chem. Soc. Rev.*, 34, 164-178
- Demirbas A., **2009**. Biorefineries: Current activities and future developments. *Energy Convers. Manage.* 50, 2782–2801.
- Dhake K.P., Thakare D.D. & Bhanage B.M., **2013**. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour Frag. J.*, 28(2), 71–83.
- Dominguez P.; Sanchez-Montero J.M., Sinisterra J.V., Alcantara A.R., **2006a**. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.*, 24, 180-196.
- Dominguez, P.; Alcantara, A.R.; Carballeira, J.D.; de la Casa, R.M.; Garcia-Burgos, C.A.; Hernaiz, M.J.; Sanchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V. **2006b**. *Candida rugosa* lipase: A traditional and complex biocatalyst. *Curr. Org. Chem.*, 10, 1053-1066
- Dominguez P., **2008**. Nonsolvent" applications of ionic liquids in biotransformations and organocatalysis. *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 47, 6960-6968.

- Dominguez P., Maugeri Z., **2011**. Ionic liquids in biotransformations: from proof-of-concept to emerging deep-eutectic-solvents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 220-225.
- Duan Z., Gu Y., Zhang J., Zhu L., Deng Y., **2006**. Protic pyridinium ionic liquids: Synthesis, acidity determination and their performances for acid catalysis. *J. Mol. Catal. A Chem.* 250, 163–168.
- Dufreche S., Hernandez R., French T., Sparks D., Zappi M., Alley E., **2007**. Extraction of Lipids from Municipal Wastewater Plant Microorganisms for Production of Biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 181–187.
- Dunn P.J., Wells P.J., Williams M.T. **2010**. *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Dunn P.J., **2012**. The importance of green chemistry in process research and development. *Chem. Soc. Rev.* 41, 1452-1461.
- Dupont J., de Souza R.F., Suarez P.A.Z., **2002**. Ionic liquids (molten salts) phase organometallic catalysis. *Chem. Rev.* 102, 3667–3691.
- Dupont J., **2004**. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.* 15, 341–350
- Dupont J., **2011**. From molten salts to ionic liquids: a “nano” journey. *Acc. Chem. Res.* 44, 1223–31.
- Dzyuba S.V. & Bartsch R.A, **2003**. Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO₂ systems. *Angew. Chem. Int. Ed. (English)*, 42(2), 148–50.
- Earle M.J., Esperança J.M.S.S., Gilea M.A., Lopes J.N.C., Rebelo L.P.N., Magee J.W., Seddon K.R., Widegren J.A., **2006**. The distillation and volatility of ionic liquids. *Nat.* 439, 831–4.
- Eberhardt R., Löbbecke S., Neidhart B., Reichardt C., **1997**. PyridiniumN-Phenoxide Betaines and Their Application to the Characterization of Solvent Polarities, XXIII. Determination of ET(30) Values of Supercritical Carbon Dioxide at Various Pressures and Temperatures. *Liebigs Ann.*, 1195–1199.
- Fan X., Burton R., **2009**. Recent Development of Biodiesel Feedstocks and the Applications of Glycerol: A Review. *Open Fuels Energy Sci. J.* 2, 100–109.
- Fang D., Yang J., Jiao C., **2011**. Dicationic Ionic Liquids as Environmentally Benign Catalysts for Biodiesel Synthesis. *ACS Catal.* 1, 42–47.
- Fehér E., Illeová V., Kelemen-Horváth I., Bélafi-Bakó K., Polakovič M., Gubicza L., **2008**. Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid–alcohol biphasic system. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 50, 28–32.
- Fehér E., Major B., Bélafi-Bakó K., Gubicza L., **2009**. Semi-continuous enzymatic production and membrane assisted separation of isoamyl acetate in alcohol—ionic liquid biphasic system. *Desalination* 241, 8–13.
- Fernandez-Lafuente R., **2010**. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 62, 197-212.
- Fonteyn F., Blecker C., Lognay G., Marlier M., Severin M., **1994**. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of citronellyl acetate in solvent-free medium. *Biotechnol. Lett.* 16, 693–696.
- Foro Química y Sociedad, **2012**. La Química y la Salud. *RSEQ-ANQUE-FEIQUE*
- Fricks A.T., Oestreicher E.G., Filho L.C., Feihrmann A.C., Cordeiro Y., Dariva C., Antunes O.A.C., **2009**. Effects of compressed fluids on the activity and structure of horseradish peroxidase. *J. Supercrit. Fluids* 50, 162–168.
- Frost C.G., Mutton L., **2010**. Heterogeneous catalytic synthesis using microreactor technology. *Green Chem.* 12, 1687.
- Fu, B., Vasudevan, P.T., 2009. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. *Energy & Fuels* 23, 4105–4111.
- Ghiaci M., Aghabarari B., Habibollahi S., Gil A., **2011**. Highly efficient Brønsted acidic ionic liquid-based catalysts for biodiesel synthesis from vegetable oils. *Bioresour. Technol.* 102, 1200–4.
- Gog, A.; Roman, M.; Tosa, M.; Paizs, C.; Irime, F. **2012**. Biodiesel production using enzymatic transesterification e Current state and perspectives. *Renew. Energ.* 39, 10–16

- Gordon C.M., **2001**. New developments in catalysis using ionic liquids. *Appl. Catal., A*, 222(1-2), 101–117.
- Gu Y. & Li G., **2009**. Ionic Liquids-Based Catalysis with Solids: State of the Art. *Adv. Synth. Catal.*, 351(6), 817–847.
- Guo F., Fang Z., Tian X.F., Long Y.D., Jiang L.Q., **2011**. One-step production of biodiesel from Jatropha oil with high-acid value in ionic liquids. *Bioresour. Technol.* 102, 6469–72.
- Gutowski K.E., Broker G.A., Willauer H.D., Huddleston J.G., Swatloski R.P., Holbrey J.D., Rogers R.D., **2003**. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6632–3.
- Ha S.H., Lan M.N., Lee S.H., Hwang S.M., Koo Y.M., **2007**. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 480–483.
- Habulin M., Knez M., **2001**. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 1260–1266.
- Habulin, M.; Primožic, M.; Knez, Z. **2007**. Supercritical fluids as solvents for enzymatic reactions. *Acta Chim. Sloven.*, 54, 667-677.
- Hobbs H.R., Kondor B., Stephenson P., Sheldon R.A., Thomas N.R., Poliakoff M., **2006**. Continuous kinetic resolution catalysed by cross-linked enzyme aggregates, 'CLEAs', in supercritical CO₂. *Green Chem.* 8, 816.
- Hobbs H.R., Thomas N.R., **2007**. Biocatalysis in supercritical fluids, in fluorosolvents, and under solvent-free conditions. *Chem. Rev.* 107, 2786–820.
- Hoffmann J., [Nüchter](#) M., Ondruschka B. & Wasserscheid P., **2003**. Ionic liquids and their heating behaviour during microwave irradiation? a state of the art report and challenge to assessment. *Green Chem.* 5(3), 296.
- Holbrey J.D., Seddon K.R., **1999**. The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2133–2140.
- Horvath I.T., **1998**. Fluorous biphasic chemistry. *Acc. Chem. Res.* 31, 641-650.
- Horváth I.T., Rábai J., **1994**. Facile catalyst separation without water: fluorosolvent biphasic hydroformylation of olefins. *Sci.* 266, 72–5.
- Hudson E.P., Eppler R.K., Clark D.S., **2005**. Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 637–43.
- Hult K., Berglund P., **2003**. Engineered enzymes for improved organic synthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 395–400.
- Inomata H., Kondo T., Hirohama S., Arai K., Suzuki Y. & Konno M., **1989**. Vapour-liquid equilibria for binary mixtures of carbon dioxide and fatty acid methyl esters. *Fluid Phase Equilibria*, 46(1), 41–52.
- Itoh T., Akasaki E., Kudo K., Shirakami S., **2001**. Lipase-catalyzed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system. Reaction of enzyme anchored to the solvent. *Chem. Lett.* 262–263.
- Itoh T., Akasaki E., Nishimura Y., **2002**. Efficient lipase-catalyzed enantioselective acylation under reduced pressure conditions in an ionic liquid solvent system. *Chem. Lett.* 154-155.
- Jackson M.A. & King J.W., **1996**. Methanolysis of seed oils in flowing supercritical carbon dioxide. *JAACS*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(3), 353–356.
- Jadhav V.H., Jeong H.J., Lim S.T., Sohn M.H., Song C.E., Kim D.W., **2013**. Polymer-supported oligoethylene glycols as heterogeneous multifunctional catalysts for nucleophilic substitution. *Tetrahedron* 69, 3577–3583.
- Jaeger K.E., Eggert T., **2002**. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 390–397.
- Jessop P.G., Jessop D.A., Fu D., Phan L., **2012**. Solvatochromic parameters for solvents of interest in green chemistry. *Green Chem.* 14, 1245.
- Jessop P.J., Leitner W., **1999**. *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*, Wiley-VCH, Weinheim.

- Johnson M.B., Wen Z., **2009**. Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass. *Energy Fuels* 23, 5179–5183.
- Joseph T., Sahoo S., Halligudi S.B., **2005**. Brønsted acidic ionic liquids: A green, efficient and reusable catalyst system and reaction medium for Fischer esterification. *J. Mol. Catal. A Chem.* 234, 107–110.
- Kamat S., Critchley G., Beckman E.J., Russell A.J., **1995**. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: III. Does carbon dioxide covalently modify enzymes? *Biotechnol. Bioeng.* 46, 610–20.
- Karbass N., Sans V., Garcia-Verdugo E., Burguete M.I., Luis S.V, **2006**. Pd(0) supported onto monolithic polymers containing IL-like moieties. Continuous flow catalysis for the Heck reaction in near-critical EtOH. *Chem. Commun.* 3095–3097.
- Kawakami K., Urakawa T., Oda Y., Iwai Y., **2009**. Activation of lipase by sol-gel coating with hydrophobic alkyl-substituted silicates in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 1412–1417.
- Kazlauskas R.J., **2005**. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 195–201.
- Kendall J.L., Canelas D.A., Young J.L., DeSimone J.M., **1999**. Polymerizations in Supercritical Carbon Dioxide. *Chem. Rev.* 99, 543–563.
- Keskin S., Kayrak-Talay D., Akman U., Hortaçsu Ö., **2007**. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *J. Supercrit. Fluids* 43, 150–180.
- Kim D.W., Chi D.Y., **2004**. Polymer-Supported Ionic Liquids: Imidazolium Salts as Catalysts for Nucleophilic Substitution Reactions Including Fluorinations. *Angew. Chemie* 116, 489–491.
- Kim D.W., Jeong H.J., Lim S.T., Sohn M.H., Chi D.Y., **2008**. Facile nucleophilic fluorination by synergistic effect between polymer-supported ionic liquid catalyst and tert-alcohol reaction media system. *Tetrahedron* 64, 4209–4214.
- Kim Y.H., Choi Y.K., Park J., Lee S., Yang Y.H., Kim H.J., Park T.J., Hwan Kim Y., Lee S.H., **2012**. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. *Bioresour. Technol.* 109, 312–315.
- Kirk O., Christensen M. W. **2002**. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin. *Org. Process Res. Dev.*, 6, 446-451
- Klibanov A.M., **2001**. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nat.* 409, 241–6.
- Knez, Z. **2009**. Enzymatic reactions in dense gases. *J. Supercrit. Fluids* 47, 357–372.
- Koel, **2000**. Physical and chemical properties of ionic liquids based on the dialkylimidazolium cation. *Proc. Est. Acad. Sci. Chem.* 49, 1.
- Kulkarni M. G. & Dalai A. K., **2006**. Waste Cooking Oil An Economical Source for Biodiesel: A Review. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45(9), 2901–2913.
- Lapis A.A.M., de Oliveira L.F., Neto B.A.D., Dupont J., **2008**. Ionic liquid supported acid/base-catalyzed production of biodiesel. *ChemSusChem* 1, 759–762.
- Lawson D. M., Brzozowski A. M., Rety S., Verma C., Dodson G. G. 1994. Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling *Protein Eng.*, 1994, 7, 543-550
- Leadbeater N. E. & Torenius H. M., **2002**. A Study of the Ionic Liquid Mediated Microwave Heating of Organic Solvents. *J. Org. Chem.*, 67(9), 3145–3148.
- Leadbeater N.E., Torenius H.M. & Tye H., **2004**. Microwave-promoted organic synthesis using ionic liquids: A mini review. [Comb Chem High Throughput Screen.](#) 7(5):511-28.
- Leitner W., **2002**. Supercritical carbon dioxide as a green reaction medium for catalysis. *Acc. Chem. Res.* 35, 746–56.
- Leung D.Y.C., Wu X., Leung M.K.H., **2010**. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl. Energy* 87, 1083–1095.
- Lévêque J.M. & Cravotto G., **2006**. Microwaves, Power Ultrasound, and Ionic Liquids. A New Synergy in Green Organic Synthesis. *CHIMIA*, 60(6), 313–320.

- Li C.J., Trost B.M., **2008**. Green chemistry for chemical synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 13197–202.
- Liang J.H., Ren X.Q., Wang J.T., Jiang M., Li Z.J., **2010**. Preparation of biodiesel by transesterification from cottonseed oil using the basic dication ionic liquids as catalysts. *J. Fuel Chem. Technol.* 38, 275–280.
- Liang X., **2013**. Novel acidic ionic liquid polymer for biodiesel synthesis from waste oils. *Appl. Catal. A Gen.* 455, 206–210.
- Liang X., Yang J., **2010**. Synthesis of a novel multi –SO₃H functionalized ionic liquid and its catalytic activities for biodiesel synthesis. *Green Chem.* 12, 201.
- Liaw, H.J.; Huang, S.K.; Chen, H.Y., Liu, S.N., 2012. Reason for ionic liquids to be combustible. *Procedia Eng.* 45, 502–506.
- Lidström P., Tierney J., Wathey B., Westman J., **2001**. Microwave assisted organic synthesis—a review. *Tetrahedron.* 57, 9225–9283.
- Liu X., Ma H., Wu Y., Wang C., Yang M., Yan P., Welz-Biermann U., **2011**. Esterification of glycerol with acetic acid using double SO₃H-functionalized ionic liquids as recoverable catalysts. *Green Chem.* 13, 697.
- Liu Y., Chen D., Yan Y., **2013**. Effect of ionic liquids, organic solvents and supercritical CO₂ pretreatment on the conformation and catalytic properties of *Candida rugosa* lipase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 90, 123–127.
- Liu Y., Chen D., Yan Y., Peng C., Xu L., **2011**. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. *Bioresour. Technol.* 102, 10414–8.
- Long T., Deng Y., Gan S., Chen J., **2010**. Application of Choline Chloride·xZnCl₂ Ionic Liquids for Preparation of Biodiesel. *Chinese J. Chem. Eng.* 18, 322–327.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J.L., **2001**. Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol. Lett.*, 23, 1529–1533.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J.L. **2002a**. Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chem. Commun.*, 692–693;
- Lozano P., Perez-Marin A.B., De Diego T., Gomez D., Paolucci-Jeanjean D., Belleville M.P., Rios G.M., Iborra J.L., **2002b**. Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. *J. Memb. Sci.* 201, 55–64.
- Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J.L., **2003a**. Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 21, 9–13.
- Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J.L., **2003b**. Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150°C. *Biotechnol. Prog.*, 19, 380–382;
- Lozano P., de Diego T., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J.L. **2004a**. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *J. Mol. Catal. A Chem.* 214, 113–119.
- Lozano P., Villora G., Gómez D., Gayo A., Sánchez-Conesa J., Rubio M., Iborra J., **2004b**. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 29, 121–128.
- Lozano P., De Diego T., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J.L., **2004c**. Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems. *Biotechnol. Prog.*, 20, 661–669
- Lozano,P.; De Diego,T.; Gmöh, S.; Vaultier,M.; Iborra,J.L. **2005**. Dynamic structure-function relationships in enzymes stabilization by ionic liquids. *Biocatal. Biotransform.* 23, 169-176.
- Lozano P., de Diego T., Iborra J.L., **2006**. Immobilization of Enzymes for use in Ionic Liquids, *Immobilization of Enzymes and Cells-Methods in Biotechnology Series* Vol. 22. (Ed. J.M. Guisan). 257 – 268. Humana Press Inc. Totowa, N.J., USA .

- Lozano P., Piamtongkam R., Kohns K., De Diego T., Vaultier M., Iborra J.L., **2007a**. Ionic liquids improve citronellyl ester synthesis catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in solvent-free media. *Green Chem.* 9, 780.
- Lozano P., Garcia-Verdugo E., Piamtongkam R., Karbass N., De Diego T., Burguete M.I., Luis S.V.; Iborra J.L., **2007b**. Bioreactors based on monolith-supported ionic liquid phase for enzyme catalysis in supercritical carbon dioxide. *Adv. Synth. Catal.*, 349, 1077-1084.
- Lozano P., De Diego T., Iborra J.L., **2009a**. Biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide, en *Handbook of Green Chemistry – Green Catalysis*, Vol. 3: Biocatalysis, (Ed. Robert H. Crabtree). 51-73. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Lozano P., De Diego T., Mira, C., Montague K., Vaultier M., Iborra J.L., **2009b**. Long term continuous chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, 11, 538–542.
- Lozano P., **2010**. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.* 12, 555-569.
- Lozano P., De Diego T., Iborra J.L., **2010a**. Enzyme catalysis, in *Handbook of Green Chemistry: Supercritical Solvents*, ed. W. Leitner y P.G. Jessop, Wiley-VCH, Weinheim, vol. 4, pp. 281-302.
- Lozano P., de Diego T., Vaultier M., Iborra J.L., **2010b**. Enzyme catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide, en *Ionic Liquid Applications: Pharmaceutical, Therapeutics and Biotechnology*. Eds. S. V. Malhotra. pp 181-196. ACS Symposium Series. Oxford University Press.
- Lozano P., Garcia-Verdugo E., Karbass N., Montague K., De Diego T., Burguete M.I., Luis S.V., **2010c**. Supported ionic liquid-like phases (SILLPs) for enzymatic processes: Continuous KR and DKR in SILLP–scCO₂ systems. *Green Chem.* 12, 1803–1810.
- Lozano P., García Verdugo E., Luis S.V., Pucheault M., Vaultier M., **2011**. (Bio)catalytic continuous flow processes in scCO₂ and/or ILs: Towards sustainable (Bio)catalytic synthetic platforms. *Curr. Org. Synth.* 8, 810-823
- Lu J., Nie K., Wang F., Tan T., **2008**. Immobilized lipase *Candida sp.* 99-125 catalyzed methanolysis of glycerol trioleate: solvent effect. *Bioresour. Technol.* 99, 6070–4.
- Lu J., Yan F., Texter J., **2009**. Advanced applications of ionic liquids in polymer science. *Prog. Polym. Sci.* 34, 431–448.
- Ma L., Persson M., Adlercreutz P., **2002**. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1024–1029.
- Machado G., Scholten J. D., de Vargas T., Teixeira S. R., Ronchi L.H., Dupont J., **2007**. Structural aspects of transition-metal nanoparticles in imidazolium ionic liquids. *J. Nanotechnol.* 4, 541–563.
- Madeira Lau R., Van Rantwijk F., Seddon K.R., Sheldon R.A., **2000**. Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids. *Org. Lett.* 2, 4189–4191.
- Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1451-1463.
- Marsh K., Boxall J., Lichtenhaler R., **2004**. Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review. *Fluid Phase Equilib.* 219, 93–98.
- Martínez-Palou R., **2010**. Microwave-assisted synthesis using ionic liquids. *Mol. Divers.* 14, 3–25.
- Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S., **2010**. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232.
- Matsuda T., Watanabe K., Harada T., Nakamura K., Arita Y., Misumi Y., Ichikawa S., Ikariya T., **2004**. High-efficiency and minimum-waste continuous kinetic resolution of racemic alcohols by using lipase in supercritical carbon dioxide. *Chem. Commun. (Camb)*. 2286–2287.
- Mazubert, A.; Taylor, C.; Aubin, J.; Poux, M. **2014**. Key role of temperature monitoring in interpretation of microwave effect on transesterification and esterification reactions for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 161, 270-279

- Mesiano A.J., Beckman E.J., Russell A.J., **1999**. Supercritical Biocatalysis. *Chem. Rev.* 99, 623–634.
- Miao X., Wu Q., **2006**. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* 97, 841–6.
- Moad G., Rizzardo E., Thang S.H., **2005**. Living Radical Polymerization by the RAFT Process. *Aust. J. Chem.* 58, 379.
- Mohammad Fauzi A.H., Amin N.A.S., **2012**. An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 5770–5786.
- Monhemi H., Housaindokht M.R., Bozorgmehr M.R. & Googheri M.S.S., **2012**. Enzyme is stabilized by a protection layer of ionic liquids in supercritical CO₂: Insights from molecular dynamic simulation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 69, 1–7.
- Moniruzzaman M., Nakashima K., Kamiya N., Goto M., **2010**. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochem. Eng. J.* 48, 295–314.
- Neto B.A.D., Meurer E.C., Galaverna R., Bythell B.J., Dupont J., Cooks R.G., Eberlin M.N., **2012**. Vapors from Ionic Liquids: Reconciling simulations with mass spectrometric data. *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 3435–3441.
- Niedermeyer H., Hallett J.P., Villar-Garcia I.J., Hunt P.A., Welton T., **2012**. Mixtures of ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.* 41, 7780–802.
- Nunes da Ponte M., **2009**. Phase equilibrium-controlled chemical reaction kinetics in high pressure carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 47, 344–350.
- Odian, **2004**. Principles of Polymerization, 4th ed. John Wiley & Sons.
- Olivier-Bourbigou H., Magna L., Morvan D., **2010**. Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. *Appl. Catal. A Gen.* 373, 1–56.
- Penate, I.Q.; Lesage, G.; Cagnet, P.; Poux, M. **2012**. Clean synthesis of adipic acid from cyclohexene in microemulsions with stearyl dimethyl benzyl ammonium chloride as surfactant: From the laboratory to bench scale. *Chem. Eng. J.*, 200, 357-364
- Park S. & Kazlauskas R.J., **2001**. Improved Preparation and Use of Room-Temperature Ionic Liquids in Lipase-Catalyzed Enantio- and Regioselective Acylations. *J. Org. Chem.*, 66(25), 8395–8401.
- Park S., Kazlauskas R.J., **2003**. Biocatalysis in ionic liquids—advantages beyond green technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 432–437.
- Parvin M.N., Jin H., Ansari M.B., Oh S.M., Park S.E., **2012**. Imidazolium chloride immobilized SBA-15 as a heterogenized organocatalyst for solvent free Knoevenagel condensation using microwave. *Appl. Catal. A Gen.* 413, 205–212.
- Pereda S., Brignole E.A., Bottini S.B., **2009**. Advances in phase equilibrium engineering of supercritical reactors., *J. Supercrit. Fluids* 47, 336–343.
- Perez M., Sinisterra J.V., Hernaiz M.J., **2010**. Hydrolases in green solvents. *Curr. Org. Synth.*, 14, 2366-2383.
- Persson M. & Bornscheuer U.T., **2003**. Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 22(1-2), 21–27.
- Plechkova N. V, Seddon K.R., **2008**. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.* 37, 123–50.
- Pohar A., Plazl I., Žnidaršič-Plazl P., **2009**. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/n-heptane two-phase system at the microreactor scale. *Lab Chip* 9, 3385–90.
- Poliakoff M., Licence P., **2007**. Sustainable technology: green chemistry., *Nat.* 450, 810–2.
- Poole C.F., **2004**. Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. *J. Chromatogr. A.*, 1037, 49-82.
- Poppe, J.K.; Garcia-Galan, C.; Matte, C.R.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R.C.; Ayub, M.A.Z. **2013**. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 94, 51-56.

- Porcelli M., Cacciapuoti G., Fusco S., Massa R., d'Ambrosio G., Bertoldo C., Zappia V., **1997**. Non-thermal effects of microwaves on proteins: thermophilic enzymes as model system. *FEBS Letters*, 402(2-3), 102–106.
- Qureshi Z., Deshmukh K., Bhor M., Bhabage B., **2009**. Bronsted acidic ionic liquid as an efficient and reusable catalyst for transesterification of β -ketoesters. *Catal. Commun.*, 10, 833–837.
- Rachwalski M., Vermue N., Rutjes F.P., **2013**. Recent advances in enzymatic and chemical deracemisation of racemic compounds. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 9268-9282
- Rayner C.M., **2007**. The Potential of Carbon Dioxide in Synthetic Organic Chemistry. *Org. Process Res. Dev.* 11, 121–132.
- Reetz M. T., **2002**. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 145-150.
- Reetz M.T., Wiesenhofer W., Francio G., Leitner W., **2002**. Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase. *Chem. Commun.*, 992–993.
- Reichardt C., **2005**. Polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes. *Green Chem.* 7, 339.
- Reichardt C., **2007**. Solvents and Solvent Effects. *Org. Process Res. Dev.* 11, 105–113.
- Riisager A., Fehrmann R., Flicker S., van Hal R., Haumann M., Wasserscheid P., **2005**. Very stable and highly regioselective supported ionic-liquid-phase (SILP) catalysis: Continuous flow fixed-bed hydroformylation of propene. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 815-819.
- Riisager A., Fehrmann R., Haumann M., Wasserscheid P., **2006**. Supported Ionic Liquid Phase (SILP) catalysis: An innovative concept for homogeneous catalysis in continuous fixed-bed reactors. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 695-706
- Rodrigues A.R., Paiva A., da Silva, M.G., Simões P. & Barreiros S., **2011**. Continuous enzymatic production of biodiesel from virgin and waste sunflower oil in supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids.*, 56(3), 259–264.
- Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. **2010a**. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 64, 1-22.
- Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R. **2010b**. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* 66, 15-32.
- Rogers R.D., Seddon K.R., **2003**. Chemistry. Ionic liquids-solvents of the future? *Sci.* 302, 792–793.
- Romero A., Santos A., Tojo J., Rodríguez A., **2008**. Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids. *J. Hazard. Mater.* 151(1), 268-73.
- Roosen C., Müller P., Greiner L., **2008**. Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 607–14.
- Ruzich N.I., Bassi A.S., **2010**. Investigation of enzymatic biodiesel production using ionic liquid as a co-solvent. *Can. J. Chem. Eng.* 88, n/a–n/a.
- Samart C., Chaiya C., Reubroycharoen P., **2010**. Biodiesel production by methanolysis of soybean oil using calcium supported on mesoporous silica catalyst. *Energy Convers. Manag.* 51, 1428–1431.
- Sans V., Karbass N., Burguete M.I., Compan V., Garcia-Verdugo E., Luis S.V., Pawlak M., **2011**. Polymer-Supported Ionic-Liquid-Like Phases (SILLPs): Transferring Ionic Liquid Properties to Polymeric Matrices. *Chem. Eur. J.*, 17, 1894-1906
- Schöfer S.H., Kaftzik N., Kragl U., Wasserscheid P., **2001**. Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. *Chem. Commun.*, 425–426.
- Selvam T., Machoke A., Schwieger W., **2012**. Supported ionic liquids on non-porous and porous inorganic materials—A topical review. *Appl. Catal. A Gen.* 445-446, 92–101.
- Serra, S.; Fuganti, C.; Brenna, E. **2005**. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol.* 23, 193-198

- Sharma Y.C., Singh B., **2009**. Development of biodiesel: Current scenario. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 1646–1651.
- Sheldon R.A., **2008**. E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey. *Chem. Commun.* 3352–3365.
- Sheldon R.A., **2012**. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. *Chem. Soc. Rev.* 41, 1437–51.
- Solano D.M., Hoyos P., Hernaiz M.J., Alcantara A.R., Sanchez-Montero J.M., **2012**. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresour. Technol.*, 115, 196-207.
- Smiglak M., Reichert W.M., Holbrey J.D., Wilkes J.S., Sun L.Y., Thrasher J.S., Kirichenko K., Singh S., Katritzky A.R., Rogers R.D., **2006** Combustible ionic liquids by design: is laboratory safety another ionic liquid myth?. *Chem. Commun.* 2554-2556
- Smith, A.M.; Lovelock, K.R.J.; Gosvami, N.N.; Licence, P.; Dolan, A.; Welton, T.; Perkin, S. 2013. Monolayer to bilayer structural transition in confined pyrrolidinium-based ionic liquids. *J. Phys. Chem. Lett.*, 4, 378-382
- Sovová H., Jez J. & Khachatryan M., **1997**. Solubility of squalane, dinonyl phthalate and glycerol in supercritical CO₂. *Fluid Phase Equilibria*, 137(1-2), 185–191.
- Stefan C.S., Lemordant D., Biensan P., Siret C., Claude-Montigny B., **2010**. Thermal stability and crystallization of N-alkyl-N-alkyl'-pyrrolidinium imides. *J. Therm. Anal. Calorim.* 102, 685–693.
- Sunitha S., Kanjilal S., Reddy P.S., Prasad R.B.N., **2007**. Ionic liquids as a reaction medium for lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil. *Biotechnol. Lett.* 29, 1881–5.
- Suppes G., **2004**. Transesterification of soybean oil with zeolite and metal catalysts. *Appl. Catal. A Gen.* 257, 213–223.
- Sureshkumar M., Lee C.K., **2009**. Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 60, 1–12.
- Tadesse H., Luque R., **2011**. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. *Energy Environ. Sci.* 4, 3913.
- Talebian-Kiakalaieh A., Amin N.A.S., Mazaheri H., **2013**. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Appl. Energy* 104, 683–710.
- Uppenberg J., Patkar S., Bergfors T., Jones T. A. **1994**. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *J. Mol. Biol.*, 14, 790-792.
- van Rantwijk F.; Sheldon R.A., **2007**. Biocatalysis in ionic liquids. *Chem. Rev.* 107, 2757–85.
- Vidinha P., Augusto V., Almeida M., Fonseca I., Fidalgo A., Ilharco L., Cabral J.M.S., Barreiros S., **2006**. Sol-gel encapsulation: an efficient and versatile immobilization technique for cutinase in non-aqueous media. *J. Biotechnol.* 121, 23–33.
- Vyas A.P., Verma J.L., Subrahmanyam N., **2010**. A review on FAME production processes. *Fuel* 89, 1–9.
- Wasserscheid P; Welton T (eds). 2008. *Ionic Liquids in Synthesis*, 2nd ed. Wiley-VCH.
- Weber H.K., Zuegg J., Faber K., Pleissb J., **1997**. Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 3, 131–138.
- Weingaertner H., 2008. Understanding ionic liquids at the molecular level: Facts, problems, and controversies. *Angew. Chem. Intl Ed.*, 47, 654-670.
- Wohlgemuth R., **2010**. Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 713–24.
- Wolfson W., **2005**., In the fragrance business, the right molecule smells like money. *Chem. Biol.* 12, 857–8.
- Wu B., Liu W., Zhang Y., Wang H., **2009**. Do we understand the recyclability of ionic liquids? *Chem Eur J.* 15, 1804–10.

- Wu B., Zhang Y.M., Wang H.P., **2008**. Aqueous Biphasic Systems of Hydrophilic Ionic Liquids + Sucrose for Separation. *J. Chem. Eng. Data* 53, 983–985.
- Wu Q., Chen H., Han M., Wang D., Wang J., **2007**. Transesterification of Cottonseed Oil Catalyzed by Brønsted Acidic Ionic Liquids. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 7955–7960.
- Wu X. & Leung D.Y.C., **2011**. Optimization of biodiesel production from camelina oil using orthogonal experiment. *Applied Energy*, 88(11), 3615–3624.
- Yang Z., Zhang K.P., Huang Y., Wang Z., **2010**. Both hydrolytic and transesterification activities of *Penicillium expansum* lipase are significantly enhanced in ionic liquid [BMIm][PF₆]. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 63, 23–30.
- Young D.D., Nichols J., Kelly R.M. & Deiters A., **2008**. Microwave activation of enzymatic catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(31), 10048–9.
- Young G., Nippgen F., Titterbrandt S., Cooney M.J., **2010**. Lipid extraction from biomass using co-solvent mixtures of ionic liquids and polar covalent molecules. *Sep. Purif. Technol.* 72, 118–121.
- Yu Y., Beichel W., Dlubek G., Krause-Rehberg R., Paluch M., Pionteck J., Pfefferkorn D., Bulut S., Friedrich C., Pogodina N., Krossing I., **2012**. Free volume in ionic liquids: a connection of experimentally accessible observables from PALS and PVT experiments with the molecular structure from XRD data. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 6856–6868.
- Zhang C., Zhang S., Yu L., Zhang P., Zhang Z., Wu Z., **2012**. Tribological behavior of 1-methyl-3-hexadecylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid crystal as a neat lubricant and as an additive of liquid paraffin. *Tribol. Lett.*, 46, 49–54
- Zhang, D.H.; Bai, S.; Ren, M.Y.; Sun, Y. 2008. Optimization of lipase-catalyzed enantioselective esterification of (±)-menthol in ionic liquids. *Food. Chem.*, 109, 72–80.
- Zhang K.P., Lai J.Q., Huang Z.L., Yang Z., **2011**. *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. *Bioresour. Technol.* 102, 2767–72.
- Zhang L., Xian M., He Y., Li L., Yang J., Yu S., Xu X., **2009**. A Brønsted acidic ionic liquid as an efficient and environmentally benign catalyst for biodiesel synthesis from free fatty acids and alcohols. *Bioresour. Technol.* 100, 4368–73.
- Zhao H., Baker G.A., Holmes S., **2011**. New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org. Biomol. Chem.* 9, 1908–16.
- Zhao H., Baker G. A., Song Z., Olubajo O., Zanders L. & Campbell S.M., **2009**. Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 57(1–4), 149–157.
- Zhou J.H., Lu Y.J., Huang B.H., Huo Y.P., Zhang K., **2011**. Preparation of Biodiesel from Tung Oil Catalyzed by Sulfonic-Functional Brønsted Acidic Ionic Liquids. *Adv. Mater. Res.* 314–316, 1459–1462.
- Zhou S., Liu L., Wang B., Xu F., Sun R.C., **2012**. Biodiesel preparation from transesterification of glycerol trioleate catalyzed by basic ionic liquids. *Chinese Chem. Lett.* 23, 379–382.

Anexo I

Review

Supercritical Synthesis of Biodiesel

Juana M. Bernal ¹, Pedro Lozano ^{1,*}, Eduardo García-Verdugo ², M. Isabel Burguete ², Gregorio Sánchez-Gómez ³, Gregorio López-López ³, Mathieu Pucheault ⁴, Michel Vaultier ⁴ and Santiago V. Luis ²

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Química, Regional Campus of International Excellence “Campus Mare Nostrum”, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, E-30100 Murcia, Spain; E-Mail: jmbernalpalazon@um.es

² Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Universidad Jaume I, Campus del Riu Sec, E-12071 Castellón, Spain; E-Mails: cepeda@uji.es (E.G.-V.); burguete@uji.es (M.I.B.); luiss@uji.es (S.V.L.)

³ Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Regional Campus of International Excellence “Campus Mare Nostrum”, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, E-30100 Murcia, Spain; E-Mails: gsg@um.es (G.S.-G.); gll@um.es (G.L.-L.)

⁴ Groupe Phoenix, Institut des Sciences Moléculaires, Université Bordeaux 1. CNRS UMR 5255, F33405 Talence cedex, France; E-Mails: m.pucheault@ism.u-bordeaux1.fr (M.P.); m.vaultier@ism.u-bordeaux1.fr (M.V.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: plozanor@um.es; Tel.: +34-868-88-7392; Fax: +34-868-88-4148.

Received: 18 May 2012; in revised form: 12 July 2012 / Accepted: 16 July 2012 /

Published: 23 July 2012

Abstract: The synthesis of biodiesel fuel from lipids (vegetable oils and animal fats) has gained in importance as a possible source of renewable non-fossil energy in an attempt to reduce our dependence on petroleum-based fuels. The catalytic processes commonly used for the production of biodiesel fuel present a series of limitations and drawbacks, among them the high energy consumption required for complex purification operations and undesirable side reactions. Supercritical fluid (SCF) technologies offer an interesting alternative to conventional processes for preparing biodiesel. This review highlights the advances, advantages, drawbacks and new tendencies involved in the use of supercritical fluids (SCFs) for biodiesel synthesis.

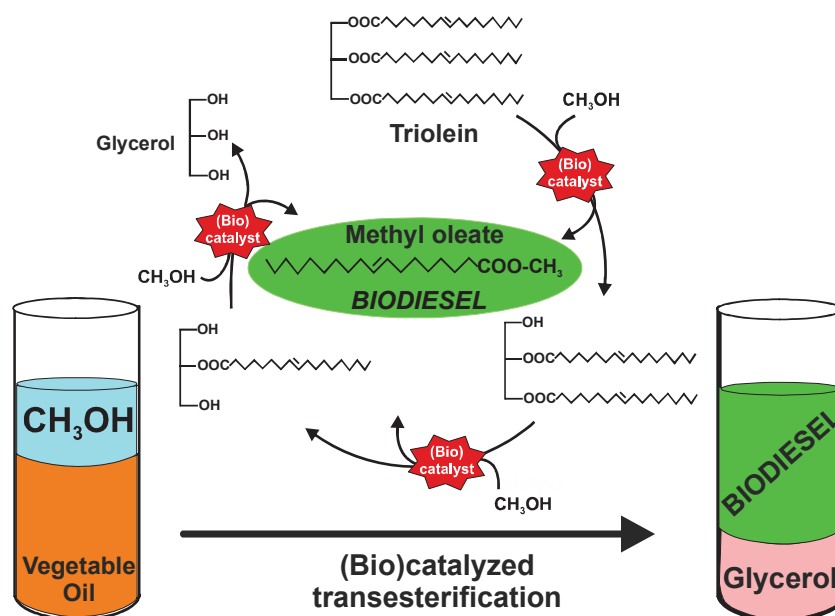
Keywords: supercritical fluids; biodiesel; biocatalysis; catalysis; ionic liquids; supported ionic liquids

1. Introduction

The depletion of fossil fuels and increasing ecological awareness has led to a search for alternative fuels made from renewable sources such as plant biomass. In 1990 during an exhibition in Paris, a diesel engine was run for the first time for several hours using peanut oil as fuel; however the high viscosity (10–20 times higher than diesel fuel) and low volatility of vegetable oils hindered the generalised use of such fuels in combustion engines. Furthermore, the decomposition of glycerol leads to the formation of the toxic compound acrolein when vegetable oil is combusted in the engine, which further hampers the direct use of vegetable oils as fuels. Replacing the glycerol by short alkyl chain alcohols (e.g., methanol or ethanol) has since provided a low viscous and useful fuel for diesel engine [1].

Mixtures of methyl and/or ethyl esters of fatty acids obtained through transesterification of the triacylglycerides contained in plant oils are named biodiesel. This biofuel is so far considered as a good substitute for diesel fuel as it can be used in any compression ignition engine without the need for modifications. Biodiesel is safe, renewable, non-toxic, biodegradable in water, free in sulfur compounds, has a high flash point ($>130\text{ }^{\circ}\text{C}$) and better lubricant properties than diesel. Its use fully complies with the aims and purposes of environmental protection [2]. Biodiesel is usually synthesized through transesterification (also named alcoholysis) of triacylglycerides with methanol, yielding Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) and glycerol as by-product. Because of the reversibility of the reaction, an excess of alcohol is used to shift the equilibrium towards the products side. Three consecutive transesterification reactions are involved in the full conversion of triacylglyceride molecules to biodiesel (see Figure 1).

Figure 1. Scheme of the catalyzed transesterification of triglycerides to synthesize biodiesel.



Catalysis of the transesterification reaction can be roughly divided into two categories, chemical and enzymatic. Chemical catalyzed transesterification reactions can be carried out by either acid or base, in homogeneous or heterogeneous phase, and selection of the conditions depends on the characteristic of the starting triacylglycerides. Basic catalysts are usually preferred to acid catalysts because they provide better reaction rates, lower temperature requirements, and higher conversion efficiencies. NaOH and KOH are classical catalysts, although sodium methoxide derived from the added NaOH is actually the most applied at industrial scale. The protocol involves the dissolution of the catalyst in methanol by vigorous stirring, and mixing the resulting alcohol/catalyst solution with the vegetable oil to give two liquid phases (biodiesel and glycerol) with high yields (>90%) after several hours at 65–90 °C. However, when the free fatty acids (FFAs) content of the triglycerides is higher than 1–2% w/w, basic catalysts can also produce saponification as a side reaction. In such cases, acid catalysts (e.g., H₂SO₄) are used, but of large amounts of alcohol (e.g., a molar excess of alcohol over the vegetable oil higher up to 10) and the complete removal of free water are required. Homogeneous catalysts usually give better results than heterogeneous catalysts for biodiesel production. However, many problems are associated with homogeneous catalysis, such as high energy consumption, the formation of unwanted soap by-products because of the presence of FFAs, expensive catalyst separation from the reaction mixture, and specially the generation of large amounts of wastewater during products separation and cleaning. These are clear breakdown points for the sustainability of homogeneous basic catalysis, the usual approach applied at industrial scale for producing biofuel. In contrast, the use of solid acids (e.g., sulfonic acid resins, sulfonic acid-modified silica, *etc.*), or solid bases (e.g., BaO, SrO, MgO, KNO₃/Al₂O₃, *etc.*), as heterogeneous catalysts permits their easy separation from reaction mixture by simple filtration, enabling recycling [3,4].

Biocatalysts represent a completely different approach. As far as all catalyzed reactions are concerned, Nature has always been a source of inspiration for chemists. To transfer the exquisite efficiency shown by enzymes in Nature to chemical processes may well constitute the most powerful toolbox for developing a clean and sustainable chemical industry. Biodiesel synthesis by transesterification and/or esterification using immobilized lipase catalysis is applicable to both refined and raw plant oils, free fatty acids, waste fats from frying, tallow and other waste fats. A small excess of alcohols (e.g., methanol, ethanol or propanol) provides a high biodiesel yields under mild conditions (20–60 °C) [5]. Low water concentrations in the reaction medium can have a positive impact on biodiesel production. In the same way, the conversion of free fatty acids (FFAs) can be much higher than in base catalyzed processes. In this case, both triacylglycerides and FFAs can simultaneously be converted to biodiesel since lipase efficiently catalyzes both transesterification and esterification. Finally, upon completion of the transesterification process, the glycerol (lower phase) is simply separated from the biodiesel (upper phase) and neither product deodorization nor neutralization is required [6].

Probably, the most intriguing feature in the catalytic synthesis of biodiesel is the phase behaviour of the reaction system during the transformation process. The starting materials, triacylglycerides and methanol, are non-miscible, as well as the final products, glycerol and biodiesel (see Figure 1). This phenomenon leads to the low efficiency of immobilized enzymes and their deactivation due to poisoning as results of the adsorption of the continuously formed glycerol by-product onto the support. In this context, both reactor design and reaction medium engineering (e.g., the use of cosolvents,

different reaction conditions, *etc.*) are essential approaches to improve the performance of the heterogeneous (bio)catalysts. However, the most important drawback to apply biocatalysts in biodiesel synthetic processes is the high cost of enzymes, making necessary to develop stable and reusable biocatalytic systems for extended operation times [5–7].

Several strategies have been developed to overcome these constraints. One example is the sequential addition of methanol in three different doses [8], or its storage by adsorption onto silica gel particles, acting as “microreservoirs” that slowly release the alcohol needed for the transesterification process. In this way, up to 90% biodiesel yield, together with improved catalyst recycling was obtained after 18 h of reaction [9]. Alternative approaches for enzyme immobilization (e.g., encapsulation by sol-gel methods [10], covalent attachment onto magnetic nanoparticles [11], *etc.*) have also been described as improving the biocatalytic efficiency of biodiesel synthesis. Enzyme efficiency (up to 97% yield after 24 h at 50 °C) is also improved by dissolution of the substrates in an organic solvent of medium polarity (e.g., *tert*-butanol), resulting in a one-phase reaction medium and avoiding the direct interaction between the enzyme and pure methanol [12].

Despite being key elements in all chemical processes (e.g., mass-transport, reactions, product separation, *etc.*), volatile organic solvents are also responsible for a not inconsiderable part of the environmental impact of the chemical industry. The search for new environmentally benign non-aqueous solvents, or green solvents, which can easily be recovered/recycled, allowing (bio)catalysts to operate efficiently, is a priority for the development of an integral green process of biodiesel synthesis. In this frame, both supercritical fluids (SCFs) and/or ionic liquids, as non-aqueous green solvents, are key targets on the current scientific agenda for biodiesel synthesis. Greenness in chemical processes also concerns the catalysts used, where lipases clearly constitute a powerful green tool for biodiesel synthesis [13]. Consequently, this critical review aims to analyze recent trends and progress in biodiesel synthesis using (bio)catalytic and non-catalytic SCFs technology, with special attention paid to the challenges if a fully clean technology is to be developed for biodiesel production in the near future.

2. Supercritical Fluids Technology: Challenges and Limitations

A supercritical fluid (SCF) is a compound, mixture, or element above its critical pressure (P_c) and critical temperature (T_c), but below the pressure required to condense into a solid [14]. Under such conditions, the densities of both liquid and gas phases become identical, and the distinction between them disappears. The properties of SCFs are frequently described as being intermediate between those of a gas and a liquid. The possibility to manipulate the physical properties of these solvents by simply changing the pressure or temperature is unique to supercritical systems, which show exceptional abilities for extraction, reaction, fractionation and analysis processes. They also determine their environmentally benign character because of the easy way in which they can be fully recovered and reused. However, the key feature of SCFs is their tunability as solvents in response to changes in pressure and temperature, particularly remarkable in the vicinity of the critical point [15]. Table 1 shows the critical parameters of some common fluids used in supercritical conditions. The density of SCFs is highly sensitive to both temperature and pressure; hence, all their density-dependent solvent properties (e.g., dielectric constant, relative permittivity, Hildebrand solubility parameter, *etc.*) may be substantially modified by small changes in pressure or temperature. This provides a potential for

controlling (bio)catalyzed reactions by precipitation of a given product, or purification by the selective precipitation of the products.

Table 1. Fluids used in near-critical or supercritical conditions for (bio)catalysis and their critical parameters [14].

Fluid	T _c (°C)	P _c (MPa)	Density (g/L)
Methane (CH ₄)	−82.6	4.60	162
Fluoroform (CHF ₃)	26.2	4.85	516
Carbon dioxide (CO ₂)	31.3	7.29	469
Ethane (C ₂ H ₆)	32.3	4.88	203
Sulfur hexafluoride (SF ₆)	45.5	3.77	755
Propane (C ₃ H ₈)	96.7	4.25	217
Butane (C ₄ H ₁₀)	152.0	3.75	230
Methanol (CH ₄ O)	239.6	8.09	272
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	240.9	6.14	276
Acetone (C ₃ H ₆ O)	235.1	4.70	278
Water (H ₂ O)	374.3	22.12	348

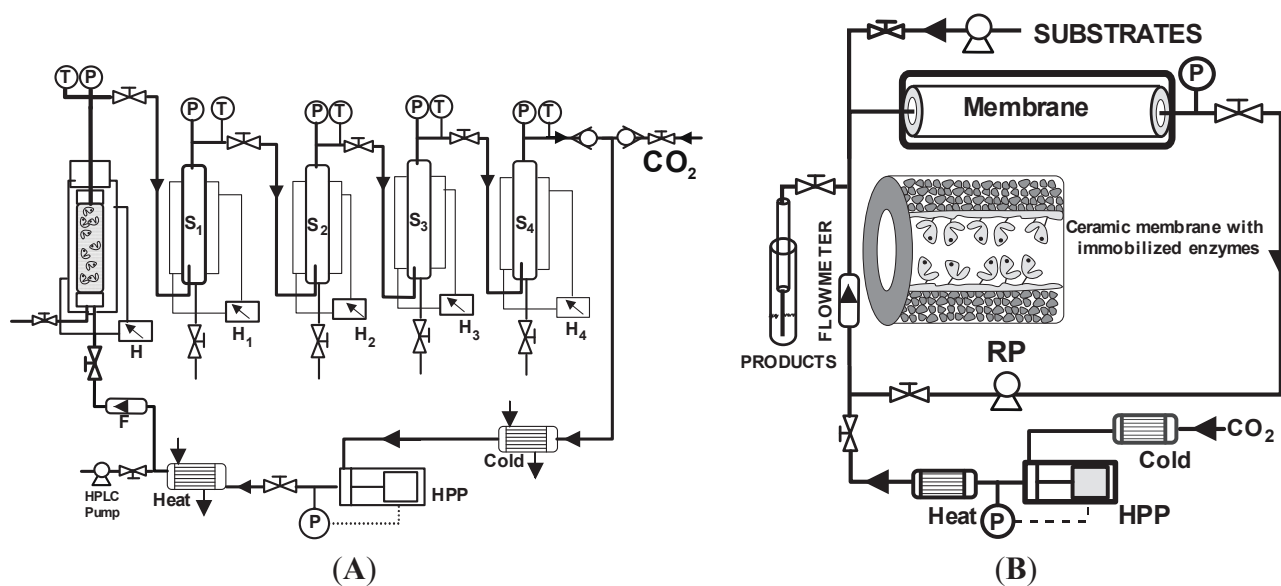
Several criteria must be considered before selecting a given SCF as medium for a (bio)catalyzed reaction, including the critical parameters themselves, safety and cost issues. Supercritical carbon dioxide (scCO₂) is the most popular SCF because of its relatively low critical parameters, low toxicity and non-flammability; furthermore, it is chemically inert under most conditions, has good solvent properties for non-polar solutes, and is considered as a green solvent. Carbon dioxide is clearly a “greenhouse gas”; however, it is massively produced as a by-product at industrial scale (e.g., in ammonia plants), and it is therefore cheap. Furthermore, at atmospheric pressure, CO₂ is gaseous, which means that simple depressurization is sufficient to separate solutes from scCO₂, after which it can be pressurized for reuse as a solvent. The solvent power of scCO₂ can be modified by increasing the bulk density or by adding a modifier (e.g., MeOH, acetone). Co-solvents can therefore be used to increase or reduce polarity, or to enhance the affinity for aromatic substances, although of course, the more co-solvent that is added, the further scCO₂ moves from being a truly green solvent. The main limitation for industrial application of SCFs is related with the cost of high-pressure equipment [15].

The high catalytic efficiency of porous chemical catalysts (e.g., zeolites) in SCFs has been widely reported, especially when their active sites are placed within the internal structure of the catalyst. In that case, the high mass transfer of reactants within a catalyst’s porous structure is particularly important for increasing catalysis rates [16]. Additionally, many of the reports on SCFs catalysis mention that catalyst lifetime can be prolonged by eliminating undesired poisoning substances. As an example, the alkylation of benzene with ethene on Y-type zeolites (250–285 °C, 7–8 MPa) in scCO₂ revealed a much lower catalyst deactivation, higher reaction rates, and higher selectivity. The reduction of catalyst deactivation was attributed to the removal of polyaromatics, considered to be precursors of coke, from the surface of the zeolites by increased solubility and diffusion rates. Extending catalyst lifetimes using SCF carbon dioxide reaction media, apart from the convenience of keeping the catalytic system running longer, also provides other potentially important economic benefits [16]. For example, due to its low viscosity and high diffusivity, scCO₂ affords an effective and

continuous cleaning within the porous catalyst structures. This good performance of heterogeneous chemical catalysts under supercritical conditions has been observed in many catalytic reactions, e.g., Fisher-Tropsch, hydroformylation, hydrogenation, Heck, Suzuki, oxidations and alkylations, even including continuous operation [17].

As regards biocatalysis, proteins are noticeably insoluble in all SCFs, allowing easy recovery and reuse, while the gas-like diffusivity and low viscosity of SCFs enhance reactant mass-transport rates to the active site of enzymes [18]. Lipases and esterases in scCO_2 are the most widely studied systems, due to the catalytic promiscuity of these enzymes towards hydrophobic substrates and the ability of this SCF to dissolve and transport hydrophobic compounds [19]. The synthesis of aliphatic esters of different alkyl chain lengths by esterification and/or transesterification (e.g., by alcoholysis, acidolysis or inter-esterification) is a common approach to the production of terpenic flavour compounds (e.g., geranyl acetate) [20], and the valorisation of oils and fats (e.g., enrichment of acylglycerols with polyunsaturated fatty acids [21]). Currently, the use of lipases for the asymmetric synthesis of esters is one of the most important tools for organic chemists, whereby the combination of the unique properties of scCO_2 with the catalytic excellence of lipases allows the kinetic resolution (KR) or (dynamic) kinetic resolution (DKR) of a large number of racemates (e.g., 1-phenylethanol [22], glycidol [23], *etc.*). However, it must be taken into account that CO_2 cannot be considered completely inert with regards to its interaction with proteins. The CO_2 forms carbamates with ϵ -amino groups of lysine residues placed on the enzyme surface, and lowers the pH of the aqueous layer around the enzyme, which can result in a significant decrease in the enzyme activity [24,25].

Figure 2. (A) High-pressure packed bed enzyme-reactor with recirculation, equipped with high pressure pump (HPP), separators (S), heaters (H), pressure (P) and temperature control (T), and flowmeter (F) for Lipozyme[®]-catalyzed ethyl oleate synthesis in scCO_2 [26]; (B) High-pressure enzymatic membrane reactor with recirculation (B) for biotransformations in scCO_2 [27].



The appropriate design of SCF (bio)reactors involves controlling mass-transfer limitations, environmental conditions (pressure and temperature) and product recovery. For example,

Marty *et al.* [26] developed a recycling packed bed enzyme reactor at pilot scale for Lipozyme[®]-catalyzed ethyl oleate synthesis through oleic acid esterification with ethanol in scCO₂ [see Figure 2(A)]. The proposed system assembled four high-pressure separator vessels, where a pressure cascade was produced by back-pressure valves, allowing a continuous recovery of the liquid product at the bottom of each separator, and then the recycling of the non-reacted substrates. Alternatively, membrane reactors constitute an attempt to integrate catalytic conversion, product separation and/or concentration and catalyst recovery into a single operation unit. Thus, enzymatic dynamic membranes, formed by depositing water-soluble polymers (e.g., gelatine, polyethyleneimine, *etc.*) on a ceramic porous support, exhibited appropriate properties for continuous butyl butyrate synthesis in scCO₂, along with a high operational stability [27,28].

The most important environmental factors affecting (bio)catalyst performance in SCFs are pressure, temperature and water content. Indeed, these parameters influence all mass-transfer phenomena and (bio)catalyst activity by changing the rate-limiting steps or modulating their selectivity [29,30]. As an example, the catalytic activity of immobilized lipase for butyl butyrate synthesis was exponentially increased by the drop in scCO₂ density accompanying different combinations of pressure and temperature [27]. In the same context, for the pressure range of 7.7 to 8.5 MPa, the changes in the conformation of lipase resulted in an increased rate of esterification reactions. Thus, Dhake *et al.* obtained good yields (up to 99%) for the enzymatic synthesis of several citronellyl esters at 45 °C and 8.0 MPa [31]. Temperature influences enzyme activity much more than pressure not only due to the usual increment in reaction rates at higher temperatures, but also because of enzyme thermodeactivation processes. The optimal temperature of enzymatic processes in SCFs is related with pressure as both control solvent properties [29]. Water concentration also greatly influences enzyme activity because proteins require a specific amount of bound water molecules to be active. When the water content is too high or if the water is a product of the reaction in the supercritical medium, the resulting increased humidity may lead to enzyme deactivation. Thus, the actual amount of water needed is specific to each SCF-substrate-enzyme system, and must be maintained constant throughout the process [32].

However, all the unique properties of scCO₂ in its role as green solvent to extract, dissolve and transport chemicals are tarnished by its denaturative effect on enzymes. Several approaches have been developed to protect enzymes against these adverse effects of scCO₂, including covalent attachment on supports coated with hydrophilic polymers, the entrapment of enzymes in silica-aerogels, and the use of cross-linking enzyme aggregates. In spite of the advantages obtained with all these stabilization approaches, the best results for enzyme-catalyzed reactions in scCO₂ were observed when the biocatalyst was applied in suspension or coated with other green solvents, such as ionic liquids, as described below [19].

There are additional challenges and/or weakness that need to be addressed before SCFs technology can play a major role in industrial applications. Those include its cost, energy consumption, and safety issues in the operation process. The SCFs technology requires expensive equipments, such as strong durable reactors, high pressure pumps, efficient control devices, *etc.*, and the costs involved in operation and maintenance are also higher than those of conventional processes. Furthermore, the energy consumption to reach supercritical conditions is dependent of the nature of the solvent in question (see Table 1 for critical parameters), and this may be unsustainable for long term industrial application. An example is the biodiesel synthesis by non-catalytic supercritical alcohol technology

requiring temperatures up to 200 °C (the critical temperature of methanol is 239 °C). Thus, we must bear in mind that the energy utilized in the manufacturing process should be not exceed the energy provided by this biofuel [33]. Regarding the safety of SCFs processes, they are usually labelled as high risk processes because of the combination of high pressures and temperatures. The SCFs technology for the industrial production of biodiesel could be improved by the design of small reactors with enhanced catalytic efficiency, which, in combination with continuous operation approaches, may help offset the described weaknesses.

3. Non-catalytic Biodiesel Synthesis by Supercritical Fluid Technology

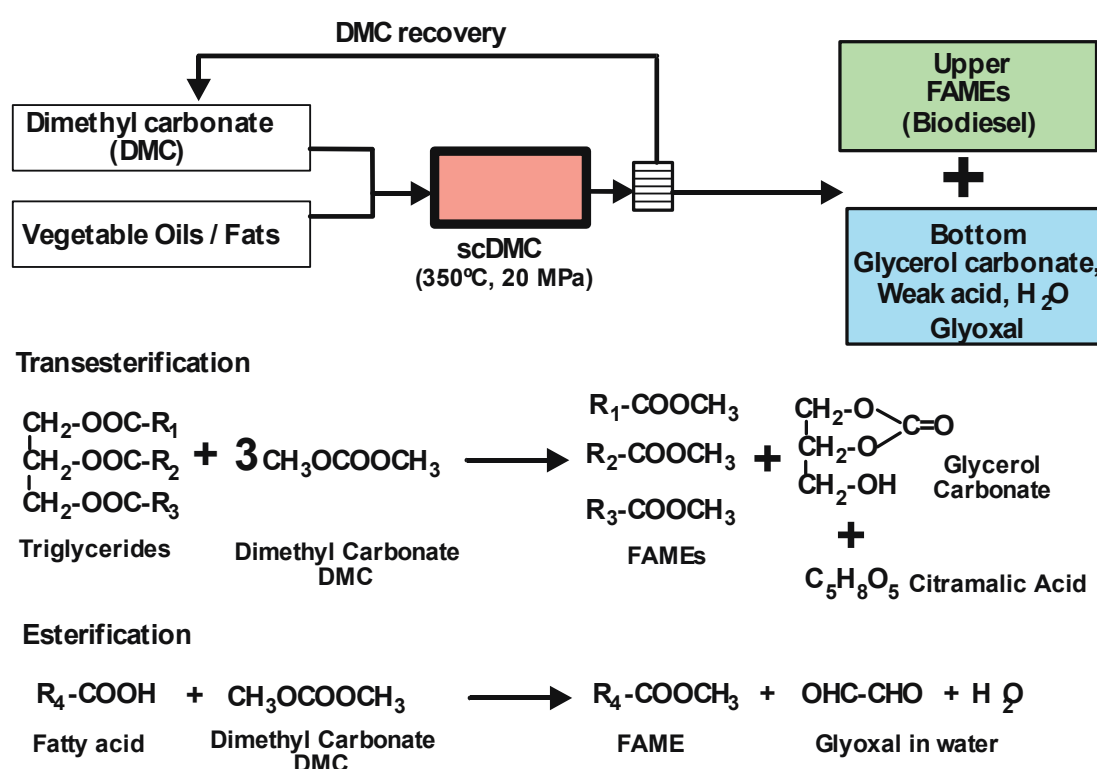
3.1. General Considerations

Product separation and isolation along with catalyst recovery are by far the most energy intensive steps in biodiesel production and, therefore, the most economically unfavorable. Supercritical fluid technology may provide some advantages, facilitating these separation and isolation processes. The use of a supercritical fluid phase as solvent/reagent for biodiesel synthesis seems, accordingly, a straightforward approach. Taking into account that the nature of the solvent is controlled by the pressure and temperature, the formation of a single phase between the reagents and the triglycerides can be induced. Although high pressures (>5 MPa) and temperatures (>200 °C) are needed to reach a homogeneous phase, the transesterification reaction kinetics is favoured under these harsh conditions. Indeed, the reaction can proceed in the absence of any catalyst, leading to non-catalytic biodiesel synthesis. Furthermore, the downstream isolation of the biodiesel from glycerol is simpler since many discrete operations such as catalyst neutralization and separation are not required, leading to products of higher purity, which is also important from a economic point of view. Thus, SCFs technology, even though it requires the use of high temperatures and pressures, may provide distinct advantages in comparison over conventional technologies. For instance, in the conventional alkali-catalyzed method, the final glycerol phase contains methanol, water, alkaline catalyst and soap. Thus, the selling price value of this crude glycerol is extremely low compared with the purified glycerol commonly used in food and pharmaceutical products [34].

The thermal stability of fatty acid methyl esters and biodiesel prepared by non-catalytic SCFs methods and obtained from various plant oils has been studied over a wide range of high temperatures (270–430 °C) and pressures (17–56 MPa) in order to evaluate the effect of the harsh experimental conditions on the biodiesel fuel quality [35,36]. It was found that although all fatty acid methyl esters, including the poly-unsaturated ones, are stable at low temperatures and pressures, but they partially decomposed with isomerization from *cis*-olefin to *trans*-olefin at high pressure and temperature. From these results, it was suggested that, for high-quality biodiesel production, the reaction temperatures in SCFs processes should be maintained below 300 °C, preferably at 270 °C for supercritical methanol (scMeOH), and lower than 360 °C for supercritical methyl acetate (scMeOAc) with a supercritical pressure higher than 8.09 MPa (see Figure 3). Besides, higher temperatures increase energy consumption and thus operating costs. However, it has been suggested that by selecting the adequate experimental conditions, processing could use less energy than the conventional method. Justification for this claim was based on the absence of the need for catalyst addition and energy intensive

purification operations (distillation), making this technology economically competitive with the conventional ones [37]. As regards reactor design, although batch biodiesel production is favoured over continuous processes in many research laboratories and in large scale operations, continuous operation is expected to gain wider acceptance, considering their added advantages that include a higher production capacity and lower operating costs to ensure the long term supply of biodiesel. Additionally, key parameters such as oil concentration in the supercritical phase, and the density of the mixture (depending on temperature, pressure and composition) can be easily controlled and optimized under flow conditions [38–41].

Figure 3. Non-catalytic one-step process for biodiesel synthesis using supercritical dimethyl carbonate. Reaction equations.



Alcohols are the most obvious choice for the development of non-catalytic biodiesel synthesis by transesterification reactions in SCFs [42]. Both ethanol and, especially, methanol, have been reported as supercritical fluids for biodiesel synthesis [43,44], although other fluids in supercritical conditions (e.g., dimethyl carbonate, methyl acetate) have also been evaluated [45].

3.2. Single Step SCFs Processes for Non-catalytic Biodiesel Synthesis

3.2.1. Supercritical Alcohol

Supercritical methanol (scMeOH), whose critical parameters are $T_c = 239.4 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_c = 8.1 \text{ MPa}$, and $\rho_c = 0.276 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, was one of the first SCFs evaluated for the production of biodiesel [46]. In light of the promising results obtained with supercritical alcohols, many researchers have studied the effects of various reactions parameters on FAMES yield. As mentioned, using SCFs it is possible the tuning and control of the solvent polarity through the adjustment of temperature (T) and pressure (P). Indeed, the

dielectric constant (ϵ) of methanol decreases from 34 to 5 upon isobaric heating from 25 to 260 °C at 20 MPa [47]. The hydrogen bond network existing in liquid methanol is broken under SC conditions, leading to a fluid in which only small oligomers exist [48,49]. Reduction of the polarity and the hydrogen bonding can facilitate a much stronger direct nucleophilic attack by the methanol on the carbonyl carbon rendering a catalyst unnecessary. Furthermore, reduced dielectric constant may even lead to a single oil/alcohol phase, increasing the reaction rate [50]. These facts explain the differences observed when the reaction is performed either under sub-critical or supercritical conditions since the reaction kinetics is highly dependent on the homogeneity of the reaction mixture. It seems that operating under supercritical conditions enhances the rate of reaction [51]. The solubility of reactants and transesterification products (homogeneous or heterogeneous) in the alcohol under various pressure-temperature-molar fraction (P-T-x) conditions is a keystone for rapid and complete transesterification reactions [42]. Liquid-vapor-SC phase transitions for the binary/ternary systems (soybean oil and alcohol at different oil:ethanol molar ratio) were studied by Anitescu *et al* using a view cell attached to the outlet of the reactor, which was heated from 26 °C to 400 °C at constant volume/density [52]. With two liquid phases in ambient conditions, the system showed increasing homogeneity with increasing temperature and pressure until a single SC phase was reached. Under these conditions, the conversion of triglyceride to FAMES was very rapid compared to that observed under subcritical conditions [53,54]. The reaction in continuous flow conditions yields above 98% conversion, with a single clear phase at moderate pressures (10–20 MPa), high temperatures (375–400 °C), low methanol ratios (3:1–6:1) and short reaction times (<3 min). These results are in contrast with those reported by Brignole and co-workers, who observed that high conversion can be obtained, in most cases, even when operating in the two-phase region [55]. In this case, the oil transesterification could mainly occur in the light supercritical phase, where the oil and the monoglycerides and diglycerides are partially soluble and the concentration of methanol is high. Moreover, the light-phase transport properties favour a higher reaction rate. The increased methanol/oil ratio leads to a homogeneous supercritical phase by increasing the system temperature while working at moderate pressures of 10–15 MPa, since an increase in the methanol/oil ratio decreases the critical temperature of the system [56,57]. Although a high methanol ratio favours the formation of a homogeneous supercritical phase while also driving the reaction to completion, it also increases costs and energy consumption. The addition of a co-solvent such as propane or CO₂ decreases the critical point of the mixture, allowing the reduction of both temperature and the oil/alcohol ratio [58–61].

An additional advantage of the use of supercritical alcohols in biodiesel synthesis is the high tolerance towards possible feedstock contaminants, mainly FFAs and water. In supercritical alcohols, esterification of the FFAs to the corresponding fatty acid alkyl esters takes place simultaneously to oil transesterification, yielding higher amounts of biodiesel. Thus, low cost feedstock, usually containing high portions of FFA/oil, can be used in the process without any additional pretreatment. As regards the water content, transesterification reactions catalyzed under acid or alkaline conditions are highly sensitive to the presence of water as hydrolysis of the corresponding esters are favoured in the presence of water. In contrast, the non-catalytic supercritical process can be performed even with a high water contents [62].

3.2.2. Supercritical Dimethyl Carbonate (scDMC)

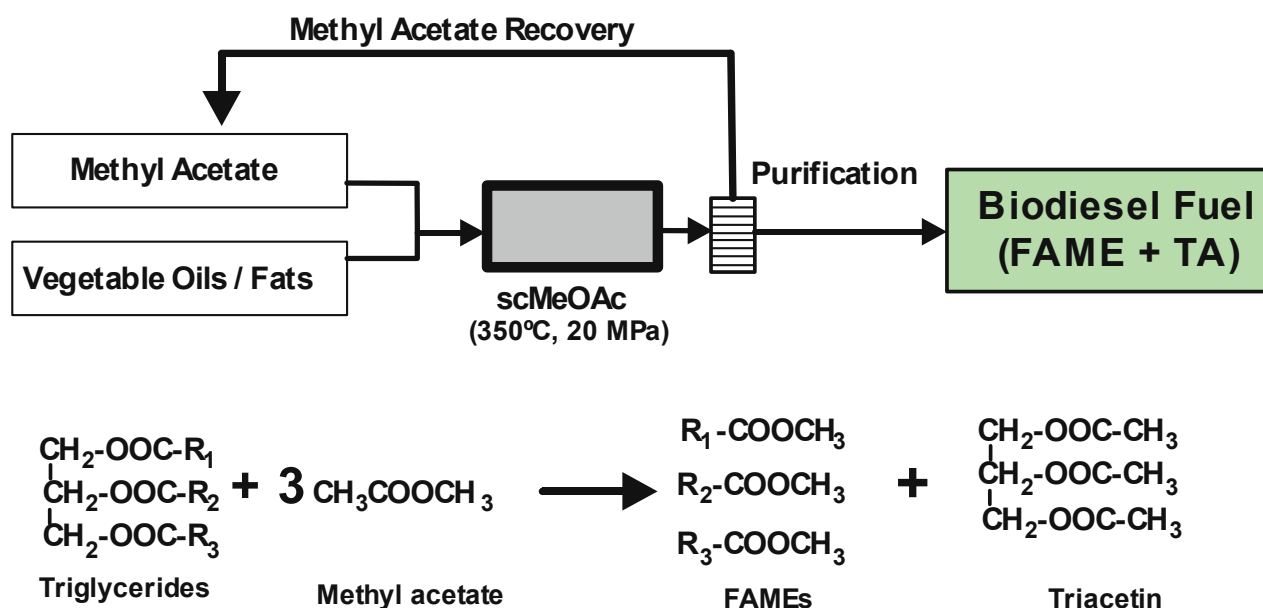
It has recently been demonstrated that biodiesel can be produced from triglycerides and dimethyl carbonate instead of methanol, in a non-catalytic process by using supercritical dimethyl carbonate ($T_c = 274.9\text{ }^\circ\text{C}$, $p_c = 4.6\text{ MPa}$) [63–65]. In this way, triglycerides as well as fatty acids are successfully converted to fatty acid methyl esters (FAMES). Besides, with this methodology another valuable compound, glycerol carbonate, is obtained as a secondary product, instead of the undesirable glycerol, and a weak acid, such as citramalic acid, as the main by-product (see Figure 3). Glycerol carbonate has a higher commercial value compared than glycerol and has a greater potential for industrial application [66]. Hence, this methodology could have a large impact on biodiesel economics as two high added value products are produced in a single-step reaction, leading to increases cost effectiveness, even if high temperatures and pressures are required. The FAMES produced by this method are obtained at higher yields than with supercritical methanol, and satisfy the international standards for use as biodiesel fuel. For instance, up to a 97.4 wt% yield can be obtained for the scDMC method at 300 °C, 20 MPa, 20 min and a 42:1 molar ratio of dimethyl carbonate to oil [67]. The properties of the biodiesel produced by this method have been evaluated according to different international standards. Overall, the FAMES from the scDMC method satisfied all the requirements for international biodiesel standards except the specification regarding oxidation stability, which is an important parameter for preventing deterioration. However, this problem could be diminished by the addition of an antioxidant or by using oils containing lower levels of unsaturated fatty acids [68].

3.2.3. Supercritical Carboxylate Esters

In order to prevent the production of glycerol as a by-product, a process was designed using methyl acetate instead of methanol under supercritical conditions [69]. The supercritical methyl acetate (scMeOAc) non-catalytic method converts triglycerides into fatty acid methyl esters (FAMES) and triacetin, instead of glycerol. Furthermore, it has been discovered that there were no adverse effects on the main fuel characteristics when the molar ratio of methyl oleate to triacetin was 3:1, which corresponds to the theoretically derived mole ratio from the trans-esterification reaction of rapeseed oil with methyl acetate (see Figure 4). Moreover, the addition of triacetin to methyl oleate improved the *pour point* (defined as the lowest temperature at which a fuel product will begin to flow), and triacetin has a high oxidation stability. Therefore, by defining biodiesel fuel as a mixture of methyl oleate and triacetin, the supercritical methyl acetate can lead to an improved yield (105%) of biodiesel fuel compared with the conventional process. However, this value is lower than the maximum recovery expected (125% yield) because of the breakdown at the required high temperatures of some unsaturated fatty acid methyl esters. Despite this, the scMeOAc method not only improves the quality of the biodiesel fuel but also minimizes the separation and purification steps, and therefore the energy required. Saka *et al.* [70] have used various supercritical carboxylate esters to convert triglycerides into FAMES and triacetin in the absence of any catalyst. The highest product yield was obtained with supercritical methyl acetate, 97.7 wt% considering a mixture of both FAMES and triacetin as biodiesel fuel. The lower reactivity shown by other carboxylate esters seems to be related to the length of alkyl chains in the esters, e.g., the longer alkyl chains in both alcohol and acyl moieties of carboxylate esters

provides the lowest product yields [71]. Banchero and co-workers [72] demonstrated that supercritical methyl acetate can be successfully used in the transesterification process of different vegetable oils to obtain biodiesel fuel. The process was suitable for edible, non-edible or waste oils, regardless of the FFA content which usually affects the conventional transesterification process at atmospheric pressure. All the examined oils reached complete conversion after 50 min at 345 °C, 20 MPa and with a methyl acetate:oil molar ratio of 42:1.

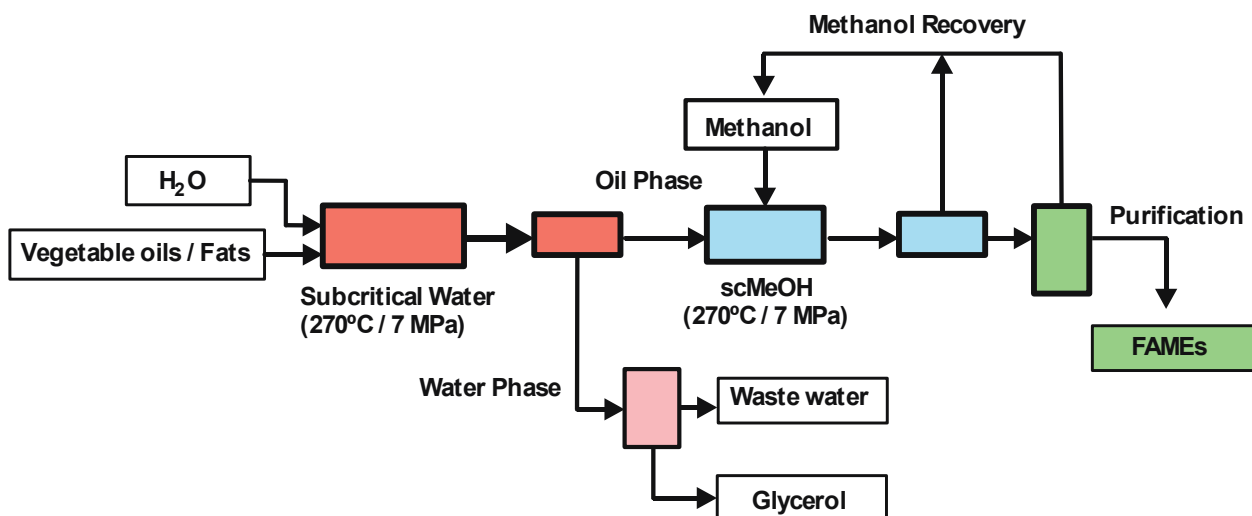
Figure 4. Biodiesel fuel synthesis using supercritical methyl acetate (scMeOAc). Reaction equations.



3.3. Two-step SCFs Process for Non-Catalytic Biodiesel Synthesis

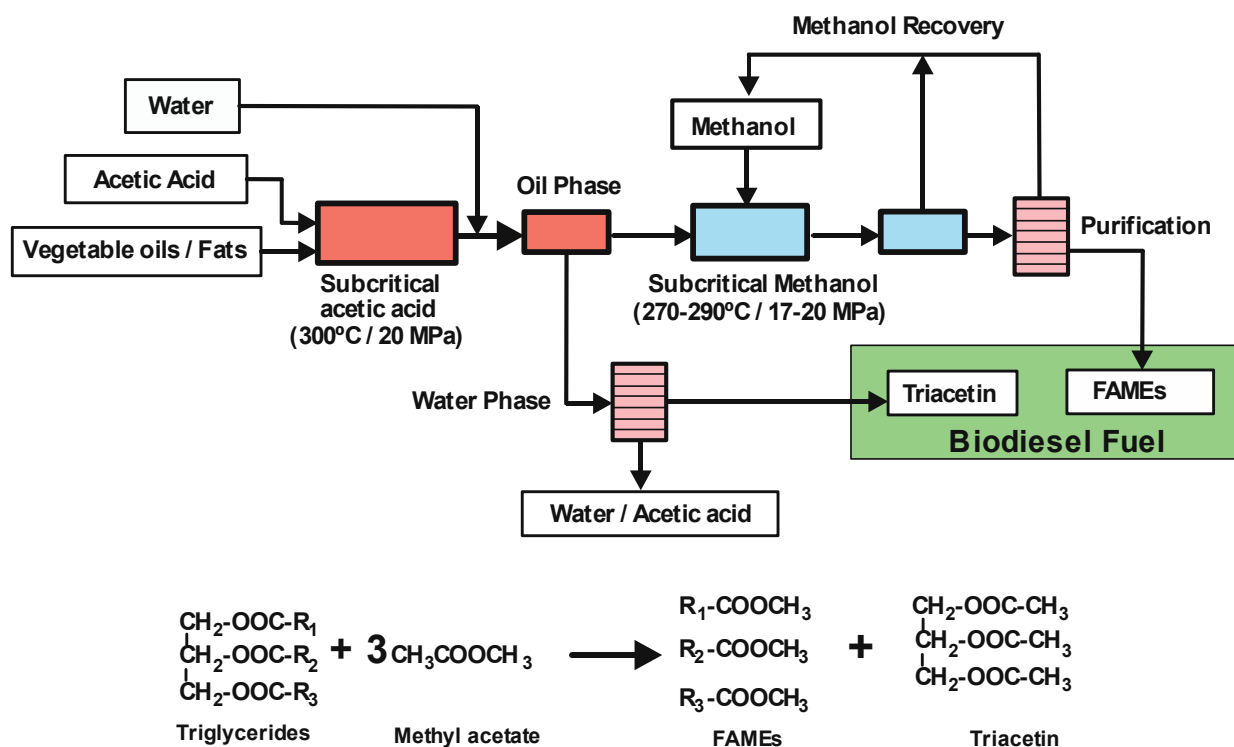
An alternative non-catalytic process in supercritical fluids for the synthesis of biodiesel fuel consists in a two steps process. In this method, triglycerides are firstly hydrolyzed to FFAs, which, in a second consecutive step, are esterified to the corresponding esters.

The first example developed according to this concept is known as the “Saka-Dadan” SCF method. In the first step the unique properties of scH₂O are exploited. It is well known that the dielectric constant of water decreases from $\epsilon = 80$ at standard T and P to $\epsilon = 31$ at 225 °C, P = 10.0 MPa, and finally to $\epsilon = 6$ at the critical point, $T_c = 374.15$ °C, $P_c = 22.1$ MPa, due to the steady decrease in the effectiveness of the hydrogen bonds with increasing temperature [73]. Thus, the reduction of the dielectric constant with increasing temperature promotes the miscibility between water and the oil, favouring a hydrolysis process. Furthermore, at a constant pressure of 25 MPa, the ionic product of water increases with temperature until it reaches a maximum (10^{-11}) at 250 °C. This allows acid- and base-catalysed reactions to be performed in high temperature pressurized water with no catalyst. Hence, scH₂O is used as both the solvent and the catalyst for the hydrolysis step at 270 °C, 7 MPa and a volumetric water/triglyceride ratio of 1:1 [74]. These conditions are milder than those reported for the original one step in scMeOH (350 °C and 20–50 MPa), thus reducing the energy consumption. After hydrolysis, two layers are formed, the upper portion containing fatty acids and the lower portion water with glycerol. In a second step, FAMES are produced in supercritical methanol after 20 min at 270 °C and 7 MPa (see Figure 5).

Figure 5. Biodiesel synthesis by the Saka-Dadan two-step supercritical method [74].

Alternatively, a two-step supercritical dimethyl carbonate method, named the “*Saka and Ilham Process*” has been proposed. This consists of the hydrolysis of triglycerides to fatty acids in subcritical water (270 °C and 27 MPa) followed in a second step by the esterification of fatty acids to FAME in supercritical dimethyl carbonate (300 °C and 9 MPa) [65]. Various parameters affecting the yield of fatty acids and FAMEs have been studied and a production scheme has been proposed. The supercritical dimethyl carbonate method is applicable to oils with a high free fatty acid contents such as *Jatropha curcas* oil, with 13.6 wt% free fatty acids. The glycerol produced in the first step was valorized in the second step, obtaining glycerol carbonate in supercritical dimethyl carbonate (280–300 °C and 9–12 MPa) without any catalyst [75]. The glycerol showed higher rate of conversion to glycerol carbonate due to its high purity. This glycerol conversion process was coupled with hydrolyzed fatty acids conversion into FAMEs to establish the two-step supercritical dimethyl carbonate method (Saka and Ilham Process). The non-catalytic two-step supercritical dimethyl carbonate method is a good process to produce high yields of FAMEs, even from oils with high levels of unsaturated fatty acids, together with a value added by-product, glycerol carbonate, under non-acidic and mild reaction conditions [68].

The same group has also reported a “two-step” process, in which first step is a transesterification of the oil to triacetin carried out in either subcritical or supercritical acetic acid, followed by supercritical methanol treatment. A transesterification reaction occurs between acetic acid and the triglycerides under subcritical conditions without the addition of catalysts. It was clear that fatty acids and triacetin could be obtained at high yields (see Figure 6). The reaction rate in acetic acid was much higher than when either methyl acetate or methanol was used in the transesterification step. The yield of triacetin recovery from subcritical acetic acid treatment by aqueous washing was 64%. On the other hand, when the oil phase from the previous treatment containing fatty acids was supplied to the supercritical methanol process at 270 °C and 17 MPa for 15 min, a 97 wt% yield of FAMEs was obtained. The recovery rate of biodiesel fuel from this process was 117wt%, a higher value than that obtained by conventional biodiesel fuel manufacturing processes, which produce glycerol as a by-product. This recovery rate is also higher than for the recently reported supercritical methyl acetate method (*Saka and Isayama method*) [76].

Figure 6. Biodiesel synthesis by the two-step supercritical approach. Reaction equations [76].

4. Biocatalytic Synthesis of Biodiesel in Supercritical Fluids

The use of dense gases, mainly scCO_2 or propane, as alternatives to organic solvents, to provide efficient reaction media for the enzymatic synthesis of biodiesel might be considered as the cleanest approach. As indicated before, the non-miscibility between triacylglycerides and methanol starting substrates, and glycerol and biodiesel final products, is rate-limiting because of the low efficiency in mass-transfer phenomena during the process, as well as the loss of activity of the biocatalyst through direct contact with methanol and glycerol. SFCs have shown to be suitable systems to overcome these drawbacks following the appropriate design of both reactor and reaction conditions.

Investigation of the phase behaviour of the reaction system is important for better understanding the enzymatic synthesis of biodiesel in supercritical fluids. Pressure and temperature can affect the reaction rate by affecting the partitioning of the reaction components between the two phases, leading to poor conversions at the enzyme surface. Thus, Ciftci *et al.* studied the phase behaviour of corn oil-methanol- CO_2 mixtures as a function of pressure by using a phase equilibrium cell equipped with a sapphire window [77]. Visual observation of the phase behaviour of the reaction mixture upon pressurization at 55 °C showed that the immiscible biphasic liquid phase, consisting of corn oil and methanol, approached a single liquid phase at pressures above the critical pressure of CO_2 and also expanded through the dissolution of CO_2 . However, as a single homogeneous phase was not fully formed at the pressure levels investigated in this study (11.0, 20.0 and 35.0 MPa), authors consider reaction mixture as a two phase (lower single liquid phase and upper CO_2 phase) system. Other authors studied the solubility of olive husk oil in scCO_2 (40–80 °C, 15.0–35.0 MPa), and the influence of methanol and ethanol (1–5% v/v) as cosolvents, by using a dynamic flow method. It was observed how the solubility of the triglyceride increased moderately when increasing the CO_2 pressure at constant

temperature, but doubled when 5% (v/v) of cosolvents was added [78]. The phase behaviour of the CO₂-biodiesel system in the presence of cosolvents (e.g., methanol [79], ethanol [80], *etc.*) has also been studied, leading to the observation that the addition of alcohol improves their miscibility.

The design of the supercritical reactor used has been seen to be key element for the efficiency of the (bio)catalytic synthesis of biodiesel. Both continuous and discontinuous reactors have been assayed using several types of immobilized lipases as biocatalysts, and optimized reaction conditions (pressure, temperature, cosolvents, stirring, *etc.*) and yields near to 100% biodiesel have been achieved. As an example of the use of discontinuous reactors, Lee *et al.* [81,82] carried out biodiesel synthesis in scCO₂ using a mixture of vegetable oil and methanol (1:4 molar ratio) and a mixture of immobilized of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases, as biocatalysts. In these studies, various factors, such as temperature, pressure, stirring speed, and the concentration of immobilized enzymes were investigated, resulting in optimal conditions for biodiesel production (100% yield at 2 h) under the following conditions: 13.0 MPa pressure, 45 °C temperature, 250 rpm stirring speed, and 20% (w/w) immobilized enzyme. Furthermore, an optimized stepwise addition of methanol allowed for the maintenance of immobilized lipase activity and the recycling of the immobilized biocatalysts. The yield of these stepwise reactions was still 85% after 20 reuses.

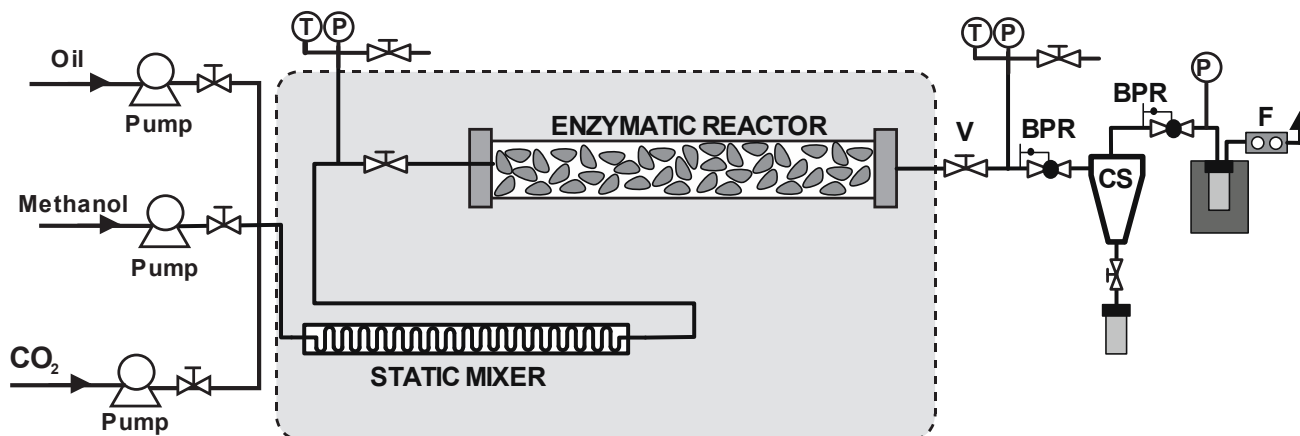
The usual advantages of continuous processes are even more evident in the case of the enzymatic synthesis of biodiesel because products are directly separated, and the methanol concentration has a low impact on the enzyme deactivation [13,17]. Jackson *et al.* [83] were pioneers in the applicability of scCO₂ in the continuous enzymatic synthesis of biodiesel from soybean and corn oils with reaction conversions above 98% at 1 mL/min CO₂ flow rate, followed by complete fractionation of the reaction mixture. In order to improve the efficiency of the continuous process for biodiesel synthesis in scCO₂ using immobilized enzymes as catalysts, several authors described how the appropriate design of the continuous reactor may provide operational advantages (e.g., efficient mixture of substrates, continuous separation of products, enhanced operational stability of enzymes, *etc.*) [77].

Barreiros and co-workers [84] implemented a continuous process for biodiesel production in supercritical carbon dioxide by using virgin sunflower oil and methanol as substrates, which were incorporated in the reactor using a static mixer with 27 elements (See Figure 7). The application of Lipozyme TL IM as biocatalyst led to FAMEs yields that exceeded 98% at 20.0 MPa and 40 °C, for a residence time of 20 s and an oil to methanol molar ratio of 1:24. Even for moderate reaction conversions, a fractionation stage based on two high pressure cyclone separators provided FAMEs of up to 96% purity. In the same context, Dalla Rosa *et al* [85] reported the continuous production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed carbon dioxide, propane and *n*-butane, using immobilized Novozym 435 as the catalyst. The experiments were performed in a packed-bed bioreactor. An evaluation of the effects of pressure and temperature in the range of 5.0 to 15.0 MPa and 30–70 °C, respectively, as well as the oil to ethanol molar ratio (from 1:6 to 1:18) and solvent to substrates mass ratio (from 4:1 to 10:1) was carried out. The best results (up to 98% yield) were obtained for lipase-catalyzed alcoholysis in a continuous tubular reactor using compressed propane (70 °C, 6.0 MPa), which it is suggested as another potential route to biodiesel production. The similar dielectric constants of compressed propane and carbon dioxide, together with the higher pressure phase transition values generally found in systems formed by carbon dioxide and high molecular weight

compounds (e.g., triglycerides) lead to the belief that propane may also be suitable as reaction medium for enzyme-catalyzed bioconversions [29,86].

Figure 7. Set-up of the continuous enzymatic reactor for biodiesel synthesis [84].

T: temperature indicator; P: pressure indicator; V: valve; BPR: Back-pressure regulator; CS: cyclone separator; F: Flow.

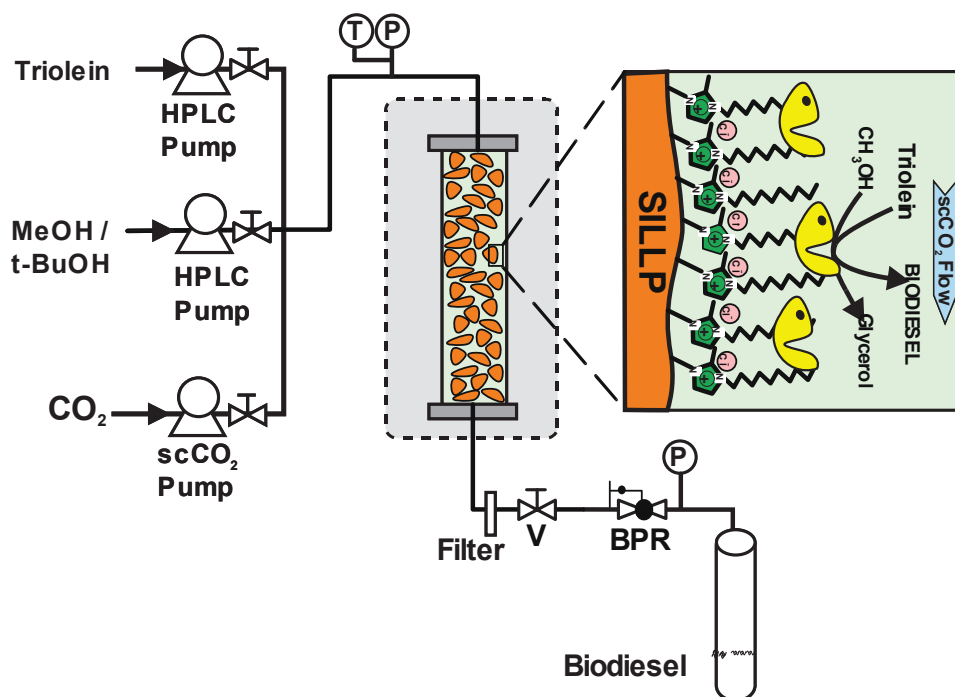


Biphasic systems based on ILs and $scCO_2$ have recently been used for the enzymatic synthesis of biodiesel [87]. For example, a continuous enzymatic reactor, based on supported biocatalyst particles coated with hydrophobic ILs having imidazolium cations with C_{12} - C_{18} alkyl side chains was studied for the methanolysis of triolein in $scCO_2$ at 60 °C and 18.0 MPa. The operational stability of the immobilized lipase was improved by its coating with the ILs, *i.e.*, 1-methyl-3-octadecylimidazolium hexafluorophosphate. A final two-phase system was obtained, revealing a good catalytic behaviour in continuous operation under supercritical conditions, with up to 82% biodiesel yield after 12 cycles of 4 h. For these IL/ $scCO_2$ systems, the unique properties of long chain ILs, providing a very appropriate microenvironment for enzyme-catalyzed reactions, led to a clear improvement in the efficiency for the biotransformation of vegetable oils into biodiesel.

However, the full miscibility of these hydrophobic ILs with both the triolein substrate and the methyl oleate product was related with the continuous activity decay observed for long term operation cycles. Thus, an excess in the triolein inlet flow or the continuous release of biodiesel product from the enzyme particle to the $scCO_2$ flow may dissolve the protective IL shell, enhancing continuous enzyme deactivation. Similarly, the low efficiency of the hydrophobic $scCO_2$ phase in transporting the hydrophilic by-product glycerol could lead to its retention in the closest enzyme microenvironment and to the continuous biocatalyst poisoning, preventing the entry of new triolein substrate molecules. Different experimental approaches to efficiently desorb glycerol from the catalytic matrix in biodiesel synthetic processes under supercritical conditions have been proposed. Desorption was carried out using absolute ethanol under atmospheric conditions at different mass flows (10–30 g/min) or using ethanol-modified supercritical CO_2 (1:3 molar ratio of ethanol: CO_2), under a pressure of 14.0 MPa, within a temperature range of 106–134 °C and with mass flow rates of 6–34 g/min. The results showed that ethanol is an efficient solvent for this process and that the supercritical desorption is much faster than conventional desorption processes [88].

The development of solid supports with a covalently attached IL phase is a further step towards reducing the amount of ILs used in catalytic processes in $scCO_2$, providing permanent protection of the enzymes against the adverse effect of this SCF. Through this approach, the properties of ILs are transferred to the solid phase, leading to either particle- or monolithic-Supported Ionic Liquid-Like Phases (SILLPs) [89]. This kind of material with tunable properties can be prepared on demand and they have been shown to efficiently immobilize a variety of catalysts. Indeed, the microenvironment provided by these “solid ionic liquid phases” can be modified by the modulation of the different design vectors of SILLPs [90]. Bioreactors based on *Candida antarctica* lipase B (CALB) adsorbed onto SILLPs have been successfully applied as macroporous monolithic mini-flow systems for the continuous synthesis of citronellyl propionate in $scCO_2$ [91], as well as the KR and DKR of *rac*-1-phenylethanol [92], showing in both cases good enzymatic activity and operational stability.

Figure 8. Set-up of a continuous reactor containing immobilized lipase onto Supported Ionic Liquid-Like Phases (SILLPs) for biodiesel synthesis by methanolysis of triolein [93]. T, Temperature indicator; P, pressure indicator; V, valve; BPR, Back-pressure regulator.



In this context, the use of different nano-structured supports, based on different 1-decyl-2-methylimidazolium cations covalently attached onto a polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) porous matrix as carriers to immobilize *Candida antarctica* lipase B (CALB), was recently reported (see Figure 8) [93]. The suitability of these immobilized lipase derivatives to carry out the synthesis of biodiesel (methyl oleate) through methanolysis of triolein has been tested in both *tert*-butanol and supercritical carbon dioxide (18.0 MPa, 45 °C) as reaction media. The use of modified supports with low ionic liquid loads covalently attached to the main polymeric backbone chains provided structured materials that led to high biodiesel yields (up to 95%) and operational stability (85% biodiesel yield after 45 cycles of 8–4 h) in $scCO_2$ (45 °C, 18.0 MPa). The presence of *tert*-butanol, as an inert co-solvent, in the $scCO_2$ phase at the same concentration as triolein was the key to avoid the

continuous poisoning of the biocatalyst through the blocking of its active sites by the polar by-product (glycerol) produced in the biodiesel synthesis. These results clearly illustrate the potential of SILLP-supported biocatalysts for the production of biodiesel, which can be obtained by means of a fully green technology under continuous operation.

5. Future Trends

In this review, we have highlighted the enormous potential of applying supercritical fluid technologies to design processes of biodiesel fuel production. However, as for any emerging technology, it also presents some weaknesses. These are challenging and should be solved before the industrial implementation of such methodologies. Our future efforts should move forward to simpler, cost-effective and “greener” SCFs processes, leading to high yields of a quality biodiesel fuel. To achieve this goal, new non-edible potential sources of vegetable oil such as *microalgae* and *jatropha* oil, which ensure that biodiesel production does not compete with resources for food industry, should be taken into consideration, as they will help to reduce costs and increase social acceptance. One of the most important approaches for the design of more intensive and cost-effective process configurations is process integration. In this respect, SCFs technology can help to process integration by combining routes for the simultaneous extraction, transesterification and valorisation of glycerol in a single step. Such technology should combine chemical reactions and extraction in the same step, achieving synergistic effects, and leading to an increase in selectivity, conversion, productivity and purity of the final product(s). Simpler reactive extraction processes without or with the (bio)catalysts can be a potential route for biodiesel production, greatly reducing the processing steps and costs at the same time.

The extreme reaction conditions necessary when working with SCFs make any such process energy intensive. This can be counterbalanced by the improvement in mass and heat transfer intensified by the fast fluid flow conditions, hence decreasing mass-transfer limitations, and avoiding phase separation, as a consequence of the large surface area-to-volume ratio available. The use of continuous-flow/micro(mini)reactor technology improves heat and mass transfer. This makes possible the potential for higher conversion yields under milder conditions and involving reduced molar ratios of alcohol to oil, as well as lower reaction temperatures and (bio)catalysts concentrations than for conventional stirred reactors. The development of new, simple, cheap and environmentally friendly catalytic systems for biodiesel production is required. Additional studies into the economic viability of any of the approaches mentioned should be made before we can safely talk of a green chemical industry for biodiesel production.

Acknowledgments

This work was partially supported by CICYT-MINECO (coordinated project CTQ 2011-28903) and SENECA Foundation (08616/PI/08).

References

1. Shahid, E.M.; Jamal, Y. Production of biodiesel: A technical review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2011**, *15*, 4732–4745.
2. Dupont, J.; Suarez, P.A.Z.; Meneghetti, M.R.; Meneghetti, S.M.P. Catalytic production of biodiesel and diesel-like hydrocarbons from triglycerides. *Energ. Environ. Sci.* **2009**, *2*, 1258–1265.
3. Melero, J.A.; Iglesias, J.; Morales, G. Heterogeneous acid catalysts for biodiesel production. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1285–1308.
4. Leung, D.Y.C.; Wu, X.; Leung, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl. Energ.* **2010**, *87*, 1083–1095.
5. Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *66*, 15–32.
6. Gog, A.; Roman, M.; Tosa, M.; Paizs, C.; Irime, F. Biodiesel production using enzymatic transesterification. *Renew. Energ.* **2012**, *39*, 10–16.
7. Wilson, P. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2009**, *29*, 81–93.
8. Shimada, Y.; Watanabe, Y.; Samukawa, T.; Sugihara, A.; Noda, H.; Fukuda, H.; Tominaga, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 789–793.
9. Soumanou, M.; Bornscheuer, U.T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzym. Microb. Technol.* **2003**, *33*, 97–103.
10. Macario, A.; Moliner, M.; Corma, A.; Giordano, G. Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related materials. *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *118*, 334–340.
11. Wang, X.; Dou, P.; Zhao, P.; Zhao, C.; Ding, Y.; Xu, P. Immobilization of lipases onto magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles for application in biodiesel production. *ChemSusChem* **2009**, *2*, 947–950.
12. Royon, D.; Daz, M.; Ellenrieder, G.; Locatelli, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 648–653.
13. Lozano, P.; García Verdugo, E.; Luis, S.V.; Pucheault, M.; Vaultier, M. (Bio)catalytic continuous flow processes in scCO₂ and/or ILs: Towards sustainable (Bio)catalytic synthetic platforms. *Curr. Org. Synth.* **2011**, *8*, 810–823.
14. Jessop, P.; Leitner, W. Introduction. In *Handbook of Green Chemistry-Supercritical Solvents*; Anastas, P.T., Leitner, W., Jessop, P., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim, Germany, 2010; Volume 4, pp. 1–30.
15. Beckmann, E.J. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. *J. Supercrit. Fluids* **2004**, *28*, 121–191.
16. Kruse, A.; Vogel, H. Heterogeneous catalysis in supercritical media—I. Carbon dioxide. *Chem. Eng. Technol.* **2008**, *31*, 23–32.
17. Burguete, M.I.; García-Verdugo, E.; Luis, S.V. Efficient and selective chemical transformations under flow conditions: The combination of supported catalysts and supercritical fluids. *Bilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1347–1359.
18. Hobbs, H.R.; Thomas, N.R. Biocatalysis in supercritical fluids, in fluorinated solvents, and under solvent-free conditions. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2786–2820.

19. Lozano, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.* **2010**, *12*, 555–569.
20. Couto, R.; Vidinha, P.; Peres, C.; Ribeiro, A.S.; Ferreira, O.; Oliveira, M.V.; Macedo, E.A.; Loureiro, J.M.; Barreiros, S. Geranyl acetate synthesis in a packed-bed reactor catalyzed by Novozym in supercritical carbon dioxide and in supercritical ethane. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50*, 1938–1946.
21. Lin, T.J.; Chen, S.W. Enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids into acylglycerols of borage oil via lipase-catalyzed reactions under supercritical conditions. *Chem. Eng. J.* **2008**, *141*, 318–326.
22. Lozano, P.; Diego, T.; Mira, C.; Montague, K.; Vaultier, M.; Iborra, J.L. Long term continuous chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Green Chem.* **2009**, *11*, 538–542.
23. Lozano, P.; Diego, T.; Carrié, D.; Vaultier, M.; Iborra, J.L. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2004**, *214*, 113–119.
24. Kamat, S.; Critchley, G.; Beckman, E.C.; Russell, A.J. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids. III. Does carbon dioxide covalently modify enzymes? *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46*, 610–620.
25. Lozano, P.; Avellaneda, A.; Pascual, R.; Iborra, J.L. Stability of immobilized alpha-chymotrypsin in supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 1345–1350.
26. Marty, A.; Combes, D.; Condoret, J.S. Continuous reaction-separation process for enzymatic esterification in supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 497–504.
27. Lozano, P.; Villora, M.G.; Gómez, D.; Gayo, A.B.; Sánchez-Conesa, J.A.; Rubio, M.; Iborra, J.L. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* **2004**, *29*, 121–128.
28. Rios, G.M.; Belleville, M.P.; Paoulucci-Jeanjean, D. Membrane engineering in biotechnology: quo vamus? *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 242–246.
29. Knez, Z. Enzymatic reactions in dense gases. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *47*, 357–372.
30. Rezaei, K.; Temelli, F.; Jenab, E. Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 272–280.
31. Dhake, K.P.; Deshmukh, K.M.; Patil, Y.P.; Singhal, R.S.; Bhanage, B.M. Improved activity and stability of *Rhizopus oryzae* lipase via immobilization for citronellol ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *J. Biotechnol.* **2011**, *156*, 46–51.
32. Rezaei, K.; Jenab, E.; Temelli, F. Effects of water on enzyme performance with an emphasis on the reactions in supercritical fluids. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *27*, 183–195.
33. Tan, K.T.; Lee, K.T. A review on supercritical fluids technology in sustainable biodiesel production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2011**, *15*, 2452–2456.
34. Johnson, D.T.; Taconi, K.A. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ. Prog.* **2007**, *26*, 338–348.
35. Imahara, H.; Minami, E.; Hari, S.; Saka, S. Thermal stability of biodiesel in supercritical methanol. *Fuel* **2008**, *8*, 1–6.

36. Niza, N.M.; Tan, K.T.; Lee, K.T.; Ahmad, Z. Biodiesel production by non-catalytic supercritical methyl acetate: Thermal stability study. *Appl. Energy* **2012**. Available online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.03.033> (accessed on 26 April 2012).
37. Diaz, M.S.; Espinosa, S.; Brignole, E.A. Model-based cost minimization in noncatalytic biodiesel production plants. *Energ. Fuel* **2009**, *23*, 5587–5595.
38. Da Silva, C.; de Castilhos, F.; Oliveira, J.V.; Filho, L.C. Continuous production of soybean biodiesel with compressed ethanol in a microtube reactor. *Fuel Process. Technol.* **2010**, *91*, 1274–1281
39. Trentin, C.M.; Lima, A.P.; Alkimim, I.P.; da Silva, C.; de Castilhos, F.; Mazutti, M.A.; Oliveira, J.V. Continuous catalyst-free production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in microtube reactor using supercritical carbon dioxide as co-solvent. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *56*, 283–291.
40. Sawangkeaw, R.; Bunyakiat, K.; Ngamprasertsith, S. Continuous production of biodiesel with supercritical methanol: Optimization of a scale-up plug flow reactor by response surface methodology. *Fuel Process. Technol.* **2011**, *92*, 2285–2292.
41. Maaira, J.; Santana, A.; Recasens, F.; Angeles Larrayoz, M. Biodiesel production using supercritical methanol/carbon dioxide mixtures in a continuous reactor. *Fuel* **2011**, *90*, 2280–2288.
42. Anitescu, G.; Bruno, T.J. Fluid properties needed in supercritical transesterification of triglyceride feedstocks to biodiesel fuels for efficient and clean combustion: A review. *J. Supercrit. Fluids* **2012**, *63*, 133–149.
43. Wen, D.; Jiang, H.; Zhang, K. Supercritical fluids technology for clean biofuel production. *Prog. Nat. Sci.* **2009**, *19*, 273–284.
44. Lee, J.-S.; Saka, S. Biodiesel production by heterogeneous catalysts and supercritical technologies. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 7191–7200.
45. Tan, K.T.; Lee, K.T. A review on supercritical fluids (SCF) technology in sustainable biodiesel production: Potential and challenges. *Renew. Sust. Energy Rev.* **2011**, *15*, 2452–2456.
46. Saka, S.; Kusdiana, D. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel* **2001**, *80*, 225–231.
47. Hiejima, Y.; Kajihara, Y.; Kohno, H.; Yao, M. Dielectric relaxation measurements on methanol up to the supercritical region. *J. Phys. Condens. Matter* **2001**, *13*, 10307–10320.
48. Yamaguchi, T.; Benmore, C.J.; Soper, A.K. The structure of subcritical and supercritical methanol by neutron diffraction, empirical potential structure refinement, and spherical harmonic analysis. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 8976–8987.
49. Wu, X.; Chen, Y.; Yamaguchi, T. Hydrogen bonding in methanol studied by infrared spectroscopy. *J. Mol. Spec.* **2007**, *246*, 187–191.
50. Kusdiana, D.; Saka, S. Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol. *Fuel* **2001**, *80*, 693–698.
51. Dasari, M.A.; Goff, M.J.; Suppes, G.J. Noncatalytic alcoholysis kinetics of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2003**, *80*, 189–192.
52. Anitescu, G.; Deshpande, A.; Tavlarides, L.L. Integrated technology for supercritical biodiesel production and power cogeneration. *Energy Fuel* **2008**, *22*, 1391–1399.

53. Pinnarat, T.; Savage, P.E. Assessment of noncatalytic biodiesel synthesis using supercritical reaction conditions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47*, 6801–6808.
54. Marulanda, V.; Anitescu, G.; Tavlarides, L.L. Investigations on supercritical transesterification of chicken fat for biodiesel production from low-cost lipid feedstocks. *J. Supercrit. Fluids* **2010**, *54*, 53–60.
55. Hegel, P.; Mabe, G.; Pereda, S.; Brignole, E.A. Phase transitions in a biodiesel reactor using supercritical methanol. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 6360–6365.
56. Sawangkeaw, R.; Teeravitud, S.; Bunyakiat, K.; Ngamprasertsith, S. Biofuel production from palm oil with supercritical alcohols: Effects of the alcohol to oil molar ratios on the biofuel chemical composition and properties. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 10704–10710.
57. Bunyakiat, K.; Makmee, S.; Sawangkeaw, R.; Ngamprasertsith, S. Continuous production of biodiesel via transesterification from vegetable oils in supercritical methanol. *Energy Fuel* **2006**, *20*, 812–817.
58. Cao, W.; Han, H.; Zhang, J. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and co-solvent. *Fuel* **2005**, *84*, 347–351.
59. Han, H.; Cao, W.; Zhang, J. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO₂ as co-solvent. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 3148–3151.
60. Santana, A.; Maçaira, J.; Larrayoz, M.A. Continuous production of biodiesel from vegetable oil using supercritical ethanol/carbon dioxide mixtures. *Fuel Process. Technol.* **2012**, *96*, 214–219.
61. Jomtib, N.; Prommuak, C.; Goto, M.; Sasaki, M.; Shotipruk, A. Effect of co-solvents on transesterification of refined palm oil in supercritical methanol. *Eng. J.* **2011**, *15*, 49–58.
62. Kusdiana, D.; Saka, S. Effects of water on biodiesel production by supercritical methanol treatment. *Bioresour. Technol.* **2004**, *91*, 289–295.
63. Ilham, Z.; Saka, S. Dimethyl carbonate as potential reactant in non-catalytic biodiesel production by supercritical method. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 1793–1796.
64. Tan, K.T.; Lee, K.T.; Mohamed, A.R. Optimization of supercritical dimethyl carbonate (SCDMC) technology for the production of biodiesel and value-added glycerol carbonate. *Fuel* **2010**, *89*, 3833–3839.
65. Ilham, Z.; Saka, S. Two-step supercritical dimethyl carbonate method for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 2735–2740.
66. Ochoa-Gómez, J.R.; Gómez-Jiménez-Aberasturi, O.; Ramírez-López, C.; Belsué, M. A brief review on industrial alternatives for the manufacturing of glycerol carbonate, a green chemical. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 389–399.
67. Ilham, Z.; Saka, S. Optimization of supercritical dimethyl carbonate method for biodiesel production. *Fuel* **2012**, *97*, 670–677.
68. Ilham, Z.; Saka, S. Production of biodiesel with glycerol carbonate by non-catalytic supercritical dimethyl carbonate. *Lipid Technol.* **2011**, *23*, 10–13.
69. Saka, S. Manufacturing Method for Fatty Acid Methyl Esters. JPN Patent No. 4378534, 2009.
70. Saka, S.; Isayama, Y. A new process for catalyst-free production of biodiesel using supercritical methyl acetate. *Fuel* **2009**, *88*, 1307–1313.
71. Goembira, F.; Matsuura, K.; Saka, S. Biodiesel production from rapeseed oil by various supercritical carboxylate esters. *Fuel* **2012**, *97*, 373–378.

72. Campanelli, P.; Banchemo, M.; Manna, L. Synthesis of biodiesel from edible, non-edible and waste cooking oils via supercritical methyl acetate transesterification. *Fuel* **2010**, *89*, 3675–3682.
73. Weingartner, H.; Franck, E.U. Supercritical water as a solvent. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2672–2692.
74. Minami, E.; Saka, S. Kinetics of hydrolysis and methyl esterification for biodiesel production in two-step supercritical methanol process. *Fuel* **2006**, *85*, 2479–2483.
75. Ilham, Z.; Saka, S. Glycerol to Value-added Glycerol Carbonate in the Two-step Supercritical Dimethyl Carbonate. In *Zero-Carbon Energy Kyoto Proceedings of the Second International Symposium of Global COE Program “Energy Science in the Age of Global Warming—Toward CO₂ Zero-emission Energy System”*; Yao, T., Ed.; Springer: Berlin, Germany, 2010; Series: Green Energy and Technology, pp. 153–158.
76. Saka, S.; Isayama, Y.; Ilham, Z.; Jiayu, X. New process for catalyst-free biodiesel production using subcritical acetic acid and supercritical methanol. *Fuel* **2010**, *89*, 1442–1446.
77. Ciftci, O.N.; Temelli, F. Continuous production of fatty acid methyl esters from corn oil in a supercritical carbon dioxide bioreactor. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *58*, 79–87.
78. De Lucas, A.; Gracia, I.; Rincon, J.; Garcia, M.T. Solubility determination and model prediction of olive husk oil in supercritical carbon dioxide and cosolvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 5061–5066.
79. Pinto, L.F.; Silva, D.I.S.; Silva, F.R.; Ramos, L.P.; Ndiaye, P.P.; Corazza, M.L. Phase equilibrium data and thermodynamic modeling of the system (CO₂+biodiesel+methanol) at high pressures. *J. Chem. Thermodyn.* **2012**, *44*, 57–65.
80. Araujo, O.A.S.; Silva, F.R.; Ramos, L.P.; Lenzi, M.K.; Ndiaye, P.M.; Corazza, M.L. Phase behavior measurements for the system (carbon dioxide+biodiesel+ethanol) at high pressures. *J. Chem. Thermodyn.* **2012**, *47*, 412–419.
81. Lee, J.H.; Kim, S.B.; Kang, S.W.; Song, Y.S.; Park, C.; Han, S.O.; Kim, S.K. Biodiesel production by a mixture of *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases using a supercritical carbon dioxide process. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 2105–2108.
82. Lee, M.; Lee, D.; Cho, J.K.; Cho, J.; Han, J.; Park, C.; Kim, S. Improved high-pressure enzymatic biodiesel batch synthesis in near-critical carbon dioxide. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 105–113.
83. Jackson, M.A.; King, J.W. Methanolysis of seed oils in flowing supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 353–356.
84. Rodrigues, A.R.; Pavia, A.; Gomes da Silva, M.; Simoes, P.; Barreiros, S. Continuous enzymatic production of biodiesel from virgin and waste sunflower oil in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *56*, 259–264.
85. Dalla Rosa, C.; Morandim, M.B.; Ninow, J.L.; Oliveira, D.; Treichel, H.; Vladimir Oliveira, J. Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 5818–5826.
86. Dalla Rosa, C.; Morandim, M.B.; Ninow, J.L.; Oliveira, D.; Treichel, H.; Vladimir Oliveira, J. Lipase catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane. *J. Supercrit. Fluids* **2008**, *47*, 49–53.

87. Lozano, P.; Bernal, J.M.; Vaultier, M. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Fuel* **2011**, *90*, 3461–3467.
88. Costa, A.E.; Santana, A.; Quadri, M.B.; Machado, R.A.F.; Recasens, F.; Larrayoz, M.A. Glycerol desorption from ion exchange and adsorbent resin using supercritical fluid technology: An optimization study. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *58*, 226–232.
89. Burguete, M.I.; Erythropel, H.; Garcia-Verdugo, E.; Luis, S.V.; Sans, V. Base supported ionic liquid-like phases as catalysts for the batch and continuous-flow Henry reaction. *Green Chem.* **2008**, *10*, 401–407.
90. Sans, V.; Karbass, N.; Burguete, M.I.; Compañ, V.; Garcia-Verdugo, E.; Luis, S.V.; Pawlak, M. Polymer-supported ionic-liquid-like phases (SILLPs): Transferring ionic liquid properties to polymeric matrices. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1894–1906.
91. Lozano, P.; Garcia-Verdugo, E.; Piamtongkam, R.; Karbass, N.; de Diego, T.; Burguete, M.I.; Luis, S.V.; Iborra, J.L. Bioreactors based on monolith-supported ionic liquid phase for enzyme catalysis in supercritical carbon dioxide. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1077–1084.
92. Lozano, P.; García-Verdugo, E.; Karbass, N.; Montague, K.; de Diego, T.; Burguete, M.I.; Luis, S.V. Supported Ionic Liquid-Like Phases (SILLPs) for enzymatic processes: Continuous KR and DKR in SILLP-scCO₂ systems. *Green Chem.* **2010**, *12*, 1803–1810.
93. Lozano, P.; García-Verdugo, E.; Bernal, J.M.; Izquierdo, D.F.; Burguete, M.I.; Sanchez-Gomez, G.; Luis, S.V. Immobilized lipase onto structured supports containing covalently attached ionic liquids for continuous synthesis of biodiesel in scCO₂. *ChemSusChem* **2012**, *5*, 790–798.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

ANEXO II

DOI: 10.1002/cssc.201000244

One-Phase Ionic Liquid Reaction Medium for Biocatalytic Production of Biodiesel

Pedro Lozano,^{*,[a]} Juana María Bernal,^[a] Rungtiwa Piamtongkam,^[a] Dirk Fetzer,^[a] and Michel Vaultier^[b]

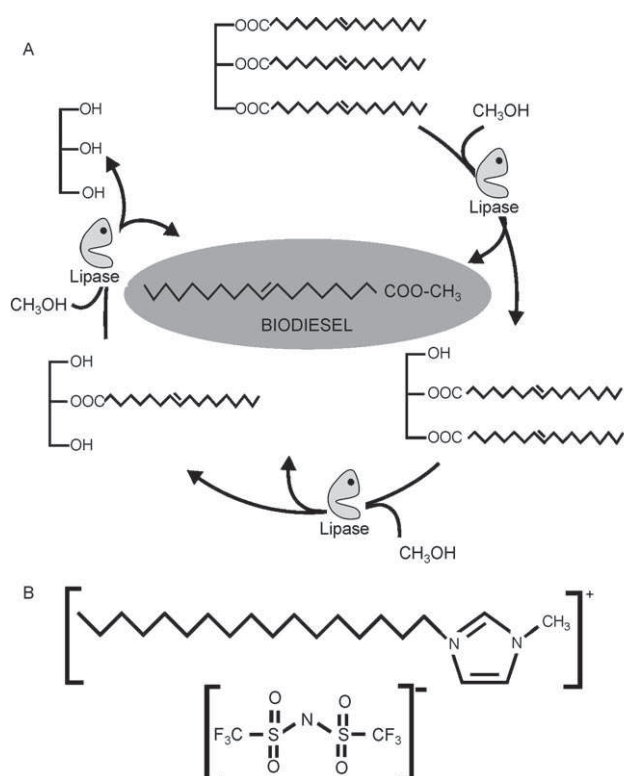
Biodiesel is a sustainable alternative liquid fuel to petroleum oils, based on fatty acid methyl esters (FAMES), and obtained by transesterification of triacylglycerides (e.g., triolein) with a primary aliphatic alcohol (e.g., methanol) by using chemical or enzymatic catalysts (Scheme 1 A). Although biodiesel is successfully produced on an industrial scale by using chemical catalysts, the glycerol recovery and the removal of inorganic

salts remain important problems because of the production of large amounts of wastewater.^[1]

Immobilized biocatalysts, for example, lipases, offer a very promising route to environmentally acceptable production of biodiesel, because they exhibit high catalytic activity and selectivity for the alcoholysis of triglycerides under mild reaction conditions, resulting in high-purity biodiesel. However, the use of immobilized lipases shows several disadvantages, which constitute a severe limitation for their exploitation on an industrial scale. Triacylglycerides (e.g., triolein) and alcohols (e.g., methanol) are not miscible, leading to two-phase systems impairing the efficiency of substrate transport towards the enzyme microenvironment. In this context, the biocatalyst may directly interact with the methanol phase producing full enzyme deactivation. Furthermore, as the byproduct glycerol is nonsoluble in the reaction media, it remains adsorbed onto the biocatalyst particles, reducing the accessibility of triglycerides to the enzyme microenvironment. All these facts are important limitations to the use of biocatalysts for biodiesel synthesis, because of the resulting decrease of both the turnover frequency and the number of recycling operations of the enzyme.^[2]

Several strategies have been developed to overcome these constraints. For example, the sequential addition of methanol in three different doses,^[3a,b] or its storage by adsorption onto silica gel particles, which then act as "microreservoirs" able to slowly release the alcohol and make it available for the transesterification process. Thus up to 90% biodiesel yield was obtained in 18 h reaction, and catalyst recycling was improved as well.^[3c] Other approaches for enzyme immobilization (e.g., encapsulation by sol-gel methods^[4a] and covalent attachment onto magnetic nanoparticles^[4b]) were also described to improve the biocatalytic efficiency. Another improvement of the enzyme efficiency in biodiesel synthesis (up to 97% yield after 24 h at 50 °C) consists of the prior solubilization of substrates in an organic solvent having medium polarity (e.g., *tert*-butanol), which results in a one-phase reaction medium, avoiding the direct interaction between the enzyme and pure methanol.^[5]

Since 2000, ionic liquids (ILs) have emerged as exceptionally interesting nonaqueous reaction media for biocatalysis because of their unique solvent properties, negligible vapor pressure, and exceptional ability to maintain enzymes in active and stable conformations.^[6,7] The biocatalytic synthesis of biodiesel in ILs has been reported, by using ILs based on short-chain 1,3-dialkylimidazolium cation (i.e., [Bmim][PF₆], Bmim][NTf₂]).^[8] All the assayed ILs for enzymatic synthesis of biodiesel were not able to dissolve triglycerides, thus resulting in two-phase reaction media leading to moderate reaction efficiency (up to 90% yield for 24 h at 60 °C).^[8b]



Scheme 1. A) Illustration of the lipase-catalyzed synthesis of biodiesel by methanolysis of triolein. B) 1-Methyl-3-octadecylimidazolium bis(trifluoromethylsulfon)imide.

[a] Prof. P. Lozano, J. M. Bernal, Dr. R. Piamtongkam, D. Fetzer
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular "B" e Inmunología
Facultad de Química, Universidad de Murcia
Campus de Espinardo, 30.100, Murcia (Spain)
Fax: (+34) 868884148
E-mail: plozanor@um.es

[b] Dr. M. Vaultier
Laboratoire de Chimie et Photonique Moléculaires
UMR CNRS 6510, Université de Rennes-1
Campus de Beaulieu, Av. Général Leclerc, 35042, Rennes (France)

Supporting Information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cssc.201000244>.

The use of lipases from several sources,^[8c] as well as whole cells producing lipases,^[8d] does not improve the catalytic efficiency for biodiesel synthesis. Recently, it was shown that several ether-functionalized ILs, based on imidazolium or ammonium cations with a C7 alkyl sidechain, were capable of dissolving middle alkyl-chain triglycerides (i.e., Miglyol oil 812) and soybean oil. However, the suitability of these ILs for the lipase-catalyzed synthesis of biodiesel in terms of yield was also moderate (e.g., up to 70% biodiesel yield after 24 h at 50 °C).^[9]

This paper analyzes for the first time the ability of three hydrophobic ILs, to dissolve triolein-methanol mixtures as a function of temperature. Following the statement “like-dissolves-like”, the assayed ILs were based on hydrophobic anions and cations with large alkyl sidechain(s), for example, 1-methyl-3-octylimidazolium hexafluorophosphate, [Omim][PF₆]; methyl trioctylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [Troma][NTf₂]; and 1-methyl-3-octadecylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide, [C₁₈mim][NTf₂] (Scheme 1B). The excellent suitability of these reaction media for lipase-catalyzed synthesis of biodiesel synthesis is demonstrated.

The phase behavior of six different IL/triolein/methanol mixtures was studied at different temperatures. In all cases, the triolein/methanol ratio was 1:6 (mol mol⁻¹), because it was often considered as the optimum proportion for lipase-catalyzed biodiesel synthesis.^[8] Both [Omim][PF₆] and [Troma][NTf₂] were not able to solubilize the mixture triolein/methanol at any of the temperatures and proportions assayed (see the Supporting Information). In the resulting two-phase systems, the bottom phase was essentially formed by an IL-methanol solution, while the upper phase mainly contained triolein. However, in the case of [Troma][NTf₂], which contains three C₈ alkyl chains in the cation, it was shown how the size of the bottom phase was increased with respect to what was observed for the [Omim][PF₆] case for all the assayed mixtures. In this context, as triolein contains three C₁₈ alkyl chains, these results suggest that the ability of an IL to dissolve triolein could be related with the length of the alkyl chain in the cation, following the statement “like-dissolves-like”, which can be seen in Figure 1 for [C₁₈mim][NTf₂]. This IL, which is solid at room temperature (m.p. 53 °C), was able to provide a homogeneous one-phase system for mixtures having an IL content higher than 30% (w/w) at 50 and 60 °C (Figure 1C, D, E, and F).^[10] Independent of this fact, the suitability of these ILs ([Omim][PF₆], [Troma][NTf₂], and [C₁₈mim][NTf₂]) for lipase-catalyzed biodiesel synthesis by transesterification of triolein was studied with a [C₁₈mim][NTf₂]/(triolein+methanol) ratio (w/w) of 63.8:36.2 (Figure 1E).

Figure 2 depicts the time course for Novozym 435-catalyzed transesterification of triolein with methanol to produce methyl oleate (biodiesel) in [C₁₈mim][NTf₂] at 60 °C, as well as pictures of the resulting clear and homogeneous reaction media at 0 and 24 h. The biocatalytic systems were able to produce up to 96% biodiesel yield in 6 h, which resulted in a transparent monophasic system because of the miscibility of methyl oleate with [C₁₈mim][NTf₂]. The byproduct glycerol was not miscible with this IL regardless of the temperature. It usually settled down at the bottom as little drops. This cannot be seen in the inserted picture because of the low amount of the glycerol

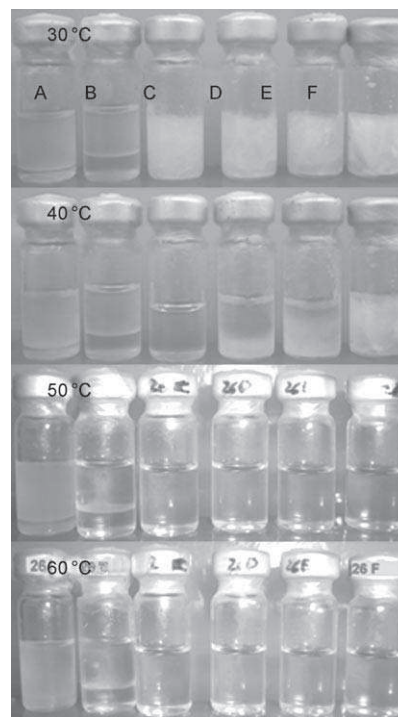


Figure 1. Phase behavior of [C₁₈mim][NTf₂]/triolein/methanol mixtures at different temperatures^[a,b] For all cases, the triolein/methanol ratio was 1:6 (mol mol⁻¹), whereas the [C₁₈mim][NTf₂]/(triolein+methanol) ratios (w/w) were as follows: A) 9.1:89.9; B) 18.5:81.5; C) 30.9:69.1; D) 47.6:52.4; E) 63.8:36.2; F) 73.7:26.3.

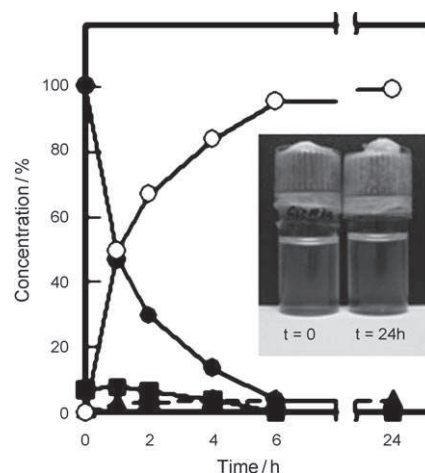


Figure 2. Time-course profile of triolein (●), diolein (■), monoolein (▲) and methyl oleate (○) for the Novozym 435-catalyzed transesterification of triolein in [C₁₈mim][NTf₂] at 60 °C. Reaction conditions: 64% w/w IL content; triolein (275 mg, 0.31 mmol); methanol (60 mg, 1.88 mmol); Novozyme 435 (10% w/w, 27.5 mg); see Experimental Section for details.

produced (up to 0.31 mmol, 23 μL). Furthermore, to confirm the excellent suitability of [C₁₈mim][NTf₂] for enzymatic synthesis of biodiesel, a comparative study on the biodiesel yield was carried out for the all the assayed ILs as a function of temperature at 6 h reaction time. As can be seen in Figure 3, the biodiesel yield showed a bell-shaped profile giving the best yield at 60 °C. Notably, the lipase was practically inactive in the IL-

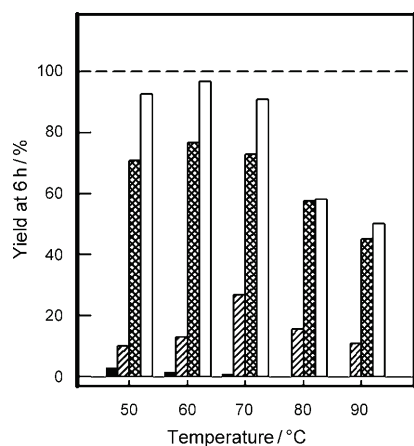


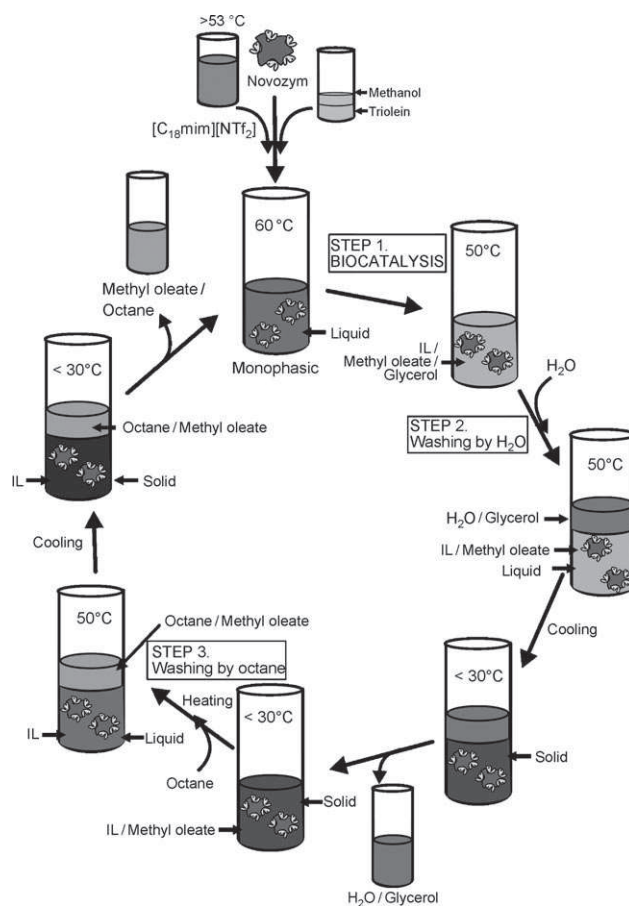
Figure 3. Effect of temperature on the biodiesel yield at 6 h for Novozym 435-catalyzed methanolysis of triolein in IL free reaction mixture (black), and in the presence of [Omim][PF₆] (striped), [Troma][NTf₂] (crosshatched), and [C₁₈mim][NTf₂] (white). Reaction conditions: 64% w/w IL content; triolein/methanol molar ratio, 1:6; see Experimental Section for details.

free case due to the enzyme deactivation induced by methanol.^[3,8,11] Furthermore, the increase in the length of the alkyl chain in the cation resulted in a clear improvement of biodiesel yield after 6 h for all the assayed temperatures; the best results were obtained in [C₁₈mim][NTf₂] at 60 °C. This result was corroborated by duplicate experiments in which the biodiesel yield after 6 h was 96% as determined by HPLC.^[12] The improvement in lipase activity for biodiesel synthesis by increasing the alkyl chain of the cation ([Emim], [Bmim], [Hmim], and [Omim]) has been shown for both [PF₆] and [NTf₂] anions, but with moderate results (up to 80% biodiesel yield in 20 h for the [Omim][NTf₂] case).^[8b]

Although [C₁₈mim][NTf₂] is a solid at room temperature, it should be mentioned that this IL provides less viscous reaction medium than [Omim][PF₆] or [Troma][NTf₂] at 60 °C (i.e., 85, 152, and 186 mPas, respectively). The high viscosity of some ILs (e.g., 11 000 and 300 mPas for the case [Bmim][Cl] at 30 and 70 °C, respectively) has been reported as a retarding factor for the rate of enzymatic catalysis, because it slows the diffusion of the enzyme to its target.^[13] The low viscosity of [C₁₈mim][NTf₂] at 60 °C is of high interest with regards to its application in the industrial production of biodiesel by biotransformation.

However, the key criteria for scaling up any biocatalytic process for biodiesel production are the operational stability of the enzyme and the recycling of the IL. Therefore, a laboratory cyclic protocol to reuse the biocatalyst/[C₁₈mim][NTf₂] system for biodiesel synthesis was designed (see the Experimental Section). In this approach, the phase behavior of methyl oleate (biodiesel) and [C₁₈mim][NTf₂] mixtures as a function of temperature were taken into account. This mixture was homogeneous (monophasic system) at temperatures higher than 40 °C, but became solid below 30 °C. Therefore, a cyclic protocol was established as follows: firstly, the biocatalytic step is run at 60 °C for 6 h, followed by two consecutive washing steps, one with water and the second one with octane, allowing for the con-

secutive and selective extraction of glycerol and methyl oleate, respectively (Scheme 2). Liquid–liquid extractions were carried out at 50 °C, but the resulting biphasic systems were then cooled to room temperature (< 30 °C) before decantation. This



Scheme 2. Cyclic protocol for enzymatic synthesis of biodiesel in [C₁₈mim][NTf₂], including recovery of products by liquid–liquid extraction, and recycling of the biocatalyst and the ionic liquid.

permits an easy and full recovery of the IL phase because of its solidification. This cyclic protocol was experimented with a reaction mixture containing triolein (1.24 mmol), methanol (7.45 mmol), [C₁₈mim][NTf₂] (64% w/w), and Novozym 435 (120 mg, 10% w/w) maintained at 60 °C. Figure 4 shows the methyl oleate yield profile after 6 h of reaction of this enzyme/IL system and consecutive recycling system in consecutive operation cycles. As it can be seen, the enzyme activity remained practically unchanged after seven operation cycles. These results clearly underlined the interest of this IL for the biocatalytic synthesis of biodiesel.

Furthermore, the interesting properties of this hydrophobic IL, based on a cation with an alkyl chain of the same length as the triolein substrate (C₁₈), have been demonstrated in two different ways. Firstly, the [C₁₈mim][NTf₂] was able to dissolve the vegetable oil, providing an homogeneous monophasic reaction system in agreement with the statement “like-dissolves-like”. Secondly, this IL provided an excellent microenvironment

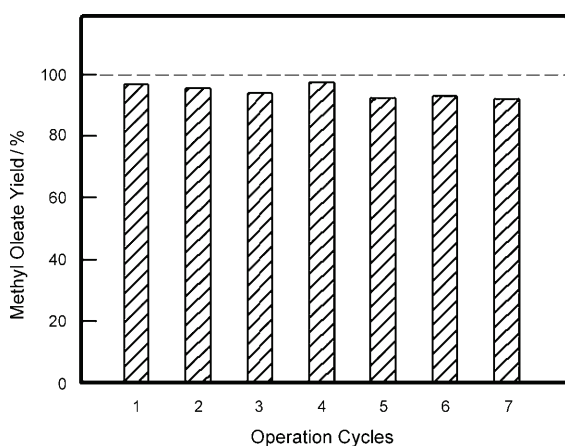


Figure 4. Operational stability (recycling) of Novozym 435-catalyzed methanolysis of triolein in [C₁₈mim][NTf₂] at 60 °C. Reaction conditions: 64% w/w IL content; triolein/methanol molar ratio, 1:6; see Experimental Section for details.

for the enzyme catalysis during both biodiesel synthesis, and the liquid–liquid extraction steps. The immobilized enzyme particles remained into the IL phase during the washing/extraction steps, and the biocatalytic performance was not modified. The protective effect of the hydrophobic ILs, based on the [NTf₂] anion and imidazolium cations, have been extensively reported, and is related to the maintenance of the native structure of the protein.^[14] The coating of the immobilized enzyme particles with these hydrophobic ILs always resulted in their excellent stabilization,^[7,11] even under extremely harsh conditions (e.g., scCO₂ at 10 MPa and 150 °C).^[15] The operational stability of enzymes in ILs for biodiesel synthesis has not been demonstrated previously.^[8] Enzyme stabilization provided by [C₁₈mim][NTf₂] was significantly better than that obtained by other enzyme stabilization approaches (i.e., encapsulation and immobilization on magnetic nanoparticles).^[4] Furthermore, the use of this hydrophobic IL resulted in an excellent medium for efficient lipase-mediated transformation of triolein to methyl oleate compared to organic solvents or a solvent-free medium in terms of yield and reaction time.^[3]

In conclusion, this work clearly showed the suitability of the Novozym 435/[C₁₈mim][NTf₂] system to carry out the synthesis of biodiesel including its easy and efficient recycling. The appropriate physical properties of this IL permit the full solubilization of all substrates over a wide range of IL/triolein concentration ratios that results in monophasic systems. The possibility to change from liquid to solid phase by moderate change in temperature is of high interest to design industrial processes for biodiesel production with an easy full recovery of the IL. Finally, this IL provided an excellent microenvironment for the enzyme activity, protecting the lipase from the methanol-induced deactivation. The unique properties of long chain and lipophilic ILs to carry out biotransformations of oils in nonaqueous environments open up new opportunities to develop green industrial processes.

Experimental Section

Chemicals: Immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435, EC 3.1.1.3) was a gift from Novozymes S. A. (Spain). Substrates, solvents, and other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich–Fluka (Madrid, Spain), and were of the highest purity available. The ILs 1-methyl-3-octylimidazolium hexafluorophosphate ([Omim][PF₆], 99% purity), methyl-trioctylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, ([Troma][NTf₂], 99% purity), and 1-methyl-3-octadecylimidazolium bis(trifluoro-methylsulfonyl)imide ([C₁₈mim][NTf₂], 99% purity) were obtained from IoLiTec GmbH (Germany).

Physical properties of ILs: Viscosity measurements of ILs were carried out in a Haake Viscometer 6Plus at 60 °C. Melting points were determined by using a Reichert Thermovar melting point apparatus equipped with microscope, and were uncorrected.

Phase behavior of IL/triolein/methanol mixtures: Into six different screw-capped vials with Teflon-lined septa (1.5 mL total capacity), different amounts (0.09, 0.18, 0.29, 0.44, 0.60, and 0.67 g, respectively) of the IL ([Omim][PF₆], [Troma][NTf₂] or [C₁₈mim][NTf₂]) were added. Then, variable amounts of methanol (0.16, 0.14, 0.12, 0.09, 0.06, and 0.04 g) were respectively dissolved into the IL. Finally, the corresponding amounts of triolein were added to each tube in order to obtain the following IL/methanol/triolein ternary mixtures (w/w/w): A) 9.1:16.2:74.7, B) 18.5:14.6:66.9; C) 30.9:12.3:56.7; D) 47.6:9.4:43.0; E) 63.8:6.5:29.7; F) 73.7:4.2:22.1. In all cases, the triolein/methanol ratio was 1:6 (mol mol⁻¹). The resulting mixtures were incubated with shaking for 1 h at the selected temperature (30, 40, 50, or 60 °C).

General procedure for methanolysis of triolein: Triolein (0.32 mmol) was added into screw-capped vials (1.5 mL total capacity) containing [Omim][PF₆], [Troma][NTf₂] or [C₁₈mim][NTf₂] (0.8 g) and methanol (1.92 mmol). The mixture was incubated at the selected temperature in a glycerol bath for 15 min under magnetic stirring at 200 rpm. The reaction was started by adding Novozym 435 (28 mg). At regular time intervals, the sealed reaction vessel was taken out of the glycerol bath and chilled briefly in an ice bath to condensate volatiles. Then, an aliquot (30 μL) was taken and added to acetone (470 μL). The resulting solution was centrifuged at 13 000 rpm for 10 min. Finally, 400 μL of acetone extracts were added to 100 mM ethyl decanoate (internal standard; 100 μL) solution in acetone and 30 μL of the resultant solution was analyzed by HPLC. All experiments were carried out in duplicate.

HPLC analysis of the reaction product: HPLC analyses were performed on a LC-10AT Shimadzu system consisting of a quaternary pump equipped with an online vacuum degasser, an autosampler with a variable injection capacity and temperature control, and a diode array SPD-M20 A (Shimadzu) detector. Methyl oleate, triolein, and intermediate methanolysis products (mono- and diglycerides) were separated by using a LiChroCart Lichrospher RP-18 column (25 cm length, 4.6 mm internal diameter and 5 μm particle size, Merck). Mobile phases were as follows, A) acetonitrile/H₂O, 80:20 (v/v); B) acetonitrile (100%); and C) isopropanol/hexane, 5:4 (v/v). A 30 min ternary gradient from 100% phase A to 50:50 (v/v) phases B/C was carried out for all compounds separation, in agreement with Holcapek et al.,^[12] and peaks were identified by comparing retention times with the appropriate corresponding standards.

Operational stability of Novozym 435 in [C₁₈mim][NTf₂] for biodiesel synthesis: In a 15 mL round-bottom flask, methanol (225 μL, 4.84 mmol) and triolein (775 μL, 0.8 mmol) were added to [C₁₈mim][NTf₂] (2 g) and the mixture was shaken at 60 °C in a glycerol bath for 10 min until a clear homogeneous phase was ob-

served. Then, Novozym 435 (100 mg) was added to initiate the reaction. The reaction mixture was sealed and incubated at 60 °C upon gentle agitation for 6 h. At this time, a 30 µL aliquot was taken and suspended in 470 µL acetone for HPLC analysis as described above. For the extraction of the reaction product, two consecutive washing steps with water and octane were carried out. First, H₂O (5 mL) was added and the resulting biphasic mixture was shaken for 20 min at 60 °C to extract glycerol and methanol in excess. Then, the mixture was chilled briefly in an ice bath to precipitate the IL phase, and the aqueous phase was decanted. This washing step with water was repeated three-times. The residual water content was eliminated by evaporation under vacuum in a rotator. For the second washing step, octane (5 mL) was added to the remaining IL phase, and the resulting biphasic mixture was shaken for 20 min at 60 °C to extract biodiesel. Then, the mixture was chilled briefly in an ice bath to precipitate the IL phase, and the octane phase was decanted. This washing step with octane was repeated for three-times to extract all compounds. Finally, the residual amount of octane was evaporated under vacuum in a rotator, and a new biocatalytic/extraction cycle for biodiesel production was started by adding methanol (225 µL, 4.84 mmol) and triolein (775 µL, 0.8 mmol).

Acknowledgements

This work was partially supported by the CICYT-MICIN (CTQ2008-00877) and SENECA Foundation (08616/PI/08) grants. R. Piamtongkam was a PhD student from Chulalongkorn University (Bangkok, Thailand). D. Fetzner was an Erasmus student from the University of Kaiserslautern (Germany). We thank M. R. Martinez (Novozymes S. A., Madrid) for the enzyme preparation.

Keywords: biocatalysis · biodiesels · enzymes · green chemistry · ionic liquids

- [1] a) J. Dupont, P. A. Z. Suarez, M. R. Meneghetti, *Energy Environ. Sci.* **2009**, *2*, 1258–1265; b) A. P. Vyas, J. L. Verma, N. Subrahmanyam, *Fuel* **2010**, *89*, 1–9; c) A. Röttig, L. Wenning, D. Broker, A. Steinbüchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1713–1733.
- [2] a) R. C. Rodrigues, F. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B* **2010**, *64*, 1–22; A. Bajaj, P. Lohan, P. N. Jha, R. Mehrotra, *J. Mol. Catal. B* **2010**, *62*, 9–14.
- [3] a) Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, Y. Tominaga, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 789–793; b) M. Soumanou, U. T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 97–103.
- [4] a) A. Macario, M. Moliner, A. Corma, G. Giordano, *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *118*, 334–340; b) X. Wang, P. Dou, P. Zhao, C. Zhao, Y. Ding, P. Xu, *ChemSusChem* **2009**, *2*, 947–950; c) E. Y. Park, M. Sato, S. Kojima, *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 889–896.
- [5] a) D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder, S. Locatelli, *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 648–653; b) Y. Wang, H. Wu, M. H. Zong, *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 7232–7237; c) M. Raita, V. Champreda, N. Laosiripojana, *Process Biochem.* **2010**, *45*, 829–834.
- [6] Pioneering work using ILs in biocatalysis: a) R. Madeira Lau, F. Van Rantwijk, K. R. Seddon, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4189–4191; b) M. Erbeltinger, A. J. Mesiano, A. J. Russell, *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 1129–1131; c) P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1529–1533; d) T. Itoh, E. Akasaki, K. Kudo, S. Shikarimi, *Chem. Lett.* **2001**, 262–263; P. Lozano, T. De Diego, J. P. Guegan, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *75*, 563–569.
- [7] For reviews on biocatalysis in ILs, see: a) F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757–2785; b) M. Sureshkumar, C. K. Lee, *J. Mol. Catal. B* **2009**, *60*, 1–12; c) M. Moniruzzaman, N. Kamiya, M. Goto, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2887–2899; d) P. Lozano, *Green Chem.* **2010**, *12*, 555–569.
- [8] a) S. Sunitha, S. Kanjilal, P. S. Reddy, R. B. N. Prasad, *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1881–1885; b) S. H. Ha, M. N. Lan, S. H. Lee, S. M. Hwang, Y. M. Koo, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 480–483; c) M. Gamba, A. A. M. Lapis, J. Dupont, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 160–164; d) S. Arai, K. Nakashima, T. Tanino, C. Ogino, A. Kondo, H. Fukuda, *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 51–55.
- [9] H. Zhao, Z. Y. Song, O. Olubajo, J. V. Cowins, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *162*, 13–23.
- [10] P. Lozano, T. de Diego, J. L. Iborra, M. Vaultier, Patent WO 2010/057996A6, **2010**.
- [11] P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Biocatal. Bio-transform.* **2005**, *23*, 169–176.
- [12] M. Holčapek, P. Jandera, J. Fischer, B. Prokeš, *J. Chromatogr. A* **1999**, *858*, 13–31.
- [13] S. Bose, D. W. Armstrong, J. W. Petrich, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8221–8227.
- [14] a) T. De Diego, P. Lozano, S. Gmouh, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1457–1464; b) E. Fehér, B. Major, K. Bélafi-Bakó, L. Gubicza, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1624–1627; c) H. Zhao, G. A. Baker, Z. Y. Song, O. Olubajo, L. Zanders, S. M. Campbell, *J. Mol. Catal. B* **2009**, *57*, 149–147.
- [15] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 380–382.

Received: August 3, 2010

Published online on October 12, 2010

Supporting Information

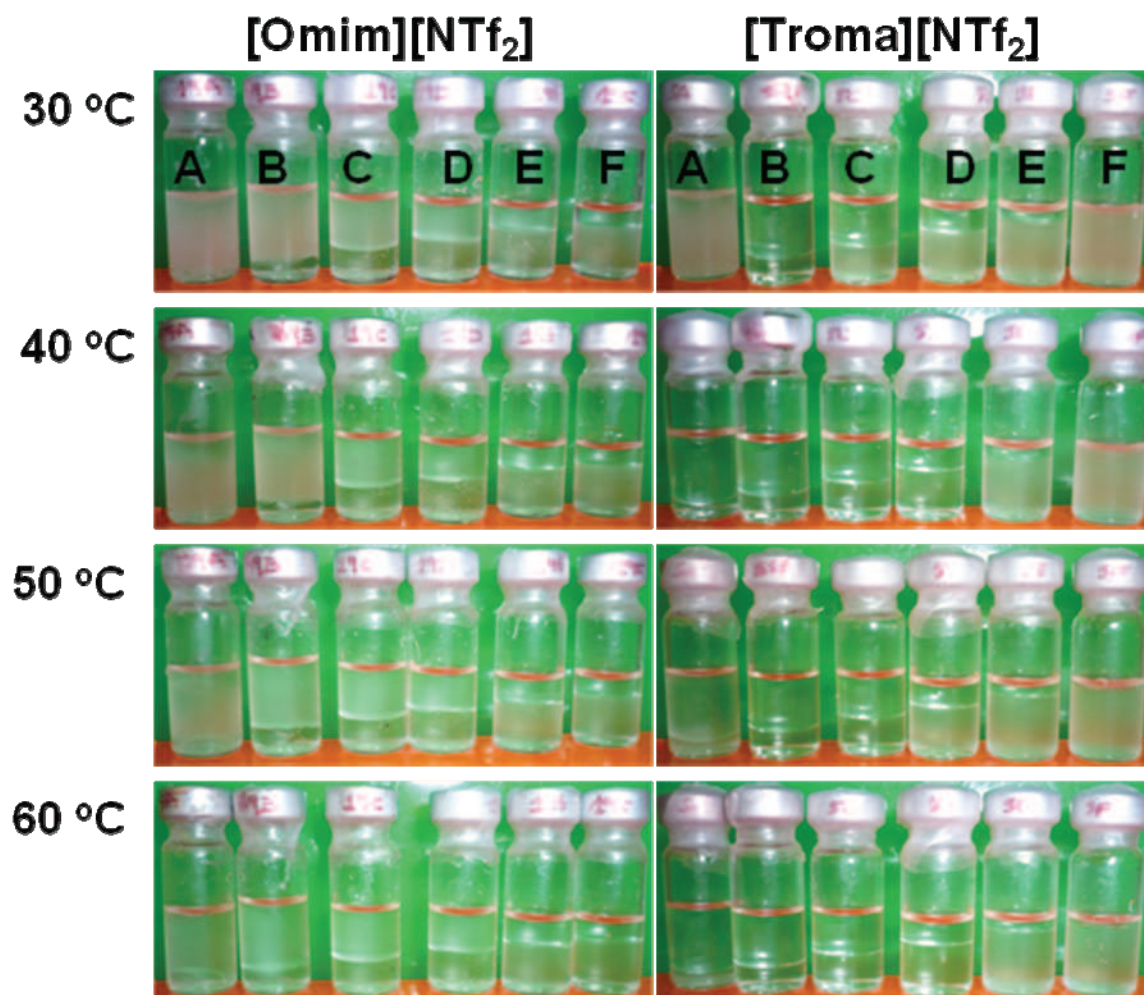
© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2010

One-Phase Ionic Liquid Reaction Medium for Biocatalytic Production of Biodiesel

Pedro Lozano,^{*,[a]} Juana María Bernal,^[a] Rungtiwa Piamtongkam,^[a] Dirk Fetzer,^[a] and Michel Vaultier^[b]

cssc_201000244_sm_miscellaneous_information.pdf

Phase behaviour of [Omim][NTf₂] / triolein / methanol, and [Troma][NTf₂] / triolein / methanol mixtures at different temperatures. For all cases, [triolein] : [methanol] ratio was 1:6 (mol:mol), while the IL : (triolein+methanol) ratio (w/w) was as follows, A, 9.1/89.9 B: 18.5/81.5; C, 30.9/69.1; D, 47.6/52.4; E, 63.8/36.2; F, 73.7/26.3.. See Experimental section for further details.



ANEXO III



Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems

Pedro Lozano^{a,*}, Juana M. Bernal^{a,1}, Michel Vaultier^{b,2}

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Química, Universidad de Murcia, P.O. Box 4021, E-30100 Murcia, Spain

^bLaboratoire de Chimie et Photonique Moléculaires, UMR CNRS 6510, Université de Rennes-1, Campus de Beaulieu, Av. Général Leclerc, F-35042 Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2011

Received in revised form 6 June 2011

Accepted 8 June 2011

Available online 30 June 2011

Keywords:

Biodiesel

Biocatalysis

Supercritical

Green process

Continuous reactor

ABSTRACT

The excellent suitability of immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) catalyst to carry out the synthesis of methyl oleate (biodiesel) by methanolysis of triolein in ILs based on imidazolium cations with large alkyl side chain (from C₁₂ to C₁₈) has been demonstrated at 60 and 85 °C. The phase behaviour of IL/triolein/methanol and IL/methyl oleate mixtures were studied at different concentrations and temperatures, the best results (up to 98.6% biodiesel yield after 6 h) being obtained for ILs able to provide monophasic reaction systems, i.e. 1-methyl-3-octadecylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide). A continuous enzymatic reactor, based on biocatalysts particles coated with hydrophobic ILs, for biodiesel synthesis in supercritical carbon dioxide was studied at 60 °C and 180 bar. The operational stability of the immobilized lipase was improved by its coating with ILs, i.e. 1-methyl-3-octadecylimidazolium hexafluorophosphate, leading to a two-phase systems with respect to the biodiesel product, which showed an excellent catalytic behaviour in continuous operation under supercritical conditions (up to 82% biodiesel yield after 12 cycles of 4 h).

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Increased demand for energy, global warming due to emission of green house gases, environmental pollution, and fast diminishing supply of fossil fuels are the major key factors leading to search for alternative sources of energy [1]. Biodiesel is a diesel substitute fuel, composed of fatty acid methyl esters (i.e. methyl oleate) and obtained from renewable sources (i.e. vegetable oils, fats, etc) by catalytic transesterification with primary aliphatic alcohols (e.g. methanol). The interest to produce biodiesel by clean and sustainable approaches including biocatalysis is doubtless, because of the improved quality of the final product, as well as the reduction in wastewater production during separation and purification steps [2]. At the opposite of chemical catalysts, biocatalysts (i.e. lipases) allow the synthesis of specific alkyl esters, the easy recovery of glycerol and the transesterification of fat substrates with high free fatty acid content [3]. However, one of the common drawbacks with the use of enzyme-based processes is the high cost of the enzyme, making it necessary to develop reusable biocatalyst derivatives with high operational stability. In this context, the immiscibility of triacylglycerides (e.g. triolein) and alcohols (e.g. methanol) clearly

impairs their exploitation at industrial scale [4,5]. These two-phase reaction systems exhibit a decrease in the catalytic efficiency of the enzyme because of its fast deactivation resulting from its direct contact with methanol, as well as, the low efficiency of substrates transport towards the enzyme microenvironment. All these features result in a decrease of both the turnover frequency and the number of recycling operations of the biocatalysts [6].

Methanol stepwise addition, acyl acceptor alterations and/or solvent engineering are the applied approaches to solve all these constrains. The stepwise addition of methanol [7,8], or the addition of silica particles containing adsorbed methanol [9], permit up to 94% biodiesel yield in a 24 h period, and the enzyme reuse for six cycles as well. When methanol is replaced by a different acyl acceptor, like methyl acetate, the lipase inactivation by methanol interaction is reduced, resulting in up to 92% biodiesel yield in 24 h for a 12:1 methyl acetate:oil molar ratio [10]. Medium engineering approaches to improve methanol solubility into the reaction medium provided good results. Thus, some organic solvents (e.g. *tert*-butanol) improve methanol solubility into the vegetable oil thus avoiding the direct interaction between the enzyme and pure methanol. This results in the improvement of the biocatalytic efficiency (up to 97% biodiesel yield after 24 h at 50 °C) [11,12]. Supercritical carbon dioxide (scCO₂) could be a good choice as a green solvent for enzymatic synthesis of biodiesel, but moderate yields (40–90%) and low operational stability of the enzyme have been reported [13–15].

* Corresponding author. Tel.: +34 868 88 73 92; fax: +34 868 88 41 48.

E-mail address: plozanor@um.es (P. Lozano).

¹ Tel.: +34 868 88 73 92; fax: +34 868 88 41 48.

² Tel.: +33 2 99 28 62 74; fax: +33 2 99 28 69 55.

The biocatalytic synthesis of biodiesel in ILs has also been reported [16–19]. However, when the assayed ILs were based on short-chain 1,3-dialkylimidazolium cations (e.g. [Bmim][PF₆], [Bmim][NTf₂]), as they were not able to dissolve triacylglycerides, the resulting two-phase reaction media only provide moderate biocatalytic efficiency (up to 90% yield for 24 h at 60 °C) [17]. The enzymatic synthesis of biodiesel performed using [Bmim][BF₄] and [Bmim][PF₆] gave similar conversions to that obtained in [Bmim][NTf₂]. However, the hydrophobic [NTf₂] anion seems to be the best choice, since [BF₄] is hydrophilic thus rendering more difficult the glycerol separation, while [PF₆] may hydrolyze and generate HF [18]. However, the better suitability of [Bmim][BF₄] for lipase-catalyzed epoxidation of methyl oleate with H₂O₂ was recently reported with respect to [Bmim][PF₆] and [Bmim][NTf₂] [20]. In the same way, water-miscible ILs based on hydrophilic anions (e.g. methylsulfate) and quaternary ammonium cations with large alkyl chains containing ether functional groups were shown to be excellent reaction media for lipase-catalyzed glycerolysis of triglycerides [21]. In fact the rule for enzyme activity in ILs is not known at the moment and seems to be “there is no rule”, since performance in a particular IL appears to vary significantly from enzyme to enzyme and reaction to reaction [22].

Recently it has been reported how hydrophobic ILs based on cations with large alkyl side-chain (e.g. 1-methyl-3-octadecylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [C₁₈mim][NTf₂]) were able to dissolve both triolein and methanol, providing one-phase reaction media that showed an excellent suitability for the biocatalytic synthesis of biodiesel, i.e. up to 96% yield in 6 h at 60 °C. The enzyme/IL system was reused for 7-times without activity loss [23–25].

The most interesting feature for biocatalytic processes in ILs is the possibility to design two-phase reaction systems that easily permit product recovery [26,27]. In this context, biocatalysis in IL/scCO₂ biphasic systems has emerged as an exceptionally interesting approach for designing continuous clean processes that directly provide pure products, because the advantages of scCO₂ for mass transport are complemented by the high catalytic efficiency of enzymes in ILs [28]. This paper shows for the first time the biocatalytic synthesis of biodiesel in IL/scCO₂ biphasic systems (see Fig. 1). Thus, the phase behaviour of IL/triolein/methanol and IL/methyl oleate mixtures, as well as its influence for lipase-catalyzed biodiesel synthesis in ILs and IL/scCO₂ reaction media has been studied. Following the statement *like-dissolves-like*, twelve different ILs based on imidazolium cations with a large alkyl side chain (from C₁₂ to C₁₈) and [BF₄], [PF₆] or [NTf₂] anions were assayed. The obtained results clearly demonstrate the suitability of IL/scCO₂ biphasic systems for the continuous enzymatic synthesis of biodiesel as a sustainable process.

2. Experimental

2.1. Materials

Immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435[®], EC 3.1.1.3) was a gift from Novozymes S.A. (Spain). Triolein (65% purity), solvents and other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich–Fluka (Madrid, Spain). The ILs (99% purity), 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₄mim][NTf₂]), 1-octyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₈mim][NTf₂]), 1-dodecyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₂mim][NTf₂]), 1-tetradecyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₄mim][NTf₂]), 1-hexadecyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₆mim][NTf₂]), 1-octadecyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₈mim][NTf₂]), 1-dodecyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C₁₂mim][PF₆]), 1-tet-

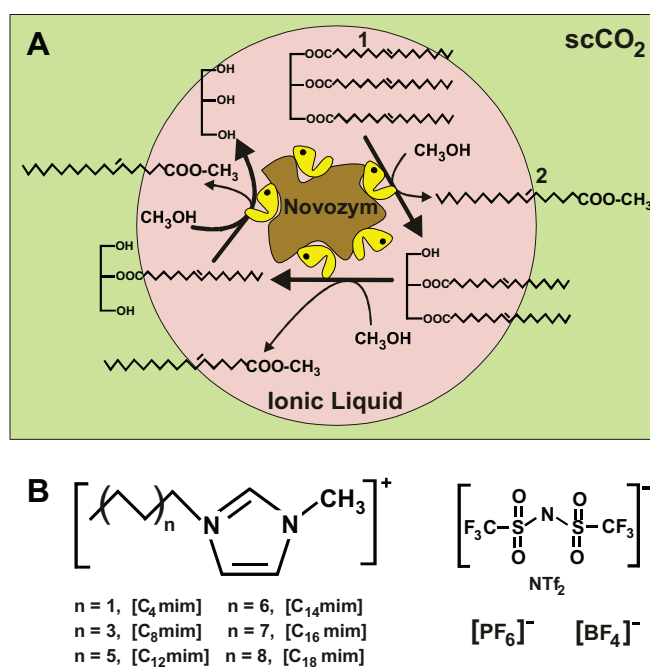


Fig. 1. A. Scheme of immobilized lipase-catalyzed synthesis of biodiesel (2, methyl oleate) by methanolysis of triolein (1) in IL/scCO₂ biphasic systems. B. Cations and anions of the assayed ILs.

radecyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C₁₄mim][PF₆]), 1-hexadecyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C₁₆mim][PF₆]), 1-octadecyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C₁₈mim][PF₆]), 1-dodecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([C₁₂mim][BF₄]), 1-tetradecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([C₁₄mim][BF₄]), 1-hexadecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([C₁₆mim][BF₄]), and 1-octadecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([C₁₈mim][BF₄]), were obtained from IoLiTec GmbH (Germany). Melting points of ILs were determined by using a Reichert Thermovar melting point apparatus equipped with a microscope, and were uncorrected.

2.2. Studies on phase behaviour of IL/substrates and IL/biodiesel mixtures

Different amounts (0.09, 0.18, 0.29, 0.44, 0.60 and 0.67 g, respectively) of IL ([C₁₂mim][NTf₂], [C₁₄mim][NTf₂], [C₁₆mim][NTf₂], [C₁₈mim][NTf₂], [C₁₂mim][PF₆], [C₁₄mim][PF₆], [C₁₆mim][PF₆], [C₁₈mim][PF₆], [C₁₂mim][BF₄], [C₁₄mim][BF₄], [C₁₆mim][BF₄] or [C₁₈mim][BF₄]) were added into six different screw-capped vials with teflon-lined septa (1.5-mL total capacity). Then, variable amounts of methanol (0.16, 0.14, 0.12, 0.09, 0.06, and 0.04 g) were respectively dissolved into the IL. Finally, the corresponding amounts of triolein were added to each tube in order to obtain the following IL/methanol/triolein ternary mixtures (w/w/w): **a**, 9.1/16.2/74.7; **b**, 18.5/14.6/66.9; **c**, 31.0/12.3/56.7; **d**, 47.6/9.4/43.0; **e**, 63.8/6.5/29.7; **f**, 73.7/4.2/22.1 (see Fig. 3 and Electronic Supplementary Information, ESI). In all cases, the triolein: methanol ratio was 1:6 (mol:mol). The resulting mixtures were incubated with shaking for 1 h at 60 °C or 85 °C, as a function of the type of anion. For the case of methyl oleate (biodiesel), the following IL/methyl oleate binary mixtures (w/w) were assayed (1 g total amount): **a**, 10/90; **b**, 20/80; **c**, 33/67; **d**, 50/50; **e**, 66/34 and **f**, 75/25 (See ESI).

2.3. Lipase-catalyzed biodiesel synthesis in ILs media

For each IL, triolein (0.36, 0.23 or 0.11 mmol) was added into three different screw-capped vials (0.9-mL total capacity),

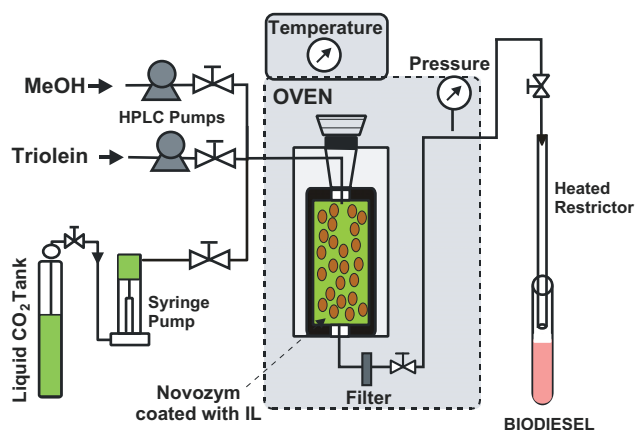


Fig. 2. Experimental set-up of the continuous packed bed reactor containing Novozym 435 coated with IL for biodiesel synthesis by methanolysis of triolein.

containing 77, 224 or 348 mg of IL, and methanol (2.18, 1.37 or 0.69 mmol), respectively. The resulting final mixtures gave the following IL/triolein/methanol ratios (w/w/w): 16.4/68.7/14.9; 47.7/43.0/9.3; 73.9/21.4/4.7, respectively. For each case, the mixture was incubated in a thermoshaker TS-100 (Baeco, Germany) at the selected temperature and at 1000 rpm for 30 min. The reaction was started by adding 10% (w/w) Novozym 435 with respect to the triolein amount, and the reaction system was incubated at 60 or 85 °C for 8 h. Then, a 20 μL aliquot was taken and added to 480 μL dodecane/isopropanol (95:5, v/v) mixture, and the resulting biphasic mixture was strongly shaken for 3 min to extract biodiesel. The resulting mixture was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min. Finally, 350 μL of dodecane/isopropanol extracts were added to 150 μL of 100 mM ethyl decanoate and 100 mM tributyrin (internal standards) solution in dodecane/isopropanol (95:5, v/v), and the final solution was analyzed by GC.

2.4. Lipase-catalyzed biodiesel synthesis in IL/scCO₂ systems

Novozym 435 (1 g) was coated with 0.5 g of IL ([C₁₄mim][NTf₂], [C₁₄mim][PF₆], [C₁₈mim][NTf₂], [C₁₈mim][PF₆] or [C₁₈mim][BF₄], respectively) as described previously in detail [29]. Novozym-IL particles were placed in the cartridge of an ISCO 220SX (Teledyne Isco, Inc, Lincoln, NE, USA) high pressure extraction apparatus. This extractor is equipped with a syringe pump (ISCO 100DX, 100 mL overall volume), and devices for pressure, temperature and flow rate control. The ISCO system was started by the continuous pumping of scCO₂ at 180 bar and 60 °C, bubbling continuously CO₂ through a calibrated heated restrictor (1 mL/min, 80 °C). Biodiesel synthesis was carried out for 4 h cycles by continuously pumping triolein (5.1 or 10.2 $\mu\text{mol}/\text{min}$ mass flow rate) and methanol (244 $\mu\text{mol}/\text{min}$ mass-flow rate) into the scCO₂ inlet flow by using two HPLC pumps (LC-10AT, Shimadzu Europe, Germany) (see Fig. 2). Substrates were transported by the scCO₂ flow through the catalytic cartridge for biotransformation, and then products were recovered by depressurizing through the calibrated heated restrictor for 30 min steps in a controlled amount of hexane/isopropanol (5:4, v/v) placed on an ice-bath. Samples were analyzed by GC. In all cases, substrate and product mass-balances from the outlet were consistent with the substrate mass-flow inlet.

2.5. GC analysis

GC analysis was performed with a Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Europe, Germany) equipped with an FID detector. Samples were analyzed on a TRB-5HT capillary column (10 m \times 0.32 mm \times

0.1 μm , Supelco), using both ethyl decanoate and tributyrin as internal standards, under the following conditions: carrier gas (He) at 28.6 kPa (40 mL/min total flow); temperature programme 100 °C, 10 °C/min, 200 °C, 15 °C/min, 370 °C, variable split ratio, (80:1 as 10:1); detector, 220 °C. See additional information for peak retention times and chromatograms.

3. Results and discussion

3.1. Phase behaviour of triolein/methanol/methyl oleate/hydrophobic IL systems

The suitability of twelve different ILs based on imidazolium cations with one large alkyl side chain (from C₁₂ to C₁₈) to dissolve both triolein and methanol substrates for biodiesel synthesis has been studied. For each IL, the phase behaviour of six different IL/triolein/methanol ternary mixtures was studied at 60 or 85 °C, because of the solid nature of most assayed ILs at room temperature (see Fig. 3 and ESI). In all cases the triolein/methanol ratio was 1/6 (mol/mol), a proportion often considered as optimum for lipase-catalyzed biodiesel synthesis [16–18]. As it can be seen,

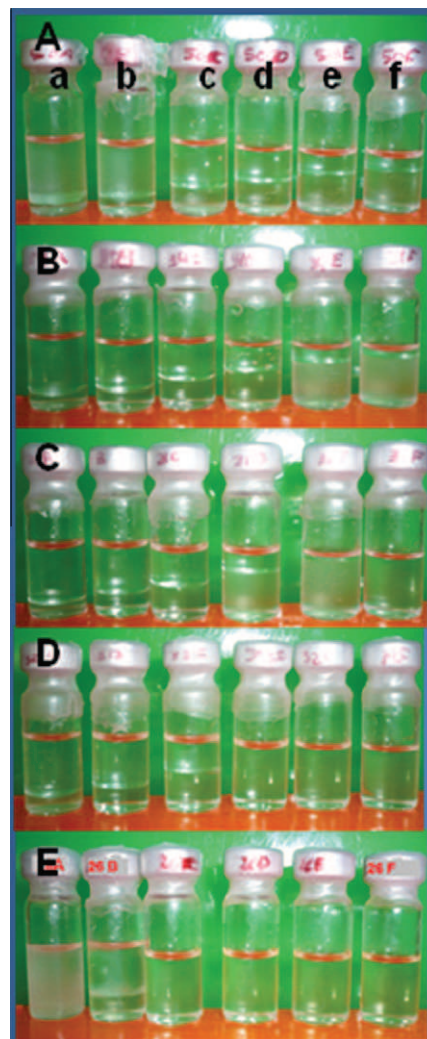


Fig. 3. Phase behaviour of [1-alkyl-3-methylimidazolium][NTf₂]/triolein/methanol mixtures at 60 °C. The following ratios were assayed: a, 9.1/16.2/74.7, b, 18.5/14.6/66.9; c, 31.0/12.3/56.7; d, 47.6/9.4/43.0; e, 63.8/6.5/29.7; f, 73.7/4.2/22.1 (w/w/w), respectively. For all cases, the [triolein]:[methanol] ratio was 1:6 (mol:mol). The following ILs are shown: A, [C₈mim][NTf₂]; B, [C₁₂mim][NTf₂]; C, [C₁₄mim][NTf₂]; D, [C₁₆mim][NTf₂]; E, [C₁₈mim][NTf₂].

the ability of these ILs to solubilise the triolein–methanol mixture was clearly dependent on both the nature of ions and the IL content. Thus, ILs based on the [NTf₂] anion showed the best ability to dissolve triolein, being improved by increasing both the length of the alkyl side chain of the cation and the IL concentration. For example, both [C₁₆mim][NTf₂] and [C₁₈mim][NTf₂] provided monophasic systems for assayed concentration higher than 40% (w/w) (cases D and E, tubes d–f), while for the case of [C₁₄mim][NTf₂], the full solubilisation of triolein only occurred when the IL concentration was higher than 70% (w/w) (case C, tube f). By using ILs having an alkyl chain in the cation shorter than C₁₄, the full solubilisation of triolein was never observed. Similarly, the solubilisation of triolein/methanol mixtures in ILs based on [PF₆] or [BF₄] anion did not provide one-phase systems in any of the assayed conditions, independently of the length of the alkyl side chain of cations, or even if the temperature was increased up to 85 °C, a temperature higher than any melting point of the assayed ILs (see Table 1 and ESI). At this point, it is quite surprising how for [C₁₆mim][PF₆], [C₁₈mim][PF₆], [C₁₄mim][BF₄], [C₁₆mim][BF₄] and [C₁₈mim][BF₄] cases, the assayed mixtures with high IL content did not show a fully liquid system at 85 °C, because of a remaining solid fraction of IL (see ESI). In fact, for the [C₁₈mim][PF₆] case, it was necessary to heat up to 90 °C to reach a fully liquid media, while for all [C₁₈mim][BF₄] cases, the IL was maintained as solid even at

100 °C (results not included). For these resulting solid–liquid–liquid systems at 85 °C, the bottom phase was essentially formed by solid IL and IL–methanol solution, while the upper phase mainly contained triolein.

A similar study of miscibility between these hydrophobic ILs and both glycerol and methyl oleate was carried out. The glycerol by-product was always non-miscible with all the assayed hydrophobic ILs, probably because of its high polar and hydrophilic characters. The phase behaviour of IL/methyl oleate binary systems was also studied under the same conditions as for the IL/triolein/methanol mixtures described in Fig. 3 (see ESI). As can be seen, the ILs based on [NTf₂] anion (from [C₈mim] to [C₁₈mim]) were fully miscible with methyl oleate under all the assayed conditions, providing monophasic homogeneous systems at 60 °C. In the same way, most ILs based on [PF₆] were also able to dissolve methyl oleate, but increasing temperature up to 85 °C, because of the high melting point of these ILs. In this case, it is necessary to point out that [C₁₈mim][PF₆] was able to fully dissolve methyl oleate for all assayed mixtures at 85 °C, even though some solid IL was still present at this temperature. However, for ILs based on [BF₄] anion, a monophasic system was only obtained for the most hydrophobic cation ([C₁₈mim]) at low IL content. Furthermore, the increase in the [C₁₈mim][BF₄] content prevents reaching the full liquid state in spite of the assayed temperature (85 °C), which was higher than

Table 1
Phase behaviour of different IL/triolein or IL/methyl oleate mixtures as a function of the nature and concentration the IL, as well as the biodiesel yield produced by 10% (w/w) Novozym 435 in each reaction medium after 8 h at 85 °C.

Ionic liquid	Melting point (°C)	IL (% w/w)	IL/S phases ^a	IL/P phases ^b	Biodiesel yield (%)
[C ₁₂ mim][NTf ₂]	17	16.4	L–L	L	5
		47.7	L–L	L	42
		73.9	L–L	L	75
[C ₁₄ mim][NTf ₂]	33	16.4	L–L	L	6
		47.7	L–L	L	42
		73.9	L	L	72
[C ₁₆ mim][NTf ₂]	46	16.4	L–L	L	6
		47.7	L	L	42
		73.9	L	L	77
[C ₁₈ mim][NTf ₂]	53	16.4	L	L	7
		47.7	L	L	43
		73.9	L	L	79
[C ₁₂ mim][PF ₆]	58	16.4	L–L	L	6
		47.7	L–L	L	32
		73.9	L–L	L	41
[C ₁₄ mim][PF ₆]	67	16.4	L–L	L	8
		47.7	L–L	L	33
		73.9	L–L	L	36
[C ₁₆ mim][PF ₆]	74	16.4	L–L	L	9
		47.7	S–L–L	L	36
		73.9	S–L–L	S–L	n.d.
[C ₁₈ mim][PF ₆]	82	16.4	L–L	S–L	9
		47.7	S–L–L	S–L	37
		73.9	S–L–L	S–L	n.d.
[C ₁₂ mim][BF ₄]	30	16.4	L–L	L–L	6
		47.7	L–L	L–L	6
		73.9	L–L	L–L	26
[C ₁₄ mim][BF ₄]	36	16.4	L–L	L–L	7
		47.7	L–L	L–L	12
		73.9	S–L–L	S–L	18
[C ₁₆ mim][BF ₄]	49	16.4	L–L	L–L	4
		47.7	S–L–L	L–L	5
		73.9	S–L–L	S–L	n.d.
[C ₁₈ mim][BF ₄]	60	16.4	L–L	L	5
		47.7	S–L–L	L	5
		73.9	S–L–L	S–L	n.d.

[C₁₂mim]: 1-dodecyl-3-methylimidazolium; [C₁₄mim]: 1-tetradecyl-3-methylimidazolium; [C₁₆mim]: 1-hexadecyl-3-methylimidazolium; [C₁₈mim]: 1-octadecyl-3-methylimidazolium; [PF₆]: hexafluorophosphate; [BF₄]: tetrafluoroborate; [NTf₂]: bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide.

L: monophasic liquid medium; L–L: liquid–liquid biphasic medium; S–L: solid–liquid biphasic medium; S–L–L: solid–liquid–liquid triphasic medium. n.d.: not detected.

^a IL/S phase: phases for IL/triolein/methanol mixtures.

^b IL/P phase: phases for IL/methyl oleate mixtures.

the melting point of this IL (60 °C). Similarly to the case of $[C_{18}mim][PF_6]$, it seems that a fraction of the melted $[C_{18}mim][BF_4]$ dissolves in the methyl oleate, while the remaining IL fraction staid in solid state. These results clearly show how both the triolein and the methanol substrates for biodiesel synthesis can be homogeneously distributed as a monophasic system, or heterogeneously, as a liquid–liquid or solid–liquid–liquid, multiphase systems, as a function of both the nature of anion and the IL concentration. The resulting phase behaviour in substrates/IL and products/IL mixtures should clearly be involved in the performance of the biocatalytic synthesis of biodiesel. In this context, as triolein is an hydrophobic compound which contains three C_{18} alkyl chains, these results suggest that the ability of any IL to dissolve triolein may be related to the increase in hydrophobicity of anion ($[NTf_2] > [PF_6] > [BF_4]$), as well as by the increase in length of the alkyl chain in the cation, according to the statement *like-dissolves-like*. Thus, the suitability for lipase-catalyzed biodiesel synthesis in these systems should be assayed [23–25].

3.2. Lipase-catalyzed biodiesel synthesis in hydrophobic ILs

Fig. 4A depicts time courses of Novozym 435-catalyzed biodiesel synthesis in four different [1-alkyl-3-methylimidazolium][NTf₂] ILs at 47.7% (w/w) IL concentration and 60 °C. As can be seen, the biodiesel yield continuously increased with reaction time for all the assayed ILs, which pointed out its suitability as reaction media for the enzyme catalysis. However, the catalytic efficiency of the reaction system proportionally increased with the length of the alkyl chain of the cation (*i.e.* $[C_{18}mim] > [C_{12}mim] > [C_8mim] > [C_4mim]$), the best results (up to 95% biodiesel yield in 8 h) being obtained for the $[C_{18}mim][NTf_2]$ case. These results could clearly be related with

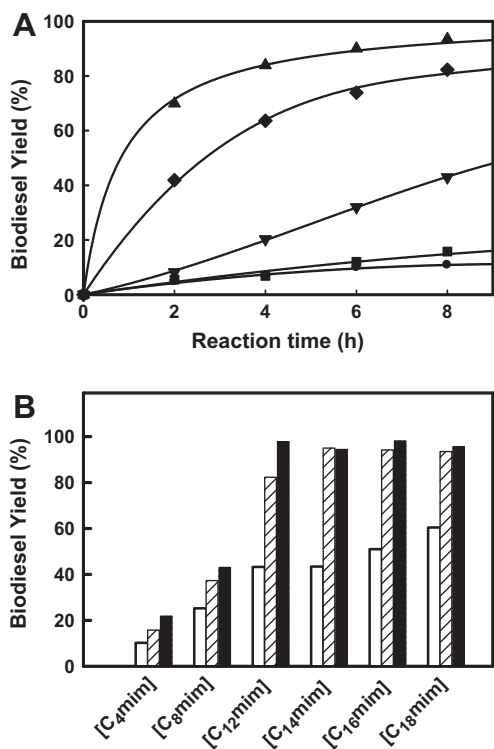


Fig. 4. A. Time courses for the methanolysis of triolein catalyzed by Novozym 435 in (▲) $[C_{18}mim][NTf_2]$, (◆) $[C_{12}mim][NTf_2]$, (▼) $[C_8mim][NTf_2]$, (■) $[C_4mim][NTf_2]$ and (●) free solvent reaction media at 60 °C. B. Effect of the nature and concentration of [1-alkyl-3-methylimidazolium][NTf₂] ILs on the biodiesel yield synthesized by Novozym 435 at 60 °C. The following IL concentration were used: 16.6 (white), 46.7 (dashed) and 73.7 w/w (black), respectively.

the miscibility of both triolein and methanol substrates with the assayed ILs (see Fig. 3). Thus, reaction mixtures shifted from a fully clear monophasic medium (for the $[C_{18}mim][NTf_2]$ case), towards different two phase reaction systems, where the size of triolein layer increased with decreasing the length of the alkyl chain of cation. Furthermore, as the overall IL concentration has been shown as key parameter to achieve the full solubilisation of the reaction mixture (see Fig. 3), its influence on the catalytic efficiency of Novozym 435 for biodiesel synthesis was also studied. Fig. 4B shows the resulting biodiesel yield after 8 h of reaction for six different [1-alkyl-3-methylimidazolium][NTf₂] ILs, as a function of the length of the alkyl chain of the cation, and for three different IL concentrations, *i.e.* 16.4, 46.7 and 73.7% w/w, respectively. The increase in the IL concentration resulted in the enhancement in biodiesel yield, which improved by increasing the length of the alkyl side chain of cation. As both $[C_4mim][NTf_2]$ and $[C_8mim][NTf_2]$ ILs were unable to dissolve triolein, the enzyme showed moderate activity for biodiesel synthesis (up to 44% yield in 8 h) in all the resulting biphasic systems. However, the enzyme was able to reach full triolein conversion in biodiesel at different $[C_{14}mim][NTf_2]$, $[C_{16}mim][NTf_2]$ and $[C_{18}mim][NTf_2]$ contents. The higher IL content should clearly be related with the better organisation of these nano-structured reaction media, which allowed hydrophobic molecules (*i.e.* triolein) to reside in less polar regions, and polar species (*i.e.* methanol) to undergo faster diffusion in the more polar regions [30]. Thus, it also was reported how this extremely ordered supramolecular structure of ILs in liquid phase might also be able to act as a “mould”, stabilizing the active 3-D structure of the enzyme in these non-aqueous nano-environments [28,31]. The decrease in the IL content could also be related with an enhancement of the direct interaction between denaturing methanol molecules with the enzyme. In the same context, the decrease in the hydrophobicity of the IL might involve a loss in the molecular organisation of these reaction media containing hydrophobic substrates with large alkyl chains (*e.g.* triolein), that results in decreased mass-transport efficiency towards the enzyme microenvironment and so, in the catalytic efficiency for biodiesel synthesis.

The influence of the nature of anions (*i.e.* $[NTf_2]$, $[PF_6]$ and $[BF_4]$) of these hydrophobic ILs on the ability of the enzyme to catalyze biodiesel synthesis was also studied. To compare results, the temperature was increased up to 85 °C to improve the melting/solubilisation of most of the assayed ILs, thus testing the biocatalytic reaction in liquid media (see ESI). Table 1 shows the phase behaviour of the resulting IL/triolein/methanol (*IL/S phase*) and IL/methyl oleate (*IL/P phase*) mixtures at three different IL content (*i.e.* 16.4, 47.7 and 73.9 w/w, respectively), as well as the biodiesel yield produced by the enzyme for each reaction system. As can be seen, biodiesel yields in ILs based on $[PF_6]$ and $[BF_4]$ were clearly lower than those obtained for $[NTf_2]$ ILs, thus demonstrating the key role of the hydrophobicity of the anion ($[NTf_2] > [PF_6] > [BF_4]$) of these ILs to carry out this enzymatic reaction in liquid media. These results again could be related with the phase behaviour of these reaction systems, where heterogeneous multiphase systems were shown in most cases. Thus, while the enzyme showed a low level activity in ILs based on $[PF_6]$ (<40% biodiesel yield in 8 h), it was practically inactive for ILs based on $[BF_4]$, including the highest IL concentrations. Once again, ILs based on the most hydrophobic anion (*i.e.* $[NTf_2]$) provided the best results for the enzymatic synthesis of biodiesel by increasing either the size of the alkyl chain of cation or the IL concentration at 85 °C. In this way, the excellent protective effect of ILs based on $[NTf_2]$ on enzyme activity against denaturing agents (*e.g.* temperature, methanol, etc.) has been reported [18,31,32], and should be considered as an added value of ILs for enzymatic biodiesel synthesis. The observed improvements for lipase-catalyzed synthesis of biodiesel in ILs reaction media by the increase in the alkyl chain length of the cation (*e.g.* $[Emim]$,

[Bmim], [Hmim] and [Omim]) have been also reported by other authors, the best result (up to 80% biodiesel yield in 20 h) being obtained for the [Omim][NTf₂] case [17].

3.3. Continuous enzymatic reactor for biodiesel synthesis in hydrophobic ILs/scCO₂ biphasic systems

Biphasic catalytic systems based on a combination of ILs and scCO₂ with enzymes may represent the most important “arsenal” of green tools for developing integrally clean chemical processes of industrial interest in the near future [28,29]. In this context, a biocatalytic packed bed reactor, containing immobilized lipase particles coated with ILs, was developed to carry out the continuous synthesis of biodiesel in scCO₂ phase (see Fig. 2). The system operated as a biphasic reactor, the substrates being transported by the scCO₂ phase to the biocatalyst microenvironment across the IL layer, and the products returning to the supercritical phase (see Fig. 1), in order to produce directly pure biodiesel. Five different ILs, *i.e.* [C₁₈mim][NTf₂], [C₁₈mim][PF₆], [C₁₈mim][BF₄], [C₁₄mim][NTf₂], [C₁₄mim][PF₆], were assayed, and each Novozym-IL system was continuously tested for 8 h cycles (see Fig. 5). It was reported how the solubility of triolein in scCO₂ is enhanced by increasing pressure (150–350 bar), temperature (40–80 °C) as the scCO₂ density increases, and by the presence of a low amount of methanol (up to 5% v/v) as cosolvent [33]. As a function of these data, the operational conditions (*i.e.* scCO₂ at 60 °C and 180 bar, 5.1 and 10.2 μmol triolein min⁻¹ and 244.4 μmol methanol min⁻¹) were selected to provide the full solubilisation of substrates at the reactor inlet. As can be seen in Fig. 5, the proposed reactor was suitable for the continuous synthesis of biodiesel, resulting in a full conversion of substrate in four Novozym-IL systems (*i.e.* [C₁₈mim][NTf₂], [C₁₈mim][PF₆], [C₁₄mim][NTf₂] and [C₁₄mim][PF₆]) during the first five operation cycles, where the triolein inlet flow was 5.1 μmol min⁻¹. The coating of the enzyme with [C₁₈mim][BF₄] provided the worst results, the biodiesel yield being reduced up to 31% after three operational cycles, probably because of the hydrophilic character of [BF₄] anion, which provided a poor ability of this IL to dissolve both triolein and methyl oleate (see ESI), and so, to transport triolein from the scCO₂ phase to the active site of the enzyme. The use of the immobilized enzyme without coating with IL showed a full triolein transformation to methyl oleate during the first three operational

cycles, then being continuously reduced. This decrease in the enzymatic activity could be attributed to the reported denaturing effect of scCO₂ on enzymes [28], and/or by the low efficiency of the hydrophobic scCO₂ phase to transport the hydrophilic by-product glycerol [34], which could be retained around the enzyme microenvironment leading to the continuous biocatalyst poisoning by the prevention of the entry of new triolein substrate molecules [3]. However, the increase by two-fold of triolein inlet flow (from 5.1 to 10.2 μmol min⁻¹) led to a fall in the biodiesel yield for all cases. The best results were obtained for the Novozym-[C₁₈mim][PF₆] system, where a high biodiesel yield (82%) was obtained after 12 cycles of continuous operation. These results could be explained as a function of the phase behaviour of IL/triolein/methanol and IL/methyl oleate mixtures, as well as, by its influence on the enzyme activity. In this context, the excellent ability of [C₁₈mim][NTf₂] to dissolve triolein could clearly be in the reason for the highest biodiesel yield obtained during the first six cycles in scCO₂ conditions. However, the full miscibility of this IL with both the triolein substrate and the methyl oleate product (see Fig. 3 and ESI) could also be involved in the continuous activity decay observed at long operation cycles. Thus, an excess in the triolein inlet flow or the continuous release of biodiesel product from the enzyme particle to the scCO₂ flow may dissolve the protective IL shell, enhancing the continuous enzyme deactivation. In fact, peaks corresponding to this IL were observed in GC analysis of the outlet product (see ESI). However, product samples obtained from the Novozym-[C₁₈mim][PF₆] outlet flow did not show peaks corresponding to the release of this IL, which could be related with the improved operational stability showed by the immobilized enzyme coated with this IL. The poor miscibility of [C₁₈mim][PF₆] with triolein or methyl oleate with respect to [C₁₈mim][NTf₂], together the high melting point of this IL (82 °C) could be involved in the preservation of the IL shell around the enzyme particles under continuous scCO₂ flow at 180 bar and 60 °C. Additionally, it was reported that ILs exhibits a melting point depression (even exceeding ΔT_m of 100 °C) in scCO₂ [35], and this fact could be a further indication towards the better stabilization of the enzyme by the [C₁₈mim][PF₆] shell in liquid state, thus protecting the lipase from methanol and scCO₂ induced deactivation. The ability of scCO₂ to extract hydrophobic compounds (*e.g.* olefins) from ILs has been widely described, where the partitioning behaviour of organic compounds between both IL and scCO₂ phases is clearly dependent on the nature of the IL and the supercritical conditions. The use of scCO₂ (35 °C, 85 bar) to discontinuously extract butyl oleate from the IL methyltrioctylammonium trifluoroacetate has been reported as a later step of the enzymatic butanolysis of triolein. The best results for this enzymatic reaction (90% butyl oleate yield) were obtained at 80% IL content, but data about the efficiency for the butyl oleate extraction with scCO₂ were not provided [36].

4. Conclusions

The suitability of enzymes to continuously catalyzed biodiesel synthesis under green non-aqueous reaction media, such as IL and scCO₂, has been demonstrated. The unique properties of long chain ILs, providing a microenvironment for enzyme-catalyzed reactions, led to a clear improvement in the efficiency for biotransformation of vegetable oil to biodiesel. Additionally, the IL anion also plays an important role on this efficiency, which is improved by the increase in its hydrophobicity (*i.e.* [NTf₂] > [PF₆] > [BF₄]). Accordingly, the enzymatic synthesis of biodiesel in IL/scCO₂ biphasic systems under continuous operation can easily be achieved because of the suitability of the supercritical phase to efficiently transport the biodiesel product. However, further studies towards

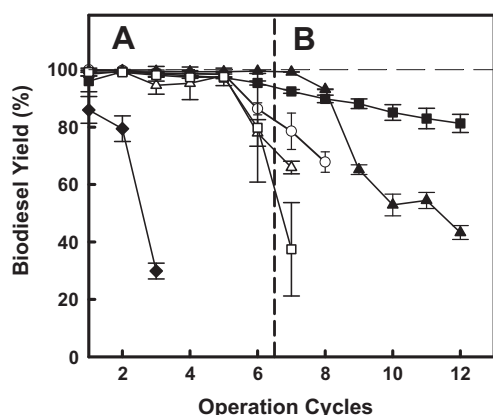


Fig. 5. Operational stability for continuous biodiesel synthesis catalyzed by Novozym 435 coated with IL ([C₁₈mim][NTf₂] (▲), [C₁₈mim][PF₆] (■), [C₁₈mim][BF₄] (◆), [C₁₄mim][NTf₂] (△), [C₁₄mim][PF₆] (□) and none (○), respectively) in scCO₂ at 60 °C and 180 bar, and at 5.1 μmol triolein min⁻¹ and 244.4 μmol methanol min⁻¹ (A), or 10.2 μmol triolein min⁻¹ and 244.4 μmol methanol min⁻¹ (B) mass-flow rates, respectively. Each point corresponds to the middle value of all samples obtained during each 4 h cycle.

designing to provide a permanent coating of enzyme with hydrophobic ILs (e.g. by using covalently supported ionic liquid phases, (SILPs) [37]) should improve the operational performance of these biocatalytic systems in continuous processes for biodiesel synthesis in scCO_2 . This approach may bring to the biofuel industry a clear strategy for developing continuous integral sustainable processes for biodiesel synthesis.

Acknowledgements

This work was partially supported by CICYT (CTQ2008-00877) and SENECA Foundation (08616/PI/08) Grants. We thank Ramiro Martinez (Novozymes España. S.A.) for the gift of Novozym 435®.

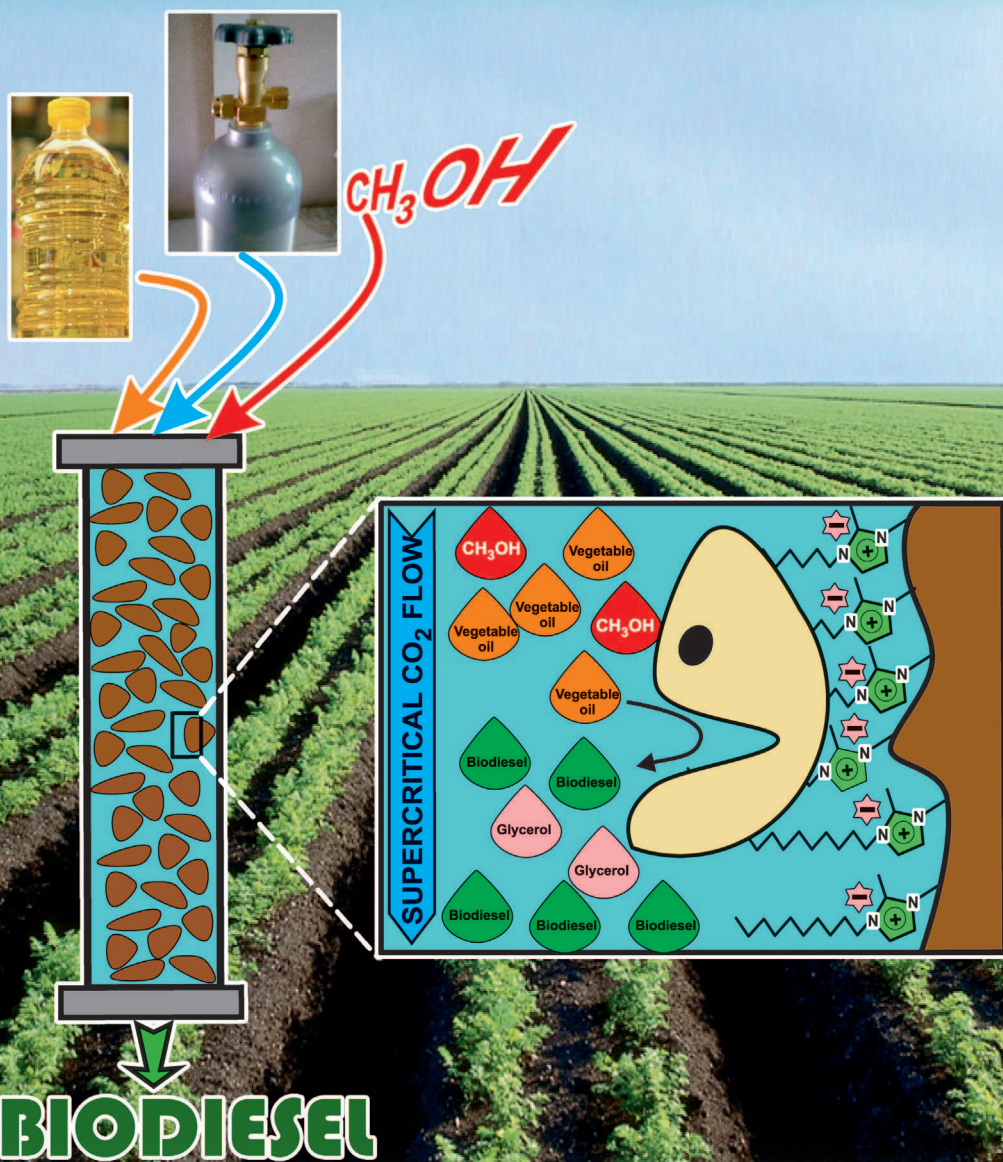
Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.fuel.2011.06.008.

References

- [1] Atadashi IM, Aroua MK, Aziz AA. *Renew Energy* 2011;36:437–43.
- [2] Vyas AP, Verma JL, Subrahmanyam N. *Fuel* 2010;89:1–9.
- [3] Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R. *J Mol Catal B Enzym* 2010;62:9–14.
- [4] Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. *J Mol Catal B Enzym* 2010;64:1–22.
- [5] Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F. *Biotechnol Adv* 2010;28:628–34.
- [6] Dupont J, Suarez PAZ, Meneghetti MR. *Energy Environ Sci* 2009;2:1258–65.
- [7] Shimada Y, Watanabe Y, Samukawa T, Sugihara A, Noda H, Fukuda H, et al. *J Am Oil Chem Soc* 1999;76:789–93.
- [8] Lu J, Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. *Process Biochem* 2007;42:1367–70.
- [9] Luo Y, Wang G, Ma YS, Wei DZ. *J Chem Technol Biotechnol* 2006;81:1846–8.
- [10] Du W, Xu Y, Liu D, Zeng J. *J Mol Catal B Enzym* 2004;30:125–9.
- [11] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, Locatelli S. *Bioresource Technol* 2007;98:648–53.
- [12] Liu Y, Yan YJ, Hu F, Yao AN, Wang ZC, Wei FX. *AIChE J* 2010;56:1659–65.
- [13] Oliveira C, Rosa MF. *J Am Oil Chem Soc* 2006;83:21–5.
- [14] Varma MN, Madras G. *Ind Eng Chem Res* 2007;46:1–6.
- [15] Varma MN, Deshpande PA, Madras G. *Fuel* 2010;89:1641–6.
- [16] Shunitha S, Kanjilal S, Reddy PS, Prasad RBN. *Biotechnol Lett* 2007;29:1881–5.
- [17] Ha SH, Lan MN, Lee SH, Hwang SM, Koo YM. *Enzyme Microb Technol* 2007;41:480–3.
- [18] Gamba M, Lapis AAM, Dupont J. *Adv Synth Catal* 2008;350:160–4.
- [19] Arai S, Nakashima K, Tanino T, Ogino C, Kondo A, Fukuda H. *Enzyme Microb Technol* 2010;46:51–5.
- [20] Silva WSD, Llapis AAM, Suarez PAZ, Neto BAD. *J Mol Catal B Enzym* 2011;68:98–103.
- [21] Chen B, Guo Z, Tan T, Xu X. *Biotechnol Bioeng* 2008;99:18–29.
- [22] van Rantwijk F, Sheldon RA. *Chem Rev* 2007;107:2757–85.
- [23] Lozano P, de Diego T, Iborra JL, Vaultier M. Patent PTC/WO 2010/057996 A6; 2010.
- [24] Lozano P, Bernal JM, Piamtongkam R, Fetzter D, Vaultier M. *ChemSusChem* 2010;3:1359–63.
- [25] de Diego T, Manjón A, Lozano P, Vaultier M, Iborra JL. *Green Chem* 2011;13:444–51.
- [26] Abe Y, Kude K, Hayase S, Kawatsura M, Tsunashima K, Itoh T. *J Mol Catal B Enzym* 2008;51:81–5.
- [27] Ha SH, Lan MN, Koo YM. *Enzyme Microb Technol* 2010;47:6–10.
- [28] Lozano P. *Green Chem* 2010;12:555–69.
- [29] Lozano P, De Diego T, Mira C, Montague K, Vaultier M, Iborra JL. *Green Chem* 2009;11:538–42.
- [30] Dupont J. *J Braz Chem Soc* 2004;15:341–50.
- [31] de Diego T, Lozano P, Gmouh S, Vaultier M, Iborra JL. *Biomacromolecules* 2005;6:1457–64.
- [32] Micaelo NM, Soares CM. *J Phys Chem B* 2008;112:2566–72.
- [33] de Lucas A, Gracia I, Rincon J, Garcia MT. *Ind Eng Chem Res* 2007;46:5061–6.
- [34] Sovova H, Jez J, Khachatryan M. *Fluid Phase Equilib* 1997;137:185–91.
- [35] Roth M. *J Chromatogr A* 2009;1216:1861–80.
- [36] Miyawaki O, Tatsumo M. *J Biosci Bioeng* 2008;105:61–4.
- [37] Lozano P, Garcia-Verdugo E, Piamtongkam R, Karbass N, de Diego T, Burguete MI, et al. *Adv Synth Catal* 2007;349:1077–84.

ANEXO IV



www.chemsuschem.org

4/2012

A Journal of



ChemPubSoc
Europe

Supported by
ACES

WILEY-VCH

The inside cover picture shows a continuous reactor, containing immobilized lipase onto a polymeric matrix with covalently attached ionic liquid phase (SILLPs), to synthesize biodiesel in supercritical CO₂ from vegetable oil and methanol. In their paper on page 790, Lozano and co-workers describe the preparation and extraordinary performance of different nanostructured supports applied to immobilize *Candida antarctica* lipase B (CALB). The suitability of these immobilized lipase derivatives to carry out the synthesis of biodiesel by methanolysis of triolein in supercritical CO₂ was excellent, leading up to 95% biodiesel yields with high operational stability.

Immobilised Lipase on Structured Supports Containing Covalently Attached Ionic Liquids for the Continuous Synthesis of Biodiesel in scCO₂

Pedro Lozano,^{*[a]} Eduardo García-Verdugo,^[b] Juana M. Bernal,^[a] Diana F. Izquierdo,^[b] M. Isabel Burguete,^[b] Gregorio Sánchez-Gómez,^[c] and Santiago V. Luis^{*[b]}

Different nanostructured supports, based on 1-decyl-2-methylimidazolium cations covalently attached to a polystyrene divinylbenzene porous matrix, were used as carriers to immobilise *Candida antarctica* lipase B. The suitability of these immobilised lipase derivatives for the synthesis of biodiesel (methyl oleate) by the methanolysis of triolein has been tested in both *tert*-butanol and supercritical (sc)CO₂ (18 MPa, 45 °C) as reaction media. The use of modified supports with low ionic-liquid loading covalently attached to the main polymeric backbone

chains provide structured materials that led to the best biodiesel yields (up to 95%) and operational stability (85% biodiesel yield after 45 cycles of 8–4 h) in scCO₂ (45 °C, 18 MPa). The presence of *tert*-butanol as an inert cosolvent in the scCO₂ phase at the same concentration as triolein was key to avoid poisoning the biocatalyst through the blockage of its active sites by the polar byproduct (glycerol) produced in the biodiesel synthesis.

Introduction

Due to the depletion of the world's petroleum reserves and increasing environmental concerns, there is a high demand for alternative sources of petroleum-based fuel, including diesel and gasoline fuels. Biodiesel, a clean renewable fuel, has recently been considered as the best candidate for a diesel substitute as it can be used in any compression ignition engine without the need for modification.^[1] Biodiesel is composed of fatty acid methyl esters (FAMES) and is obtained by the transesterification of vegetable oils or animal fats with an alcohol, usually methanol. The synthesis of FAMES can be catalysed by basic or acidic catalysts in either a homogeneous or heterogeneous phase. The conventional industrial process favours homogeneous basic catalysts such as alkaline hydroxides (e.g., NaOH, KOH and NaOCH₃) due to higher reaction rates and the requirement of lower reaction temperatures (25–70 °C) and pressures (atmospheric). However, the base-catalysed reaction generates a certain amount of water, which leads to the hydrolysis of esters and subsequently causes saponification reactions. The formation of soap decreases the yield of FAMES and leads to difficulties in the downstream separation process and, thus, increases the operational cost.^[2] Additionally, glycerol recovery and the removal of inorganic salts remain important issues because of the production of large amounts of waste water.^[3]

Many of the drawbacks associated with chemical catalysts can be overcome by using lipases for enzymatic transesterification. Biocatalysts (i.e., lipases) allow the synthesis of specific alkyl esters, the easy recovery of glycerol and the transesterification of fat substrates with high free-fatty-acid content. However, one of the common limitations with the use of enzyme-based processes is the high cost of the enzyme, and it is necessary to develop reusable biocatalyst derivatives with high

operational stability to be applied in continuous processes. In addition, the two-phase reaction systems generated by the immiscibility of triacylglycerides (e.g., triolein) and alcohols (e.g., methanol) generally lead to a decrease in the catalytic efficiency of the enzyme because of the fast deactivation that results from direct contact with methanol and the low efficiency of substrate transport towards the enzyme microenvironment. All these facts result in a decrease of both, the turnover frequency and the number of recycling operations of biocatalysts.^[4]

Medium-engineering approaches to achieve monophasic reaction media have provided the best results. Thus, *tert*-butanol has been reported as a good organic cosolvent to achieve the full solubilisation of methanol in vegetable oil, which results in a good biocatalytic efficiency (up to 97% biodiesel yield after 24 h at 50 °C) because direct interaction between the enzyme and pure methanol is avoided.^[5] Supercritical (sc)CO₂ could be a good choice as a green solvent for the enzymatic synthesis of biodiesel, but moderate yields and low operational stability of the enzyme have generally been reported.^[6] However, it has recently been described that the enzymatic biodiesel yield can

[a] Prof. P. Lozano, J. M. Bernal
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular "B" e Inmunología
Facultad de Química, Universidad de Murcia
Campus de Espinardo, E-30100, Murcia (Spain)
Fax: (+34) 868884148
E-mail: plozanor@um.es

[b] Prof. E. García-Verdugo, D. F. Izquierdo, Prof. M. I. Burguete, Prof. S. V. Luis
Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Universidad Jaime I
Campus del Riu Sec, E-12071, Castellón (Spain)
E-mail: luiss@qio.uji.es

[c] Prof. G. Sánchez-Gómez
Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química
Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, E-30100, Murcia (Spain)

be improved (up to 99%) by the appropriate selection of supercritical conditions in continuous operation^[7a] and by the stepwise addition of methanol to prevent deactivation in discontinuous operation.^[7b]

The biocatalytic synthesis of biodiesel in ionic liquids (ILs) was also reported.^[8] When the assayed ILs were based on the short-chain 1,3-dialkylimidazolium cation (e.g., [Bmim][PF₆] and [Bmim][NTf₂]; Bmim = 1-butyl-3-methylimidazolium, NTf₂ = bis(trifluoromethylsulfonyl)imide), the resulting two-phase reaction media provided a moderate biocatalytic efficiency (up to 90% biodiesel yield for 24 h at 60 °C).^[8b] Similar phenomena were observed for the IL-supported acid/base-catalysed production of biodiesel.^[9] However, ILs based on hydrophobic anions and cations with large alkyl side-chains (e.g., 1-methyl-3-octadecylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [C₁₈mim][NTf₂]) were able to dissolve both triolein and methanol to provide single-phase reaction media, which showed an excellent suitability for the biocatalytic synthesis of biodiesel, that is, up to 96% yield in 6 h at 60 °C.^[10]

Biocatalysis in IL/scCO₂ biphasic systems has emerged as an exceptionally interesting approach to design continuous clean processes that directly provide pure products because the advantages of scCO₂ for mass transport are complemented by the high catalytic efficiency of enzymes in ILs, which results in an efficient tool to develop green processes.^[11] In the case of biodiesel synthesis, it has been reported that coating immobilised lipase (Novozym 435) particles with [C₁₈mim][NTf₂] results in an efficient biocatalytic system for continuous biodiesel synthesis in scCO₂ (95% yield at 18 MPa and 60 °C). However, the continuous release of the biodiesel product from the enzyme particle to the scCO₂ flow dissolves the protective IL shell, which results in the continuous decrease of the enzyme activity.^[12] These results underline the necessity to develop approaches for the permanent protection of the enzyme by ILs under scCO₂ continuous operation for biodiesel synthesis. Furthermore, as some ILs have been described as being not fully green solvents because of their low biodegradability and high (eco)toxicological properties, the design of reaction systems based on reduced amounts of ILs are encouraged.^[13]

Therefore, there is a need to immobilise ILs on solid materials while keeping their specific properties.^[14] The development of solid supports with the IL phase covalently attached is a step towards reducing the amount of ILs used in catalytic processes in scCO₂.^[15] By this approach, IL properties are transferred to the solid phase, which leads either to particles or monolithic supported IL-like phases (SILLPs).^[16] These kinds of materials, which have tuneable properties, can be prepared on demand and have been shown to efficiently immobilise different catalysts. Indeed, the microenvironment provided by these "solid IL phases" can be modified by the modulation of the design vectors of the SILLPs. This allows, for instance, the fine tuning of the catalytic properties and the synthesis of immobilised metallic nanoparticles with controlled size distribution.^[17] Bioreactors based on *Candida antarctica* lipase B (CALB) adsorbed onto SILLPs have been successfully applied as macro-porous monolithic miniflow systems for the continuous synthesis of citronellyl propionate in scCO₂,^[18a] as well as the kinetic

resolution (KR) and the dynamic kinetic resolution (DKR) of *rac*-1-phenylethanol,^[18b] showing in both cases an excellent enzymatic activity and operational stability.

In this context, we show here for the first time a continuous bioreactor for the synthesis of biodiesel in scCO₂ by using immobilised CALB on different nanostructured SILLPs as enzyme carriers. The SILLPs are based on covalently attached 1-decyl-2-methylimidazolium moieties grafted onto a polystyrene divinylbenzene (PS-DVB) polymeric matrix (Figure 1). The suitability of the different CALB-SILLP immobilised derivatives for the catalytic methanolysis of triolein has been studied. The best immobilised derivatives were assayed for the continuous synthesis of methyl oleate in scCO₂, which demonstrated the suitability of the proposed green continuous bioreactor for the continuous synthesis of biodiesel.

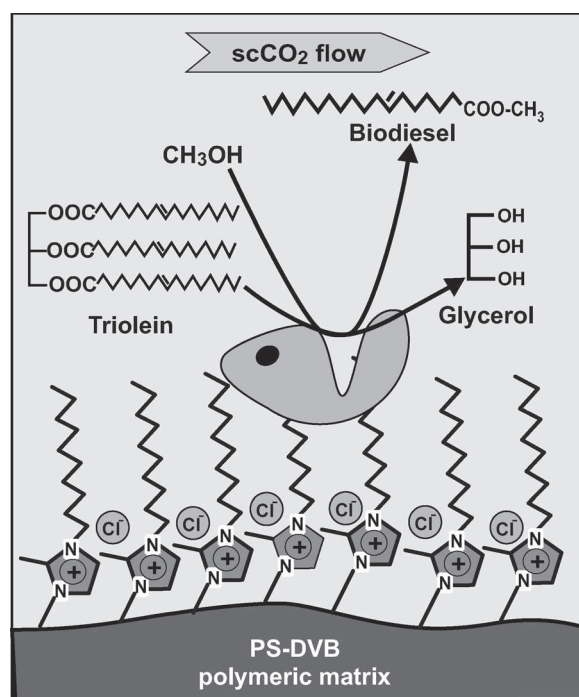


Figure 1. Representation of a lipase immobilised on covalently supported IL-like phases (SILLPs), which catalyze the synthesis of biodiesel (methyl oleate) by methanolysis of triolein in scCO₂.

Results and Discussion

Synthesis and characterisation of SILLPs

As SILLPs are tailormade carriers, an appropriate design at the macro- and microstructural level may provide both an efficient solid support for the immobilisation and stabilisation of the biocatalyst (CALB)^[18] and the required microenvironment for biodiesel synthesis. This can be accomplished as a function of the covalently attached IL moieties, that is, the length of the alkyl side-chain in the imidazolium units, the nature of anion, etc.^[10] Thus, the synthesised materials should provide good access for both immiscible substrates (e.g., triolein and methanol) to the enzyme active site and easy isolation of the syn-

thesised methyl oleate by using scCO_2 as the delivery and extraction vector.^[11,12] Two different types of functionalised PS-DVB resins were evaluated (Figure 2). The first was a PS-DVB bead-type macroporous resin with two different degrees of functionalisation (1.2 and 5.5 $\text{mmol}_{\text{Cl}}\text{g}^{-1}$). The chloromethyl

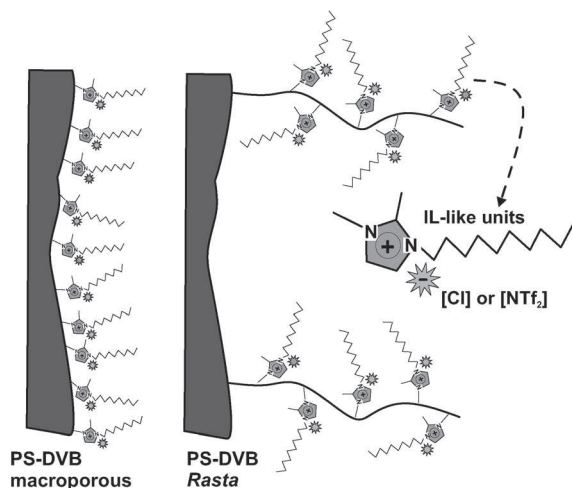


Figure 2. Schematic representation of SILLPs based on PS-DVB polymeric matrices used for lipase immobilisation.

groups in the polymeric backbone allowed the covalent attachment of the 1-dodecyl-2-methylimidazol units by simple alkylation. In addition, a highly functionalised (4.3 meq per Cl) PS-DVB *Rasta*-type resin was used to obtain the second type of supported IL. The different SILLPs were obtained by the reaction of a suspension of the starting PS-DVB material and an excess of imidazole in DMF at 90°C . As shown in Figure 2, the main difference between the types of polymeric resins was their molecular architecture. Although all resins are based on a PS-DVB polymeric framework, the functional groups on the macroporous resin are located on the main polymeric chain, whereas they are located in the more flexible side-chains that emanate from the cross-linked polymeric network in the *Rasta*-type resins. *Rasta*-type resins are usually obtained by postpolymerisation from a functionalised polymeric PS-DVB backbone.^[19] These modified solid phases (SILLPs) are suitable for CALB immobilisation by both electrostatic and hydrophobic interactions.^[20] Furthermore, as ILs based on hydrophobic anions and cations with large alkyl side-chains (e.g., $[\text{C}_{18}\text{mim}][\text{NTf}_2]$) were able to dissolve both triolein and methanol and provide a single-phase reaction medium,^[10] it is expected that SILLPs that bear long-chain imidazolium units should favour the mass-transport of substrates during biodiesel synthesis. Additionally, to have a macroporous support for comparison, the immobilisation of CALB on to a commercial Amberlyte XAD4 resin was also evaluated. PS-DVB resins have already been shown to be a good potential matrix for enzyme immobilisation, showing high activities in hydrolysis and esterification reactions.^[21] Table 1 shows the most characteristic parameters of the obtained SILLP resins.

Table 1. Characteristics of the SILLPs and enzyme loading.

Entry	Support ^[a]	Anion	Loading ^[b] [mmol g^{-1}]	$W^{\text{[c]}}$ [%]	$T_g^{\text{[d]}}$ [$^\circ\text{C}$]	Immobil. lipase [$\text{mg}_{\text{prot.}}\text{g}_{\text{sup}}^{-1}$]
1	A	–	–	–	–	10.7
2	B _L	Cl^-	0.95 (24)	2.1	251	22.0
3	B _H	Cl^-	2.47 (64)	6.2	262	16.9
4	C _L	NTf_2^-	0.77 (48)	< 1	–	19.1
5	C _H	NTf_2^-	1.40 (87)	< 1	–	17.6
6	D	Cl^-	2.21 (83)	4.6	–	9.4
7	E	NTf_2^-	1.42 (88)	< 1	–	8.4

[a] A: Amberlite XAD4; B: SILLP (Cl^-) prepared from a PS-DVB Merrifield macroporous resin with either 1.2 meq g^{-1} (L) or 5.5 meq g^{-1} (H) nominal loading; C: SILLP (NTf_2^-) prepared from support B by anion exchange; D: SILLP (Cl^-) prepared from a PS-DVB Merrifield *Rasta*-type resin (1% cross-linking, 4.3 meq g^{-1}); E: SILLP (NTf_2^-) *Rasta*-type resin prepared from support D by anion exchange. [b] Determined by means of elemental analysis (% by weight of IL-like units). [c] Percentage of water content calculated by TGA after equilibration at room temperature over 24 h. [d] Temperature of decomposition calculated by means of TGA.

The complete conversion of the chloromethyl groups in the imidazolium salt was assessed by means of FTIR and Raman spectroscopy and the 4-(4-nitrobenzyl)pyridine (NBP) test.^[22] Figure 3 displays the Raman spectra of the different SILLPs, which show the disappearance of the bands associated with the chloromethyl groups ($\tilde{\nu} \approx 1267$ and 680 cm^{-1}) and the appearance of bands characteristic of 1-dodecyl-2-butylbenzylimidazole mainly at approximately $\tilde{\nu} = 1512 \text{ cm}^{-1}$. The four resins with a low loading of $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{Cl}]$ functional groups show characteristic Raman bands ($\tilde{\nu} = 1611.3, 1511.3, 1184.3$ and 645.3 cm^{-1}) that are slightly redshifted compared to those for the SILLPs with high loadings ($\tilde{\nu} = 1614.5, 1512.3, 1189.3$ and 646.6 cm^{-1}).^[23] This suggests a stronger interaction between the IL-like groups in the SILLPs with low loadings, which could be attributed to better supramolecular organisation as a result of the easier accommodation of the large aliphatic chains. This is particularly relevant when chloride is present as the counter-anion.

In the same way, the IR spectra of the SILLPs also show characteristic peaks associated with the IL-like moieties.^[24] Thus, for instance, the attenuated total reflectance (ATR)-IR spectra of the B_H and D supports present bands similar to the related IL $[\text{C}_{10}\text{C}_1\text{BzIM}][\text{Cl}]$ prepared by the alkylation of 1-dodecyl-2-methylimidazol with benzyl chloride (Figure 4). The use of starting polymers with different properties and morphologies, after modification with alkylimidazolium groups, allows us to tailor the characteristics of the resulting SILLPs. Hence, important properties such as thermal stability and hygroscopicity can be significantly modified by taking the nature of the counterion into account. Both properties can be estimated by means of thermal analysis. Thus, measuring the weight loss at low temperatures (up to ca. 100°C), the water content of the material can be calculated by using thermogravimetric analysis (TGA).^[16,25] For this purpose, the different resins were initially left in contact with air under the same conditions for 24 h. The starting Merrifield resins do not present any water uptake as shown by the absence of any weight loss between 40 – 200°C .

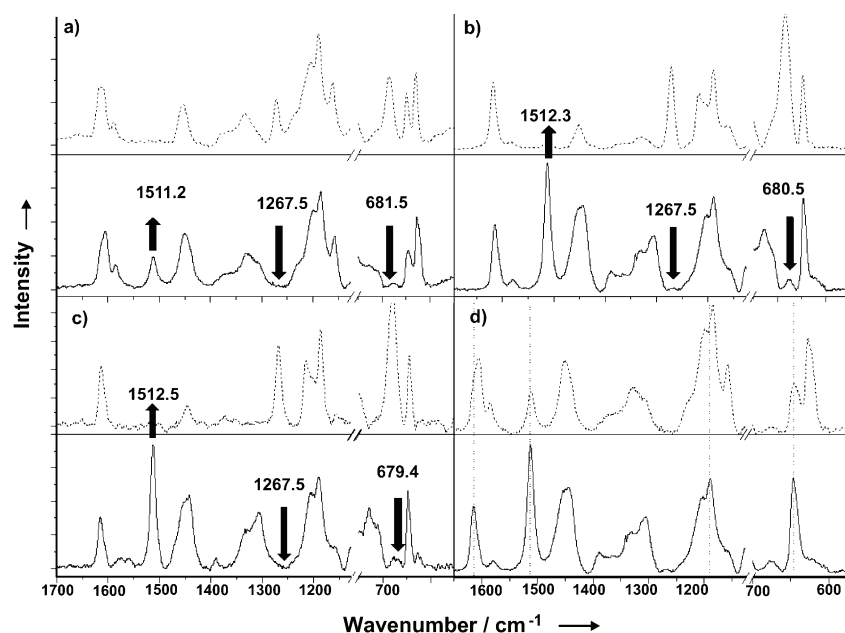


Figure 3. Raman spectra of the different SILLPs prepared. a) SILLP B_L (bottom) vs. PS-DVB Merrifield macroporous resin (1.2 meq g^{-1} , top), b) SILLP B_H (bottom) vs. PS-DVB Merrifield macroporous resin (5.5 meq g^{-1} , top), c) SILLP D (bottom) vs. PS-DVB Merrifield *Rasta*-type resin (4.3 meq g^{-1} , top) and d) SILLP B_L (top) vs. SILLP B_H (bottom).

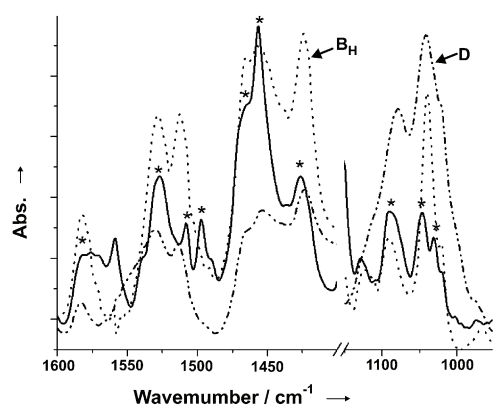


Figure 4. ATRIR spectra of 1-dodecyl-2-methyl-3-benzyl-imidazolium chloride ($[\text{C}_{10}\text{C}_{12}\text{BzIm}][\text{Cl}]$, solid line), support B_H (dotted line) and support D (dash dotted line).

In this regard, IL-based polymeric materials have been recently reported as efficient humidity absorbers.^[26] Figure 5 shows the TGA curves obtained for the six different supports evaluated. Thus, for modified macroporous resins, the water content varies from ca. 6.2–2.1% depending on the degree of functionalisation, with the resins with low loadings showing the lowest water contents. The exchange of Cl^- by NTf_2^- significantly reduces the hygroscopicity of the SILLPs, which is a clear indication of the lower polarity provided by the IL-like phase in these materials. The *Rasta*-type polymers (supports D and E) present similar tendencies to those of the high loading macroporous resins, although with a slightly lower water content (4.6%). TGA-differential thermal analysis (DTA) also allows a simple evaluation of their thermal stability. Reasonable stabil-

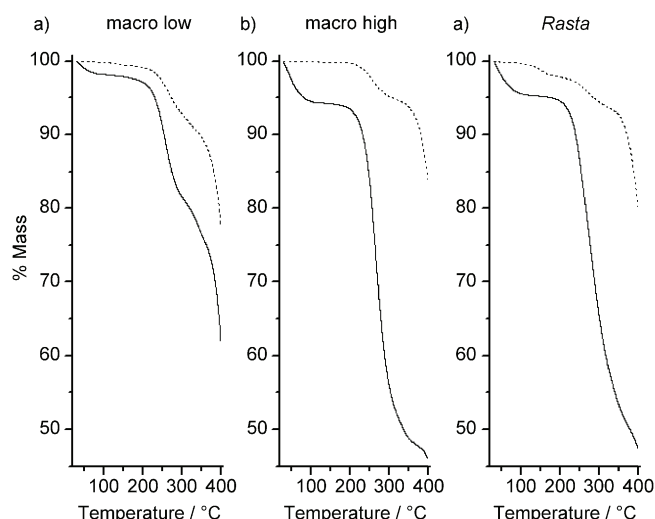


Figure 5. TGA curves of the different SILLPs. a) Support B (SILLP- $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{Cl}]$, solid line) vs. support C (SILLP- $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{NTf}_2]$, dotted line) prepared from PS-DVB Merrifield macroporous resin with low functional loading, b) support B (SILLP- $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{Cl}]$, solid line) vs. support C (SILLP- $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{NTf}_2]$, dotted line) prepared from PS-DVB Merrifield macroporous resin with high functional loading and c) support D (SILLP- $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{Cl}]$, solid line) vs. support E (SILLP- $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{NTf}_2]$, dotted line) prepared from PS-DVB Merrifield *Rasta* resin.

clear that different patterns of supramolecular interactions can be established between the IL-like moieties based on either intermolecular hydrogen bonding or Coulombic interactions. Hence, the higher T_g values observed for support B_L (51°C) compared to support B_H (40°C), suggest a more ordered structure, most likely through anion-cation interactions, for supports with a lower imidazolium loading, which is in good agreement with that observed by means of spectroscopy. The

ity has been established, and all of the samples have been stable up to approximately 200°C .

The differential scanning calorimetry (DSC) thermograms shown in Figure 6 present different weak endothermal and exothermal transitions apparently associated with the glass transition (T_g) and crystallisation temperatures of some SILLPs. The presence of these peaks, absent for the starting polymers, suggests the presence of an ordered structure of the IL-like fragments on the surface of the polymer. Such structures can be disordered/ordered upon heating or cooling. The temperatures, at which these transitions take place, depend on the structure of the polymeric backbone. According to their nature, it is

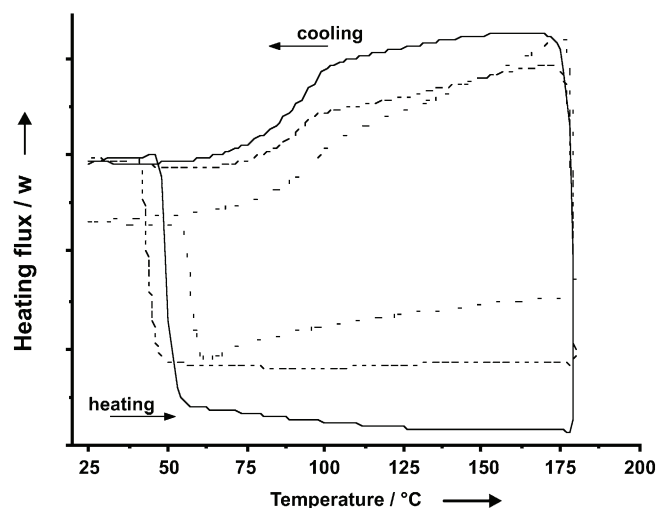


Figure 6. DSC curves for the different SILLPs at the third heating and cooling run ($10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Solid line: support D prepared from the PS-DVB Merrifield *Rasta*-type resin. Dotted line: support B prepared from PS-DVB Merrifield macroporous resin with high functional loading. Dashed line: support E *Rasta*-type resin prepared from support D by anion exchange.

comparison between support D derived from a *Rasta*-type resin and support B_H is more complex to rationalise, as not only the loading (83 and 64 wt%, respectively), but also the polymeric architecture are varied. In this case, a slightly higher T_g value was established for support D ($46\text{ }^{\circ}\text{C}$) with respect to B_H ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$). As the spectroscopic studies suggested, a more ordered structure for the case in which the imidazolium groups are located on the surface of the main polymeric backbone (B_H), the difference in T_g may be attributed to interchain interactions in the case of support D, which are not directly associated with the IL-like fragments.

Synthesis of CALB-SILLP derivatives

The enzyme was immobilised by simple adsorption of an aqueous solution of CALB onto the SILLPs by mixing an aqueous solution of the enzyme (1.5 mL , 15.1 mg mL^{-1}) with the support (1 g of Amberlite XAD4 or the corresponding SILLP) for 5 h at room temperature. The supernatant was recovered, and the support was washed with water to remove any unretained enzyme. Table 1 summarises the enzyme loadings obtained under those conditions for the different supports assayed. All of the polymers were able to absorb the protein, with loadings ranging from approximately $8\text{--}23\text{ mg}_{\text{protein}}\text{g}^{-1}$ of support. SILLPs derived from a macroporous PS-DVB matrix that bears [C₁₀mim] IL-like groups on the main polymeric chain show a twofold increase in the amount of adsorbed enzyme (Table 1, entries 2 and 4) with respect to the unmodified PS-DVB support (Table 1, entry 1). This suggests that both hydrophobic and Coulombic interactions are involved in the enzyme immobilisation mechanism (whereas the latter is not possible when Amberlite XAD4 was used as the support). The correct balance between these interactions seems to be an important factor to achieve high enzyme loadings. A slight reduction of the amount of immobilised protein was observed when the load-

ing of imidazolium groups was increased (Table 1, entry 2 vs. 3 and entry 4 vs. 5). Unexpectedly, the nature of the anion, Cl^- or NTf_2^- , does not have a significant effect on the ability of supports to absorb the enzyme, whereas the structure of the polymeric backbone seems to have an active role. Indeed, SILLPs derived from *Rasta*-type resins adsorb less protein than the SILLPs derived from high loading macroporous resins (entries 6 and 7), which is similar to that obtained for the unmodified macroporous PS-BVD carrier (Table 1, entry 1). For the *Rasta*-type resins, the high ionic loading of the chains protruding from the main PS-BVD chain and their flexibility can produce an extensive encapsulation of the enzyme. This phenomenon is not accompanied by covalent cross-linking of the chains, which hampers the incorporation of additional enzymatic units.^[18]

Biodiesel synthesis in a monophasic liquid medium

The activity exhibited by each CALB-immobilised derivative was evaluated for the synthesis of biodiesel in a liquid reaction medium and discontinuous operation method. *tert*-Butanol was selected as the cosolvent because of its ability to provide full solubilisation of both triolein and methanol, resulting in a clear, homogeneous reaction medium compatible with both the reactants and the enzyme catalysts.^[5] Table 2 summarises

Table 2. Influence of the nature of the immobilisation support on the lipase-catalysed synthesis of methyl oleate (biodiesel) from triolein and methanol in *tert*-butanol medium at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Entry	Support ^[a]	Anion	Activity [U g _{sup} ⁻¹]	Biodiesel yield at 24 h [%]
1	A	–	12.3 (1.15) ^[b]	52
2	B _L	Cl^-	33.1 (1.50) ^[b]	87
3	B _H	Cl^-	28.9 (1.71) ^[b]	81
4	C _L	NTf_2^-	49.8 (2.61) ^[b]	95
5	C _H	NTf_2^-	42.4 (2.41) ^[b]	92
6	D	Cl^-	11.1 (1.18) ^[b]	34
7	E	NTf_2^-	5.7 (0.68) ^[b]	8

[a] See Table 1 for support characteristics. [b] Specific activity [U mg_{protein}⁻¹]

the results obtained in terms of both enzyme activity and biodiesel yield obtained after 24 h of reaction at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. The best results were achieved with CALB-SILLPs derived from Merrifield macroporous resins with either high or low degrees of functionalisation, resulting in biodiesel yields from 81–95%. These results are significantly better (two- to fourfold) than those obtained for the CALB-Amberlite XAD4 derivative, which demonstrates the key role of the IL-based microenvironment of the support. Thus, the presence of IL-like units seems to have a positive effect on the enzymatic activity for biodiesel synthesis. The catalytic efficiency of these immobilised derivatives in liquid medium was similar to those reported for commercially available immobilised lipases. For example, Halim and Kamaruddin^[5b] reported biodiesel yields of up to 75% in 12 h by using Novozym 435 in the methanolysis of waste palm oil.

The combination of two immobilised lipases (Novozym 435 and Lipozym RM) improved the biodiesel yield to up to 85% in 20 h for this type of oil.^[5c] However, the best results for Novozym 435-catalysed biodiesel synthesis in a *tert*-butanol medium were obtained for the methanolysis of cottonseed oil (up to 97% yield in 24 h).^[5a]

When the nature of the counterion was considered, an increase in the activity of about 1.5-fold was observed when Cl^- was exchanged with NTf_2^- . The more hydrophobic microenvironment provided by NTf_2^- on the SILLP surface could facilitate a more efficient enzyme conformation as well as a higher accessibility of the oil substrate to the active centre of the enzyme in these monophasic media, leading to an increase in the observed activity.^[11,12] Furthermore, *Rasta*-type SILLPs led to biocatalysts with lower activities (Table 2, entries 6 and 7), which could be attributed to a decrease in the IL-protective effect against methanol for some adsorbed enzyme molecules because of the reduced number of anchoring points for the loading of the same IL-like groups on the immobilisation support (cf. Table 1, entries 3 and 6). This highlights the importance of the structure formed by the supported IL-like units to define the properties of the CALB-SILLPs.^[18,20]

Continuous biodiesel synthesis in scCO_2

Biphasic catalytic systems based on a combination of ILs and scCO_2 with enzymes may represent the most important “arsenal” of green tools to develop clean chemical processes of industrial interest.^[10,18,20] In this context, a biocatalytic packed-bed reactor that contained immobilised lipase on SILLP particles was developed to carry out the synthesis of biodiesel in scCO_2 (Figure 1). The system operated with a continuous feed of substrates, which were transported by the scCO_2 phase to the biocatalyst-IL microenvironment, and the products were returned to the *sc* phase (Figure 7) to directly produce pure

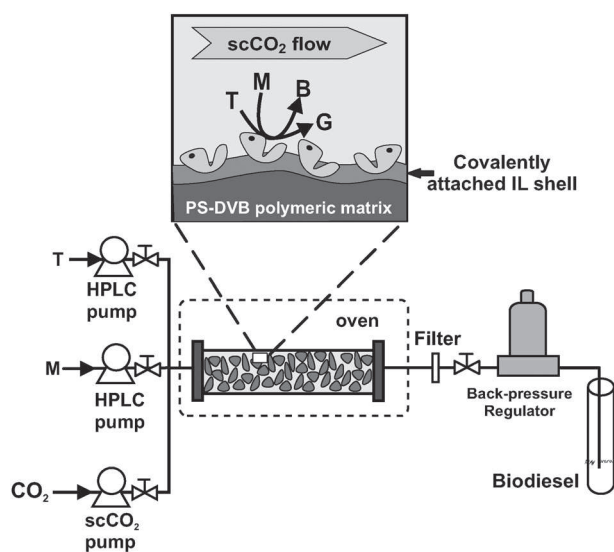


Figure 7. Experimental setup for the packed-bed reactor containing immobilised lipase on SILLPs for continuous biodiesel synthesis by the methanolysis of triolein. T: triolein, M: methanol, G: glycerol, B: methyl oleate (biodiesel).

biodiesel. First, the suitability of the CALB-SILLP derivative prepared from a macroporous resin with a low functional loading (B_L support) was tested.

It has been reported that the solubility of triolein in scCO_2 is modified by pressure, temperature and methanol content.^[6,27] Thus, the operational conditions (i.e., scCO_2 at 60 °C and 18 MPa, $10.2 \mu\text{mol}_{\text{triolein}} \text{min}^{-1}$ and $244.4 \mu\text{mol}_{\text{methanol}} \text{min}^{-1}$) were selected to provide the full solubilisation of the substrates at the reactor inlet.^[12] As shown in Figure 8, the proposed reactor

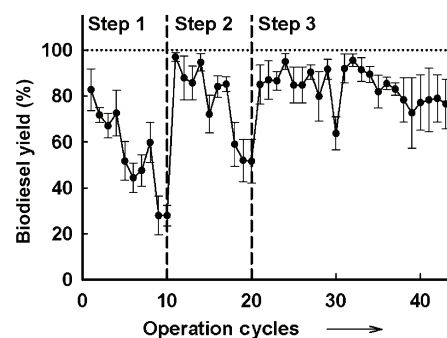


Figure 8. Operational stability of continuous biodiesel synthesis catalysed by CALB immobilised on SILLP- $[\text{C}_{10}\text{mim}][\text{Cl}]$ prepared from a macroporous resin with low functional loading (300 mg, support B_L) under scCO_2 at 45 °C and 18 MPa, fed with triolein ($10.2 \mu\text{mol min}^{-1}$) and methanol ($244.4 \mu\text{mol min}^{-1}$). Each point corresponds to the middle value of all samples obtained during each 6 h cycle. Steps 1 and 2 correspond to operation cycles without *tert*-butanol. The immobilised enzyme was washed with 4 mL *tert*-butanol at the end of each step. Step 3 corresponds to operation cycles with a continuous feed of *tert*-butanol ($10.5 \mu\text{mol min}^{-1}$).

was suitable for the continuous synthesis of biodiesel, resulting in 78–95% yields for a first cycle of 6 h of continuous operation. No enzymatic activity was detected at the reactor outlet, which was attributed to the insolubility of the proteins in *sc* fluids.^[11a] However, the biodiesel yield was continuously reduced down to approximately 30% after ten further cycles of 6 h (Figure 8, step 1), which could be related to the deactivation of the biocatalyst.^[12] However, washing the CALB-SILLP derivative with *tert*-butanol led to the full recovery of the catalytic activity, resulting in up to 98% biodiesel yield for the new cycle after washing (cycle 11). This was attributed to the low efficiency of the hydrophobic scCO_2 phase to transport the hydrophilic byproduct glycerol out of the active sites. Thus, it was retained on the IL layer of the support, which led to continuous biocatalyst poisoning and prevented the entry of fresh substrate molecules (triolein) to the active sites. Once again, the catalytic efficiency of the immobilised lipase was continuously reduced down to approximately 50% biodiesel yield for ten additional cycles of continuous operation (Figure 8, step 2), and the activity was then recovered by washing with *tert*-butanol (cycle 21).

In this context, the suitability of this immobilised biocatalyst was tested under continuous feed conditions using *tert*-butanol as the cosolvent in the substrate inlet at 1:1 (mol/mol) concentration with respect to the triolein mass-flow (Figure 8, step 3). The catalytic activity shown by the enzyme was practi-

cally constant during the following additional 20 operation cycles (i.e., 72–95% biodiesel yield). These results indicate the importance of mass-transfer limitations to achieve long-term, continuous, stable, biocatalytic systems for the biodiesel synthesis.

The influence of the nature of the IL moieties of the SILLPs on the catalytic activity of CALB for biodiesel synthesis under $scCO_2$ conditions was also studied under continuous flow conditions by using *tert*-butanol as the cosolvent in the methanol inlet flow. Figure 9a shows the biodiesel mean yield obtained

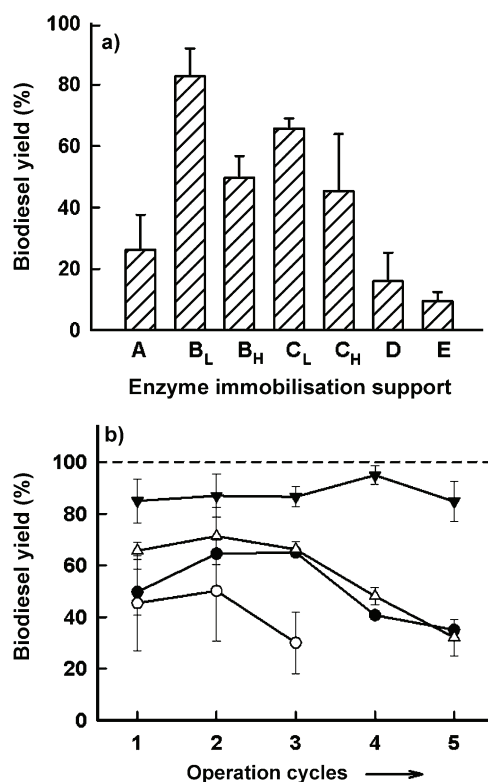


Figure 9. a) Influence of the enzyme-immobilisation support on the biodiesel yield obtained by the methanolysis of triolein in $scCO_2$ (18 MPa, 45 °C). b) Operational stability of immobilised lipase on B_L (▼), B_H (△), C_L (●) or C_H (○) supports for continuous biodiesel synthesis in $scCO_2$ (18 MPa, 45 °C). See Table 1 for details of supports.

for each immobilised derivative for 6 h of continuous operation in $scCO_2$. Clearly, both the free-IL PS-DVB support (A) and the CALB-SILLP biocatalysts derived from *Rasta*-type resins (D and E) showed low catalytic activities, which led to poor biodiesel yields (ca. 15–39%) in agreement with the results obtained in *tert*-butanol as the liquid medium (Table 2). In the same way, more efficient biocatalysts were obtained for CALB adsorbed onto SILLPs that bear IL-like moieties directly attached to the main polymeric backbone, forming a covalently attached, well defined monolayer of $[C_{10}mim][X]$ groups on the polymeric surface (B_L, B_H, C_L and C_H). Once again, the increase in IL loading from low to high did not improve the biodiesel yields under sc conditions. The best results (up to 78–95% bio-

diesel yield) were obtained for the CALB-SILLP that bears a low loading of $[C_{10}mim][Cl]$ moieties on the support (B_L).

It should be taken into account that the architecture defined by the layer of IL-like groups on the surface of the polymeric support will help not only to immobilise and stabilise/destabilise the enzyme, but also contribute to the mass-transfer of the reactants and products to the active sites using $scCO_2$ as carrier. Thus, as considered above, the exchange of Cl^- by NTf_2^- can lead to significant differences in terms of both polarity and the structural organisation of this IL layer (Figure 10). The

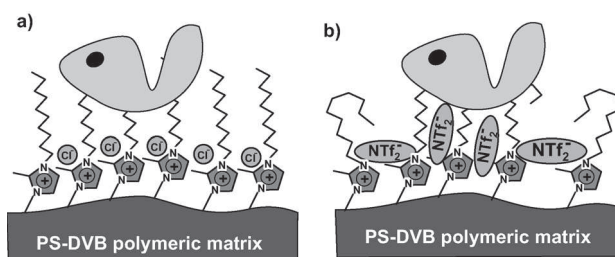


Figure 10. Schematic representation of the CALB adsorbed on to SILLPs based on $[C_{10}mim][Cl]$ (A) or $[C_{10}mim][NTf_2]$ (B) monolayers.

higher molecular size and charge delocalisation for NTf_2^- , with respect to Cl^- ,^[28] is associated with a loss of organisation of the $[C_{10}mim]$ layer, which hampers extensive wrapping of the enzyme. The critical role of mass-transfer phenomena involving the IL phase and the sc phase has been evidenced in studies involving IL-coated enzymes.^[11,29] Thus, improved wrapping of the biocatalyst benefits the catalytic efficiency of the enzyme for biodiesel synthesis in $scCO_2$ (Figure 9).

Finally, Figure 9b shows the operational stability profiles of all immobilised CALB derivatives for the continuous synthesis of biodiesel under sc conditions (18 MPa, 45 °C). In spite of continuous feeding with the polar cosolvent *tert*-butanol to avoid catalyst poisoning, the increase in loading of B_H, compared to B_L, leads to a continuous decay in the biodiesel yield. These results can only be explained by a loss in the efficiency of these SILLPs for mass-transport phenomena for the glycerol byproduct, which is associated with the higher polarity provided by the chloride counterion to the enzyme microenvironment. In both cases, the suitability of these immobilised biocatalysts was improved by the optimisation of the concentration of *tert*-butanol as the glycerol-washing cosolvent. Overall, the best result was obtained for the macroporous CALB-SILLP with 1.2 meq of $[C_{10}mim][Cl]$ -like fragments/g support, because of both the higher biodiesel yield (up to 95%) and the maintenance of the activity during 40 operation cycles of 6 h (Figure 8).

Conclusions

We have demonstrated the key role that the microenvironment plays in enzyme-catalysed reactions in $scCO_2$. The unique properties of ILs to enhance the catalytic efficiency of enzymes in $scCO_2$ can be improved by using covalently attached ILs

(SILLPs). The use of SILLPs allows a reduction of the amount of IL and accomplishes its full recovery in a simple way.^[10,18] The results obtained show that the optimisation of biotransformations based on enzymes immobilised on SILLPs is based on a delicate balance of different structural and morphological factors. These factors determine, on one hand, the efficiency of the mass-transfer processes at the interfaces either of the substrates to the active site or the products from the enzyme. Conversely, the microenvironment of the biocatalyst can play a critical role by stabilizing the corresponding active conformation, as well as by controlling the mass-transfer phenomena of products from the polymeric matrix. This is evidenced in the synthesis of biodiesel from vegetable oil, a process of high industrial and economic relevance, which, in addition, is very sensitive to the parameters mentioned above.

Thus, the appropriate selection of the IL, that is, one that contains a large alkyl chain in the cation, results in a clear improvement of the efficiency for the biotransformation in monophasic liquid systems, which leads to the selection of this structure for the preparation of the corresponding SILLPs.^[8,10] SILLPs based on IL-like fragments with highly flexible chains (i.e., *Rasta*-type resins) are not as effective, most likely due to the loss of the IL-protective effect for biocatalysts on the polymeric matrix because of the reduced number of anchoring points for IL-like groups on the immobilisation support that may facilitate interactions between the enzyme and deactivating agents, such as methanol and $scCO_2$. The degree of organisation of the IL-like units on the polymeric surface, regarding its homogeneous distribution and the nature of the anion (i.e., Cl^- or NTf_2^-) is the key criteria to improve the performance of CALB-catalysed biodiesel synthesis in both liquid and sc reaction media. Based on these elements, it is possible to develop efficient continuous processes for the transformation of vegetable oil into biodiesel. In this regard, the design of continuous processes for enzymatic biodiesel synthesis in $scCO_2$ media needs to take into account the low solubility of the polar by-product glycerol in the sc phase, which necessitates a washing step, for example, by the addition of an inert polar cosolvent such as *tert*-butanol, to reach a high level of operational stability. These results clearly illustrate the potential of SILLP-supported biocatalysts for the production of a green biofuel (e.g., biodiesel), which may be produced by fully green technology under continuous operation.

Experimental Section

Materials and methods

Candida antarctica lipase B CALB (Novozym 525L, EC 3.1.1.3) was a gift from Novozymes S.A. (Spain). Amberlite XAD4, triolein (65% purity), solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (Madrid, Spain).

Preparation of SILLPs

The synthesis of supports B, C, D and E was performed according to general procedures described in detail elsewhere.^[15a,16]

Lipase immobilisation on to Amberlite XAD4 and SILLPs

First, the commercial enzyme preparation was ultrafiltered, to eliminate all the low molecular weight additives, as follows: Novozym 525 L (25 mL) was diluted in water (225 mL), and the resulting solution was concentrated tenfold by ultrafiltration at 8 °C by using a Vivaflow 50 (Sartorius) system equipped with polysulphone membranes (10 kDa cutoff). This process was repeated three times to obtain a 15.1 mg protein mL⁻¹ lipase solution, as determined by means of the Lowry method. Immobilised lipase derivatives were prepared by simply mixing the aqueous solution of lipase (1.5 mL) with the support (Amberlite XAD4 or SILLP, 1 g). The mixture was gently shaken for 5 h at room temperature for enzyme adsorption. The supernatant was recovered, and the support washed with water to remove nonadsorbed enzyme. The immobilised derivative was frozen at -60 °C, lyophilised and finally stored under controlled a_w (0.11) conditions over LiCl in a desiccator at 8 °C. The protein content of the immobilised lipase was determined by means of the corresponding mass balance between the amount of enzyme available for immobilisation and the amount of recovered enzyme in the supernatant, as determined by the Lowry method.

Lipase-catalysed biodiesel synthesis in liquid medium

In each case, triolein (0.18 mL, 0.19 mmol) was added into a screw-capped vial (0.9 mL total capacity), which contained methanol (0.05 mL, 1.32 mmol) and *tert*-butanol (0.47 mL, 5.03 mmol) as co-solvent. The final mixture was a clear and homogeneous solution with a 7:1 (mol/mol) triolein/methanol ratio. The mixture was incubated in a thermoshaker TS-100 (Baeco, Germany) at 45 °C and 1000 rpm for 30 min. The reaction was started by adding 5% (w/w) immobilised lipase with respect to the amount of triolein, and the reaction system was incubated for 24 h under the same conditions. At regular intervals, aliquots (15 µL) were taken from the reaction mixture and added to a hexane/isopropanol mixture (485 µL; 5:4, v/v). The resulting homogenous mixture was shaken vigorously for 1 min and then placed in an ice bath. Finally, a portion of this solution (350 µL) was added to ethyl decanoate (100 mm) and tributyrin solution (100 mm, internal standards) in hexane/isopropanol mixtures (150 µL, 5:4, v/v), and the final solution was analysed by means of GC.

Lipase-catalysed biodiesel synthesis in $scCO_2$

In each case, the immobilised lipase derivative (0.3 g) was placed in the cartridge of an ISCO 2205X (Teledyne Isco, Inc, Lincoln, NE, USA) high-pressure extraction apparatus. This extractor was equipped with a syringe pump (ISCO 100DX, 100 mL overall volume), and devices for pressure, temperature and flow-rate control. The ISCO system was started with the continuous pumping of $scCO_2$ at 18 MPa and 45 °C, bubbling CO_2 continuously through a calibrated heated restrictor (1 mL min⁻¹, 60 °C). Biodiesel synthesis was carried out for 6 h cycles by continuously pumping triolein (10.2 µmol min⁻¹ mass-flow rate) and methanol or 90:10 (v/v) methanol/*t*-butanol (244 µmol_{methanol} min⁻¹ mass-flow rate) into the $scCO_2$ inlet flow by using two HPLC pumps (LC-10AT, Shimadzu Europe, Germany; Figure 7). The continuous transport of the substrates by the $scCO_2$ flow through the catalytic cartridge allowed the biotransformation, and the products were recovered by depressurizing through the calibrated heated restrictor for 30 min steps in a controlled amount of hexane/isopropanol (5:4, v/v) in an ice-bath. Samples were analysed by means of GC. In all cases, sub-

strate and product mass-balances from the outlet were consistent with the substrate mass-flow at the inlets.

GC analysis

GC analysis was performed by using a Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Europe, Germany) equipped with a flame ionisation detector. Samples were analysed by using a TRB-5HT capillary column (10 m × 0.32 mm × 0.1 μm, Supelco) with both ethyl decanoate and tributyrin as internal standards under the following conditions: carrier gas (He) at 28.6 kPa (40 mL min⁻¹ total flow); temperature programme: 100 °C, 10 °C min⁻¹, 200 °C, 15 °C min⁻¹, 370 °C, variable split ratio, (80:1 to 10:1); detector, 220 °C. See the Supporting Information for peak retention times and chromatograms.

Acknowledgements

This work was partially supported by CICYT-MICINN (CTQ 2011-28903, CTQ2008-00877 and CTQ2008-04412), the SENECA Foundation (08616/PI/08) and Bancaixa-UJI (P1 2009-58) grants. We thank Ramiro Martinez (Novozymes España. S.A.) for the gift of Novozym 525L.

Keywords: biocatalysis · biodiesel · continuous flow · supercritical fluids · ionic liquids

- [1] a) L. Lin, Z. Cunshan, S. Vittayapadung, S. Xiangqian, D. Mingdong, *Appl. Energy* **2011**, *88*, 1020–1031; b) I. M. Atadashi, M. K. Aroua, A. A. Aziz, *Renewable Energy* **2011**, *36*, 437–443.
- [2] M. I. Koh, T. I. M. Ghazi, *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2011**, *15*, 2240–2251.
- [3] J. Dupont, P. A. Z. Suarez, M. R. Meneghetti, *Energy Environ. Sci.* **2009**, *2*, 1258–1265; G. El Diwani, N. K. Attia, S. I. Hawash, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2009**, *6*, 219–224.
- [4] R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 1–22; T. Tan, J. Lu, K. Nie, L. Deng, F. Wang, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 628–634; P. S. Bisen, B. S. Sanodiya, G. S. Thakur, R. K. Baghel, G. B. K. S. Prasad, *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1019–1030.
- [5] a) D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder, S. Locatelli, *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 648–653; b) S. F. A. Halim, A. H. Kamaruddin, *Process Biochem.* **2008**, *43*, 1436–1439; c) Y. Liu, Y. J. Yan, F. Hu, A. N. Yao, Z. C. Wang, F. X. Wei, *AIChE J.* **2010**, *56*, 1659–1665.
- [6] a) A. C. Oliveira, M. F. Rosa, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 21–25; b) M. N. Varma, G. Madras, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 1–6; c) M. N. Varma, P. A. Deshpande, G. Madras, *Fuel* **2010**, *89*, 1641–1646.
- [7] a) A. R. Rodrigues, A. Pavia, M. Gomes da Silva, P. Simoes, S. Barreiros, *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *56*, 259–264; b) J. H. Lee, S. B. Kim, S. W. Kang, Y. S. Song, C. Park, S. O. Han, S. W. Kim, *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 2105–2108.
- [8] a) S. Sunitha, S. Kanjilal, P. S. Reddy, R. B. N. Prasad, *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1881–1885; b) S. H. Ha, M. N. Lan, S. H. Lee, S. M. Hwang, Y. M. Koo, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 480–483; c) M. Gamba, A. A. M. Lapis, J. Dupont, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 160–164; d) S. Arai, K. Nakashima, T. Tanino, C. Ogino, A. Kondo, H. Fukuda, *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 51–55; e) O. Miyawaki, M. Tatsumo, *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, *105*, 61–64.
- [9] A. A. M. Lapis, L. F. de Oliveira, B. A. D. Neto, J. Dupont, *ChemSusChem* **2008**, *1*, 759–762.
- [10] a) P. Lozano, T. de Diego, J. L. Iborra, M. Vaultier, EP 2189535A1, **2010**; b) P. Lozano, J. M. Bernal, R. Piamtongkam, D. Fetzer, M. Vaultier, *ChemSusChem* **2010**, *3*, 1359–1363; c) T. de Diego, A. Manjón, P. Lozano, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Green Chem.* **2011**, *13*, 444–451.
- [11] a) P. Lozano, *Green Chem.* **2010**, *12*, 555–569; b) M. Arai, S. Fujita, M. Shirai, *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *47*, 351–356; c) S. Keskin, D. Kayrak-Talay, U. Akman, O. Hortaçsu, *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *43*, 150–180.
- [12] P. Lozano, J. M. Bernal, M. Vaultier, *Fuel* **2011**, *90*, 3461–3467.
- [13] a) J. F. Fernandez, J. Neumann, J. Thoeming, *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 1992–2014; b) C. Samori, *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 1888–1904; c) M. Crucianelli, R. Saladino, F. De Angelis, *ChemSusChem* **2010**, *3*, 524–540.
- [14] a) J. Le Bideau, L. Viau, A. Vioux, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 907–925; b) C. van Doorslaer, J. Wahlen, P. Martens, K. Binnemans, D. De Vos, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8377–8390; c) M. Haumann, M. Jakuttis, R. Franke, A. Schonweiz, P. Wasserscheid, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1822–1827; d) M. Gruttadauria, L. F. Liotta, A. M. P. Salvo, F. Giacalone, V. La Parola, C. Aprile, R. Noto, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2119–2130.
- [15] a) M. I. Burguete, H. Erythropel, E. García-Verdugo, S. V. Luis, V. Sans, *Green Chem.* **2008**, *10*, 401–407; b) N. Fontanals, S. Ronka, F. Borrull, A. W. Trochimczuk, R. M. Marce, *Talanta* **2009**, *80*, 250–256; c) R. Duque, E. Ochsner, H. Clavier, F. Caijo, S. P. Nolan, M. Mauduit, D. J. Cole-Hamilton, *Green Chem.* **2011**, *13*, 1187–1195.
- [16] a) V. Sans, N. Karbass, M. I. Burguete, V. Compañ, E. García-Verdugo, S. V. Luis, M. Pawlak, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1894–1906; b) S. Werner, N. Szesni, M. Kaiser, R. W. Fischer, M. Haumann, P. Wasserscheid, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 1399–1402.
- [17] a) M. I. Burguete, E. García-Verdugo, I. García-Villar, F. Gelat, P. Licence, S. V. Luis, V. Sans, *J. Catal.* **2010**, *269*, 150–160; b) E. Öchsner, M. J. Schneider, C. Meyer, M. Haumann, P. Wasserscheid, *Appl. Catal. A* **2011**, *399*, 35–41; c) A. E. C. Collis, I. T. Horvath, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 912–919; d) M. I. Burguete, E. García-Verdugo, S. V. Luis, J. A. Restrepo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 14831–14838.
- [18] a) P. Lozano, E. García-Verdugo, R. Piamtongkam, N. Karbass, T. De Diego, M. I. Burguete, S. V. Luis, J. L. Iborra, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1077–1084; b) P. Lozano, E. García-Verdugo, N. Karbass, K. Montague, T. de Diego, M. I. Burguete, S. V. Luis, *Green Chem.* **2010**, *12*, 1803–1810.
- [19] a) S. R. McAlpine, C. W. Lindsley, J. C. Hodges, D. M. Leonard, G. F. Filzen, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 1–5; b) J. C. Hodges, L. S. Harikrishnan, S. Ault-Justus, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 80–88.
- [20] P. Lozano, E. García-Verdugo, S. V. Luis, M. Pucheault, M. Vaultier, *Curr. Org. Synth.* **2011**, *8*, 810–823.
- [21] a) P. C. de Oliveira, G. M. Alves, H. F. Castro, *Biochem. Eng. J.* **2000**, *5*, 63–71; b) Y. Yücel, C. Demir, N. Dizge, B. Keskinler, *Biomass Bioenergy* **2011**, *35*, 1496–1501; c) P. Lozano, B. Bernal, J. M. Bernal, M. Pucheault, M. Vaultier, *Green Chem.* **2011**, *13*, 1406–1410.
- [22] F. Galindo, B. Altava, M. I. Burguete, R. Gavara, S. V. Luis, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 859–861.
- [23] a) M. I. Burguete, E. García-Verdugo, N. Karbass, S. V. Luis, V. Sans, M. Sokolova, *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 1991–2000; b) F. Shi, Q. H. Zhang, D. M. Li, Y. Q. Deng, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5279–5288.
- [24] M. E. Mahmoud, H. M. Al-Bishri, *Chem. Eng. J.* **2011**, *166*, 157–167.
- [25] J. Lemus, J. Palomar, M. A. Gilarranz, J. J. Rodriguez, *Adsorption* **2011**, *17*, 561–571.
- [26] T. Erdmenger, I. Perevyazko, J. Vitz, G. Pavlov, U. S. Schubert, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 3583–3585.
- [27] A. De Lucas, I. Gracia, J. Rincon, M. T. Garcia, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 5061–5066.
- [28] J. Dupont, *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 341–350.
- [29] P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 661–669.

Received: November 4, 2011

Published online on March 1, 2012

ANEXO V

Green Chemistry

Cutting-edge research for a greener sustainable future

www.rsc.org/greenchem

Volume 14 | Number 11 | November 2012 | Pages 2953–3238



ISSN 1463-9262

RSC Publishing

COVER ARTICLE

Lozano *et al.*

A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases



1463-9262 (2012) 14:11;1-4

enzyme-catalyzed direct esterification between “natural” substrates could be considered as the most straightforward way to obtain “natural” ester products. Furthermore, by using either supercritical fluids or solvent-free reaction media, clean processes can easily be designed. However, distinctly moderate results (e.g. maximum of 60–80% isoamyl acetate yield under solvent-free conditions,^{9b,c} and 80% geranyl acetate yield in supercritical ethane^{8d}), the deactivation of enzyme by direct contact with acids, or cost of high-pressure equipment are also drawbacks for industrial application. Reflecting the suitability of ILs for use in enzyme-catalyzed reactions,¹⁰ it has been reported that [Bmim][PF₆] is a suitable reaction medium for lipase-catalyzed flavour ester synthesis by esterification (e.g. 80% geranyl acetate yield at 311 h reaction,^{7a} and up to 100% isoamyl acetate yield,^{7b-d}), but product recovery by liquid–liquid extraction with organic solvents tarnishes the greenest aspects of the approach. The use of high hydrostatic pressure (up to 500 MPa^{7d}) or pervaporation membrane systems^{7b} permits isoamyl acetate separation in IL–alcohol biphasic systems.

Hydrophobic ILs based on cations with large alkyl side-chains (e.g. 1-methyl-3-octadecylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [C₁₈mim][NTf₂]) have been used to synthesize nickel nanoparticles with reduced diameters,¹¹ as anticancer agents,¹² and also as excellent reaction media for the enzymatic synthesis of biodiesel (i.e. up to 96% biodiesel yield in 6 h at 60 °C), because of their ability to dissolve both triolein and methanol, thus providing monophasic systems where the lipases are highly active and stable.¹³

The most interesting feature of biocatalytic processes in ILs is the possibility to design two-phase reaction systems that permit easy product recovery (e.g. IL–scCO₂ biphasic systems).^{10a} The ability of hydrophobic ILs with large alkyl side-chains to switch from the solid to the liquid phase at temperatures compatible with enzyme catalysis (e.g. 53 °C for [C₁₈mim][NTf₂],^{13a} 43 °C for [C₁₆mim][NTf₂],¹² etc.) could be used to develop easy protocols for enzymatic synthesis and separation of natural flavour ester products.

This paper demonstrates for the first time the biocatalytic synthesis of sixteen different flavour alkyl esters by direct esterification of an alkyl carboxylic acid (acetic, propionic, butyric or valeric) with a flavour alcohol (citronellol, geraniol, nerol or isoamyl alcohol) in the IL *N,N',N'',N'''*-hexadecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₆tma][NTf₂], see Fig. 1B) as a switchable ionic liquid/solid phase, used for the reaction and subsequent product separation by centrifugation (see Fig. 2). The influence of several reaction parameters (e.g. acid/alcohol ratio, IL concentration, length of the IL alkyl side-chain, enzyme amount, etc.) to achieve maximal product yield is studied. A cyclic protocol for enzymatic synthesis, product separation and enzyme–IL reuse has also been developed to demonstrate the suitability of the proposed approach as a sustainable process for producing “natural” flavour esters at an industrial level.

2 Experimental

Immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym® 435, EC 3.1.1.3) was from Novozymes S.A. (Spain), and was equilibrated

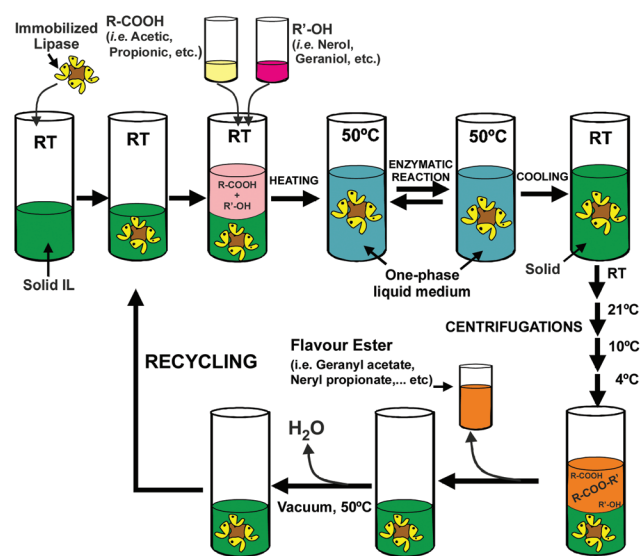


Fig. 2 Scheme of the cyclic protocol for the production of flavour esters by lipase-catalyzed direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases, and reusing the enzyme/IL system. For details see the Experimental section.

to 0.11 Aw by over saturated LiCl solutions in a closed container at 25 °C for one week prior to use.^{9d} Citronellol (95% GC), geraniol (98% GC), nerol (97% GC), isoamyl alcohol (>98% GC), citronellyl acetate (99% GC), geranyl acetate (>98% GC), neryl acetate (>98% GC), isoamyl acetate (>98% GC), acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid, molecular sieves 13x (MS13x; 270 mg H₂O g⁻¹ adsorption capacity), solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co. The ILs, dodecyltrimethylammonium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide ([C₁₂tma][NTf₂], 99% purity), tetradecyltrimethyl-ammonium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide ([C₁₄tma][NTf₂], 99% purity), hexadecyl-trimethylammonium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide ([C₁₆tma][NTf₂], 99% purity) and octadecyltrimethyl-ammonium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide ([C₁₈tma][NTf₂], 99% purity), were obtained from IoLiTec GmbH (Germany). The melting points of ILs were determined by using a Reichert Thermovar melting point apparatus equipped with a microscope, and were uncorrected. The density of solid [C₁₆tma][NTf₂] was determined by filling a 10 mL pycnometer with the IL in the liquid phase at 60 °C, then cooled until 25 °C.

Phase behaviour of [C₁₆tma][NTf₂]/flavour ester mixtures

In 1.5 mL screw-capped vials with teflon-lined septa, 0.3, 0.4 or 0.5 g of citronellyl acetate, geranyl acetate, neryl acetate or isoamyl acetate were mixed with the corresponding amount of [C₁₆tma][NTf₂] to finally obtain IL concentrations of 50, 60 or 70% (w/w), respectively. All IL/flavour ester mixtures were incubated under shaking (300 rpm) for 10 min at 50 °C, which produced fully clear monophasic systems. Then, the solutions were consecutively centrifuged four times at 14 000 rpm (15 min) and at room temperature, 21, 10 and 4 °C, resulting in a top liquid phase of flavour ester and a bottom solid phase containing IL

alone. After each centrifugation step, a sample (10 μL) of the resulting top flavour ester phase was dissolved in 1 mL acetone- d_6 , then analyzed by 300 MHz ^1H NMR and 282 MHz ^{19}F NMR, respectively in a Bruker AC 300E spectrometer to detect the presence of the IL. See ESI.†

Lipase-catalyzed flavour esters synthesis in switchable ILs

Into 3 mL screw-capped vials with teflon-lined septa, 3 mmol of citronellol (575 μL), geraniol (537 μL), nerol (545 μL) or isoamyl alcohol (334 μL), and 1, 2 or 3 mmol of acetic acid (58, 116 or 174 μL , respectively), propionic acid (75, 150 or 225 μL , respectively), butyric acid (93, 186 or 278 μL , respectively) or valeric acid (110, 220 or 330 μL , respectively) were added. Then, the corresponding amount of $[\text{C}_{12}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, $[\text{C}_{14}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ or $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, respectively, was added to reach a final IL concentration of 50, 60 or 70% (w/w) with respect to the mass substrates. Reaction mixtures were pre-incubated at 50 $^\circ\text{C}$ for 10 min, resulting in fully clear monophasic systems, and then 80 mg MS13x per mmol of carboxylic acid were also added. The reaction was started by adding Novozym 435 (40 mg mmol^{-1} of carboxylic acid) and the reaction was incubated at 50 $^\circ\text{C}$ under shaking (300 rpm) for 4 h. To obtain time-course profiles, 20 μL aliquots were taken at regular intervals and suspended in 500 μL octane, and the resulting biphasic mixture was strongly shaken for 3 min to extract products. The resulting mixture was centrifuged at 14 000 rpm for 10 min. Finally, 300 μL of the octane extract were added to 100 μL of 100 mM ethyl propionate (internal standard) solution in octane, and the final solution was analyzed by GC. One unit of synthetic activity was defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of flavour alkyl ester per min. For full recovery of the flavour ester products at 4 h, the reaction mixtures were centrifuged as described above, resulting in a fully clear liquid phase containing products and non-reacted substrates, and a solid phase containing IL, immobilized enzyme and MS13x, respectively. Samples of each liquid phase were collected and stored at -20 $^\circ\text{C}$ until use for product identification by GC/MS. All experiments were carried out in duplicate.

GC analysis

GC analysis was performed with a Shimadzu GC-17A (Shimadzu Europe, Germany) equipped with an FID detector. Samples were analyzed on a SupraWax-280 capillary column (30 m \times 0.32 mm \times 0.5 μm , Teknokra, Spain), using ethyl propionate as an internal standard, under the following conditions: carrier gas (He) at 1.1 mL min^{-1} ; inlet split ratio, 1 : 20; temperature programme: 60 $^\circ\text{C}$, 4 min, 10 $^\circ\text{C}$ min^{-1} , 200 $^\circ\text{C}$, 12 min. Peak retention times (min) were as follows: β -citronellol, 18.7; citronellyl acetate, 17.4; citronellyl propionate, 18.3; citronellyl butyrate, 18.8; citronellyl valerate, 21.0; geraniol, 20.0; geranyl acetate, 18.8; geranyl propionate, 19.6; geranyl butyrate, 20.9; geranyl valerate, 22.6; nerol, 19.3; neryl acetate, 18.3; neryl butyrate, 20.3; neryl valerate, 22.0; isoamyl alcohol, 9.7; isoamyl propionate, 10.0; isoamyl butyrate, 11.2; isoamyl valerate, 13.0; acetic acid, 14.0; propionic acid, 15.5; butyric acid, 17.1; valeric acid, 18.2; ethyl propionate, 5.1. For the neryl

propionate case, temperature programme was: 60 $^\circ\text{C}$, 4 min, 5 $^\circ\text{C}$ min^{-1} , 200 $^\circ\text{C}$, 12 min. Peak retention times (min) were as follows: nerol, 28.0; neryl propionate, 27.7; propionic acid, 21.1. For the isoamyl acetate propionate case, temperature programme was: 60 $^\circ\text{C}$, 4 min, 4 $^\circ\text{C}$ min^{-1} , 140 $^\circ\text{C}$, 5 min. Peak retention times (min) were as follows: isoamyl alcohol, 12.0; isoamyl acetate, 9.4; acetic acid, 20.3. See ESI.†

Identification of flavour ester products by GC/MS

GC-MS analyses were carried out by using a GC-6890 (Agilent, USA) coupled with a MS-5973 (Agilent, USA) system. The GC was equipped with an HP-5MS column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm , Agilent, USA), used under the following conditions: carrier gas (He) at 53.9 mL min^{-1} ; inlet split ratio, 1 : 60; temperature program: 60 $^\circ\text{C}$, 10 $^\circ\text{C}$ min^{-1} , 200 $^\circ\text{C}$, 12 min; MS source ionization energy: 70 eV; the scan time was 0.5 s, covering a mass range of 40–800 amu. Each flavour alkyl ester was identified by comparison of its mass spectra with those in a computer library (NIST Library). Citronellyl acetate, retention time (Rt): 13.9 min; positive-ion (m/z) 43.2, 55.2, 69.2, 81.2, 95.2, 109.2, 123.2, 138.2. Citronellyl propionate, Rt: 15.2 min; m/z : 41.2, 57.2, 69.2, 81.2, 95.2, 109.2, 123.2, 138.2. Citronellyl butyrate, Rt: 16.2 min; m/z : 41.2, 55.2, 69.2, 81.2, 95.2, 109.2, 123.2, 138.2. Citronellyl valerate, Rt: 17.4 min; m/z : 41.2, 57.2, 69.2, 81.2, 95.2, 109.2, 123.2, 138.2. Geranyl acetate, Rt: 14.4 min; m/z : 41.2, 69.2, 93.2, 121.2, 136.2. Geranyl propionate, Rt: 15.6 min; m/z : 41.2, 57.2, 69.2, 93.2, 121.2, 136.2. Geranyl butyrate, Rt: 16.6; m/z : 41.2, 69.2, 80.2, 93.2, 121.2, 136.2. Geranyl valerate, Rt: 17.7 min; m/z : 41.2, 57.2, 69.2, 85.2, 93.2, 121.2, 136.2. Neryl acetate, Rt: 14.0 min; m/z : 41.2, 69.2, 80.2, 93.2, 121.2, 136.2. Neryl propionate, Rt: 15.3; m/z : 41.2, 57.2, 69.2, 80.2, 93.2, 121.2, 136.2. Neryl butyrate, Rt: 16.3 min; m/z : 41.2, 69.2, 80.2, 93.2, 107.2, 121.2, 136.2. Neryl valerate, Rt: 17.5; m/z : 41.2, 55.2, 69.2, 80.2, 93.2, 107.2, 121.2. Isoamyl propionate, Rt: 8.5 min; m/z : 43.2, 55.2, 70.2. Isoamyl butyrate, Rt: 9.2 min; m/z : 43.2, 55.2, 70.2, 115.2. Isoamyl valerate, Rt: 10.9 min; m/z : 43.2, 55.2, 70.2, 99.2, 117.2.

Operational stability of $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ /Novozym 435 system

For the first operation cycle, 3 mmol of citronellol (575 μL), geraniol (537 μL) or isoamyl alcohol (334 μL) and 2 mmol of acetic acid (116 μL), propionic acid (150 μL) or butyric acid (186 μL) were mixed in 3 mL screw-capped vials with the corresponding amount of $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ to reach a 60% (w/w) final IL concentration with respect to mass substrates. Reaction mixtures were pre-incubated at 50 $^\circ\text{C}$ for 10 min, resulting in fully clear monophasic systems. The reaction was started by adding 80 mg Novozym 435, and run under shaking (300 rpm) for 14 h at 50 $^\circ\text{C}$ without the presence of MS13x. At this time, a 20 μL aliquot was taken and suspended in 500 μL octane for GC analysis as described above. Reaction products and non-reacted substrates were extracted from the IL media following the centrifugation protocol described above, resulting in an IL-free top liquid phase of flavour ester, and a bottom solid phase containing both the IL and immobilized enzyme. Flavour ester and non-reacted substrates were recovered by decantation, and the

remaining IL/Novozym solid phase was incubated under vacuum at 50 °C for 4 h to evaporate any remaining product/substrate traces. Finally, a new biocatalytic/extraction cycle for flavour alkyl ester production was started by adding the corresponding flavour alcohol (3 mmol) and carboxylic acid (2 mmol), respectively.

3 Results and discussion

Phase behaviour of [C₁₆tma][NTf₂]/flavour ester mixtures

The suitability of the [C₁₆tma][NTf₂] ionic liquid to dissolve geranyl acetate, citronellyl acetate, neryl acetate or isoamyl acetate was first studied at concentrations of 50, 60 and 70% IL and 50 °C, resulting in fully clear monophasic systems in all cases, even though the melting point of this IL is 64 °C (see Fig. 3A and ESI†). All media became monophasic solid systems after cooling to room temperature (Fig. 3B). Furthermore, each solid phase could be separated into two phases, an upper IL-free liquid, and another bottom solid containing the IL by following an iterative centrifugation protocol of four steps (15 min, 14 000 rpm) and lowering the temperature from room (25 °C approx.) to 4 °C (Fig. 3C). The 50/50 (w/w) [C₁₆tma][NTf₂]/geranyl acetate mixture was taken as a representative example to detect any IL residual content in the flavour ester phase after each centrifugation step, based on ¹H and ¹⁹F NMR spectra. The IL content of this top liquid phase continuously decreased, until IL-free geranyl acetate was obtained at the last step of the proposed iterative centrifugation protocol (see ESI†). The absence of any peak in the ¹⁹F NMR spectrum confirmed that full separation of [C₁₆tma][NTf₂] and geranyl acetate can be attained using simple and cheap methods, in this case cooling and centrifugation. Furthermore, the resulting liquid–solid biphasic systems remained stable at room temperature with time. In preliminary experiments using a unique centrifugation step at 25, 21 or 10 °C, it was observed how the resulting top liquid phase became solid by incubation in an ice bath, because of the presence of residual IL

content. This phenomenon was not observed when the proposed iterative cooling/centrifugation protocol was used, allowing to recover IL-free ester flavours by simple decantation at different yields (w/w), *i.e.* 51% geranyl acetate, 82% isoamyl acetate, 59% citronellyl acetate, or 60% neryl acetate. The increase in centrifugation time and/or centrifugation speed might improve these results.

These features could be explained as being a function of the solid/liquid structural organization of ILs. Although many papers have focused on the liquid phase behaviour of ILs with organic compounds,¹⁴ no study of solid/liquid phase transitions of ILs containing dissolved substances has been published. However, as regards the structure of imidazolium ILs, Dupont reports how ILs possess analogous structural patterns in both the solid and liquid phases, as a result of an ionic network formed by monomeric units of a cation surrounded by three anions and *vice versa*.¹⁵ The incorporation of molecules into the IL network causes changes in their physical–chemical properties, and even the formation of polar and non-polar regions. Thus, ILs are described as nano-structured materials, which permit neutral molecules to reside in less polar regions, while ionic or polar species undergo faster diffusion in the more polar regions. Similarly, the phase transitions of 1-butyl-3-methylimidazolium ILs were recently studied by positron lifetime spectroscopy.¹⁶ This paper analyzes both the occupied and free volumes of ions for four different ILs in amorphous and crystalline phases, as well as the corresponding phase transitions, and concludes that the free volume increases with temperature because the molecules require more space to move. Zhang *et al.*¹⁷ studied the tribological behaviour of the 1-methyl-3-hexadecylimidazolium tetrafluoroborate [C₁₆mim][BF₄] IL crystal as an additive of liquid paraffin, reporting how this IL (m.p. 49 °C)^{13b} is transformed from the solid state to the liquid crystalline phase at 80 °C, the IL molecules being arranged in layers with their long molecular axes parallel to each other, and resulting in excellent tribological properties. In agreement with these results, the unique feature observed in Fig. 3C might be explained as a consequence of the nano-structured organization of [C₁₆tma][NTf₂], where the large alkyl side chains of cations interact by forming hydrophobic holes suitable for the incorporation of alkyl flavour esters (see Fig. 3D). Thus, geranyl acetate could be regarded as being included rather than dissolved in the liquid/solid IL phases. The decrease in free volume of the ionic net produced by cooling allowed compaction of the IL solid phase by centrifugation, and the consequent release of geranyl acetate molecules outside the net. As the density of the solid [C₁₆tma][NTf₂] (1.09 g mL⁻¹ at 25 °C) is higher than that of the liquid geranyl acetate (0.92 g mL⁻¹ at 25 °C), the flavour liquid phase easily shifted to the upper phase. Thus, the IL net could be considered as a nano-sponge that can switch from the solid to the liquid phase (and *vice versa*) as a result of temperature changes, with holes of variable volume, which are suitable for housing or releasing hydrophobic molecules as a function of their liquid or solid phase, respectively. In the same way as the pioneering work of Brennecke's group in 1999 which showed how supercritical carbon dioxide was able to extract dissolved hydrophobic compounds (*e.g.* naphthalene) into an IL phase (*e.g.* [Bmim][PF₆])¹⁹ and the subsequent application for (bio)catalytic processes,²⁰ our new green approach to extract products from IL

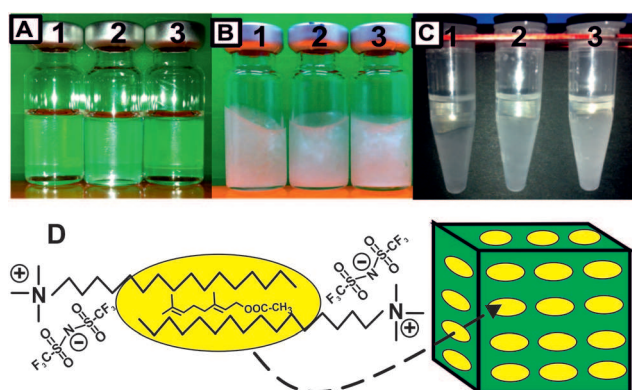


Fig. 3 Phase behaviour of 50/50 (1), 60/40 (2) and 70/30 (3) (w/w) [C₁₆tma][NTf₂]/geranyl acetate mixtures at 50 °C (A), 25 °C (B), and after four consecutive centrifugation steps at 14 000 rpm (15 min) and at room temperature, 21, 10 and 4 °C (C), respectively. (D) Schematic hypothesis of the structural organization of the solid [C₁₆tma][NTf₂] net (green) with hydrophobic holes (yellow) containing liquid geranyl acetate. See ESI†

phases, based on more straightforward technologies (e.g. cooling, centrifugation, etc.), can also be applied to a broad spectrum of synthetic processes, e.g. enzymatic reactions.

Novozym 435-catalyzed flavour esters synthesis by direct esterification in $[C_{16}tma][NTf_2]$

Fig. 4A depicts time courses of the Novozym 435-catalyzed esterification of citronellol, geraniol, nerol and isoamyl alcohol, respectively, with acetic acid in 50% (w/w) $[C_{16}tma][NTf_2]$ at 50 °C, using a 2/3 (mol/mol) acetic acid/alcohol ratio concentration. As can be seen, the enzyme was able to synthesize all flavour esters, reaching up to 89% yield (with respect to the initial acetic acid) for the citronellyl acetate case. However, the enzyme activity was clearly dependent on the nature of the flavour alcohol (see Fig. 4B, citronellol > geraniol > nerol > isoamyl alcohol), the activity for citronellyl acetate synthesis being up to 12.5 times higher than for the isoamyl acetate. To assess the influence of the $[C_{16}tma][NTf_2]$ as a reaction medium, comparative reactions for lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in solvent-free and IL reaction media, with (and without) the presence of the MS13x drying agent, were carried out. Furthermore, the enzyme amount for these reactions was four-times higher than in the experiments of Fig. 4 in order to speed up synthetic processes of industrial interest. As can be seen in Fig. 5, the direct enzymatic esterification of acetic acid with isoamyl alcohol under solvent-free conditions gave a low product yield (14.9% at 4 h reaction), but was doubled in the presence of the MS13x dehydrating agent because of its ability to shift the reaction equilibrium towards the synthetic product pathway by adsorbing the water by-product released. The moderate activity shown by the enzyme in these solvent-free media has been related to the high acid concentration (4.45 M for our experiments) in reaction media, which might have provoked enzyme deactivation.^{9a,b} However, the isoamyl acetate yield was greatly improved when the enzymatic esterification reaction occurred in $[C_{16}tma][NTf_2]$, reaching nearly 100% yield at 4 h reaction when MS13x was present in the reaction medium. These results agree with the excellent suitability of hydrophobic

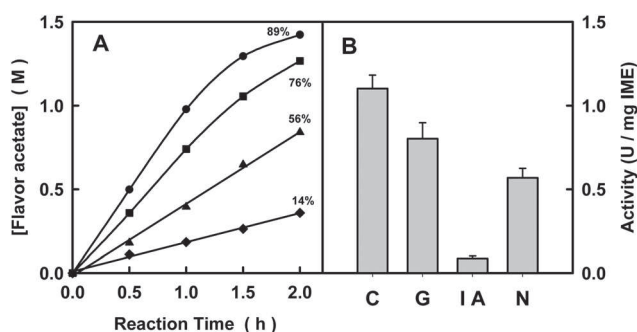


Fig. 4 Time course profiles (A) and enzymatic activity (B) shown by Novozym 435 (20 mg)-catalyzed esterification reactions of 2 mmol acetic acid with 3 mmol flavour alcohols, (●, C) citronellol, (■, G) geraniol, (▲, N) nerol, or (◆, I A) isoamyl alcohol, in 50% (w/w) $[C_{16}tma][NTf_2]$ at 50 °C. Product yields at 2 h reaction with respect to initial acetic acid concentration are also included. For details, see the Experimental section.

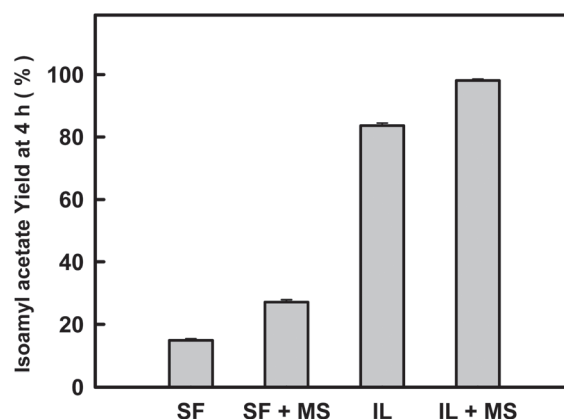


Fig. 5 Isoamyl acetate yield obtained by the esterification between acetic acid (2 mmol) and isoamyl alcohol (3 mmol) catalyzed by Novozym 435 (40 mg mol⁻¹ acetic acid) after 4 h reaction at 50 °C. SF, solvent-free; SF + MS, solvent-free with molecular sieves (80 mg mmol⁻¹ acetic acid); IL, 50% (w/w) $[C_{16}tma][NTf_2]$; IL + MS, 50% (w/w) $[C_{16}tma][NTf_2]$ with molecular sieves (80 mg mmol⁻¹ acetic acid).

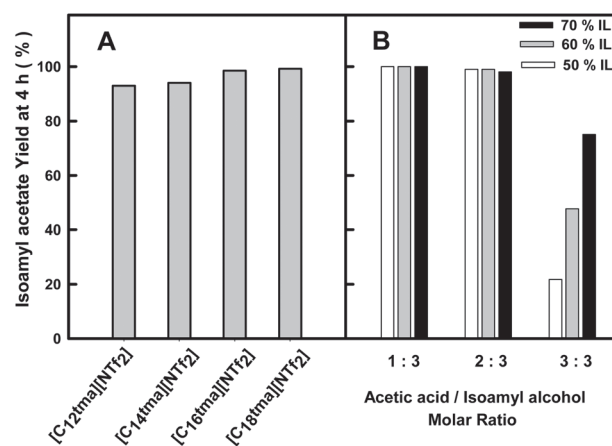


Fig. 6 (A) Influence of the alkyl side chain length of the IL (50% w/w) on the isoamyl acetate yield obtained by the esterification between acetic acid (2 mmol) and isoamyl alcohol (3 mmol) catalyzed by Novozym 435 (40 mg mol⁻¹ acetic acid) after 4 h reaction at 50 °C. (B) Effect of the acetic acid/isoamyl alcohol molar ratio on the isoamyl acetate yield obtained by the esterification reaction catalyzed by Novozym 435 (40 mg mol⁻¹ acetic acid) at different $[C_{16}tma][NTf_2]$ concentrations after 4 h reaction at 50 °C. All reaction media contained 80 mg molecular sieves per mmol acetic acid.

ILs for lipase-catalyzed esterification and transesterification reactions,^{10,18} which has also been reported for the case of ILs based on cations with large alkyl side chains.¹³ The excellent stability displayed by enzymes in water-immiscible ILs should be mentioned. This was due to the maintenance of the native conformation of the proteins as demonstrated by spectroscopic techniques (e.g. fluorescence, circular dichroism, FT-IR, etc.), protecting them against the usual unfolding that occurs in non-aqueous environments.²¹

The effect of the alkyl side chain length of IL cations was also studied for the Novozym 435-catalyzed synthesis of isoamyl acetate by direct esterification at 50 °C. Fig. 6A depicts the resulting isoamyl acetate yields at 4 h reaction in four different

[*N,N',N'',N'''*-alkyltrimethylammonium][NTf₂] ILs at 50% (w/w) IL concentration and at a 2/3 (mol/mol) acetic acid/isoamyl alcohol molar ratio. As can be seen, the synthetic product yield increased proportionally with the length of the alkyl chain of the cation (*i.e.* [C₁₈tma] > [C₁₆min] > [C₁₄mim] > [C₁₂mim]), the best results (approx. 100% isoamyl acetate yield with respect to acetic acid content) being obtained for both the [C₁₆tma][NTf₂] (m.p. 64 °C) and [C₁₈tma][NTf₂] (m.p. 74 °C) cases. The [C₁₆tma][NTf₂] IL was used in further studies because of its lower melting point. Fig. 6B shows the influence of the acetic acid/isoamyl alcohol molar ratio on Novozym 435-catalyzed isoamyl acetate synthesis by direct esterification at 50, 60 and 70% (w/w) IL concentration and 50 °C. As can be seen, the esterification of the acetic acid substrate with isoamyl alcohol was practically 100% for both the 1/3 and 2/3 (mol/mol) molar ratios at all IL concentrations. As an example, the resulting 98.1% yield for the 2/3 (mol/mol) experiment at 60% IL concentration corresponds to a 0.572 g mL⁻¹ concentration of isoamyl acetate, a value higher than those reported in the literature using direct esterification.^{7b-e,9a-c,e} However, increasing the acetic acid concentration up to equimolar level with respect to the isoamyl alcohol resulted in a reduction in isoamyl acetate yield of up to 21% for the 50% (w/w) IL concentration. This was improved up to 75% isoamyl acetate yield by increasing the IL concentration to 70% (w/w).

The suitability of the proposed methodology for flavour ester production based on enzymatic synthesis by direct esterification followed by clean product separation using a cooling/centrifugation protocol was tested for the production of sixteen different compounds, resulting from combinations of four aliphatic acids (acetic, propionic, butyric or valeric) and four flavour primary alcohols (*i.e.* isoamyl alcohol, nerol, geraniol or citronellol) (see Table 1). Enzymatic reactions were carried out at 1/3, 2/3 and 3/3 acid/alcohol molar ratios, respectively, and at 60% [C₁₆tma][NTf₂] concentration. As can be seen, the enzyme was able to synthesize all sixteen flavour esters, the product yield

reaching levels higher than 90% (most close to 100%) in practically all cases, demonstrating the excellent potential of the proposed methodology. It should be emphasized that up to 0.757 g mL⁻¹ concentration (*e.g.* geranyl valerate) was achieved. Furthermore, enzymatic reactions run like solvent-free systems, because nearly pure flavour products are obtained directly by the proposed cooling/centrifugation methodology. This clean approach is obviously simpler and cheaper than those reported by other authors, such as *e.g.* enzymatic synthesis in ILs and product separation by membrane technology,^{7b-d} biocatalysis in supercritical fluids,⁸ or IL-supercritical fluid biphasic systems,^{18b,20c,d} *etc.* Ohno and co-workers recently reported an interesting temperature-dependent phase change for tetrabutylphosphonium trifluoroacetate ([P₄₄₄₄][CF₃COO])-type IL/water mixtures, which was successfully used to extract proteins, and suggested that an enzymatic reaction might be possible using this behaviour.²²

Enzymatic cyclic production of flavour esters in switchable [C₁₆tma][NTf₂] solid/liquid phases

The key criteria for scaling-up any biocatalytic process for flavour ester production are the operational stability of the enzyme, and the recycling of the IL. Therefore, a cyclic laboratory protocol to reuse the biocatalyst/[C₁₆tma][NTf₂] system for five different flavour esters was designed (see the Experimental section). In this approach, the phase behaviour of the flavour ester product (*e.g.* geranyl acetate) and [C₁₆tma][NTf₂] mixtures as a function of temperature was taken into account. These mixtures are homogeneous (monophasic systems) at 50 °C, but become solid below approx. 35 °C. Therefore, a cyclic protocol was established as follows: firstly the biocatalytic step was run using a 2/3 acid/alcohol molar ratio and a 60% (w/w) IL at 50 °C for 14 h, followed by cooling to room temperature (approx. 25 °C). Then, the reaction media were centrifuged four times (15 min, 14 000 rpm) at 25, 21, 10 and 4 °C, respectively,

Table 1 Production of flavour esters by Novozym 435-catalyzed esterification between an aliphatic carboxylic acid (acetic, propionic, butyric or valeric) and a flavour alcohol (isoamyl alcohol, nerol, geraniol or citronellol) in 60% (w/w) [C₁₆tma][NTf₂] after 4 h reaction at 50 °C, using 40 mg immobilized enzyme and 80 mg molecular sieves per mmol of the acid substrate, respectively. Assayed substrate amounts were 3 mmol flavour alcohol and 1 (A), 2 (B) or 3 (C) mmol aliphatic carboxylic acid, respectively

Flavour ester	Product concentration, g mL ⁻¹ (yield, %)		
	A	B	C
Isoamyl acetate	0.325 (97.0 ± 0.1)	0.572 (98.1 ± 1.7)	0.369 (47.7 ± 6.4)
Isoamyl propionate	0.356 (99.9 ± 0.1)	0.601 (99.9 ± 0.1)	0.738 (94.7 ± 3.7)
Isoamyl butyrate	0.374 (99.9 ± 0.1)	0.613 (99.1 ± 0.9)	0.739 (91.1 ± 6.4)
Isoamyl valerate	0.392 (99.9 ± 0.1)	0.626 (99.8 ± 0.2)	0.741 (86.6 ± 11.5)
Neryl acetate	0.305 (99.9 ± 0.1)	0.540 (96.6 ± 0.3)	0.687 (88.6 ± 2.2)
Neryl propionate	0.314 (98.7 ± 1.3)	0.543 (95.0 ± 0.1)	0.694 (89.2 ± 2.2)
Neryl butyrate	0.330 (99.9 ± 0.1)	0.556 (95.7 ± 0.3)	0.611 (78.4 ± 0.5)
Neryl valerate	0.335 (97.8 ± 0.4)	0.559 (94.5 ± 0.6)	0.650 (85.6 ± 9.3)
Geranyl acetate	0.324 (99.9 ± 0.1)	0.552 (93.4 ± 1.1)	0.702 (86.1 ± 6.8)
Geranyl propionate	0.337 (99.6 ± 0.4)	0.570 (94.6 ± 3.4)	0.680 (83.3 ± 5.8)
Geranyl butyrate	0.350 (99.9 ± 0.1)	0.599 (97.9 ± 0.3)	0.696 (85.4 ± 7.9)
Geranyl valerate	0.355 (97.9 ± 2.1)	0.593 (95.5 ± 0.3)	0.757 (93.0 ± 5.3)
Citronellyl acetate	0.301 (99.9 ± 0.1)	0.546 (98.5 ± 1.3)	0.692 (90.1 ± 1.7)
Citronellyl propionate	0.315 (99.9 ± 0.1)	0.537 (94.8 ± 0.8)	0.741 (96.0 ± 2.1)
Citronellyl butyrate	0.327 (99.9 ± 0.1)	0.558 (96.9 ± 3.1)	0.722 (93.4 ± 4.6)
Citronellyl valerate	0.339 (99.9 ± 0.1)	0.570 (97.2 ± 1.5)	0.706 (91.0 ± 9.4)

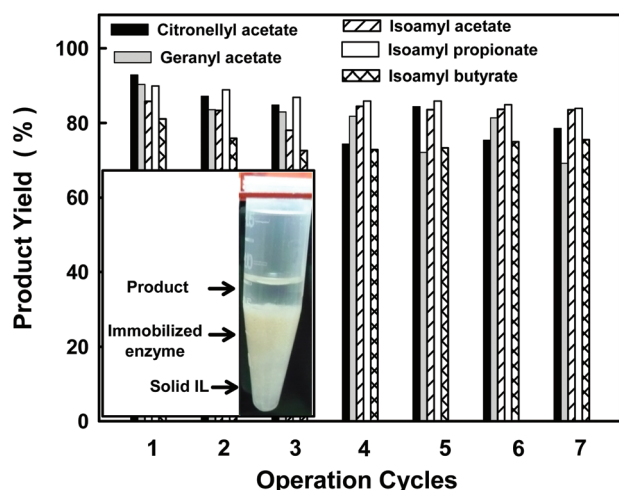


Fig. 7 Recycling protocol for Novozym 435-catalyzed flavour ester synthesis by direct esterification of acetic, propionic or butyric acids with citronellol, geraniol or isoamyl alcohol, respectively, in 60% (w/w) $[C_{16}tma][NTf_2]$ at 50 °C. As an example, the inset picture shows the phase behaviour of a reaction system after the cooling/centrifugation step carried out at the end of each catalytic cycle. See the Experimental section for further details.

to achieve the full precipitation of the IL solid phase, thus permitting an easy separation of the flavour ester by decantation (see the inset picture of Fig. 7). The biocatalyst–IL solid system was then incubated under vacuum at 50 °C for 2 h to evaporate any remaining products and/or substrates, and a new cycle for flavour alkyl ester production was started by adding the corresponding substrate mixture. These reactions were carried out without MS13x to facilitate the release of remaining substrates/products during the vacuum step, thus avoiding any interference on the part of this adsorption agent, and the reaction time was increased up to 14 h to compensate the absence of this dehydrating agent. As can be seen in Fig. 7, the flavour ester yield falls slightly as the operation cycles increase for all the assayed cases, *i.e.* citronellyl acetate, geranyl acetate, isoamyl acetate, isoamyl propionate and isoamyl butyrate, which may be related with a non-appropriate release of the water by-product content of the reaction media during the evaporation step. Furthermore, the attempted reduction in product yield, which could be related with the absence of MS13x, was compensated by the increase in reaction time with respect to previous experiments, reaching initial flavour ester yields higher than 80% practically in all cases. Further studies to optimize the release of the water content from the biocatalyst/ $[C_{16}tma][NTf_2]$ /MS13x reaction mixture after each catalytic cycle could well improve product yields up to 100%.

The protective effect of hydrophobic ILs, based on the $[NTf_2]$ anion and alkyltrimethylammonium cations, has been reported to be related to the maintenance of the native structure of the protein.^{18b,21b,c} The coating of immobilized enzyme particles with these hydrophobic ILs resulted in their excellent stabilization.¹⁰ It is also noticeable that enzyme stabilization provided by $[C_{16}tma][NTf_2]$ is largely better than that obtained by other enzyme stabilization approaches. For example, Karagoz *et al.* reported the covalent immobilization of *R. miehei* lipase onto

poly(glycidyl methacrylate)–polystyrene diblock copolymers and application of the immobilized enzyme for isoamyl acetate synthesis by direct esterification in a solvent-free system, showing a 50% activity loss after 10 cycles reuse.^{9g} In the same way, the application of adsorbed *C. rugosa* lipase onto Sepa-beads® for geranyl butyrate synthesis in isoctane,^{5f} or the use of *S. simulans* lipase adsorbed onto Ca_2CO_3 for isoamyl acetate synthesis,^{9b} by direct esterification also showed 40% residual activity after 8 cycles. However, when hydrophobic ILs (*e.g.* $[Bmim][PF_6]$) were used as reaction media for isoamyl acetate synthesis by enzyme-catalyzed direct esterification, excellent operational stability of the enzyme was observed. Further studies regarding the role of the alkyl side chain of $[C_{16}tma][NTf_2]$ in the structure–function relationships of *C. antarctica* lipase B should be carried out.

Conclusions

This paper shows for the first time an easy and green method for efficiently separating a hydrophobic organic compound (*e.g.* flavour esters) from a homogeneous ionic liquid–organic compound mixture by simple cooling and centrifugation. The ability of hydrophobic ILs based on long alkyl side chains in cations (*e.g.* $[C_{16}tma][NTf_2]$) to melt at temperatures compatible with enzyme catalysis (*e.g.* lower than 80 °C) permitted development of a two-step protocol for flavour ester production: (i) lipase-catalyzed direct esterification between an aliphatic acid and a flavour alcohol with a product yield close to 100%, and (ii) clean separation of the reaction product by a cooling/centrifugation method. Using this approach, an almost pure product was obtained, while recovery and reuse of the biocatalyst/IL system led to a very low decrease in activity because of the demonstrated ability of hydrophobic ILs to stabilize enzymes. The presence of a dehydrating agent (*e.g.* MS13x) in the reaction media was important for the maximum level of conversion to be reached. It should be emphasized that since substrates obtained from “natural” sources (*e.g.* acetic acid from fermentation cultures, and geraniol from plants) are used, the resulting ester product can also be considered as “natural”.

The unique properties of hydrophobic ILs, based on cations with long alkyl side chains (*e.g.* $[C_{16}tma][NTf_2]$), to carry out combined biotransformations and clean separation steps could open up new opportunities to develop green industrial processes. Further studies on the switching from solid to liquid phases of organic compound–IL mixtures should be carried out.

This work was partially supported by MINECO CTQ2011-28903-C02-02, and SENECA Foundation (08616/PI/08) grants. We thank Ramiro Martinez (Novozymes España. S.A.) for a gift of Novozym 435.

Notes and references

- S. Serra, C. Fuganti and E. Brenna, Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances, *Trends Biotechnol.*, 2005, **23**, 193–198.
- US Code of Federal Regulations, 21CFR 101.22, *Food and Drug Administration*, Washington, D.C., 1985.
- The Council of the European Communities, *Council Directive 88/388/EEC*, 1988.
- R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **64**, 1–22.

- 5 For examples of flavour ester synthesis by enzymatic esterification in organic solvents, see: (a) P. A. Claon and C. C. Akoh, *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, **16**, 835–838; (b) F. Laboret and R. Perraud, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1999, **82**, 185–198; (c) H. Stamatis, P. Christakopoulos, D. Kekos, B. J. Macris and F. N. Kolisis, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1998, **4**, 229–236; (d) S. Y. Huang, H. L. Chang and M. Goto, *Enzyme Microb. Technol.*, 1998, **22**, 552–557; (e) A. Larios, H. S. Garcia, R. M. Oliart and G. Valerio-Alfaro, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **65**, 373–376; (f) J. J. Damjanovic, M. G. Zuza, J. K. Savanovic, D. I. Bezbradica, D. Z. Mijin, N. Boskovic-Vragolovic and Z. D. Knezevic-Jugovic, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2012, **75**, 50–59.
- 6 For examples of flavour ester synthesis by enzymatic transesterification in organic solvents, see: (a) W. Chulalaksananukul, J. S. Condoret and D. Combes, *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, **14**, 293–298; (b) M. D. Romero, L. Calvo, C. Alba and A. Daneshfar, *J. Biotechnol.*, 2007, **127**, 269–277; (c) S. S. Kanwar, C. Sharma, M. L. Verma, S. Chauhan, S. S. Chimni and G. S. Chauhan, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, **109**, 1063–1071; (d) S. Torres, M. D. Baigori, S. L. Swathy, A. Pandey and G. R. Castro, *Food Res. Intl.*, 2009, **42**, 454–460; (e) P. You, E. Su, X. Yang, D. Mao and D. Wei, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2011, **71**, 152–158.
- 7 For examples of enzyme-catalyzed flavour ester synthesis in ILs, see: (a) D. Barahona, P. H. Pfromm and M. E. Rezac, *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, **93**, 318–324; (b) A. Trusek-Holownia and A. Noworyta, *J. Biotechnol.*, 2007, **130**, 47–56; (c) L. Gubicza, K. Belafi-Bako, E. Feher and T. Frater, *Green Chem.*, 2008, **10**, 1284–1287; (d) E. Feher, B. Major, K. Belafi-Bako and L. Gubicza, *Desalination*, 2009, **241**, 8–13; (e) A. Pohar, I. Plazl and P. Znidarsic-Plazl, *Lab Chip*, 2009, **9**, 3385–3390; (f) M. J. Eisenmenger and J. I. Reyes-de-Corcuera, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **67**, 36–40.
- 8 For examples of enzyme-catalyzed flavour ester synthesis in supercritical fluids, see: (a) W. Chulalaksananukul, J. S. Condoret and D. Combes, *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, **15**, 691–698; (b) M. D. Romero, L. Calvo, C. Alba, M. Habulin, M. Primožic, Z. Knez and J. Supercrit. Fluids, 2005, **33**, 77–84; (c) M. Habulin, S. Sabeder, M. Paljevac, M. Primožic, Z. Knez and J. Supercrit. Fluids, 2007, **43**, 199–203; (d) R. Couto, P. Vidinha, C. Peres, A. S. Ribeiro, O. Ferreira, M. V. Oliveira, E. A. Macedo, J. M. Loureiro and S. Barreiros, *Ind. Eng. Res.*, 2011, **50**, 1938–1946.
- 9 For examples of enzyme-catalyzed flavour ester synthesis in solvent-free systems, see: (a) A. Guvenç, N. Kapucu and U. Mehmetoglu, *Process Biochem.*, 2002, **38**, 379–386; (b) H. Ghamgui, M. Karra-Chaabouni, S. Bezzine, N. Miled and Y. Gargouri, *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, **38**, 788–794; (c) A. Guvenç, N. Kapucu, H. Kapucu, O. Aydogan and U. Mehmetoglu, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, **40**, 778–785; (d) P. Lozano, R. Piamtongkam, K. Kohns, T. Diego, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Green Chem.*, 2007, **9**, 780–784; (e) P. Mahapatra, A. Kumari, G. V. Kumar, R. Banerjee and A. Nag, *Biocatal. Biotransform.*, 2009, **27**, 124–130; (f) N. Paroul, L. P. Grzegozeski, V. Chiaradia, H. Treichel, R. L. Cansian, J. V. Oliveira and D. de Oliveira, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 1636–1641; (g) B. Karagoz, G. Bayramoglu, B. Altintas, N. Bicak and M. Y. Arica, *Ind. Eng. Chem.*, 2010, **49**, 9655–9665; (h) N. Paroul, L. P. Grzegozeski, V. Chiaradia, H. Treichel, R. L. Cansian, J. V. Oliveira and D. de Oliveira, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, **166**, 13–21.
- 10 (a) P. Lozano, *Green Chem.*, 2010, **12**, 555–569; (b) P. Dominguez de Maria and Z. Maugeri, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, **15**, 220–225; (c) P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis, M. Pucheault and M. Vaultier, *Curr. Org. Synth.*, 2011, **8**, 810–823; (d) R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1437–1451.
- 11 P. Migowski, G. Machado, S. R. Texeira, M. C. M. Alves, J. Morais, A. Traverse and J. Dupont, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 4814–4821.
- 12 S. V. Malhotra and V. Kumar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 581–585.
- 13 (a) P. Lozano, J. M. Bernal, R. Piamtongkam, D. Fetzer and M. Vaultier, *ChemSusChem*, 2010, **3**, 1359–1363; (b) P. Lozano, J. M. Bernal and M. Vaultier, *Fuel*, 2011, **90**, 3461–3467; T. De Diego, A. Manjon, P. Lozano, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Green Chem.*, 2011, **13**, 444–451.
- 14 A. Chapeaux, L. D. Simoni, T. S. Ronan, M. A. Stadtherr and J. F. Brennecke, *Green Chem.*, 2008, **10**, 1301–1306; J. M. Crosthwaite, M. J. Muldoon, S. N. V. K. Aki, E. J. Maginn and J. F. Brennecke, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 9354–9361; K. Anderson, H. Rodriguez and K. R. Seddon, *Green Chem.*, 2009, **11**, 780–784.
- 15 (a) J. Dupont, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2004, **15**, 341–350; (b) J. Dupont, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 1223–1231.
- 16 Y. Yu, W. Beichel, G. Dlubek, R. Krause-Rehberg, M. Paluch, J. Pionteck, D. Pfefferkorn, S. Bulut, C. Friedrich, N. Pogodina and I. Krossing, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 6856–6868.
- 17 C. L. Zhang, S. M. Zhang, L. G. Yu, P. Y. Zhang, Z. J. Zhang and Z. S. Wu, *Tribol. Lett.*, 2012, **46**, 49–54.
- 18 (a) P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1529–1533; (b) P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biotechnol. Prog.*, 2004, **20**, 661–669; (c) Y. Abe, K. Kude, S. Hayase, M. Kawatsura, K. Tsunashima and T. Itoh, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2008, **51**, 81–85; (d) Y. Abe, K. Yoshiyama, Y. Yagi, S. Hayase, M. Kawatsura and T. Itoh, *Green Chem.*, 2010, **12**, 1976–1980.
- 19 L. A. Blanchard, D. Hancu, E. J. Beckman and J. F. Brennecke, *Nature*, 1999, **399**, 28–29.
- 20 Pioneering works in (bio)catalytic processes in IL/scCO₂ systems: (a) F. C. Liu, M. B. Abrams, R. T. Baker and W. Tumas, *Chem. Commun.*, 2001, 433–434; (b) A. Bosmann, G. Francio, E. Janssen, M. Solinas, W. Leitner and P. Wasserscheid, *Angew. Chem., Intl. Ed.*, 2001, **40**, 2697–2699; (c) P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Chem. Commun.*, 2002, 692–693; (d) M. T. Reetz, W. Wiesenhofer, G. Francio and W. Leitner, *Chem. Commun.*, 2002, 992–993.
- 21 (a) S. N. Baker, T. M. McCleskey, S. Pandey and G. A. Baker, *Chem. Commun.*, 2004, 940–941; (b) T. De Diego, P. Lozano, S. Gmouh, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 1457–1464; (c) P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biocatal. Biotransform.*, 2005, **23**, 169–176; (d) F. van Rantwijk, F. Secundo and R. A. Sheldon, *Green Chem.*, 2006, **8**, 282–286; (e) N. M. Micaelo and C. M. Soares, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 2566–2572; (f) T. A. Page, N. D. Kraut, P. M. Page, G. A. Baker and F. V. Bright, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 12825–12830; (g) H. Zhao, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 891–907.
- 22 (a) K. Fukamoto and H. Ohno, *Angew. Chem., Intl. Ed.*, 2007, **46**, 1852–1855; (b) Y. Kohno, S. Saita, K. Murata, N. Nakamura and H. Ohno, *Polym. Chem.*, 2011, **2**, 862–867; (c) Y. Kohno and H. Ohno, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 7119–7130.

ANEXO VI

How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquid†

Cite this: *Energy Environ. Sci.*, 2013, **6**, 1328Pedro Lozano,^{*a} Juana M. Bernal,^a Gregorio Sánchez-Gómez,^b Gregorio López-López^b and Michel Vaultier^c

Hydrophobic ionic liquids (ILs) based on cations with long alkyl side-chains (e.g. *N*-octadecyl-*N*',*N*'',*N*''''-trimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₈tma][NTf₂])) are switchable ionic liquid/solid phases with temperature that behave as sponges. As liquid phases, they are excellent monophasic reaction media for lipase-catalyzed methanolysis of triolein, resulting in fast and efficient biodiesel synthesis, e.g. up to 100% yield in 8 h at 60 °C, with exceptional enzyme stability (up to 1370 days half-life time at 60 °C). As solid phases, the reaction mixture can easily be fractionated by iterative centrifugations at controlled temperature into three phases, *i.e.* solid IL, glycerol and pure biodiesel. A straightforward and sustainable approach for producing biodiesel has been developed, allowing full recovery and reuse of the biocatalyst–IL system for successive cycles and suitable for scaling-up.

Received 20th December 2012
Accepted 20th February 2013

DOI: 10.1039/c3ee24429f

www.rsc.org/ees

Broader context

A clean biocatalytic approach for producing biodiesel using temperature switchable ionic liquid/solid phases as reaction/separation media has been developed. This paper demonstrates a novel property of ionic liquids (ILs) based on cations with long alkyl side-chains (e.g. *N*-octadecyl-*N*',*N*'',*N*''''-trimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₈tma][NTf₂])) that behave as sponge-like systems for soaking and releasing (wringing) hydrophobic compounds (triolein and methyl oleate). As liquid phases, these ILs are excellent monophasic reaction media for the lipase-catalyzed methanolysis of triolein, resulting in fast and efficient biodiesel synthesis: up to 100% yield in 8 h at 60 °C, accompanied by exceptional enzyme stability (up to 1370 days half-life time at 60 °C). As solid phases, the reaction mixture can easily be fractionated by iterative centrifugations at controlled temperature into three phases: solid IL, glycerol and pure biodiesel. This represents a straightforward and sustainable approach for producing biodiesel, allowing full recovery and reuse of the biocatalyst–IL system for successive cycles and suitable for scaling-up. The unique properties of hydrophobic ILs, based on cations with long alkyl side chains (e.g. [C₁₈tma][NTf₂]), allow the combined biotransformation and straightforward separation of the product opening up new opportunities to develop new reaction platforms for green industrial processes.

1 Introduction

The depletion of fossil fuels and increasing ecological awareness have led modern societies to a search for alternative fuels made from renewable sources such as plant biomass. Due to its functional similarity with petroleum-based fuel, biodiesel has become a very attractive alternative for use in diesel engines. Biodiesel is usually synthesized by transesterification of triacylglycerides with methanol, yielding Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) and glycerol as by-products. Three consecutive

transesterification reactions are involved in the full conversion of triacylglyceride molecules to biodiesel using chemical or enzymatic catalysts and an excess of alcohol to shift the equilibrium towards the product side (see Fig. 1A).¹ Although biodiesel is successfully produced on an industrial scale using

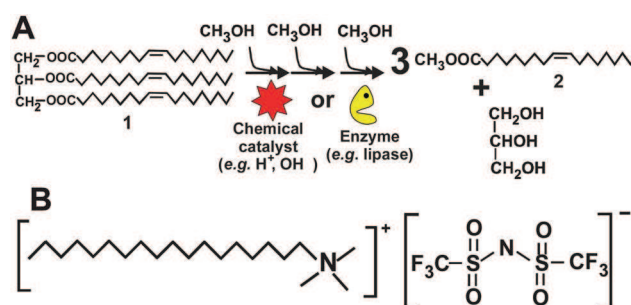


Fig. 1 (A) Scheme of the immobilized lipase-catalyzed synthesis of biodiesel (2, methyl oleate) by methanolysis of triolein (1). (B) The IL, [C₁₈tma][NTf₂], as an example of the switchable ionic liquid/solid phase used for the synthesis and purification of biodiesel.

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Química, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, P.O. Box 4021, E-30100 Murcia, Spain. E-mail: plozanor@um.es; Fax: +34 868 884148; Tel: +34 868 887392

^bDepartamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, P.O. Box 4021, E-30100 Murcia, Spain

^cInstitut des Sciences Moléculaires, Université Bordeaux 1, CNRS UMR 5255, Groupe Phoenix, F33405 Talence cedex, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3ee24429f

chemical catalysts, mainly homogeneous alkaline catalysts like KOH, the undesired side reactions (*e.g.* soap formation), glycerol recovery and the removal of inorganic salts remain important problems because they affect yields and involve the consumption of large amounts of energy and water.² Furthermore, the sustainability of the industrial process to produce biodiesel is clearly questionable. In this respect, important effort is being put into developing acidic^{3a,b} or basic^{3c,d} heterogeneous catalysts for biodiesel synthesis in order to improve the efficiency of the process. However, to date, moderate results have been obtained, *e.g.* a 42% biodiesel yield was obtained from a 1/20 (w/w) oil-methanol mixture using a silica-supported guanidine catalyst under continuous operation in a 50 bar N₂ pressure atmosphere and at 126 °C.^{3e}

Because of their high catalytic activity and selectivity, the use of enzymes as catalysts for biodiesel synthesis by methanolysis of triglycerides is regarded as the perfect solution to the problems associated with conventional chemical-catalysed processes. Enzymatic synthesis of biodiesel occurs under mild conditions (40–60 °C), giving clean biodiesel and a nearly pure glycerol by-product. Thus, the sustainability of the process is clearly increased by minimising both energy consumption and waste generation, as well as by improving the overall processing costs through the possible marketability of the resulting high-quality glycerol.⁴

The main hurdle to the industrial application of the biocatalytic production of biodiesel is the cost of enzymes, making it necessary to develop processes that ensure complete recyclability and stability over time. As the use of immobilized biocatalysts permits their easy separation and recycling, several approaches for enzyme immobilization onto solid supports have been developed.⁵ By using advanced materials, such as a sol-gel mesoporous matrix,^{6a} silica-based biohybrid monolithic foam,^{6b} silica nanoparticles with oil-filled core-shell,^{6c} magnetic nanoparticles,^{6d} or a polymeric matrix containing supported ionic liquid-like phases (SILLPs),^{6e} it has been possible to obtain active and stable immobilized lipase derivatives for biodiesel synthesis.

However, the key feature that limits the catalytic efficiency of any transesterification process to synthesize biodiesel is the non-miscibility of the triglycerides and the methanol substrates. The resulting vegetable oil-alkanol biphasic systems strongly reduce reaction rates and, in the case of biocatalysis, this also causes full enzyme deactivation as a result of the direct interaction between the catalytic protein and the methanol phase. Furthermore, as the final reaction products, *i.e.* glycerol and biodiesel, are not mutually miscible this phenomenon also leads to the low catalytic efficiency and deactivation of the immobilized enzyme due to poisoning as a result of the adsorption of the continuously formed glycerol by-product onto the support.^{4,5,7}

Two different approaches have usually been applied to solve these constraints: controlled methanol addition and solvent engineering. The stepwise addition of methanol allowed us to achieve up to 90% biodiesel yield in a 24 h period, including recycling of the enzyme for six times.^{8a} Methanol storage by adsorption onto silica gel particles, which act as

“microreservoirs” that slowly release the alcohol needed for the enzymatic transesterification process, provides up to 94% biodiesel yield in 18 h reaction and, furthermore, the biocatalyst is recycled.^{8b} Concerning the solvent engineering approach, the addition of organic co-solvents that result in suitable monophasic reaction systems is the most simple and widely used strategy to improve the catalytic efficiency in biodiesel synthesis. For example, a vegetable oil-methanol biphasic mixture becomes monophasic by the addition of 37.5% (w/w) *t*-butanol, allowing the Novozym 435 biocatalyst to reach up to 97% biodiesel yield after 20 h at 50 °C.^{8c} When KOH was used as a catalyst, the addition of a 25% (w/w) volatile organic solvent (*e.g.* acetone, isopropyl alcohol, THF or acetone, *etc.*) to the oil-methanol mixture also resulted in a monophasic system in which biodiesel synthesis reached 98% yield in a 15 min reaction at 20 °C.^{8d} In the same way, addition of 50% (w/w) heptane to the sunflower oil-ethanol mixture was used to obtain a monophasic reaction system suitable for continuous pumping through a reactor column containing immobilized lipase onto a monolithic foam, although the biodiesel yield was low (40%) and the enzymatic activity continuously decayed with operation time.^{8e} In addition to increasing production costs, the use of volatile organic solvents as co-solvents in biodiesel synthesis must be regarded as a clear breakdown in the greenness of the process, going in the opposite direction to the search for green solvents that can easily be recovered and recycled.⁹

Supercritical carbon dioxide (scCO₂) is a green solvent that has been applied in biocatalytic biodiesel synthesis.^{10a} This solvent provided a single corn oil-methanol liquid phase at pressures above the critical pressure of CO₂, but not a monophasic system.^{10b} However, the continuous biocatalytic synthesis of biodiesel in scCO₂ (20 MPa, 40 °C) has been successfully carried out by pumping the vegetable oil and methanol substrates separately into a static mixer placed at the reactor inlet, allowing up to 99% biodiesel yield in continuous operation.^{10c}

Since 2000, ionic liquids (ILs) have emerged as exceptionally non-aqueous green reaction media because of their unique solvent properties, headed by their negligible vapour pressure,¹¹ and their exceptional ability to stabilize enzymes.^{9,12} The use of ILs as reaction media for lipase-catalyzed biodiesel synthesis has also been reported. In all cases, the use of ILs based on cations with short alkyl-side chains (*e.g.* 1-butyl-3-methylimidazolium) provided moderate catalytic activity because of the resulting biphasic reaction media, formed by an alcohol-IL phase immiscible with a vegetable oil phase.¹³ In this way, among the 23 ILs tested for immobilized lipase-catalyzed biodiesel synthesis, the best yield (80%) was achieved in the 1-ethyl-3-methylimidazolium trifluoroacetate IL after 12 h at 50 °C, which did not increase at longer reaction times.^{13a} However, these results were improved by using the hydrophobic IL [Bmim[NTf₂]] as a reaction medium, which provided a 96% biodiesel yield after 48 h at room temperature.^{13b} An additional improvement in biocatalytic activity was observed using 80% (w/w) methyltrioctylammonium trifluoroacetate, as a mid-sized alkyl-side chain IL, as a reaction medium for the

lipase-catalyzed butanolysis of triolein at 35 °C. Under these conditions, the higher hydrophobicity of both the IL cation based on three octyl chains and the acyl acceptor (1-butanol), compared with methanol in the above examples, resulted in a monophasic reaction medium that allowed up to 85% butyl oleate yield after 8 h reaction.^{13c}

It has been demonstrated how highly hydrophobic ILs based on an imidazolium cation with a long alkyl-side chain (e.g. 1-methyl-3-octadecylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, [C₁₈mim][NTf₂]) were able to dissolve both triolein and methanol at any concentration, providing one-phase reaction media that showed excellent suitability for the biocatalytic synthesis of biodiesel, *i.e.* up to 96% yield in 6 h at 60 °C. Furthermore, the excellent suitability of the enzyme–IL system for biodiesel synthesis was also demonstrated by the total preservation of the catalytic activity for subsequent reuse. However, the proposed way to extract the synthesized biodiesel from the IL phase using organic solvents is a clear breakdown point considering the cost and the sustainability of the approach.¹⁴ Biocatalysis in IL–scCO₂ biphasic systems is an efficient tool for designing continuous clean biocatalytic processes that directly provide pure products.⁹ The clean and continuous biocatalytic synthesis of biodiesel (95% yield) in scCO₂ (18 MPa and 60 °C) was reported using fixed bed reactors based on either immobilised enzyme particles coated with [C₁₈mim][PF₆]¹⁵ or immobilized enzymes on SILLPs with covalently attached IL moieties.^{6e} However, despite the greenness of such approaches based on supercritical fluids, their industrial application may be doubtful mainly because of the excessive cost of high-pressure equipment.

Another interesting feature of hydrophobic ILs with long alkyl side-chains is the possibility of switching from the solid to the liquid phase at temperatures compatible with enzyme catalysis (e.g. 53 °C for [C₁₈mim][NTf₂],^{14b} 64 °C for [C₁₆tma][NTf₂],¹⁶ *etc.*, see Fig. 1B), which has recently been applied to develop an easy approach for producing nearly pure flavour esters in two steps. In this approach, the esterification between a carboxylic acid (e.g. acetic acid) and a flavour alcohol (e.g. geraniol) occurs through the enzyme action in the switchable IL as a liquid phase, resulting in a nearly 100% product yield. Then, the pure product is separated from the IL phase following a cooling/centrifugation protocol, providing up to 0.757 g mL⁻¹ of IL-free product.

This paper demonstrates for the first time how to produce biodiesel by means of a straightforward and fully green biocatalytic approach based on the sponge-like behaviour of *N*-alkyl-*N'*,*N''*,*N'''*-trimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C_{*n*}tma][NTf₂]) ILs having a long alkyl side-chain in their cation, as switchable ionic liquid/solid phases. The suitability of these ILs as reaction media for immobilized lipase-catalyzed methanolysis of triolein is studied first. Then, a simple protocol to separate both the biodiesel and the glycerol products as well as to recover and reuse the enzyme–IL system is described, demonstrating both the sponge-like behaviour of these ILs and the suitability of the proposed approach as a sustainable biocatalytic process for producing biodiesel on an industrial scale.

2 Experimental

Immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym® 435, EC3.1.1.3) was from Novozymes S.A. (Spain). Triolein (65% or 99% purity), methyl oleate (99% purity), solvents and other chemicals were from Sigma-Aldrich-Fluka (Madrid, Spain). The ILs, butyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₄tma][NTf₂], 99% purity), dodecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₂tma][NTf₂], 99% purity), tetradecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₄tma][NTf₂], 99% purity), hexadecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₆tma][NTf₂], 99% purity) and octadecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([C₁₈tma][NTf₂], 99% purity) were obtained from IoLiTec GmbH (Germany). The melting points of ILs were determined by using a Reichert Thermovar melting point apparatus equipped with a microscope and were uncorrected. The densities of solid ILs were determined by filling a 10 mL pycnometer with ILs in the liquid phase at 60 °C and then cooled to 25 °C.¹⁶

Phase behaviour of [C_{*n*}tma][NTf₂]-substrates and [C_{*n*}tma][NTf₂]-biodiesel mixtures

Different amounts (0.09, 0.18, 0.29, 0.44, 0.60 and 0.67 g, respectively) of ILs (*i.e.* [C₄tma][NTf₂], [C₁₂tma][NTf₂], [C₁₄tma][NTf₂], [C₁₆tma][NTf₂] or [C₁₈tma][NTf₂]) were added to six different screw-capped vials with teflon-lined septa (1.5 mL total capacity). Then, variable amounts of methanol (0.16, 0.14, 0.12, 0.09, 0.06, and 0.04 g) were dissolved in the ILs. Finally, the corresponding amounts of triolein were added to each tube in order to obtain the following IL–methanol–triolein ternary mixtures (w/w/w): A, 9.1/16.2/74.7; B, 18.5/14.6/66.9; C, 31.0/12.3/56.7; D, 47.6/9.4/43.0; E, 63.8/6.5/29.7; F, 73.7/4.2/22.1. In all cases, the triolein : methanol ratio was 1 : 6 (mol/mol). The resulting mixtures were incubated, shaking for 1 h at 60 °C. In the case of methyl oleate (biodiesel), the phase behaviour was tested for the following IL–methyl oleate binary mixtures (w/w, 1 g total mass): A, 10/90; B, 20/80; C, 33/67; D, 50/50; E, 66/34 and F, 75/25 (see ESI†).

Novozym 435-catalyzed methanolysis of triolein in [C_{*n*}tma][NTf₂] ILs

For each IL (*i.e.* [C₄tma][NTf₂], [C₁₂tma][NTf₂], [C₁₄tma][NTf₂], [C₁₆tma][NTf₂], or [C₁₈tma][NTf₂]), triolein (0.36, 0.23 or 0.11 mmol) was added into three different screw-capped vials (1.0 mL total capacity) containing 77, 224 or 348 mg of IL and methanol (2.18, 1.37 or 0.69 mmol). The resulting mixtures at a 1/6 (mol/mol) triolein–methanol ratio gave the following IL–triolein–methanol ratios (w/w/w): 16.4/68.7/14.9; 47.7/43.0/9.3; 73.9/21.4/4.7, respectively. For each case, the mixture was previously incubated in an orbital shaker (IKA KS4000i, Germany) for 30 min at 1000 rpm and at 60 °C to melt the IL. The reaction was started by adding Novozym 435, 18% (w/w) with respect to the amount of triolein, and the reaction system was incubated at 60 °C for 8 h. At regular intervals, 20 μL aliquots were taken and suspended in 480 μL dodecane–isopropanol

(95 : 5, v/v) solution, and the resulting biphasic mixtures were strongly shaken for 3 min, and then centrifuged at 15 000 rpm for 10 min to extract biodiesel. Finally, 350 μL of dodecane–isopropanol extracts (upper phase) were added to 150 μL of 100 mM ethyl decanoate and 100 mM tributyrin (internal standards) solution in dodecane–isopropanol (95 : 5, v/v), and the final solution was analyzed by CG. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of methyl oleate per min (see ESI†). All experiments were carried out in duplicate.

GC analysis

GC analysis was performed with a Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Europe, Germany) equipped with an FID detector. Samples were analyzed on a TRB-BIODIESEL capillary column (10 m \times 0.28 mm \times 0.1 μm , Teknokroma, Spain), using both ethyl decanoate and tributyrin as internal standards, under the following conditions: carrier gas (He) at 28.6 kPa (40 mL min^{-1} total flow); temperature programme 100 $^{\circ}\text{C}$, 10 $^{\circ}\text{C} \text{ min}^{-1}$, 200 $^{\circ}\text{C}$, 15 $^{\circ}\text{C} \text{ min}^{-1}$, 370 $^{\circ}\text{C}$; variable split ratio (80 : 1 to 10 : 1); detector, 220 $^{\circ}\text{C}$.¹⁵

Enzyme stability in IL–triolein mixtures

A set of 4 mL screw-capped vials with teflon-lined septa containing the same amounts of triolein (0.45 mmol, 404 mg) and IL (*i.e.* $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ or $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$) (448 mg) were prepared. The vials were incubated in a thermo block for 30 min at 60 $^{\circ}\text{C}$ until homogeneous and fully clear solutions were observed. To each vial, Novozym 435 (73 mg) was added, and the resulting mixtures were maintained at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 100 days. At different incubation times, methanol (2.7 mmol, 87 mg) was added to a given vial, and the biocatalytic synthesis of biodiesel was performed as described above.

Cooling/centrifugation protocol for biodiesel extraction from sponge-like ILs

A set of 2 mL vials containing 55/45 (w/w) methyl oleate–IL (*i.e.* $[\text{C}_{12}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, $[\text{C}_{14}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ or $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, respectively) (1 g total mass) mixtures were prepared, and then incubated under shaking for 15 min at 60 $^{\circ}\text{C}$, which produced fully clear monophasic liquid systems. Then, the vials were cooled to room temperature, and the resulting heterogeneous mixtures were consecutively centrifuged three times at 15 000 rpm (50 min) and at room temperature (non-controlled), 23 and 15 $^{\circ}\text{C}$, respectively, resulting in a top liquid phase of methyl oleate and a bottom solid phase containing IL. To a second set of vials containing identical methyl oleate–IL homogeneous mixtures at 60 $^{\circ}\text{C}$, hot water (0.5 mL, 60 $^{\circ}\text{C}$) was added to each sample (washing-by-water step), and the resulting multiphase solutions were vigorously shaken for 60 min at 60 $^{\circ}\text{C}$, and then cooled to room temperature. The methyl oleate–water–IL multiphase mixtures were centrifuged as described above, resulting in three phases, as follows: a top liquid phase of methyl oleate, an aqueous middle phase and a bottom phase containing solid IL. The top phases were collected and quantified using a mass balance. In the case of $[\text{C}_{12-16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, a

40 μL sample of each top liquid phase was dissolved in 0.5 mL acetone- δ_6 containing trifluoroacetic acid (TFA, 10 μL) as internal standard, while for the $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ case, an 80 μL sample of top phase was dissolved in 340 μL acetone- δ_6 containing TFA (80 μL) as internal standard. The samples were analyzed by 188 MHz ^{19}F NMR using a Bruker AC 200E spectrometer, and the residual IL was quantified with respect to standard IL solutions (*i.e.* $[\text{C}_{12}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, $[\text{C}_{14}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ or $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, respectively) in acetone- δ_6 containing TFA.

Extraction of glycerol and methanol from a model reaction mixture in $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ ILs

The extraction of glycerol and methanol from a model final reaction mixture containing glycerol–methyl oleate–methanol (1/3/3, molar ratio) in $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ was carried out using the cooling/centrifugation protocol with water added as described above. The reaction mixture was prepared by adding methyl oleate (1.5 mmol), glycerol (0.5 mmol), methanol (1.5 mmol) and 450 mg IL $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ into a 2 mL vial, and the mixture was incubated under shaking for 30 min at 60 $^{\circ}\text{C}$, which gave a homogeneous solution. Then 0.5 mL D_2O at 60 $^{\circ}\text{C}$ were also added, and the resulting heterogeneous mixture was incubated in a orbital shaker (IKA KS4000i, Germany) for 30 min at 300 rpm and at 60 $^{\circ}\text{C}$. Finally, the mixture was subjected to the cooling/centrifugation protocol, as described above, and the resulting three fractions were carefully collected. Samples (80 μL) from each of the three phases were dissolved in 340 μL acetone- δ_6 containing TFA (80 μL , IS), then 300 MHz ^{13}C NMR spectra were recorded in a Bruker AC 300E. In the case of the middle D_2O phase, the samples (80 μL) were also dissolved in 340 μL D_2O containing TFA (80 μL , IS). Standard solutions of glycerol and methanol in either acetone- δ_6 or D_2O , containing TFA, were used for quantification (see ESI†).

Sponge-like behaviour of $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ and $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$

To 2 mL vials, 550 mg methyl oleate and 450 mg IL (*i.e.* $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ or $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$) were added, and the mixtures were incubated under shaking for 15 min at 60 $^{\circ}\text{C}$, obtaining fully clear homogeneous solutions. Then, these solutions were subjected to the cooling/centrifugation protocol with added water for methyl oleate extraction, resulting in three phases as described above. Both the methyl oleate and the aqueous liquid fractions were carefully collected, while the remaining bottom solid phase was recovered and reused to dissolve a new methyl oleate sample (550 mg). The cooling/centrifugation protocol, including the washing-by-water step, was repeated to extract methyl oleate. This iterative dissolving/extracting procedure was carried out for five cycles. The IL concentration in the remaining solid phase from the last cycle was determined by 188 MHz ^{19}F NMR, as described in the previous section.

Biocatalytic production of biodiesel in sponge-like IL systems

Reaction media containing 1/6 (mol/mol) triolein–methanol in 45% (w/w) IL were prepared in 4 mL vials as follows: methanol (6 mmol) and triolein (1 mmol) were added to 885 mg IL

([C₁₈tma][NTf₂] or [C₁₆tma][NTf₂]), and the mixture was shaken (IKA KS4000i, Germany) for 15 min at 300 rpm and at 60 °C until a clear homogeneous phase was observed. The reaction was started by adding the immobilized enzyme (Novozym 435, 150 mg), and the mixture was maintained under shaking for 8 h at 60 °C. Then, the liquid fraction of the reaction medium was fully collected in separate vials, while the remaining immobilized enzyme particles were washed with *t*-butanol (0.2 mL), and then stored at room temperature for further operation cycles. The biodiesel product was extracted from the IL media following the cooling/centrifugation protocol with a washing-by-water step as described above, resulting in an IL-free top liquid phase of biodiesel, a middle aqueous phase containing dissolved glycerol and non-reacted methanol, and a bottom solid phase of IL. Both liquid phases were carefully collected, and the IL solid phase was incubated under vacuum at 80 °C for 4 h for drying. Finally, a new biocatalytic/extraction cycle for biodiesel production was prepared by dissolving the same amounts of triolein and methanol, and then started by adding the immobilized enzyme particles recovered from the previous cycle.

Results and discussion

Phase behaviour of the reaction mixture for biodiesel synthesis in [C_{*n*}tma][NTf₂]

The suitability of five different [C_{*n*}tma][NTf₂] (*n* = 4, 12, 14, 16 or 18, respectively) ILs to dissolve a 1/6 (mol/mol) mixture of triolein and methanol, a proportion often considered as optimum for lipase-catalyzed biodiesel synthesis,^{8,14,15} was studied. For each IL, six different IL–triolein–methanol ternary mixtures were considered (see Table 1) at 60 °C, a temperature suitable for enzymatic reactions. As can be seen in the ESI†, all the assayed IL–triolein–methanol ternary mixtures were liquid at 60 °C, even though both the [C₁₆tma][NTf₂] and [C₁₈tma][NTf₂] ILs have melting points higher than 60 °C. Nevertheless, the ability of these ILs to solubilise the triolein–methanol mixture was clearly dependent on the length of the alkyl side-chain of the ammonium cation. Thus, [C₄tma][NTf₂] and [C₁₂tma][NTf₂] always provided biphasic systems at all the assayed concentrations and they were unable to dissolve triolein. However, the triolein–[C₁₄tma][NTf₂] mixture resulted in a monophasic system at the highest IL concentration (case F). Thus, a further

increase in the alkyl side-chain of the ammonium cation to C₁₆ or C₁₈ allowed us to reduce the minimum IL content in the mixture necessary to give a fully clear monophasic medium. Thus, [C₁₆tma][NTf₂] provided monophasic mixtures for all IL concentrations higher than 60% (w/w) (cases E and F), while the triolein–[C₁₈tma][NTf₂] mixture became monophasic at IL concentrations as low as 15% (w/w). A similar study of the miscibility of the reaction products obtained in biodiesel synthesis (methyl oleate and glycerol) with these hydrophobic ILs was also carried out. The glycerol by-product was always non-miscible at all concentrations in the assayed hydrophobic ILs, probably because of its high hydrophilic character, whereas the phase behaviour of IL–methyl oleate mixtures always resulted in fully clear monophasic systems at all the assayed concentrations (see ESI†). Hydrophobic interactions between alkyl chains of both methyl oleate and IL should be involved in their total in agreement with the rule “like-dissolves-like”, as was also observed for the case of ILs based on imidazolium cations with long alkyl side-chains.¹⁵ It should also be noted how monophasic liquid media were observed at a temperature (60 °C) lower than melting points of the most hydrophobic ILs, which might be related to a decrease in the hydrophobic interactions between ammonium cation moieties, resulting from the “housing” of these hydrophobic compounds with long alkyl chains (*i.e.* triolein or methyl oleate) inside the IL network.¹⁶ These results clearly show how both the triolein and the methanol substrates for biodiesel synthesis can be homogeneously distributed as a monophasic system, or heterogeneously, as a biphasic system, as a function of both the length of the alkyl chain of the ammonium cation and the IL concentration. In this context, the resulting phase behaviour in substrate–IL and product–IL mixtures is almost certainly involved in the performance of the biocatalytic synthesis of biodiesel.^{13–15}

Lipase-catalyzed methanolysis of triolein in [C_{*n*}tma][NTf₂] ILs

The biocatalytic synthesis of biodiesel was carried out through methanolysis of triolein in these five different [C_{*n*}tma][NTf₂] (*n* = 4, 12, 14, 16 or 18, respectively) ILs as reaction media at 60 °C, using a 1/6 triolein–methanol molar ratio as a substrate. Fig. 2A shows the resulting reaction media after 8 h reaction at a 47.7% (w/w) IL concentration. As can be seen, a totally clear monophasic system with precipitated immobilized enzyme particles resulted for all ILs, except in the case of [C₄tma][NTf₂]. In agreement with its inability to dissolve triolein, this IL provided a biphasic system throughout the course of the reaction, with enzyme particles placed at the interphase. However, in the case of [C₁₂tma][NTf₂] and [C₁₄tma][NTf₂], the initial biphasic behaviour became monophasic after 1 h of reaction. These different phase behaviours may be related to the suitability of ILs for enzyme catalysis. In this way, Fig. 2B depicts the time courses of Novozym 435-catalyzed biodiesel synthesis in these [C_{*n*}tma][NTf₂] ILs at 60 °C. As can be seen, the biodiesel yield continuously increased with reaction time for all the assayed ILs, which pointed to their suitability as reaction media. Nevertheless, the biodiesel yield after 8 h reaction was close to

Table 1 Physical parameters of alkyltrimethylammonium [NTf₂] ILs and the phase behaviour of different IL–triolein–methanol mixtures at 60 °C. A, 9.1/16.2/74.7; B, 18.5/14.6/66.9; C, 31.0/12.3/56.7; D, 47.6/9.4/43.0; E, 63.8/6.5/29.7; F, 73.7/4.2/22.1 (w/w/w)

Ionic liquid	<i>T</i> _m (°C)	Density ^a (g mL ⁻¹)	A	B	C	D	E	F
[C ₄ tma][NTf ₂]	–18	1.395	LL	LL	LL	LL	LL	LL
[C ₁₂ tma][NTf ₂]	36	1.111	LL	LL	LL	LL	LL	LL
[C ₁₄ tma][NTf ₂]	52	1.074	LL	LL	LL	LL	LL	L
[C ₁₆ tma][NTf ₂]	64	1.054	LL	LL	LL	LL	L	L
[C ₁₈ tma][NTf ₂]	74	1.034	LL	L	L	L	L	L

^a L: monophasic liquid medium; LL: liquid–liquid biphasic medium.

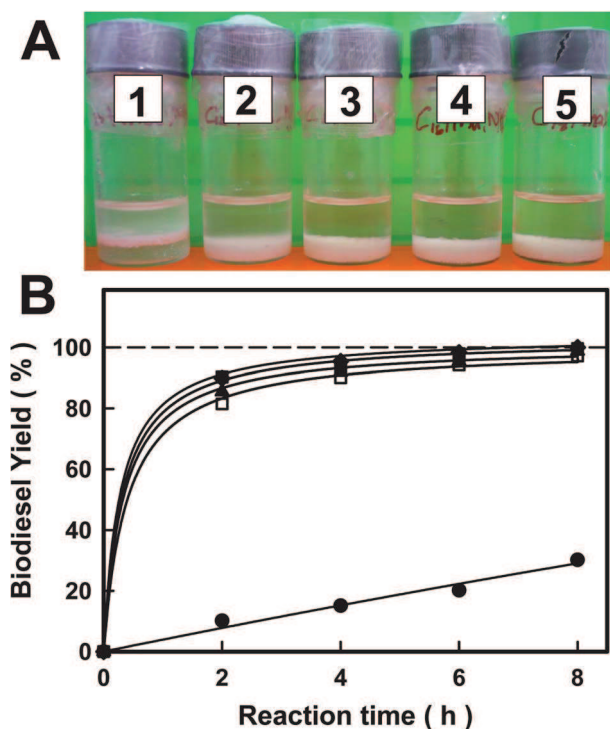


Fig. 2 Time course profiles shown by Novozym 435 (38 mg)-catalyzed methyl oleate (biodiesel) synthesis by transesterification of triolein (0.24 mmol) with methanol (1.44 mmol) in 47% (w/w) IL (◆, [C₁₈tma][NTf₂]; ■, [C₁₆tma][NTf₂]; ▲, [C₁₄tma][NTf₂]; □, [C₁₂tma][NTf₂]; and ●, [C₄tma][NTf₂]) at 60 °C.

100% for all ILs that provided monophasic systems, slightly increasing with the length of the alkyl chain of the ammonium cation (*i.e.* [C₁₈tma] > [C₁₆tma] > [C₁₄tma] > [C₁₂tma]). However, the biphasic system provided by [C₄tma][NTf₂] resulted in low biodiesel yield (24.1%) for the same reaction time. Other authors also observed the low biocatalytic efficiency of immobilized lipases for biodiesel synthesis when 40% (w/w) [C_nmim][NTf₂] ILs with a short alkyl side chain in the imidazolium cation were used as reaction media, providing biphasic reaction systems.¹³ Thus, Ha *et al.* observed how biodiesel yield improved practically three-fold by using imidazolium ILs of increasing length in the alkyl side-chain from C2 to C8, a yield up to 50% biodiesel being possible after 48 h reaction at 60 °C with [C₈mim][NTf₂].^{13a} In the same way, the use of hydrophobic ILs based on cations with long alkyl side-chains (*e.g.* 64% w/w [C₁₈mim][NTf₂]), which are able to provide monophasic reaction media, provided an excellent biocatalytic efficiency for biodiesel synthesis (up to 96% yield after 6 h at 60 °C).^{14b}

The IL concentration in the catalytic activity of immobilized lipase for methanolysis of triolein was also studied. Table 2 shows the resulting biodiesel yield after 8 h reaction for six different [C_ntma][NTf₂] ILs at three different concentrations, *i.e.* 17, 47 and 74% w/w, respectively. As can be seen, an increase in the concentration of [C₄tma][NTf₂], which always provided biphasic reaction mixtures, resulted in a slight improvement in biodiesel yield (from 10.1 to 30.2%). In the same way, when the hydrophobic [C_{12–18}tma][NTf₂] ILs were assayed at the lowest concentration (17% w/w) which also resulted in biphasic

Table 2 Influence of the nature of [1-alkyl trimethylammonium][NTf₂] ILs on the biodiesel yield obtained by the methanolysis of triolein (0.36, 0.24 or 0.12 mmol; 1 : 6 triolein : methanol molar ratio) catalyzed by Novozym 435 (160 mg mmol⁻¹ triolein) in 17 (A), 47 (B) or 74% (w/w) IL (C), respectively, during 8 h reaction at 60 °C. See ESI†

Ionic liquid	Biodiesel yield ^a (%)			Activity ^b (U g ⁻¹)
	A	B	C	
[C ₄ tma][NTf ₂]	10.1	24.1	30.2	11.3
[C ₁₂ tma][NTf ₂]	20.2	92.6	96.8	331.1
[C ₁₄ tma][NTf ₂]	22.3	98.8	98.1	396.1
[C ₁₆ tma][NTf ₂]	29.4	99.1	99.5	404.1
[C ₁₈ tma][NTf ₂]	31.3	99.7	100	420.2

^a SD < 1%. ^b For 47% (w/w) IL.

reaction media (see ESI†), moderate biodiesel yields (up to 31.3%) were obtained. However, by increasing the concentration of these [C_{12–18}tma][NTf₂] ILs that gave monophasic media, almost total biotransformation of triolein to methyl oleate was observed in all cases after 8 h reaction. Some slight improvements were observed with an increase in both the length of the alkyl chain and the IL concentration, the best results (420 U g⁻¹ enzyme activity, 100% biodiesel yield after 8 h reaction) being obtained with [C₁₈tma][NTf₂].

ILs have been defined as nano-structured reaction media which allow hydrophobic molecules (*i.e.* triolein) to reside in less polar regions, and polar species (*i.e.* methanol) to undergo faster diffusion in the more polar regions.^{9,17} Thus, a larger alkyl side-chain for the IL and a higher concentration of the same should be related to a better molecular organisation of substrates for biodiesel synthesis in reaction media.¹⁴ In the same context, it was also reported how this extremely ordered supramolecular structure of ILs in a liquid phase might also be able to act as a “mould”, stabilizing the active 3-D structure of the enzyme in these non-aqueous nano-environments.^{9,18} The increase in both the IL content and the length of the alkyl chain of the cation, which resulted in fully clear monophasic media, could be regarded as an improvement in the molecular organization of the reaction medium. In monophasic systems, the direct interaction between denaturing methanol molecules with the enzyme is minimised, while the mass-transport efficiency of hydrophobic substrates with long alkyl chains (*e.g.* triolein) towards the enzyme microenvironment is enhanced, and so the overall catalytic efficiency for biodiesel synthesis is greatly improved with respect to biphasic systems.¹⁵

The complete recyclability and stability of biocatalysts are key targets for the industrial scale of biocatalytic synthesis of biodiesel. Fig. 3 shows the residual activity profile of the immobilized lipase for long incubation times in 1/1 (w/w) triolein-IL (*i.e.* [C₁₆tma][NTf₂] or [C₁₈tma][NTf₂], respectively) solutions at 60 °C. As can be seen, the enzyme showed a similar profile of activity decay for [C₁₄tma][NTf₂], [C₁₆tma][NTf₂] and [C₁₈tma][NTf₂] ILs, resulting in approx. 90% residual activity after 100 days incubation. These monophasic systems based on ILs with a long alkyl chain were seen to be excellent for preserving the catalytic activity of the enzyme under operational

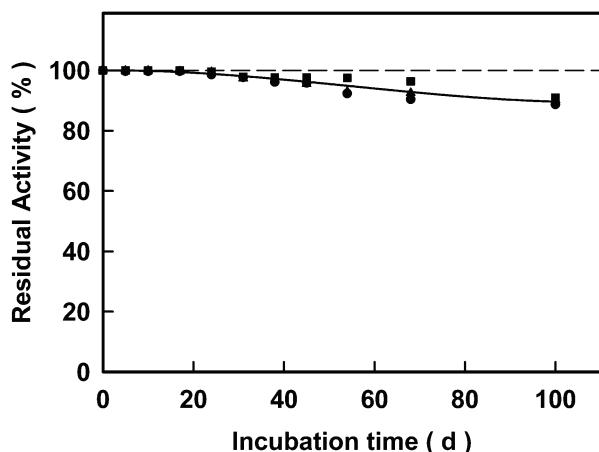


Fig. 3 Residual activity shown by Novozym 435 after incubation in 50/50 (w/w) triolein-IL (■, [C₁₈tma][NTf₂]; ▲, [C₁₆tma][NTf₂]; ●, [C₁₄tma][NTf₂]) mixtures at 60 °C. See Experimental section for further details.

conditions during biodiesel synthesis, with half-lives of up to 1370 days obtained using a first order deactivation kinetic approach.^{12a} These results agree with the widely reported ability of hydrophobic ILs to over-stabilize enzymes,^{9,12,18} but are much better than any other result described for the enzymatic synthesis of biodiesel.^{13–15}

Biodiesel extraction from monophasic solutions in ILs

Another essential target for developing an industrial process for the biocatalytic synthesis of biodiesel in this kind of system is a method for extracting the biodiesel product from the IL in a straightforward and sustainable way, allowing full recovery and reuse of the IL. Taking into account the melting points of these [C_{12–18}tma][NTf₂] ILs (see Table 1), an easy protocol for methyl oleate extraction was developed, based on the sponge-like behaviour of switchable ionic liquid/solid phases.¹⁶ As can be seen in Fig. 4A, the (55/45, w/w) methyl oleate-IL (*i.e.* [C₁₂tma][NTf₂], [C₁₄tma][NTf₂], [C₁₆tma][NTf₂] or [C₁₈tma][NTf₂], respectively) mixtures, which are fully clear monophasic systems at 60 °C, became monophasic solid systems after cooling to room temperature, except for [C₁₂tma][NTf₂] (Fig. 4B). Then, each solid phase was separated into two phases, an upper liquid containing methyl oleate and a bottom solid containing the IL, by following an iterative cooling/centrifugation protocol of three steps (50 min, 15 000 rpm) at room temperature (non-controlled), 23 and 15 °C, respectively (Fig. 4C). Table 3 shows the biodiesel yield recovered for each assayed methyl oleate-IL mixture, as well as the residual IL content in this liquid phase, as determined by ¹⁹F NMR spectroscopy. The increase in the alkyl chain of the ammonium cation IL resulted in a decrease in the biodiesel yield extracted from the solid IL fraction (from 59.8 to 39.8% yield), as well as an improvement in the purity of the extracted biodiesel fraction (residual IL content was from 0.67 to 0.1% w/w). In preliminary experiments using a unique centrifugation step at room temperature, 23 or 15 °C, it was observed how the resulting top liquid phase became solid after incubation in an ice bath

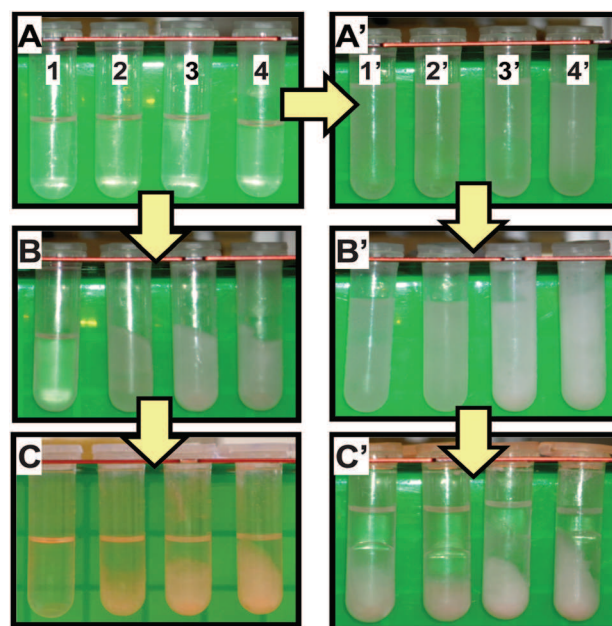


Fig. 4 Phase behaviour of 55/45 (w/w) methyl oleate-[1-alkyl trimethylammonium][NTf₂] (1 and 1', [C₁₂tma][NTf₂]; 2 and 2', [C₁₄tma][NTf₂]; 3 and 3', [C₁₆tma][NTf₂]; 4 and 4', [C₁₈tma][NTf₂]) mixtures at 60 °C (A), after addition of H₂O at 60 °C (A'), after cooling to 25 °C (B and B'), and after three consecutive centrifugation steps at 15 000 rpm (1 h) and at room temperature, 23 and 15 °C (C and C'). See Experimental section for further details.

because of the residual IL content. This phenomenon was not observed using the proposed iterative cooling/centrifugation protocol, which it allows nearly IL-free methyl oleate to be recovered by simple decantation.

These results might be explained as a function of the structural organization of these hydrophobic ILs in both the solid and liquid phases. Recently it has been reported how [C₁₆tma][NTf₂] IL is able to dissolve terpene esters (*e.g.* geranyl acetate) to give fully clear monophasic solutions at 50 °C, but solid phases at room temperature with a sponge-like behaviour that permits fragrance extraction by a cooling/centrifugation protocol.¹⁶ In the case of biodiesel, these switchable ionic liquid/solid phases seem to “soak up” this biofuel as a liquid phase and can then be “wrung out” by the action of centrifugal force in the solid phase. In agreement with this hypothesis, Hayes *et al.* showed that the propylammonium nitrate IL self-assembles into a quasi-periodic bicontinuous nanostructure reminiscent of an amphiphilic L₃-sponge phase, as determined by neutron diffraction.^{19a} Thus, the structure of this IL consists of two interpenetrating networks of polar (nitrate and ammonium groups) and non-polar propyl chains, showing a nanoscale heterogeneity as a result of cation alkyl chain aggregation into non-polar domains through a solvophobic effect, which is larger than that observed for ethylammonium nitrate.^{19b} Zhang *et al.*²⁰ studied the tribological behaviour of the 1-methyl-3-hexadecylimidazolium tetrafluoroborate IL crystal as an additive of liquid paraffin, reporting how this IL (m.p. 49 °C)¹⁵ is transformed from the solid state to the liquid crystalline phase at 80 °C, the IL molecules being arranged in layers with their long molecular axes parallel to each other, providing excellent tribological

Table 3 Influence of the alkyl chain length of $[C_n\text{tma}][\text{NTf}_2]$ ILs on the methyl oleate (MO) yield extracted from 55/45 (w/w) MO–IL mixtures (1 g total mass) by using the cooling/centrifugation protocol with or without addition of water. The residual IL content in the recovered biodiesel was determined by ^{19}F NMR. (See Experimental and ESI† sections for further details)^a

Ionic liquid	Without H ₂ O		With H ₂ O	
	Biodiesel yield (%)	Residual IL (%)	Biodiesel yield (%)	Residual IL (%)
$[\text{C}_{12}\text{tma}][\text{NTf}_2]$	—	—	67.2	3.45
$[\text{C}_{14}\text{tma}][\text{NTf}_2]$	59.8	0.64	52.1	0.23
$[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$	41.5	0.55	51.8	0.23
$[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$	39.8	0.06	48.9	n.d.

^a n.d.: not detected.

properties. As schematized in Fig. 5A, the hydrophobic interactions between methyl oleate molecules and the cation alkyl chain of the IL permits the “sponge to be soaked” in the liquid phase (Fig. 5B). Then, the centrifugation step of the solid mixture allowed us “to wring the soaked sponge” and hence the recovering biodiesel (Fig. 5C). The observed reduction in the extraction yield with increasing length of the cation alkyl chain of IL could be related to a concomitant increase in hydrophobic methyl oleate–IL interactions. As the densities of these ILs (see Table 1) are higher than that of methyl oleate (0.874 g mL^{-1} at 20°C), centrifugation of methyl oleate–IL mixtures at temperatures lower than the IL melting points would enable the biodiesel liquid phase to be easily shifted to the upper phase, the solid sponge-like IL remaining as the bottom phase. Thus, any increase in the melting point of ILs due to an increase in the alkyl chain length of the ammonium cation (see Table 1) should also improve the precipitation of the solid IL phase during the

cooling centrifugation protocol, leading to a lower residual IL content in the extracted biodiesel.

Nevertheless, in an attempt to improve these results, an alternative way of biodiesel extraction, involving an initial washing-by-water step in the liquid phase, was also tested. The addition of water to each monophasic methyl oleate–IL solution at 60°C resulted in heterogeneous mixtures, which were rigorously shaken for 60 min at 60°C (Fig. 4A'), before cooling to room temperature, at which point semisolid heterogeneous mixtures were observed (Fig. 4B'). These mixtures were separated by following the iterative cooling/centrifugation protocol, which then resulted in three phases for all ILs including $[\text{C}_{12}\text{tma}][\text{NTf}_2]$: an upper liquid containing methyl oleate, a middle liquid aqueous phase, and a bottom solid containing the IL. The presence of water, as green molecular solvent non-miscible with methyl oleate or IL, improved the separation between phases, which followed the density parameter (methyl oleate < water < IL). Furthermore, both the biodiesel extraction yield and the residual IL content in the biodiesel fraction were improved for all IL cases, the best results (48.9% biodiesel yield, undetected residual IL content) being obtained for $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$.

In addition to this antisolvent effect of water which favours the separation of biodiesel and IL during the iterative cooling/centrifugation protocol, the use of water is a non-innocent decision in order to provide an easy and sustainable way to separate both glycerol and non-reacted methanol from the biocatalytic reaction mixture. To demonstrate this, a model reaction mixture containing glycerol–methyl oleate–methanol (1/3/3, molar ratio) in $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ was separated using the proposed iterative cooling/centrifugation protocol, including the initial washing-by-water step. ^{13}C NMR analysis of samples from each resulting phase showed that both the initial glycerol and methanol were entirely in the aqueous phase after the separation protocol. Indeed, both the liquid methyl oleate and the solid IL hydrophobic phases were fully free of glycerol by-product (see ESI†).

Despite the excellence (*i.e.* nearly pure and IL-free biodiesel, full IL recovery, *etc.*) of this sustainable and straightforward approach for the separation of biodiesel and glycerol from sponge-like ILs, the low biodiesel extraction yield (51.8% for $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, 48.9% for $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, *etc.*) is a clear limitation for its possible industrial exploitation. The ability of both the $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ and $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ sponge-like ILs “to soak up” biodiesel and then to be “wring” using the centrifugation protocol was studied for five cycles. For each IL, a homogeneous methyl oleate–IL (55/45, w/w) mixture was separated using the proposed cooling/centrifugation protocol, including the initial washing-by-water step. The resulting solid IL phase was iteratively used to dissolve a new methyl oleate sample (550 mg), and the extraction yield was determined at the end of each cycle (see Fig. 6). As can be seen for both ILs, the amount of methyl oleate released from the solid IL phase increased during the three initial operation cycles and then remained constant for the following cycles during which the dissolved methyl oleate was fully extracted. As determined by ^{19}F NMR, the IL ($[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ or $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$) content in the final solid phases were

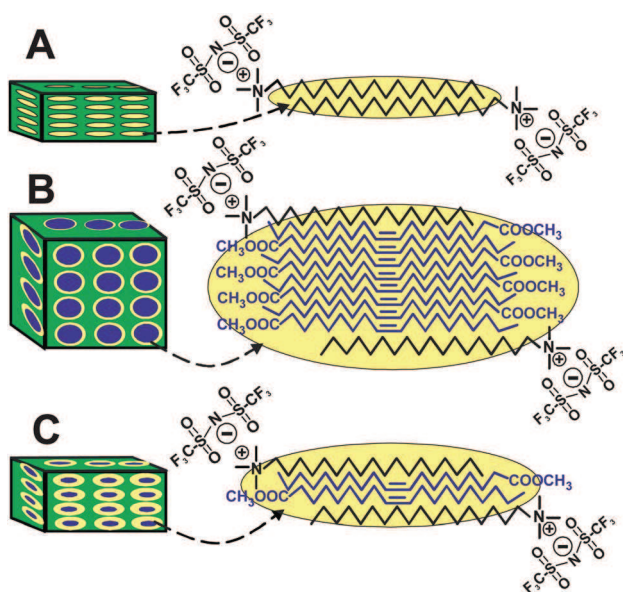


Fig. 5 Schematic representation of the sponge-like IL hypothesis, showing the $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ net as a dry sponge (A), a sponge swollen with methyl oleate (B), and a “wet” sponge after wringing out by centrifugation (C).

76.2 (± 6.1) and 78.0 (± 7.6)% (w/w), respectively (see ESI[†]). These results reflect a sponge-like behaviour, whereby three initial cycles of “soaking/wringing” provide a “wet sponge” able to fully release all the new biodiesel during the centrifugation protocol (see Fig. 5C). In this way, the suitability of the proposed methodology for clean biodiesel separation is confirmed. Increasing centrifugation time and/or speed of the protocol might improve the extraction yields, although the temperature at which centrifugation can be carried out is limited by the melting point of the fatty acid methyl esters present in the biodiesel.

Biocatalytic cyclic production of biodiesel in sponge-like ILs

Two milestones need to be achieved for scaling-up any biocatalytic process for biodiesel production in ILs: high activity and operational stability of the biocatalyst, and the full recovery and recycling of the IL. Fig. 7 shows a cyclic laboratory protocol for the biocatalytic synthesis of biodiesel with reusing the enzyme–IL ($[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ or $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$, respectively) system, where both the phase behaviour of the reaction mixture as a function of temperature and the proposed centrifugation protocol for biodiesel extraction have been taken into account (see Experimental section). In this approach, the reaction mixture is a fully clear monophasic system at 60 °C, but becomes solid below approx. 40 °C. Therefore, the cyclic protocol was established as follows: firstly the biocatalytic step was run using a 1/6 triolein–methanol molar ratio and a 50% (w/w) IL at 60 °C for 8 h. Then, the biocatalyst particles were separated by decantation, and stored for further use, while the liquid reaction medium was mixed with water (1 : 2 v/v), and shaken for 1 h at 60 °C, followed by cooling to room temperature (approx. 25 °C). The resulting heterogeneous mixtures were centrifuged three times (50 min, 15 000 rpm) at room temperature, 25 and 15 °C, to achieve the separation of the mixture into

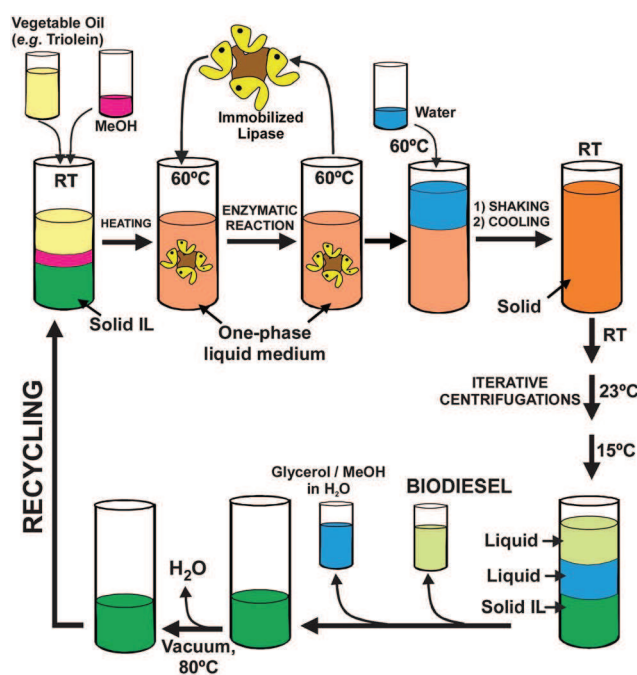


Fig. 7 Cyclic protocol for the biocatalytic synthesis and purification of biodiesel in sponge-like IL phases, including full recovery and reuse of the enzyme–IL system. For details see Experimental section.

three phases, *i.e.* the upper liquid containing biodiesel, the middle aqueous phase containing glycerol and non-reacted methanol, and the bottom solid containing the IL (see the inset of Fig. 8). After collecting both the biodiesel and aqueous liquid phases, the solid IL phase was incubated under vacuum at 80 °C for 3 h to evaporate any remaining water, and a new cycle for biodiesel production was started by adding the corresponding triolein–methanol mixture as well as the immobilized enzyme stored previously.

As can be seen in Fig. 8A, the first cycle permitted full conversion of triolein into biodiesel for both the $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ and $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ ILs, but then the biodiesel yield fell sharply during the next two operation cycles. This seemed to be contrary to the excellent thermal stability observed previously for the immobilized enzyme in these ILs (see Fig. 3). This decay in activity could be related to a continuous poisoning of the biocatalyst particles during operation cycles, due to the non-appropriate release of the glycerol by-product from the enzyme microenvironment towards the bulk hydrophobic reaction medium. Thus, any enzyme particles recovered after three consecutive biocatalytic steps would be coated by a hydrophilic shell preventing the entry of a new triolein substrate in further operation cycles. Washing the enzyme particles with *t*-butanol resulted in a clear enhancement of the biocatalytic activity and excellent biodiesel yield (96–98%) in the fourth cycle, which was maintained practically unchanged for 12 consecutive operation cycles (Fig. 8B).

Two key elements should be considered to explain this excellent operational stability of the immobilized biocatalyst in biodiesel synthesis: the protective effect of hydrophobic ILs and the suitability of the proposed methodology to extract biodiesel

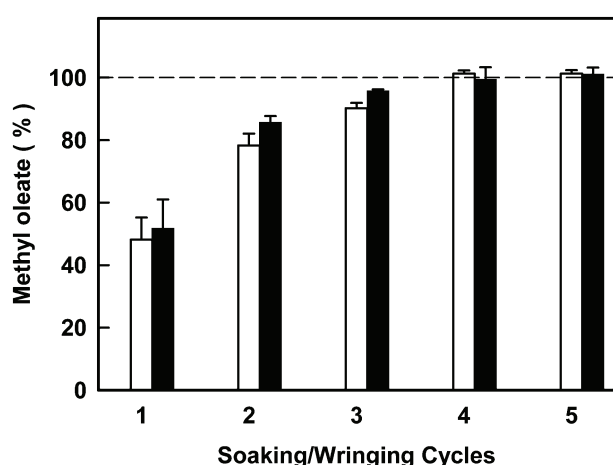


Fig. 6 Methyl oleate (MO) extracted from 55/45 (w/w) MO– $[\text{C}_{18}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ (white bars) or $[\text{C}_{16}\text{tma}][\text{NTf}_2]$ (black bars) sponge-like IL mixtures during five consecutive soak/wring cycles using the cooling/centrifugation protocol with a washing-by-water step. After each cycle, the resulting solid IL phase was used to dissolve a new MO sample (550 mg) at 60 °C. (See Experimental section for further details.)

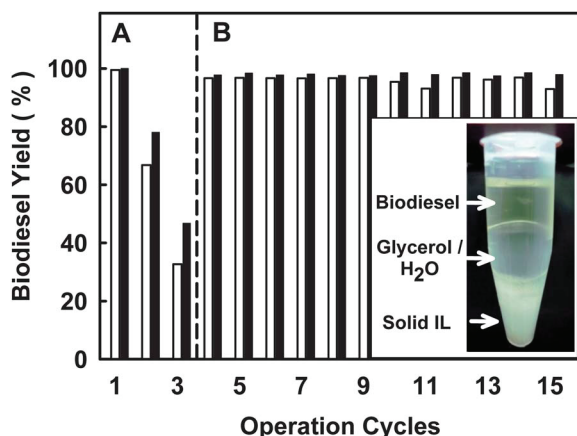


Fig. 8 Recycling protocol of Novozym 435- $[C_{16}tma][NTf_2]$ (white) or $[C_{18}tma][NTf_2]$ (black bars) systems for producing biodiesel by methanolysis of triolein, involving a catalytic step (see Fig. 3 for details), followed by a product separation step (the cooling/centrifugation protocol with addition of water) for each cycle. The recovered immobilized enzyme was directly reused (A), or reused after washing with *t*-butanol (B). As an example, the inset shows the phase behaviour of a reaction system after the separation step. See Experimental section for further details.

and glycerol by an easy and sustainable approach that permits full recovery and reuse of enzyme-IL systems. It has been reported that hydrophobic ILs, based on the $[NTf_2]$ anion and cation with a long alkyl-side chain (e.g. $[C_{18}mim]$,¹⁴ $[C_{16}mim]$,¹⁵ $[C_{16}tma]$,¹⁶ etc.), provide a protective effect on lipase-catalyzed transesterification or esterification reactions in continuous operation, attributable to the maintenance of the native conformation of the protein.^{9,18a} In our case, the microenvironment provided by these sponge-like ILs (e.g. $[C_{18}tma][NTf_2]$) was excellent for the biocatalytic synthesis of biodiesel, resulting in a nearly 100% biodiesel yield because of the homogeneous distribution of both triolein and methanol substrates in a monophasic liquid reaction medium at moderate temperatures (60 °C). Other reported approaches for the biocatalytic synthesis of biodiesel, based on multiphase reaction media with or without ILs, showed poorer results in operational stability.⁶⁻⁸ Furthermore, the proposed green methodology for biodiesel production also includes a straightforward way to extract both biodiesel and glycerol in different fractions from the sponge-like IL by centrifugation. Other proposed approaches based on liquid-liquid extraction with organic solvents (e.g. hexane),¹⁴ or supercritical fluid extraction,^{13c,15} are less interesting for industrial application both from the economic and technical standpoint.

Conclusions

This paper shows for the first time a new straightforward strategy to directly produce biodiesel by a sustainable biocatalytic approach in sponge-like ILs. These hydrophobic ILs, based on the $[NTf_2]$ anion and alkyltrimethylalkylammonium ($[C_{12-18}tma]$) cation, are switchable ionic liquid/solid phases able to dissolve vegetable oils and methanol in a fully clear monophasic liquid phase. Their suitability as reaction media for immobilized lipase-catalyzed biodiesel synthesis was

excellent providing fast and full biodiesel synthesis, which improved with the increasing length of the alkyl side-chain of the IL cation, reaching 100% yield in 8 h and a 1370 days half-life time at 60 °C for $[C_{18}tma][NTf_2]$. Furthermore, clean separation of the reaction products by cooling/centrifugation is proposed. Using this approach, an almost pure biodiesel product was easily obtained, while the recovery and reuse of the biocatalyst-IL system led to a very low decrease in activity because of the ability of these hydrophobic ILs to stabilize enzymes.

The unique properties of hydrophobic ILs, based on cations with long alkyl side chains (e.g. $[C_{18}tma][NTf_2]$), as switchable ionic liquid/solid phases can be extended to include a new feature: their behaviour as sponge-like systems. The sponge-like ILs were able to "soak up" biodiesel as a liquid phase and then could be "wrung out" by centrifugation in a solid phase. These results open up a new way in green chemistry for separating products from reaction media based on ILs. Although further studies on the sponge-like behaviour of these ILs should be carried out, the combination of biocatalysts and this clean separation methodology enhances the possibility of developing green industrial processes.

Acknowledgements

This work was partially supported by MINECO, Spain (Ref.: CTQ2011-28903-C02-02), and SENECA Foundation, Spain (Ref.: 08616/PI/08) grants. We thank Ramiro Martinez (Novozymes España. S.A.) for a gift of Novozym 435.

Notes and references

- For recent review on biodiesel production, see: (a) V. B. Borugadda and V. V. Goud, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2012, **16**, 4763-4784; (b) E. M. Shahid and Y. Jamal, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2011, **15**, 4732-4745; (c) J. Dupont, P. A. Z. Suarez and M. R. Meneghetti, *Energy Environ. Sci.*, 2009, **2**, 1258-1265; (d) R. Luque, J. C. Lovett, B. Datta, J. Clancy, J. M. Campelo and A. A. Romero, *Energy Environ. Sci.*, 2010, **3**, 1706-1721; (e) D. Y. C. Leung, X. Wu and M. K. H. Leung, *Appl. Energy*, 2010, **87**, 1083-1095.
- I. M. Atadashi, M. K. Aroua, A. R. Aziz and N. M. N. Sulaiman, *Appl. Energy*, 2011, **88**, 4239-4251.
- (a) J. M. Melero, J. Iglesias and G. Morales, *Green Chem.*, 2009, **11**, 1285-1308; (b) A. A. M. Lapis, L. F. De Oliveira, B. A. D. Neto and J. Dupont, *ChemSusChem*, 2008, **1**, 759-762; (c) J. M. Balbino, E. W. De Menezes, E. V. Benvenuti, R. Cataluña, G. Ebeling and J. Dupont, *Green Chem.*, 2011, **13**, 3111-3116; (d) K. Faungnawakij, B. Yoosuk, S. Namuangruk, P. Krasae, N. Viriya-empikul and B. Puttasawat, *ChemCatChem*, 2012, **4**, 209-216.
- For recent review on biocatalytic synthesis of biodiesel, see: (a) A. Gog, M. Roman, M. Tosa, C. Paizs and F. Irime, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 2012, **39**, 10-16; (b) P. R. Bisen, B. S. Sanodiya, G. S. Thakur, R. K. Baghel and G. B. K. S. Prasad, *Biotechnol. Lett.*, 2010, **32**, 1019-1030; (c)

- A. Bajaj, P. Lohan, P. N. Jha and R. Mehrotra, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **62**, 9–14; (d) R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **62**, 197–212.
- 5 (a) X. Y. Yang, G. Tian, N. Jiang and B. L. Su, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **5**, 5540–5563; (b) B. H. Zhang, Y. Q. Weng, H. Xu and Z. P. Mao, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **93**, 61–70; (c) T. W. Tan, J. K. Lu, K. L. Nie, L. Deng and F. Wang, *Biotechnol. Adv.*, 2010, **28**, 628–634.
- 6 (a) A. Macario, M. Moliner, A. Corma and G. Giordano, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2009, **118**, 334–340; (b) N. Brun, A. Babeau-Garcia, M. F. Achard, C. Sanchez, F. Durand, G. Laurent, M. Birot, H. Deleuze and R. Backov, *Energy Environ. Sci.*, 2011, **4**, 2840–2844; (c) Y. Kuwahara, T. Yamanishi, T. Kamegawa, K. Mori and M. Che, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 2882–2884; (d) X. Wang, P. Dou, P. Zhao, C. Zhao, Y. Ding and P. Xu, *ChemSusChem*, 2009, **2**, 947–950; (e) P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, J. M. Bernal, D. F. Izquierdo, M. I. Burguete, G. Sanchez-Gomez and S. V. Luis, *ChemSusChem*, 2012, **5**, 790–798.
- 7 (a) Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda and Y. Tominaga, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, **76**, 789–793; (b) P. Wilson, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2009, **29**, 81–93.
- 8 (a) M. M. Soumanou and U. T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 97–103; (b) Y. Luo, G. Wang, Y. S. Ma and D. Z. Wei, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2006, **81**, 1846–1848; (c) D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder and S. Locatelli, *Bioresour. Technol.*, 2007, **98**, 648–653; (d) Y. Maeda, L. T. Thanh, K. Imamura, K. Izutani, K. Okitsu, L. V. Boi, P. N. Lan, N. C. Tuan, Y. E. Yood and N. Takenaka, *Green Chem.*, 2011, **13**, 1124–1128.
- 9 (a) P. Lozano, *Green Chem.*, 2010, **12**, 555–569; (b) P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis, M. Pucheault and M. Vaultier, *Curr. Org. Synth.*, 2011, **8**, 810–823.
- 10 (a) J. M. Bernal, P. Lozano, E. Garcia-Verdugo, M. I. Burguete, G. Sanchez-Gomez, G. Lopez-Lopez, M. Pucheault, M. Vaultier and S. V. Luis, *Molecules*, 2012, **17**, 8696–8719; (b) O. N. Ciftci and F. Temelli, *J. Supercrit. Fluids*, 2011, **58**, 79–87; (c) A. R. Rodrigues, A. Pavia, M. Gomes da Silva, P. Simoes and S. Barreiros, *J. Supercrit. Fluids*, 2011, **56**, 259–264.
- 11 (a) J. Dupont, R. F. de Souza and P. A. Z. Suarez, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 3667–3691; (b) T. Welton, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, **248**, 2459–2477.
- 12 (a) P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1529–1533; (b) T. Itoh, S. H. Han, Y. Matsushita and S. Hayase, *Green Chem.*, 2004, **6**, 437–439.
- 13 (a) S. H. Ha, M. N. Lan, S. H. Lee, S. M. Hwang and Y. M. Koo, *Enzyme Microb. Technol.*, 2007, **41**, 480–483; (b) M. Gamba, A. A. M. Lapis and J. Dupont, *Adv. Synth. Catal.*, 2008, **350**, 160–164; (c) O. Miyawaki and M. Tatsumo, *J. Biosci. Bioeng.*, 2008, **105**, 61–64.
- 14 (a) P. Lozano, T. de Diego, J. L. Iborra and M. Vaultier, EP 2189535A1, 2010; (b) P. Lozano, J. M. Bernal, R. Piamtongkam, D. Fetzer and M. Vaultier, *ChemSusChem*, 2010, **3**, 1359–1363; (c) T. de Diego, A. Manjon, P. Lozano, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Green Chem.*, 2011, **13**, 444–451.
- 15 P. Lozano, J. M. Bernal and M. Vaultier, *Fuel*, 2011, **90**, 3461–3467.
- 16 P. Lozano, J. M. Bernal and A. Navarro, *Green Chem.*, 2012, **14**, 3026–3033.
- 17 (a) J. Dupont, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2004, **15**, 341–350; (b) J. Dupont, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 1223–1231.
- 18 (a) P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biocatal. Biotransform.*, 2005, **23**, 169–176; (b) E. Feher, B. Major, K. Belafi-Bako and L. Gubicza, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, **35**, 1624–1627.
- 19 (a) R. Hayes, S. Imberti, G. G. Warr and R. Atkin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 13544–13551; (b) R. Hayes, S. Imberti, G. G. Warr and R. Atkin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 3237–3247.
- 20 C. L. Zhang, S. M. Zhang, L. G. Yu, P. Y. Zhang, Z. J. Zhang and Z. S. Wu, *Tribol. Lett.*, 2012, **46**, 49–54.

ANEXO VII

COMMUNICATION

An efficient microwave-assisted enzymatic resolution of alcohols using a lipase immobilised on supported ionic liquid-like phases (SILLPs)[†]

Cite this: *RSC Advances*, 2013, 3, 13123

Received 12th April 2013,

Accepted 12th June 2013

DOI: 10.1039/c3ra42467g

www.rsc.org/advances

Diana F. Izquierdo,^a Juana M. Bernal,^b M. Isabel Burguete,^a Eduardo García-Verdugo,^a Pedro Lozano^{*b} and Santiago V. Luis^{*a}

The combined action of microwave irradiation and CALB immobilised onto polymeric SILLPs leads to an excellent activity improvement (28 fold) and operational stability towards reuse (12 operation cycles). This procedure also allows the microwave-assisted one-pot DKR by the combination with a solid acid catalyst.

The use of microwave irradiation is spreading in the field of organic chemistry, since it is a cleaner and more efficient energy source than the traditional convective heating.¹ Microwave irradiation has also been described for accelerating enzymatic processes.² Besides, under microwave irradiation, the stability of *Candida antarctica* lipase B (CALB) in both organic solvents³ and solvent-free systems⁴ has been shown to be higher than under conventional heating. On the other hand, ionic liquids (ILs) have emerged as exceptionally interesting non-aqueous (co)solvents to create novel reaction media for biocatalytic processes.⁵ Furthermore, they are good candidates for microwave heating due to their polar character.⁶ Hence, microwave-assisted synthesis using ILs has been also explored to facilitate organic synthesis.⁷ Although both microwave irradiations and biocatalytic processes in ILs may provide several advantages and possible synergies, only a few reports describe the combination of both sustainable approaches.⁸ SILLPs are polymeric matrices modified with IL-like units, which can be regarded as “solid ionic solvents” or as nanostructured materials with microenvironments of tunable polarity similar to those provided by bulk ionic liquids.⁹ In the search of more efficient biocatalytic processes in ILs, we have demonstrated the suitability of supported ionic liquid-like phases (SILLPs) to improve the performance of enzymes.¹⁰ For the first time, this work shows how the synergistic combination of an

immobilised enzyme onto SILLPs and microwave heating greatly enhances the enzymatic resolution of *sec*-alcohols.

SILLPs were prepared from two different types of chloromethylated polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) bead-type resins as described previously, namely: (i) a macroporous resin with low (1.2 mmol Cl g⁻¹, SILLP-L) and high (4.3 meq per Cl, SILLP-H) functionalisation degree; (ii) a highly functionalised PS-DVB Rasta-type (SILLP-R) polymer. In both cases, the resins were modified by alkylation with 1-dodecyl-2-methylimidazol.^{10c} The immobilization of the enzyme (CALB) was carried out by adsorption from an aqueous solution of the enzyme onto the SILLP bearing either Cl⁻ or NTF₂⁻ as the counterion.¹⁰ For comparison, the CALB was also immobilised onto Amberlyst-XAD-4, as an equivalent commercial PS-DVB support to SILLPs but without IL-like moieties.

The kinetic resolution (KR) of *rac*-1-phenylethanol with vinyl propionate catalysed by these CALB-SILLPs was firstly assayed to evaluate the effect of the microwave irradiation over reaction parameters such as catalytic activity and stereoselectivity (see

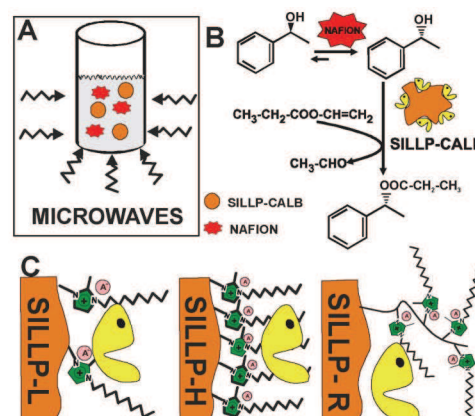


Fig. 1 (A) General scheme of the combo reaction system heated by microwaves; (B) DKR of 1-phenylethanol by using both Nafion and lipase B from *C. antarctica* adsorbed onto supported ionic liquid-like phases (CALB-SILLP) as catalysts. (C) General representation of CALB immobilised on SILLPs containing different IL loadings: low (SILLP-L), high (SILLP-H) and Rasta (SILLP-R).

^aUniversidad Jaume I, Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Campus del Riu Sec, E-12071, Castellón, Spain. E-mail: luis@uji.es

^bUniversidad de Murcia, Campus de Excelencia Internacional Regional “Campus Mare Nostrum”, Facultad de Química, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Campus de Espinardo, E-30100, Murcia, Spain. E-mail: plozanor@um.es

[†] Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3ra42467g

Table 1 Comparison of microwave and conventional heating in the KR of *rac*-1-phenylethanol by immobilised lipases in cyclohexane at 40 °C^a

Entry	Heating ^b	Catalyst	X	% IL ^c	IL loading (meq g ⁻¹) ^d	Conv. ^e (%)	<i>e.e.</i> ^f (%)	<i>e.e.</i> ^f (%)	Activity ^g (U per g supp)
1	Mw	CALB-XAD4	—	—	—	50	>99	>99	41.6
2	Mw	CALB-SILLP-L	Cl	33	1.03	49	>99	>99	720.7
3	Mw	CALB-SILLP-L	NTf ₂	47	0.78	50	>99	>99	1138.3
4	Mw	CALB-SILLP-H	Cl	74	2.21	32	47	>99	71.9
5	Mw	CALB-SILLP-H	NTf ₂	88	1.46	49	94	>99	129.4
6	Mw	CALB-SILLP-R	Cl	75	2.31	47	89	>99	53.9
7	conv.	CALB-XAD4	—	—	—	49	95	>99	46.3
8	conv.	CALB-SILLP-L	Cl	33	1.03	50	>99	>99	110.0
9	conv.	CALB-SILLP-L	NTf ₂	47	0.78	50	>99	>99	187.7
10	conv.	CALB-SILLP-H	Cl	74	2.21	40	65	>99	70.7
11	conv.	CALB-SILLP-H	NTf ₂	88	1.46	48	93	>99	109.5
12	conv.	CALB-SILLP-R	Cl	75	2.31	49	97	>99	58.8

^a *rac*-1-Phenylethanol (18.6 μL, 0.150 mmol), vinyl propionate (34.3 μL, 0.315 mmol, 2.1 equiv.), and 20 mg of the corresponding biocatalyst were reacted in cyclohexane (1.5 mL) for 180 min. ^b Magnetic stirring at 100 rpm (conventional heating) or by using the setting "low" (Mw), respectively. ^c % by weight of IL-like units. ^d Determined by means of elemental analysis. ^e Conversion values: $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^f Determined by GC analysis. ^g One unit of synthetic activity was defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol of (*R*)-1-phenylethyl propionate per min. See ESI for further details.

Fig. 1). In all the cases the reaction was carried out in cyclohexane as a microwave-transparent solvent, because of its $\tan\delta$ parameter (capacity of a given material to be heated under microwave irradiation) lower than 0.01.¹¹ Cycles of 10 min of reaction were performed. After this time the reaction was cooled down, and a sample was taken to be analysed by GC (see ESI[†]).^{12,10b} Alternatively, the both biocatalysts were also tested under conventional heating at 40 °C using a reaction block, placed on a standard hot plate. The heating profile of the both systems was evaluated in order to ensure a fair comparison between microwave heating and thermal heating. In both cases the reaction reached the set-up temperature in four minutes and the temperature was kept constant at 40 ± 3 °C.¹² All the supported enzymes were able to catalyse the selective formation of (*R*)-1-phenylethyl propionate with excellent enantiomeric excess (>99% *ee*). The catalytic efficiency of the immobilized enzyme derivatives was clearly dependent on the characteristics of SILLPs and the heating source applied (see Table 1).

The enzyme immobilized onto the resin without IL-units (CALB-XAD4, entries 1 and 7, Table 1) showed similar activity and enantioselectivity independently of the heating source used.¹¹ However, a significant enhancement on the enzyme activity was observed for the enzyme supported on SILLPs with respect to the CALB-XAD4 derivative. Under microwave irradiation, the increase was up to 28-times for CALB-SILLP-L containing the hydrophobic [NTf₂] counter anion (entry 3 vs. 1, Table 1). Furthermore, this CALB-SILLP-L derivative, independent of the nature of the counter anion, was 6-fold more active under microwave irradiation than under conventional heating (e.g. entry 2 vs. entry 8, and entry 3 vs. entry 9). By using Rasta-type SILLPs (see Fig. 1C), containing the same IL loading but a non-homogeneous distribution,^{10c} a low activity was observed for both microwave (entry 6) and conventional (entry 12) heating approaches. The presence of regions with high concentration of IL-like fragments in SILLP-R is most likely to lead to the formation of highly hydrophobic domains, specially attending the long alkyl chains of the imidazolium system, which

could affect the mass-transfer of the reactants and product to the active sites. Thus, the presence of well distributed IL moieties onto the support surface can provide a better enzyme microenvironment than a IL-free polymeric matrix, although an excess in IL loading seems to be negative for enzyme action. Indeed, the increase in IL loading (CALB-SILLP-H cases), resulted in a loss in catalytic efficiency of immobilized CALB for both microwave (entries 4 and 5 vs. entries 2 and 3) and conventional (entries 10 and 11 vs. entries 8 and 9) heating systems. The increase in reaction rates for other supported lipase-catalyzed reactions under microwave irradiation has been generally associated with the presence trace of residual water in the immobilized enzyme.⁸ Although, some activation due to this factor cannot be completely ruled out, it is important to note, however, that no microwave biocatalytic activation was observed in the case of a CALB-XAD4. Thus, the enzyme activity enhancement observed for CALB-SILLPs is likely to be related to thermal stimulation during Mw-heating due to presence in the support of ILs-like phases. In this context,

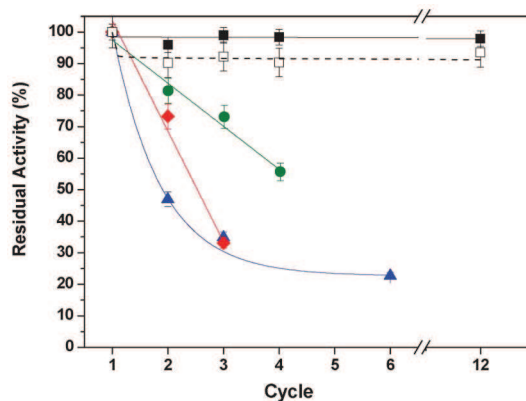


Fig. 2 Residual activity profile for consecutive catalytic cycles. CALB-SILLP-L(Cl), (■); CALB-SILLP-L(NTf₂), (□); CALB-SILLP-H(Cl), (●); CALB-SILLP-R(Cl), (◆); CALB-XAD4 (▲).

Table 2 DKR of *rac*-1-phenylethanol by CALB-SILLP and Nafion SAC-13 in cyclohexane at 40 °C under Mw heating for 60 min^a

Entry	DKR catalytic mixture (mg)	Yield ^b . [%]	<i>e.e.</i> _S ^b [%]	<i>e.e.</i> _P ^b [%]
1	CALB-SILLP-L(Cl)/NAFION 20/20	64	92	99
2	CALB-SILLP-L(Cl)/NAFION 20/40	70	85	99
3	CALB-SILLP-L(NTf ₂)/NAFION 20/100	81	37	94
4	CALB-SILLP-L(NTf ₂)/NAFION 20/200	72	20	95

^a *rac*-1-Phenylethanol (18.6 μL, 0.150 mmol), vinyl acetate (34.3 μL, 0.315 mmol, 2.1 equiv.), and 20 mg of the enzyme and a variable amount of NAFION SAC-13 in cyclohexane (1.5 mL). ^b Determined by GC.

we have reported that the heating effects of microwaves on materials containing SILLPs are highly dependent of the loading of IL-like units, the nature of the counterion and the polymer architecture.^{9,13} Thus, $\tan\delta$ parameter for SILLPs was significantly higher than that observed for non-modified PS-DVD supports.⁹ Furthermore, for a given SILLP, this $\tan\delta$ parameter increased by 6-fold when the NTf₂⁻ counterion was changed to Cl⁻. Hence, the higher activity observed for CALB-SILLP-L can be related with the fact that the supported IL-like-phase facilitates a more efficient microwave energy absorption at the microenvironment of the enzyme. In this way, these supported IL-like domains, where the enzyme is located, are rapidly heated due to material-wave interactions, leading to an enhancement of the enzyme activity when compared with conventional heating. In the same context, the enzyme activation by microwaves could be further enhanced by changing the counteranion (NTf₂⁻ vs. Cl⁻). Indeed, the nature of the counteranion determined the enzyme activity, being always obtained the more active biocatalyst for the hydrophobic [NTf₂].¹⁴ This fact could be related with a favoured transport of the hydrophobic substrate towards the immobilized enzyme, resulting in the excellent suitability of the CALB-SILLP-L derivatives.^{10c} An excessive absorption on microwave irradiation near to the enzyme microenvironment might occur for CALB-SILLP-H cases, resulting, along with the above-mentioned effect of hydrophobic shell formation around the enzyme, in enzyme deactivation.¹⁵

Fig. 2 depicts residual activity profiles for the different catalysts obtained during operating cycles under microwave heating. As can be seen, the activity of both CALB-SILLP-L derivatives was practically unchanged during reuse. The microenvironment provided by the ILs-like units for these derivatives is able to maintain the performance of the enzyme against deactivation by superheating due to microwave irradiation. However, without the presence of IL-fragments, or at high IL content (SILLP-H and SILLP-R derivatives), the CALB-SILLPs derivatives showed a fast deactivation under microwave irradiation. Hence, the adequate design of the SILLP support not only contributes to enhance the catalytic activity of the immobilised enzyme but also its stability.

The DKR of *rac*-1-phenylethanol catalyzed by the combined action of Nafion-SAC13 and CALB-SILLP-L has been also carried out in a one-pot system at different catalyst ratios under Mw irradiation (see Table 2).¹⁶ The DKR process is achieved with good yields for the corresponding *R*-ester (70–80%) at high enantioselectivities (94–99% *e.e.*). These results are better than those recently reported for lipase PS-CI and Nafion-SAC 13 mixtures

under conventional heating (71% *e.e.*, (*R*)-ester),¹⁷ pushing towards the excellences of the proposed approach.

The results reported here illustrate for the first time the intrinsic effect of microwave irradiation on biocatalysis produced by supported ionic liquid like phases. Furthermore, they indicate that enzymes supported onto SILLPs could be used to regulate biocatalytic rates by the appropriate selection of the structural parameters of the polymeric SILLP such as resin morphology, loading and nature of IL-like groups. Besides, the SILLPs can contribute to the long-term stability of the corresponding supported biocatalysts, which allows their prolonged use under microwave irradiation. These results demonstrate that the SILLPs are able to reproduce the behaviour observed for biocatalytic processes under microwave activation assayed in bulk ILs. However SILLPs lead to similar results using significantly fewer amounts of IL equivalents and being supported in a polymeric phase, which provides an easy mechanism for facilitating work-up and reuse. Microwave-assisted multi-enzymatic and/or multi-chemoenzymatic green chemical processes for synthesizing fine chemicals are only a beginning, but the door to the development of a sustainable chemical industry is open.

This work was partially supported by MINECO, Spain (Ref: CTQ2011-28903), Generalitat Valenciana (PROMETEO 2012/020) and SENECA Foundation, Spain (Ref: 08616/PI/08) grants.

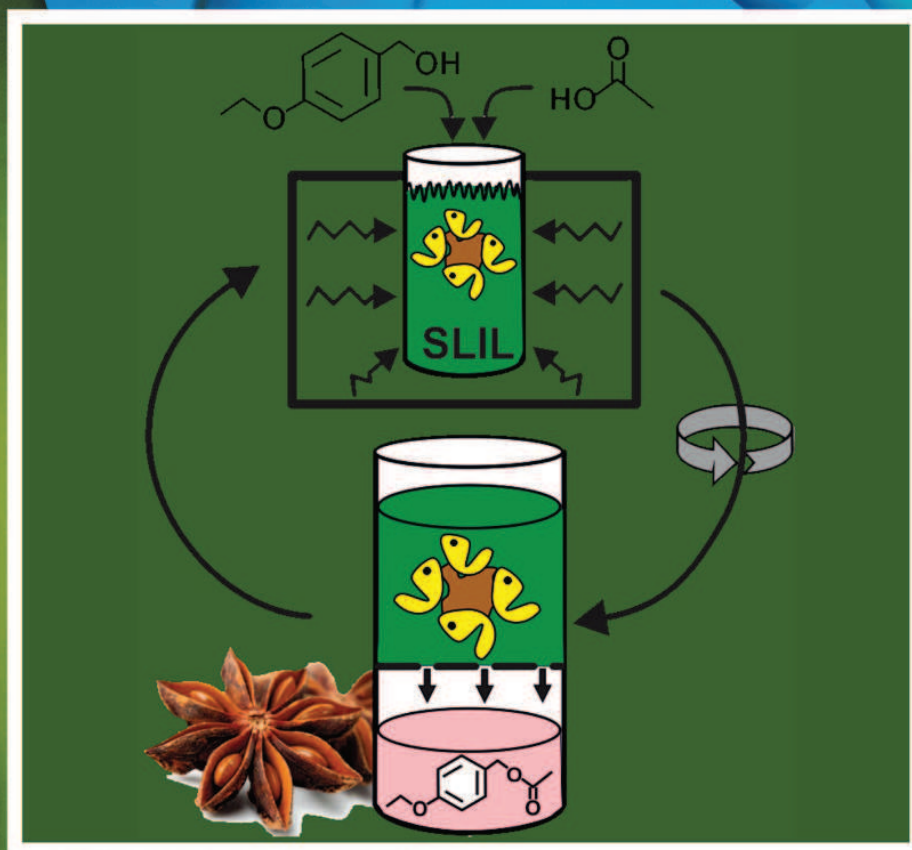
References

- 1 A. de la Hoz and A. Loupy, *Microwaves in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
- 2 D. Yu, Z. Wang, P. Chen, L. Jin, Y. Cheng, J. Zhou and S. Cao, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2007, **48**, 51–57.
- 3 (a) B. Rejasse, S. Lamare, M. D. Legoy and T. Besson, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 1086–1089; (b) P. Bachu, J. S. Gibson, J. Sperry and M. A. Brimble, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 1618–1624; (c) G. D. Yadav and S. V. Pawar, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **96**, 69–79.
- 4 B. Rejasse, T. Besson, M.-D. Legoy and S. Lamare, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 3703–3707.
- 5 P. Lozano and E. García-Verdugo, *Ionic Liquids in Biotransformations and Organocatalysis: Solvents and Beyond* (Ed. P. Dominguez de Maria), pp. 103–150, Wiley-VCH, 2012.
- 6 (a) J. Hoffmann, M. Nuchter, B. Ondruschka and P. Wasserscheid, *Green Chem.*, 2003, **5**, 296–299; (b) R. Martínez-Palou, *J. Mex. Chem. Soc.*, 2007, **51**, 252–264.
- 7 R. Martínez-Palou, *Mol. Diversity*, 2010, **14**, 3–25.
- 8 (a) A. Loupy, L. Perreux, L. Marion, K. Burle and M. Moneuse, *Pure Appl. Chem.*, 2001, **73**, 161–166; (b) K. Lundell, T. Kurki,

- M. Lindroos and L. T. Kanerva, *Adv. Synth. Catal.*, 2005, **347**, 1110–1118; (c) D. Yu, Y. Wang, C. Wang, D. Ma and X. Fang, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2012, **79**, 8–14; (d) H. Zhao, G. A. Baker, Z. Song, O. Olubajo, L. Zanders and S. M. Campbell, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, **57**, 149–157; (e) B. Major, I. Kelemen-Horvath, Z. Csanadi, K. Belafi-Bako and L. Gubicza, *Green Chem.*, 2009, **11**, 614–616.
- 9 (a) M. I. Burguete, F. Galindo, E. Garcia-Verdugo, N. Karbass and S. V. Luis, *Chem. Commun.*, 2007, 3086–3088; (b) V. Sans, N. Karbass, M. I. Burguete, V. Compañ, E. Garcia-Verdugo, S. V. Luis and M. Pawlak, *Chem.–Eur. J.*, 2011, **17**, 1894–1906.
- 10 (a) P. Lozano, E. García-Verdugo, R. Piamtongkam, N. Karbass, T. De Diego, M. I. Burguete, S. V. Luis and J. L. Iborra, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, **349**, 1077–1084; (b) P. Lozano, E. García-Verdugo, N. Karbass, K. Montague, T. de Diego, M. I. Burguete and S. V. Luis, *Green Chem.*, 2010, **12**, 1803–1810; (c) P. Lozano, E. García-Verdugo, J. M. Bernal, D. F. Izquierdo, M. I. Burguete, G. Sanchez-Gomez and S. V. Luis, *ChemSusChem*, 2012, **5**, 790–798.
- 11 R. O. M. A. de Souza, O. A. C. Antunes, W. Kroutil and C. Oliver Kappe, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 6157–6162.
- 12 A CEM-Discovery microwave working under “temperature control mode” was used at 100 W power. See ESI† for further details.
- 13 A. García-Berna, V. Compañ, M. I. Burguete, E. García-Verdugo, N. Karbass, S. V. Luis and E. Riande, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 7030.
- 14 (a) P. Lozano, T. De Diego, D. Carrie, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1529–1533; (b) P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier and J. L. Iborra, *Biocatal. Biotransform.*, 2005, **23**, 169–176.
- 15 S. P. M. Ventura, L. D. F. Santos, J. A. Saraiva and J. A. P. Coutinho, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **28**, 2303–2310.
- 16 H. Pellissier, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 3769–3802.
- 17 K. Benaissi, M. Poliakoff and N. R. Thomas, *Green Chem.*, 2009, **11**, 617–621.

ANEXO VIII

CURRENT GREEN CHEMISTRY



**BENTHAM
SCIENCE**

A Green Approach for Producing Solvent-free Anisyl Acetate by Enzyme-catalyzed Direct Esterification in Sponge-like Ionic Liquids Under Conventional and Microwave Heating

Pedro Lozano^{1,*}, Juana M. Bernal¹, Almudena Lajarin¹, Daniel Romera¹, Eduardo Garcia-Verdugo², Gregorio Sanchez-Gomez³, Mathieu Pucheault⁴, Michel Vaultier⁴, M. Isabel Burguete² and Santiago V. Luis²

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología. Facultad de Química, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, P.O. Box 4021, E-30100 Murcia, Spain;

²Departamento de Química Inorgánica y Orgánica. Universidad Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, 12071, Castellon, Spain; ³Departamento de Química Inorgánica. Facultad de Química, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, P.O. Box 4021, E-30100 Murcia, Spain; ⁴Institut des Sciences Moléculaires - Université Bordeaux-I. CNRS UMR 5255, Groupe Phoenix. F33405 Talence cedex. France

Abstract: The biocatalytic synthesis of anisyl acetate fragrance was carried out by direct esterification of acetic acid with anisyl alcohol in sponge-like ionic liquids (SLILs), e.g. N,N,N,N-hexadecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ($[C_{16}tma][NTf_2]$), N,N,N,N-octadecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ($[C_{18}tma][NTf_2]$), etc. as reaction/separation media under conventional and microwave (MW) heating. These SLILs are temperature-switchable ionic liquid/solid phases that behave as sponges. As liquid phases, they are excellent monophasic reaction media for the lipase-catalyzed synthesis of anisyl acetate, the product yield being improved up to 100% for 2 hour reaction under the appropriate reaction conditions (i.e. SLIL concentration, alcohol: acid molar ratio, enzyme amount, dehydrating molecular sieves, temperature and MW heating). As a function of the phase behaviour of different SLIL/anisyl acetate mixtures, a new clean separation protocol based on the centrifugation of the solid IL/flavour ester through nylon membranes was proposed, which provided a nearly full separation of the solid SLIL and the easy recovery of the reaction mixture. The enzymatic synthesis of anisyl acetate in $[C_{16}tma][NTf_2]$ under MW assistance, followed by the separation step of the solid SLIL, provided a nearly solvent-free fragrance product with up to 0.89 g/mL concentration. The catalytic activity of the enzyme / SLIL system remained unchanged for ten consecutive operational cycles. This work reports a straightforward and sustainable approach for producing anisyl acetate as a natural flavour and demonstrates to be suitable for scaling-up, providing a high potential for practical application.

Keywords: Anisyl acetate, anisyl alcohol, biocatalysis, biocatalytic process, clean process, enzymatic synthesis, esterification, flavours, fragrances, green chemistry, ionic liquids, lipase, neoteric solvents, pure products, solvent-free, sponge-like ionic liquids, sustainable chemistry, switchable ionic liquids.

1. INTRODUCTION

Anisyl acetate (see Fig. 1A) is a fragrance ingredient used in many cosmetic and fine fragrance products with a worldwide consumption of 1-10 metric tons per year [1]. Despite that most fragrance compounds are obtained using chemical synthesis, the demand for natural products is continuously growing nowadays. However, natural flavours extracted from plant materials are often too scarce or expensive for industrial use, making it necessary to develop new methods for their production by using "natural" criteria and green approaches suitable for industrial scaling-up [2]. In this context, U.S and European legislations dictate that "natural" fragrance substances can only be prepared either by physical

processes (e.g. extraction) from natural sources, or by enzymatic or microbial transformation of precursors isolated from nature [3].

Lipases are one of the most important biocatalysts for the synthesis of valuable flavour and fragrance esters by means of either esterification or transesterification approaches in reaction media with low water content (e.g. organic solvents, etc.) [4]. Although the enzymatic synthesis of anisyl acetate has never been reported, lipase-catalyzed direct esterification of acetic acid with anisyl alcohol in solvent-free media could be considered as the most straightforward way to obtain this fragrance ester product (see Fig. 1A), which therefore could be considered as a "natural" product if using substrates of "natural" origin. However, it has been reported for other flavour ester cases (e.g. isoamyl acetate, butyl acetate, etc), how enzyme-catalyzed direct esterification provides moderate results in solvent-free media (e.g. maximum of 60-80 % isoamyl acetate yield), whereas the enzyme was deactivated rapidly by direct contact with acetic acid [5].

*Address correspondence to this author at the Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología. Facultad de Química, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, P.O. Box 4021, E-30100 Murcia, Spain; Tel: +34 868 887392; Fax: +34 868 884148; E-mail: plozanor@um.es

Since 2000, ionic liquids (ILs) have emerged as exceptionally non-aqueous green reaction media because of their unique solvent properties, headed by their high thermal stability and negligible vapour pressure [6], as well as their exceptional ability to stabilize enzymes [7]. Furthermore, ILs have been widely described as excellent non-aqueous reaction media for biocatalytic reactions, e.g. synthesis of aliphatic esters [8a], (dynamic) kinetic resolution of *sec*-alcohols [8b, c], oxidations [8d, e], etc. The improvement in enzyme activity by using microwave (MW) irradiation in both solvent-free [9] and IL reaction media [10] has also been recently reported. Concerning the flavours synthesis by biocatalysis, it has been reported that several ILs, e.g. [Bmim][PF₆], [Omim][PF₆] etc, are suitable reaction media for lipase-catalyzed flavour ester synthesis by esterification (e.g. 80 % geranyl acetate yield after 311 h of reaction [11a]), but product recovery by liquid-liquid extraction with organic solvents tarnish the green aspects of the approach [11].

Recently an interesting feature of hydrophobic ILs with long alkyl side-chains has been described such as the possibility of switching from the solid to the liquid phase at temperatures compatible with enzyme catalysis (e.g. 53°C for 1-methyl-3-octadecylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide [12a], 64°C for N,N,N,N-hexadecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide [12b] etc, see (Fig. 1B)). As liquid phases, these ILs are able to dissolve different hydrophobic compounds (e.g. triolein, geraniol, etc), resulting in transparent monophasic systems. However, these systems, which become solid by cooling at room temperature, behave like sponges. They can release dissolved compounds from their solid net that by simple centrifugation, and have been therefore named as Sponge-Like Ionic Liquids (SLILs) [13]. This unique property of SLILs has been applied to develop an easy approach for the biocatalytic synthesis of aliphatic ester flavours [13a], as well as biodiesel [13b]. Reactions take place in one-liquid phase media and then products separation follows a straightforward cooling/centrifugation protocol providing nearly IL-free products.

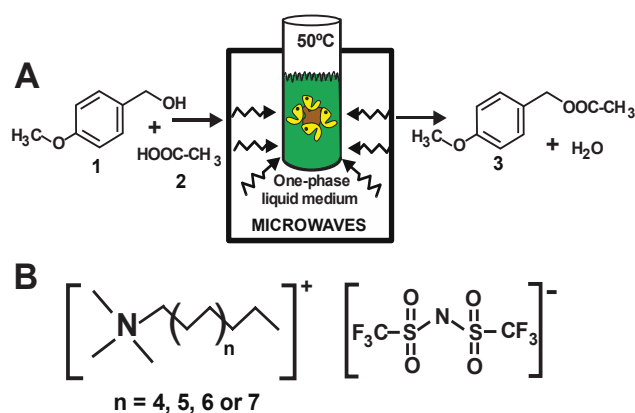


Fig. (1A). Immobilized lipase-catalyzed anisyl acetate (3) synthesis by direct esterification of anisyl alcohol (1) with acetic acid (2) in sponge-like ionic liquids (SLILs) under MW assistance. **(B).** Different SLILs based on the combination of dodecyl-, tetradecyl-, hexadecyl- or octadecyltrimethylammonium cation with [NTf₂]⁻ anion, respectively.

This paper shows for the first time the synthesis of the anisyl acetate fragrance by means of a straightforward and green biocatalytic approach. We took advantage of the sponge-like behaviour of N,N,N,N-alkyltrimethylammonium bis(trifluoromethyl-sulfonyl)imide ([C_ntma][NTf₂]) ILs having a long alkyl side-chain in their cation, as switchable ionic liquid/solid phases. The suitability of these SLILs as reaction media for immobilized lipase-catalyzed direct esterification of acetic acid with anisyl acetate, with and without MW assistance, is studied first see (Fig. 1). Then, a simple protocol to separate the anisyl acetate product, as well as to recover and reuse the enzyme/SLIL system is also described, demonstrating the suitability of the proposed approach as a sustainable biocatalytic process for producing fragrance esters on an industrial scale.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Lipase-catalyzed Anisyl Acetate Synthesis in SLILs

The ability of four different hydrophobic SLILs with a long alkyl chain in cation, i.e. [C_ntma][NTf₂] (*n* = 12, 14, 16 or 18, respectively) to dissolve an equimolar mixture of anisyl alcohol and acetic acid, as well as the anisyl acetate product was studied at 50, 60, 70 and 80% (w/w) SLIL concentration, and at temperatures ranging from 30 to 60°C (see ESI). In all cases, the corresponding mixtures changed from a semisolid phase at room temperature to a transparent monophasic liquid system at higher temperature. All became liquids at 50°C, except for mixtures containing [C₁₈tma][NTf₂] (74°C mp), which became liquids at 60°C. The excellent ability of these SLILs to fully dissolve hydrophobic compounds (e.g. triolein, methyl oleate, geranyl propionate, etc.) at temperatures lower than their melting point has been attributed to the hydrophobic interactions with the long alkyl chain of the ammonium cation [13], a phenomenon similar to the one found for imidazolium-based SLILs [12].

Figure 2 depicts the time courses of the Novozym 435-catalyzed esterification of acetic acid with anisyl alcohol in 70% (w/w) [C₁₆tma][NTf₂] at a 1/1 (mol/mol) acetic acid/anisyl alcohol ratio concentration, by using either MW irradiation (4W power) or conventional heating (50°C), in the presence of MS13x dehydrating agent. The enzyme was able to synthesize anisyl acetate in both cases, reaching up to 82% yield (with respect the initial acetic acid) in 1h under MW irradiation. The anisyl acetate product was identified by GC/MS (see ESI). MW assistance gave a slightly better anisyl acetate yield profile than conventional heating, which reached a similar product concentration as MW after 4h.

The synergism between MW irradiation and biocatalysis has been proven for different synthetic reactions, like the kinetic resolutions of *rac*-1-phenylethanol [9a, 10d], or *rac*-2 octanol [10c], the synthesis of ethyl miristate [9c], ethyl-3-phenylpropanoate [9d], or biodiesel [10a], or the isomerisation of glucose to fructose [10e], where the reaction rate improvements have been attributed to both thermal and non-thermal effects of this irradiation [14]. Concerning non-thermal effects, MW irradiation is thought to selective induce changes in protein conformation, stimulating certain movements of the biocatalyst required for catalysis (e.g. opening of the active site of the enzyme [9a], facilitating the substrate to approach the active site [10e], etc). For enzyme-

catalyzed reactions in non-aqueous environments, the layer of water molecules surrounding the enzymes is key for maintaining activity: both the immobilization support and the hydrophobicity of the medium greatly contribute to avoid enzyme deactivation by a water-stripping phenomenon [7]. Other authors [9b, c] consider that a MW-induced “super-heating” of this essential water layer around immobilized lipases (e.g. Novozym 435) when working in hydrophobic ILs resulted in enzyme activation. The existence of “hot spots” or selective heating in heterogeneous reaction systems, as responsible for the improvement in reaction rates under MW irradiation, has also been described for chemical reactions, e.g. zeolites catalyzed alkylation of secondary amines [14]. In our case, where the heating profile of reaction system under 4W MW remained nearly constant at 50°C for all the irradiation period (see ESI), the observed improvements in enzyme activity as result of MW irradiation could also be attributed to such phenomena.

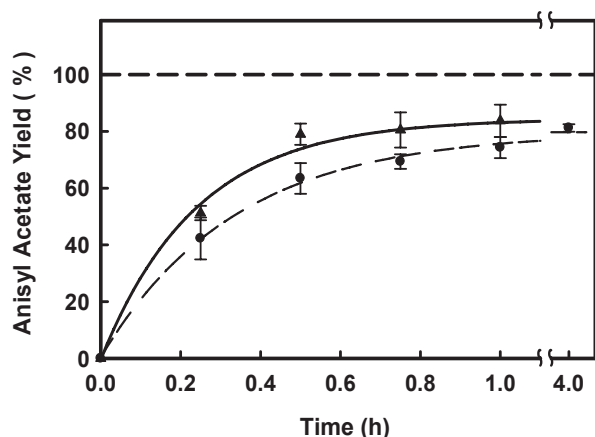


Fig. (2). Time-course profiles shown by Novozym 435 (120 mg)-catalyzed anisyl acetate synthesis by direct esterification of acetic acid (3 mmol) with anisyl alcohol (3 mmol) in 70% (w/v) $[C_{16}tma][NTf_2]$ SLILs at 4W MW power (▲), or at 50°C conventional heating (●), in the presence of MS13x (240 mg).

To assess the influence of the $[C_{16}tma][NTf_2]$ SLIL in this MW-assisted enzymatic reaction, comparative experiments for Novozym 435-catalyzed anisyl acetate synthesis in

solvent-free and SLIL reaction media, with and without the presence of the MS13x dehydrating agent, were carried out using an equimolar mixture of acetic acid and anisyl alcohol as substrates see (Fig. 3A). The direct enzymatic esterification of anisyl alcohol with acetic acid under solvent-free conditions led to very low conversion (0.4% at 1h reaction), that was doubled in the presence of the dehydrating agent. This low activity can be related to the high acid concentration present (5.42 M for our experiments, which might provoke a fast enzyme deactivation [5, 13a]). Thus, the anisyl acetate yield was greatly improved when the enzymatic esterification was carried out in 70% (w/w) $[C_{16}tma][NTf_2]$ in the presence of MS13x, reaching 81% yield after 1h reaction. Furthermore, increasing the immobilized enzyme loading led to better yields, the maximum being reached at 40 mg Novozym / mmol acetic acid see (Fig. 3B). MW heating for 1h provided higher anisyl acetate yields than those obtained when using conventional heating systems for 4h. These results corroborate the synergism of MW irradiation with enzymatic reactions [9], as well as with the excellent suitability of hydrophobic ILs for lipase-catalyzed synthetic reactions [7, 8a-c, 2, 13]. In this regards, the excellent stability showed by enzymes in water-immiscible ILs has been attributed to the maintenance of native protein conformation [15].

2.2. Reaction Parameters for Microwave-assisted Enzymatic Synthesis of Anisyl Acetate in Sponge-like ILs

The influence of the MW irradiation power, ranged from 3 to 6W, on the enzymatic synthesis of anisyl acetate in four different SLILs, i.e. $[C_{12}tma][NTf_2]$, $[C_{14}tma][NTf_2]$, $[C_{16}tma][NTf_2]$ and $[C_{18}tma][NTf_2]$, was studied at 70% (w/w) SLIL see (Fig. 4A), and compared with conventional heating at different temperatures see (Fig. 4B). For all ILs, the anisyl acetate yield at 1h reaction was maximum at 4W MW power, except for the $[C_{18}tma][NTf_2]$ case, where the product yield was continuously improved by the increase in MW irradiation power. Furthermore, in all cases, the longer the alkyl chain on the SLIL cation the better the product yield. Although that all reaction media were liquid at temperatures lower than the melting point of the pure IL, the irradiation of $[C_{18}tma][NTf_2]$ reaction medium at 3 and 4W

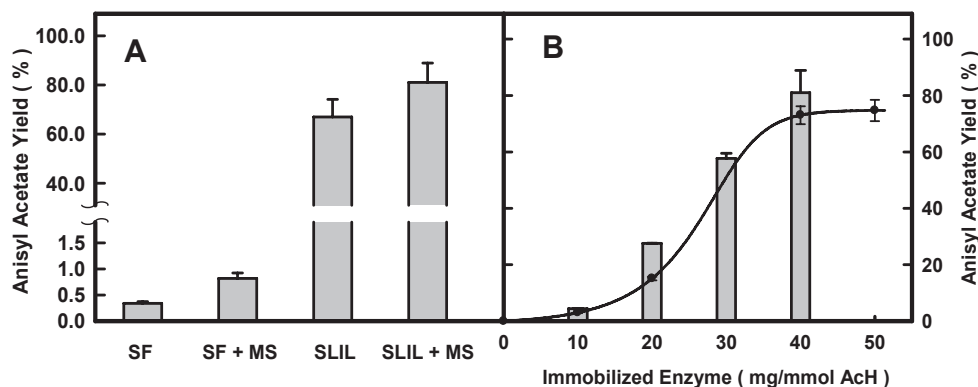


Fig. (3A). Anisyl acetate yield obtained by the esterification of acetic acid (3 mmol) with anisyl alcohol (3 mmol) catalysed by Novozym 435 (120 mg) after 1h reaction under MW heating at 4W constant power. SF, solvent-free; SF+MS, solvent free with MS13x (80 mg /mmol); SLIL, 70% (w/w) $[C_{16}tma][NTf_2]$; SLIL+MS, 70% (w/w) $[C_{16}tma][NTf_2]$ with MS13x (80 mg /mmol). **B.** Effect of the immobilized enzyme loading on the anisyl acetate yield obtained by the esterification of acetic acid (3 mmol) and anisyl alcohol (3 mmol) in 70% (w/w) $[C_{16}tma][NTf_2]$ in the presence of MS13x (80 mg /mmol ACh), for 1h reaction at 4W MW power (bars), or for 4h reaction at 50°C conventional heating (●). See experimental section for details.

MW power (37°C max. temperature) was unable to provide a transparent liquid system, which was obtained only at higher power (5 and 6W). From these results, [C₁₆tma] [NTf₂] seems to be the best SLIL for the enzymatic synthesis of anisyl acetate, in agreement with previous results for enzymatic synthesis of terpenic esters [13a], and taking into account the phase behaviour of the SLILs and their heating profiles as a function of MW power (see ESI) [13b]. As seen in (Fig. 4B), the profiles of anisyl acetate yields for 4h reaction time in these SLILs under conventional heating at 40, 50 and 60°C were similar to those obtained with MW irradiation. The product yield reached a maximum value at 50°C, except for C₁₈tma] [NTf₂] case. Once again, the [C₁₆tma] [NTf₂] SLIL was shown to be the best reaction medium for the enzymatic synthesis of anisyl acetate by direct esterification.

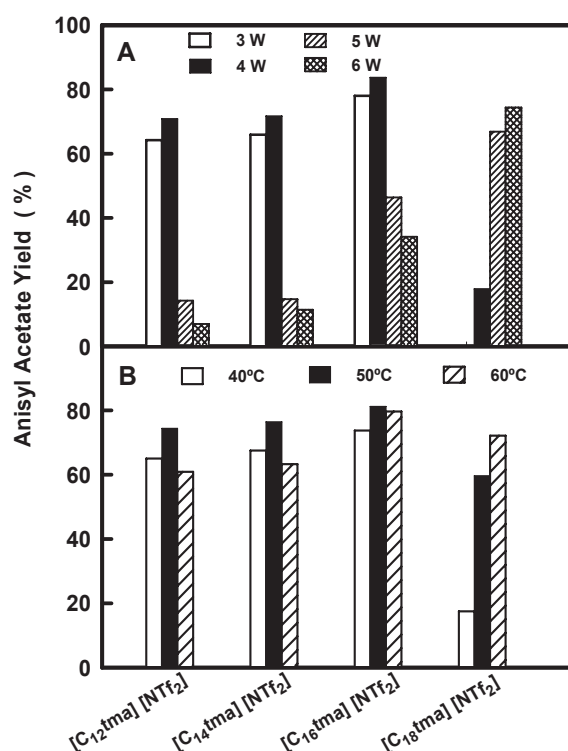


Fig. (4). Effect of alkyl chain length in the cation of SLIL (70% w/w) on the anisyl acetate yield obtained by the esterification of acetic acid (3 mmol) with anisyl alcohol (3 mmol) catalyzed by Novozym 435 (40 g / mol acetic acid) after 1h under MW assistance at different heating powers (A), or after 4h under conventional heating at different temperatures (B).

The influence of the [C₁₆tma] [NTf₂] SLIL concentration on the enzymatic activity was also studied using an equimolar mixture of substrates at either 4W MW irradiation or 50°C conventional heating (Fig. 5A). The SLIL concentration was shown as a key parameter, and anisyl acetate yields near 80% were only obtained at 70% (w/w) or higher SLIL concentration for both heating modes. Once again, the MW assistance resulted in an enhanced efficiency of the enzyme catalysis (up to 83 % product yield in 1h) with respect to conventional heating, requiring 4h for a similar product yield. Taking into account the observed protective effect of this hydrophobic [C₁₆tma] [NTf₂] SLIL on lipase with respect to the acetic acid concentration see (Fig. 3A), the low

product yield obtained for 50 and 60% (w/w) [C₁₆tma] [NTf₂] could be attributed to a critical limit for the acid substrate/SLIL ratio for avoiding enzyme denaturation by this substrate. The negative effect of the acetic acid concentration was also observed for the enzymatic synthesis of isoamyl acetate by direct esterification in [C₁₆tma] [NTf₂], the product yield being increased from 21% to 75 % when the IL concentration was increased from 50% to 70% (w/w) [13a]. Such critical limit to avoid the strong negative effect of methanol has also detected for lipase-catalyzed methanolysis of triglycerides to produce biodiesel in hydrophobic ILs [12].

The results at 4W MW irradiation were also influenced by the acetic acid/anisyl alcohol molar ratio see (Fig. 5B). Thus, the esterification of the acetic acid substrate with anisyl alcohol reached nearly 100% for the 1/3 (mol/mol) molar ratio, while product yields of 86% and 82% were obtained for 2/3 and 3/3 (mol/mol) ratios, respectively. As an example of the excellent suitability of this proposed green methodology for synthesizing anisyl acetate, (Fig. 5B) also shows the corresponding anisyl acetate concentration for each obtained product yield, reaching up to 0.89 g/mL, a value of high interest for industrial production, and in the range of those previously reported for the enzymatic synthesis of terpene esters in [C₁₆tma] [NTf₂] under conventional heating [13a].

2.3. Anisyl Acetate Separation from Monophasic Solutions in Sponge-like ILs

The suitability of the proposed methodology for the industrial biocatalytic anisyl acetate production, based on direct esterification of acetic acid and anisyl alcohol in these hydrophobic ILs, needs to be combined with a green approach for product recovery and the reuse of the enzyme/IL system.

Figure 6A shows that all 30/70 (w/w) anisyl acetate/ILs (i.e. [C₁₂tma] [NTf₂], [C₁₄tma] [NTf₂] and [C₁₆tma] [NTf₂]) mixtures are fully clear monophasic systems after 15 min under 4W MW irradiation power (50-52°C final temperature). They became solid by cooling down to room temperature, except for the case of [C₁₂tma] [NTf₂] which remained liquid see (Fig. 6B). By using a previously reported iterative centrifugation protocol at controlled temperatures on the solid IL/anisyl acetate mixtures [13a], the solid IL phase and the liquid fragrance ester phase could be fractionated. However, the physical separation between both phases could not be adequately performed for product recovery, because of the low consistency of the solid phase that rapidly re-dissolved again into the fragrance liquid phase. Thus, a new fractionation approach to efficiently carry out the separation of these 30/70 (w/w) anisyl acetate/IL solid mixtures was proposed. This approach was based on the use of a nylon filter (0.2 mm pore size) during the centrifugation step (10 min, 16,000 rpm, 0°C) to provide a physical separation between both phases suitable to facilitate an IL-free fragrance recovery see (Fig. 6C). The use of this centrifugal filter resulted in the retention of the solid IL phase above the nylon membrane, and in the filtration of the liquid anisyl acetate phase across the membrane to the bottom tube, a behaviour identical to a sponge wringing up see (Fig. 6D). To demonstrate the efficiency of this separation process, the residual IL content in this liquid phase was determined by using ¹⁹F

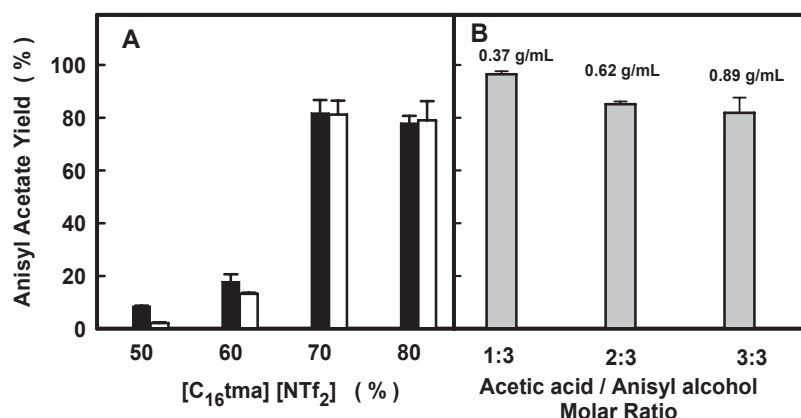


Fig. 5(A). Influence of the [C₁₆tma][NTf₂] SLIL concentration on the anisyl acetate yield obtained by the esterification of acetic acid (3 mmol) with anisyl alcohol (3 mmol) catalyzed by Novozym 435 (40 g/mol acetic acid) after 1h reaction under MW assistance at 4W power (black bars), or after 4h reaction under conventional heating at 50°C (white bars). **(B)** Effect of the acetic acid/anisyl alcohol molar ratio on the anisyl acetate yield (anisyl acetate concentrations are shown as inset data) obtained by Novozym 435-catalyzed direct esterification in 70% (w/w) [C₁₆tma][NTf₂] containing MS13x (80 mg/ mmol acetic acid) after 1 h reaction under 4W MW power.

NMR spectroscopy along with the yield of the recovered fragrance as liquid phase at the bottom tube for each assayed anisyl acetate/IL mixture (see ESI). For [C₁₄tma][NTf₂] (52°C m.p. [13b]) and [C₁₆tma][NTf₂] (64°C m.p. [13b]) cases, the anisyl acetate yields obtained by filtration were 95 and 93% of the initial amount dissolved into each IL, whereas residual IL contents were 4.1 and 3.1% (w/w), respectively. The extraction product yield from these SLILs decreased with the increase in the alkyl chain length of the cation, which could be linked to stronger hydrophobic fragrance/IL interactions, in agreement with biodiesel and terpene ester cases [13]. Also, as results of the increase in the IL melting point with alkyl-chain length of cation, the residual IL in liquid product fraction decreased. For the less hydrophobic IL case, i.e. [C₁₂tma][NTf₂] (36°C m.p.) [13b], the IL content into the filtered phase was 60.1%. The low melting point of ILs with the shorter alkyl-side chain in the cation is an important constrain, as it should require centrifugation at 0°C for efficient separation. However, the IL melting point can be tuned as a function of the anion, the alkyl-chain length of cation and/or by using ILs mixtures of different melting points [6, 17]. On the other hand, as some ILs have been described as being not fully green solvents because of their low biodegradability and their (eco) toxicological properties [16], the elimination of any residual IL from the fragrance product is an essential requisite for industrial application. Accordingly, all parameters involved in the separation of anisyl acetate during the centrifugation step, e.g. time, temperature, rotation speed, etc. should be optimized in order to improve yield and purity of the filtered fragrance fraction. Additionally, the non-volatile character of these hydrophobic ILs can be regarded as an important advantage for a final step of product refining, because an IL-free anisyl acetate fragrance should be obtained through a classical distillation process.

The unique ability of these sponge-like ILs to firstly dissolve hydrophobic compounds (e.g. anisyl acetate) at temperatures in the region of their melting points (resulting in transparent monophasic liquid phases), and then to fractionate the mixture by a straightforward technology like cooling

and centrifugation, can be explained by its solid structural organization. For the case of ILs based on imidazolium cations, Dupont reported how these ILs show similar structural patterns in both the solid and liquid phase, as a result of an ionic network formed by monomeric units of a cation surrounded by three anions and viceversa [18]. The incorporation of solute molecules in the IL network can cause changes in their physical/chemical properties, and even the formation of polar and non-polar regions (phase separation). Thus, ILs are described as nano-structured materials, allowing neutral molecules to reside in less polar regions, while ionic or polar species undergo faster diffusion in the more polar regions. In the same context, structural studies on the propylammonium nitrate showed how this IL self-assembles into a quasi-periodic bicontinuous nanostructure reminiscent of an amphiphilic L₃-sponge phase, as determined by neutron diffraction [19a]. Thus, the structure of this IL consists of two interpenetrating polar and non-polar networks, showing a nanoscale heterogeneity [19b]. It was also reported that pyrrolidinium-based ILs are organized as an intricately nanostructured net, where the ILs containing cations with shorter alkyl chain substituents form alternating cation-anion monolayer structures on confinement to a thin film, whereas a cation with a longer alkyl chain substituent leads to bilayer formation [19c]. In the same way, Zhang *et al.* [19d] studied the tribological behaviour of the 1-methyl-3-hexadecylimidazolium tetrafluoroborate [C₁₆mim][BF₄] IL crystal as an additive of liquid paraffin, reporting how this IL (m.p. 49 °C) is transformed from the solid state to the liquid crystalline phase at 80 °C, the IL molecules being arranged in layers with their long molecular axes parallel to each other, and resulting in excellent tribological properties. By using metastable atom electron spectroscopy, other authors report how 1-alkyl-3-methylimidazolium ILs (i.e. for butyl, octyl or decyl alkyl chain) were observed to be organized as a double-layered structure at the surface [19e]. According to the former, the nanostructural organization of the liquid/solid temperature switchable [C_ntma][NTf₂] phases may be described in terms of ordered layers in which the alkyl side chains of the cations provide hydrophobic holes for “housing” anisyl acetate molecules in solid phase (see Fig. 6E). Then, the

centrifugation step of the solid mixture across the filter allowed “to wring the soaked sponge” and so, recovering fragrance (Fig. 6F). The use of centrifugal filters in this step improves the efficiency of the sponge wringing, as can be seen from the resulting higher product yield with respect to the centrifugation process without a coupled filtration [13].

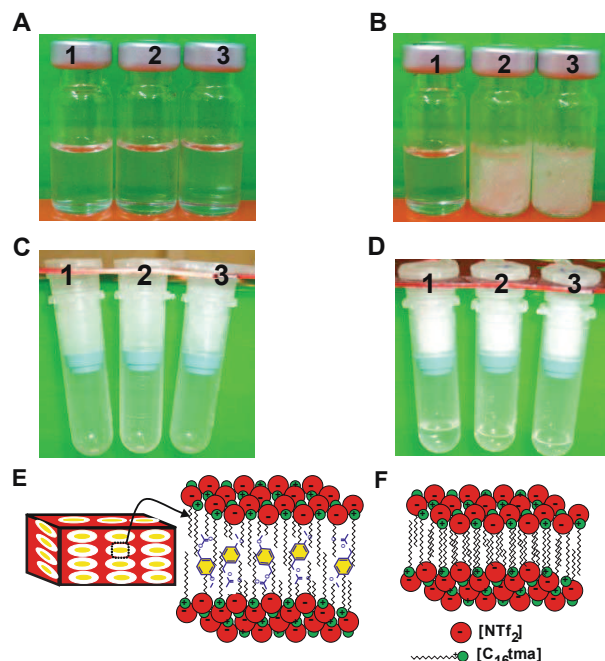


Fig. (6). Phase behaviour of 30/70 (w/w) anisyl acetate/ [C₁₂₋₁₆tma] [NTf₂] mixtures after MW irradiation (15 min, 4W power) (A), at 20°C (B), and at 0°C (placed into a centrifugal filter 0.2 μm pore size) (C), respectively. (D) Separation of the SLIL/anisyl acetate solid mixture in a solid phase (SLIL) and a liquid phase (anisyl acetate) by centrifugation at 16,000 rpm (15 min) and at 0°C. (E and F) Schematic hypothesis of the structural organization of the solid [C₁₆tma] [NTf₂] sponge-like ionic liquid net, showing the ionic layers interacting with anisyl acetate through the hydrophobic alkyl chains like to a soaked sponge (E), and the resulting dry sponge nanostructure after wringing out by centrifugation coupled with filtration (F).

2.4. Enzymatic Cyclic Production of Anisyl Acetate in the [C₁₆tma][NTf₂] Sponge-like IL

High operational stability of the biocatalyst and, recovery and reuse of the IL, are key criteria for scaling-up. Therefore, a cyclic laboratory protocol was designed to reuse the biocatalyst/ [C₁₆tma] [NTf₂] system for anisyl acetate synthesis taking into account the catalytic performance of the system under assistance of MW irradiation, as well as the experimental approach developed for product extraction from fragrance/IL mixtures, based on the sponge-like character of this IL. However, despite the catalytic activity of the Novozym 435/ [C₁₆tma] [NTf₂] was able to reach anisyl acetate yields higher than 80% using an equimolar mixtures of substrates (up to 0.89 g/mL, see (Fig. 5), it was considered that unreacted acetic acid, which will remain into the final reaction mixture, might hamper the direct application of the extract as a fragrance product. In the same context, the use of MS13x was re-considered because of the potential undesired adsorption /releasing of unreacted substrates or water by-product during operational cycles of reuse. Thus, in order to reach a 100% biotransformation of the acetic acid into anisyl acetate, a 1/3 acetic acid/anisyl alcohol molar ratio of substrates in 70% (w/w) [C₁₆tma] [NTf₂] reaction mixture was assayed using MW irradiation in the presence and absence of MS13x see (Fig. 7A). As expected, the presence of the dehydrating agent into the reaction system improved product yield during entire course of the reaction, reaching a 96% yield (with respect to the initial acetic acid) in 1h. However, a 100% anisyl acetate yield could be obtained when the reaction time was increased up to 2 h even in the absence of MS13x. This can be explained by the hygroscopic character of water-immiscible ILs (e.g. [Bmim] [NTf₂], being able to absorb up to 1.4% w/w water [20]), allowing the slow diffusion of the water by-product into more polar regions of the structured phases net and so avoiding its interference for the lipase-catalyzed esterification by increasing reaction time [18].

Therefore, a cyclic protocol was established as follows see (Fig. 8): firstly the biocatalytic reaction was run using a 1/3 acetic acid/anisyl alcohol molar ratio and a 70% (w/w) IL under MW irradiation (4W power) for 2h, followed by cooling in an ice bath for 2h. Then, the resulting solid mixture was spin dried across a membrane filter (0.2 μm pore size) allowing for the easy recovery of the fragrance ester in the bottom tube. Finally,

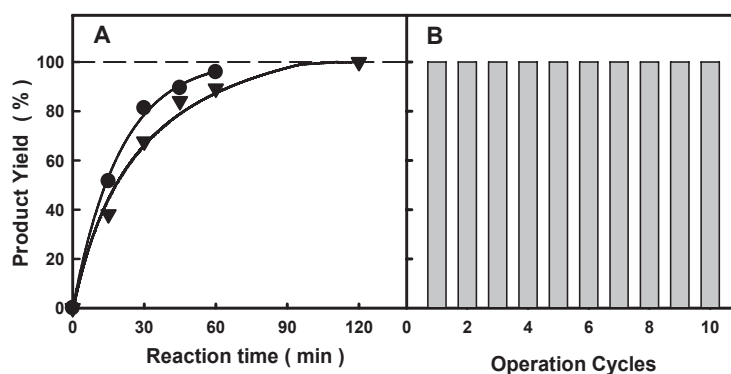


Fig. (7A). Time-course profiles for Novozym 435 (40 mg)-catalyzed anisyl acetate synthesis by direct esterification of anisyl alcohol (3 mmol) with acetic acid (1 mmol) in 70% (w/v) [C₁₆tma] [NTf₂] SLIL at 4W MW power with (●) and without (▼) the presence of MS13x (80 mg). **B.** Operational stability of the Novozym 435-[C₁₆tma] [NTf₂] (70% (w/w) system for producing anisyl acetate by direct esterification of acetic acid (1 mmol) with anisyl alcohol (3 mmol) for 2h reaction under 4W MW heating without the presence MS13x.

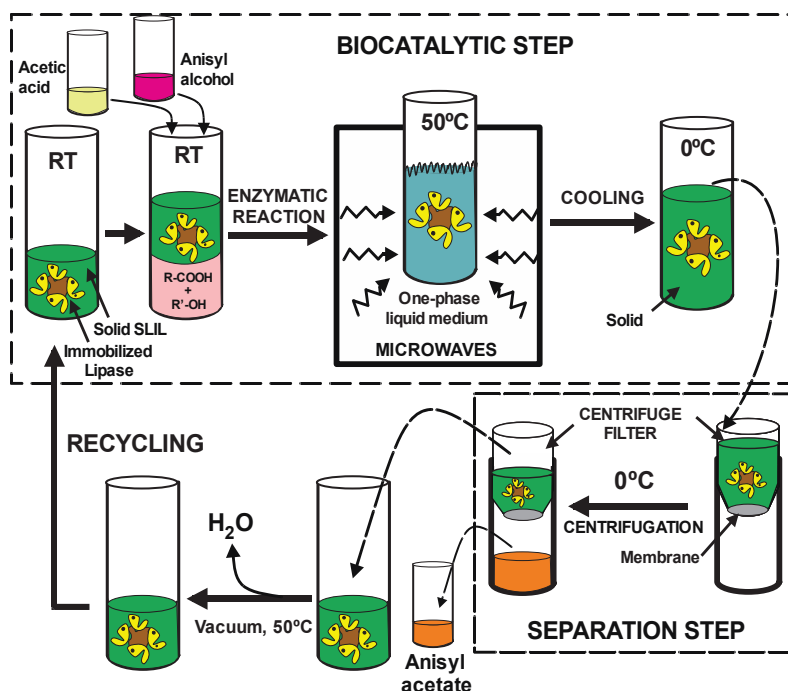


Fig. (8). Scheme of the cyclic protocol for producing anisyl acetate by immobilized lipase-catalyzed esterification of acetic acid with anisyl alcohol in Sponge-Like Ionic Liquids (SLILs) under MW assistance, including recovery and reuse of the enzyme/SLIL system. See experimental section for further details.

any remaining substrates/products in the solid phase were removed under vacuum, affording a Novozym 435/ [C₁₆tma] [NTf₂] SLIL solid mixture ready to be reused for another production cycle. As can be seen in (Fig. 7A), the fragrance ester yield was remained unchanged at 100% for all the operation cycles assayed. These results agree with the excellent suitability displayed by this SLIL for preserving lipase activity under non-aqueous environment, i.e. up to 90% residual activity after 100 days incubation in a 50/50 (w/w) triolein/[C₁₆tma] [NTf₂] mixture at 60°C [13b]. In the same way, it has been reported that hydrophobic ILs, based on the [NTf₂] anion and cation with a long alkyl-side chain (e.g. [C₁₈mim], [C₁₆mim], etc), provide a protective effect on lipase-catalyzed transesterification or esterification reactions in continuous operation, attributable to the maintenance of the native conformation of the protein [7, 12, 15a]. Furthermore, it should be underlined that the fragrance extract obtained after each operation cycle by using the centrifugal filter was an acetic acid-free anisyl acetate solution (0.4 g/mL approx.) in anisyl alcohol, a product suitable for the fragrance industry applications. Other reported approaches for the biocatalytic synthesis of flavour esters, based on multiphase reaction media with or without ILs, showed poorer results in operational stability [11]. Furthermore, the proposed green methodology for anisyl acetate production also includes a straightforward way to extract the fragrance product from the sponge-like IL by centrifugation, a technology largely more interesting for industrial application than the classical liquid-liquid extraction with organic solvents.

3. CONCLUSIONS

This paper shows for the first time a new straightforward and green strategy to produce anisyl acetate by lipase-catalyzed direct esterification of acetic acid with anisyl alcohol

in sponge-like ILs (e.g. [C₁₆tma] [NTf₂]) under MW assistance, obtaining product yields higher than 80% (i.e. up to 0.89 g/mL anisyl acetate concentration). The presence of these hydrophobic ILs at concentrations higher than 60% (w/w) was a key parameter to avoid enzyme deactivation by the high acetic acid concentration used, whereas the MW irradiation provided an enhancement in the studied biocatalytic transformation with respect to the conventional heating mode. Furthermore, a new approach for clean separation of the fragrance product by cooling/centrifugation using a nylon filter is proposed. By this approach, a nearly IL-free reaction product was easily obtained, while recovery and reuse of the biocatalyst/IL system was also facilitated. The catalytic activity of this system was maintained for several runs, which again evidence the ability of these hydrophobic ILs to stabilize enzymes.

Besides, the sponge-like behaviour of these hydrophobic ILs based on cations with long alkyl side chains (e.g. [C₁₆tma][NTf₂]) is clearly demonstrated. These ILs are able to “soak up” anisyl acetate as liquid phase, and then this fragrance can be “wrung out” by centrifugation from the solid phase. These results open up a new way in green chemistry for preparing “natural” fragrances by using substrates obtained from “natural” sources. Although further studies on these sponge-like ILs should be carried out, the combination of biocatalysts and a clean separation methodology as described here, enhances the possibility of developing green chemical industrial processes.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Materials

Immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym[®] 435, EC 3.1.1.3) was obtained from Novozymes S.A.

(Spain), and was equilibrated to 0.11 Aw by over saturated LiCl solutions in a closed container at 25°C for one week prior to use [12]. Anisyl alcohol (>98%), acetic acid (>99%), anisyl acetate (>97%), molecular sieves 13x (MS13x; 270 mg H₂O/g adsorption capacity), solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co. Centrifugal filters containing nylon membranes (0.2 µm pore size) were obtained from VWR Int. (Barcelona, Spain). The ILs, N,N,N,N-dodecyltrimethylammonium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide ([C₁₂tma][NTf₂], 99% purity), N,N,N,N-tetradecyltrimethylammonium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide ([C₁₄tma][NTf₂], 99% purity), N,N,N,N-hexadecyltrimethylammonium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide ([C₁₆tma][NTf₂], 99% purity) and N,N,N,N-octadecyltrimethylammonium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide ([C₁₈tma][NTf₂], 99% purity) were obtained from IoLiTec GmbH (Germany).

4.2. Phase Behaviour of [C_ntma][NTf₂] / Anisyl alcohol / Acetic acid, and [C_ntma][NTf₂] / Anisyl Acetate Mixtures

In 1.5-mL screw-capped vials with teflon-lined septa, a mixture of acetic acid (90 mg, 1.5 mmol) and anisyl alcohol (211 mg, 1.5 mmol), or anisyl acetate (279 mg, 1.5 mmol), were mixed with the corresponding amount of [C_ntma][NTf₂] to finally obtain IL concentrations of 50, 60, 70 or 80% (w/w), respectively. All mixtures were incubated under shaking (300 rpm) for 1h at 30, 40, 50, 60 or 70°C, to investigate the phase behaviour (see *Electronic Supporting Information*, ESI). For 70/30 (w/w) [C_ntma][NTf₂]/anisyl acetate cases, mixtures were incubated at 50°C for 1h, which produced transparent monophasic systems. Each SLIL/anisyl acetate solution was cooled into an ice bath for 3h, and 0.5 g of the resulting solid mixture was placed into a centrifugal filter, then centrifuged at 16,000 rpm (10 min) and at 0°C, resulting in a top SLIL solid phase retained inside the filter, and a bottom liquid phase of anisyl acetate fragrance. For each case, a sample (60 mg) of bottom liquid phase was dissolved in 0.45 mL acetone-*d*₆, containing 10 µL TFA (internal standard), then analyzed by 282 MHz ¹⁹F NMR in a Bruker AC 300E spectrometer to detect the presence of the SLIL. See ESI.

4.3. Lipase-catalyzed Anisyl Acetate Synthesis in SLILs

Into 3-mL screw-capped vials with teflon-lined septa, anisyl alcohol (423 mg, 3 mmol) and 1, 2 or 3 mmol of acetic acid (60, 120 or 180 mg, respectively) were added. Then, the corresponding amount of [C₁₂tma][NTf₂], [C₁₄tma][NTf₂], [C₁₆tma][NTf₂] or [C₁₈tma][NTf₂], respectively, was added to reach a final IL concentration of 50, 60, 70 or 80% (w/w) with respect to the mass substrates. For conventional heating cases, reaction mixtures were pre-incubated at the desired temperature for 10 min, and then 80 mg MS13x per mmol of carboxylic acid were also added. The reaction was started by adding Novozym 435 (40 mg per mmol of carboxylic acid) and the reaction mixture was incubated under shaking (300 rpm) for 4 h. For microwave-assisted cases, reactions were performed with a Microwave Discover System (CEM Corporation Model 908010, USA) using high purity quartz vials (10-mL capacity). Reaction mixtures were pre-incubated at 50°C for 10 min, resulting in clear monophasic systems, and then MS13x (80 mg per mmol of car-

boxylic acid) was also added. The reaction was started by adding Novozym 435 (40 mg per mmol of carboxylic acid) and the reaction mixture was heated in the MW oven at 3, 4, 5, 6 or 7W irradiation power with low stirring. The MW system was run at constant power operation mode for 15 min steps and coupled with the air cooling feature of the apparatus (70°C maximum safety temperature set). Then, the MW irradiation was stopped by 1 min for sampling. For each MW power used, different time-course profiles of temperature were obtained (see ESI). For all cases, 50 µL aliquots were taken at regular intervals and suspended in 500 µL 1-butanol, and the resulting mixture was cooled into an ice bath for 30 min. The resulting mixture was centrifuged at 16,000 rpm (10 min) and at 0°C, resulting in the precipitation of the solid IL. Finally, 300 µL of 1-butanol extract were added to 100 µL of 100 mM ethyl propionate (internal standard) solution in 1-butanol, and the final mixture was analyzed by CG. All experiments were carried out in duplicate.

4.4. GC Analysis

GC analysis was performed with a Shimadzu GC-17A (Shimadzu Europe, Germany) equipped with FID detector. Samples were analyzed on a SupraWax-280 capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.5 µm, Teknokra, Spain), using ethyl propionate as internal standard, under the following conditions: carrier gas (He) at 1.1 mL/min; inlet split ratio, 1:20; temperature programme: 70°C, 20°C/min, 240°C, 12 min. Peak retention times (min) were as follows: ethyl propionate, 3.5; acetic acid, 6.7; anisyl acetate, 12.2; anisyl alcohol, 14.4.

4.5. Identification of Anisyl Acetate Product by GC/MS

GC-MS analyses were carried out by using a GC-6890 (Agilent, USA) coupled with a MS-5973 (Agilent, USA) system. The GC was equipped with an HP-5MS column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, Agilent, USA), used under the following conditions: carrier gas (He) at 1 mL/min; inlet split ratio, 1:50; temperature program: 60°C, 1 min; 10°C/min, 310°C, 2min; MS source ionization energy: 70 eV; the scan time was 0.5 s, covering a mass range of 40–800 amu. Peak retention times (min) were as follows: anisyl alcohol, 5.4; anisyl acetate, 6.2. Anisyl acetate product was identified by comparison of its mass spectra with this in a computer library (NIST Library), as well as respect the commercial standard anisyl acetate (Rt: 6.2. min; m/z: 77.1, 91.2, 121.2, 138.2, 180.2. (see ESI).

4.6. Operational Stability of [C₁₆tma][NTf₂]/Novozym 435 System with Microwave Assistance

The operational stability study was carried out by following a series of catalytic / product separation consecutive steps with reusing the SLIL/enzyme system see (Fig. 8). For the biocatalytic step, both anisyl alcohol (423 mg, 3 mmol) and acetic acid (60 mg, 1 mmol) substrates were added into a 4-mL screw-capped vial with teflon-lined septum containing [C₁₆tma][NTf₂] (1.127 g), resulting in a 70% (w/w) SLIL reaction medium, with respect to the mass substrates. The mixture was pre-incubated at 50°C for 10 min, resulting in a clear monophasic system, then the reaction was started by adding Novozym 435 (40 mg per mmol of carboxylic acid),

the reaction mixture being heated by the MW oven at 4Watts irradiation power with low stirring for 2h. The MW system was run at constant power operation mode for 15 min steps by using the air cooling feature of the apparatus (70°C maximum temperature), being stopped by 1 min to avoid overheating. Concerning the product recovery, the reaction mixture was cooled into an ice bath for 2h, and the resulting solid mixture was distributed into two different centrifugal filter, then centrifuged at 16,000 rpm (10 min) and at 0°C, resulting in top SLIL/Novozym solid phase retained by each filter, and bottom liquid phases of reaction product and non-reacted substrates. The liquid phase was analysed by GC as described above, while the solid phase was carefully collected and placed into a screw-capped vial. This recovered SLIL/Novozym solid phase was incubated under vacuum at 80°C for 4 h for drying. Finally, a new biocatalytic/extraction cycle for anisyl acetate production was prepared by dissolving same amounts of anisyl alcohol and acetic acid into the recovered SLIL/Novozym mixture, pre-heated at 50°C, then assisted by MW irradiation.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by MINECO, Spain (Ref: CTQ2011-28903), and SENECA Foundation, Spain (Ref: 08616/PI/08) grants. We thank Ramiro Martinez (Novozymes España. S.A.) for a gift of Novozym 435.

Author's Contributions

- Prof. Pedro Lozano. Main researcher. Design and performance of research/study, data analysis, designing of Figures and paper writing.
- Juana M. Bernal, PhD student. Collecting and data analysis.
- Almudena Lajarin, Undergraduate student. Collecting data.
- Daniel Romera. Undergraduate student. Collecting data
- Prof. Eduardo Garcia-Verdugo. Researcher. Data analysis and improvements in paper writing.
- Prof. Gregorio Sanchez-Gomez. Researcher. Data analysis and improvements in paper writing.
- Dr. Mathieu Pucheault. Researcher. Data analysis and improvements in paper writing.
- Dr. Michel Vaultier. Researcher. Data analysis and improvements in paper writing.
- Prof. M. Isabel Burguete. Researcher. Data analysis and improvements in paper writing.
- Prof. Santiago V. Luis. Researcher. Data analysis and improvements in paper writing.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

REFERENCES

- [1] McGinty, M.; Letizia, C.S.; Api, A.M. Fragrance material review on anisyl acetate. *Food Chem. Toxicol.*, **2012**, *50*, S467-S470.
- [2] Serra, S.; Fuganti, C.; Brenna, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol.*, **2005**, *23*, 193-198.
- [3] a) US Code of Federal Regulations, 21CFR 101.22, Food and Drug Administration, Washington, D.C., **1985**; b) The Council of the European Communities, Council Directive 88/388/EEC, **1988**.
- [4] a) Dhake, K.P.; Thakare, D.D.; Bhanage, B.M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance compounds. *Flavor Frag. J.*, **2013**, *28*(2), 71-83; b) Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **2010**, *64*(1-2), 1-22.
- [5] a) Guvenç, A.; Kapucu, N. Mehmetoglu, U. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochem.*, **2002**, *38*(3), 379-386; b) Ghangui, H. Karra-Chaabouni, M.; Bezzine, S.; Miled, N.; Gargouri, Y. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. *Enzyme. Microb. Technol.*, **2006**, *38*(6), 788-794; c) Guvenç, A.; Kapucu, N. Kapucu, H.; Aydogan, O.; Mehmetoglu, U. Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fuel oil: Optimization by response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, *40*(4), 778-785.
- [6] a) Dupont, J.; de Souza, R.F.; Suarez, P.A.Z. Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*(10), 3667-3691; b) Welton, T. Ionic liquids in catalysis. *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, *248*, 2459-2477; c) Cassity, C.G.; Mirjafari, A.; Mobarrez, N.; Strickland, K.J.; O'Brien, R.A.; Davis, J.H. Ionic liquids of superior thermal stability. *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 7590-7592.
- [7] a) Lozano, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. *Green Chem.*, **2010**, *12*(4), 555-569; b) Lozano, P.; García-Verdugo, E.; Luis, S.V.; Pucheault, M.; Vaultier, M. (Bio) Catalytic continuous flow processes in scCO₂ and/or ILs: Towards Sustainable (Bio)Catalytic Synthetic Platforms. *Curr. Org. Synth.*, **2011**, *8*, 810-823; c) Lozano, P.; De Diego, T.; Carrié, D.; Vaultier, M.; Iborra, J.L. Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol. Lett.*, **2001**, *23*, 1529-1533. d) Feher, E.; Major, B.; Belafi-Bako, K.; Gubicza, L. On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids. *Biochem. Soc. Trans.*, **2007**, *35*, 1624-1627.
- [8] a) Lozano, P.; De Diego, T.; Carrié, D.; Vaultier, M.; Iborra, J.L. Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2003**, *21*(1-2), 9-13; b) Abe, Y.; Yagi, Y.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Itoh, T. Ionic liquid engineering for lipase-mediated optical resolution of secondary alcohols: design of ionic liquids applicable to ionic liquid coated-lipase catalyzed reaction. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2012**, *51*(30), 9952-9958; c) Lozano, P.; De Diego, T.; Mira, C.; Montague, K.; Vaultier, M.; Iborra, J.L. Long term continuous chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Green Chem.*, **2009**, *11*, 538-542; d) Fernandez-Alvaro, E.; De Maria, P.D. Ionic liquids in biocatalytic oxidations: From non-conventional media to non-solvent applications. *Curr. Org. Chem.*, **2012**, *16*(21), 2492-2507; e) de Maria, P.D. "Nonsolvent" applications of ionic liquids in biotransformations and organocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 6960-6968.
- [9] a) de Souza, R.O.M.A.; Antunes, O.A.C.; Kroutil, W.; Kappe, C.O. Kinetic resolution of rac-1-phenylethanol with immobilized lipases: A critical comparison of microwave and conventional heating protocols. *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*(16), 6157-6162; b) Zhao, H.; Baker, G.A.; Song, Z.Y.; Olubajo, O.; Zanders, L.; Campbell, S.M. Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **2009**, *57*(1-4), 149-157; c) Yadav, G.D.; Thorat, P.A. Microwave-assisted lipase catalyzed synthesis of isoamyl myristate in solvent-free systems. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2012**, *83*, 16-22; d) Yadav, G.D.; Pawar, S.V. Synergism between microwave irradiation and enzyme catalysis in transesterification of ethyl-3-phenylpropanoate with n-butanol. *Bioresour. Technol.*, **2012**, *109*, 1-6.
- [10] a) Yu, D.H.; Wang, C.M.; Yin, Y.N.; Zhang, A.J.; Gao, G.; Fang, X.X. A synergistic effect of microwave irradiation and ionic liquids on enzyme-catalyzed biodiesel production. *Green Chem.*,

- 2011, 13, 1869-1875; b) Paul, C. E.; Gotor-Fernandez, V.; Lavandera, I.; Montejó-Bernardo, J.; García-Granda, S.; Gotor, V. Chemoenzymatic preparation of optically active 3-(1H-imidazol-1-yl) cyclohexanol-based ionic liquids: Application in organocatalysis and toxicity studies. *RSC Adv.*, **2012**, 2, 6455-6463; c) Yu, D. H.; Ma, D. X.; Wang, Z.; Wang, Y.; Pan, Y.; Fang, X. X. Microwave-assisted enzymatic resolution of (R,S)-2-octanol in ionic liquid. *Process Biochem.*, **2012**, 47(3), 479-484; d) Izquierdo, D. F.; Bernal, J. M.; Burguete, M. I.; García-Verdugo, E.; Lozano, P.; Luis, S. V. An efficient microwave-assisted enzymatic resolution of alcohols using a lipase immobilised on supported ionic liquid-like phases (SILLPs). *RSC Adv.*, **2013**, 3(32), 13123-13126; e) Yu, D.H.; Wu, H.; Zhang, A.J.; Tian, L.; Liu, L.D.; Wang, C. M.; Fang, X. X. Microwave irradiation-assisted isomerisation of glucose to fructose by immobilized glucose isomerase. *Process Biochem.*, **2011**, 46(1, 2), 599-603.
- [11] a) Barahona, D.; Pfromm, P. H.; Rezac, M. E. Effect of water activity on the lipase catalyzed esterification of geraniol in ionic liquid. *Biotechnol. Bioeng.*, **2006**, 93(2), 318-324; b) Lozano, P.; Piamtongkam, R.; Kohns, K.; Diego, T.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. Ionic liquids improve citronellol ester synthesis catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in solvent-free media. *Green Chem.*, **2007**, 9(7), 780-784; c) Feher, E.; Illeova, V.; Kelemen-Horvath, I.; Belafi-Bako, K.; Polakovic, M.; Gubicza, L. Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid-alcohol biphasic system. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **2008**, 50(1, 2), 28-32; d) Pohar, A.; Plazl, I.; Znidarsic-Plazl, P. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/n-heptane two-phase system at the microreactor scale. *Lab Chip*, **2009**, 9(23), 3385-3390.
- [12] a) Lozano, P.; Bernal, J. M.; Piamtongkam, R.; Fetzer, D.; Vaultier, M. One-phase ionic liquid reaction medium for biocatalytic production of biodiesel. *Chem. Sus. Chem.*, **2010**, 3, 1359-1363; b) Lozano, P.; Bernal, J. M.; Vaultier, M. Towards continuous sustainable processes for enzymatic synthesis of biodiesel in hydrophobic ionic liquids/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Fuel*, **2011**, 90(11), 3461-3467.
- [13] a) Lozano, P.; Bernal, J. M.; Navarro, A. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases. *Green Chem.*, **2012**, 14, 3026-3033; b) Lozano, P.; Bernal, J. M.; Sanchez-Gomez, G.; Lopez-Lopez, G.; Vaultier, M. How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids. *Environ. Sci.*, **2013**, 6, 1328-1338.
- [14] De la Hoz, A.; Díaz-Ortiz, A.; Moreno, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effect. *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 164-178
- [15] a) Lozano, P.; De Diego, T.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. Dynamic structure-function relationships in enzyme stabilization by ionic liquids. *Biocatal. Biotransform.*, **2005**, 23(3-4), 169-176; b) Micaelo, N. M.; Soares, C. M. Protein structure and dynamics in ionic liquids. Insights from molecular dynamics simulation studies. *J. Phys. Chem. B.*, **2008**, 112, 2566-2572; c) Sandoval, M.; Cortes, A.; Civera, C.; Trevino, J.; Ferreras, E.; Vaultier, M.; Berenguer, J.; Lozano, P.; Hernaiz, M. J. Efficient and selective enzymatic synthesis of N-acetyl-lactosamine in ionic liquid: A rational explanation. *RSC Adv.*, **2012**, 2, 6306-6314; d) Weingartner, H.; Cabrele, C.; Herrmann, C. How ionic liquids can help to stabilize native proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2012**, 14, 415-426.
- [16] Petkovic, M.; Seddon, K. R.; Rebelo, L. P. N.; Pereira, C. S. Ionic liquids: A pathway to environmental acceptability. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 1383-1403.
- [17] Lin, R. Y.; Taberna, P. L.; Fantini, S.; Presser, V.; Perez, C. R.; Malbosc, F.; Rupesinghe, N. L.; Teo, K. B. K.; Gogotsi, Y.; Simon, P. Capacitive energy storage from -50 to 100 degrees C using an ionic liquid electrolyte. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2011**, 2, 2396-2401.
- [18] a) Dupont, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2004**, 15, 341-350; b) Dupont, J. From molten salts to ionic liquids: A "nano" journey. *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 1223-1231; c) Dupont, J.; Eberlin, M. N. Structure and physico-chemical properties of ionic liquids: what mass spectrometry is telling us. *Curr. Org. Chem.*, **2013**, 17, 257-272.
- [19] a) Hayes, R.; Imberti, S.; Warr, G. G.; Atkin, R. Pronounced sponge-like nanostructure in propylammonium nitrate. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13(30), 13544-13551; b) Hayes, R.; Imberti, S.; Warr, G. G.; Atkin, R. Amphiphilicity determines nanostructure in protic ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13(8), 3237-3247; c) Smith, A.M.; Lovelock, K.R.J.; Gosvami, N.N.; Licence, P.; Dolan, A.; Welton, T.; Perkin, S. Monolayer to bilayer structural transition in confined pyrrolidinium-based ionic liquids. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2013**, 4(3), 378-382; d) Zhang, C. L.; Zhang, S. M.; Yu, L. G.; Zhang, P. Y.; Zhang, Z. J.; Wu, Z. S. Tribological behavior of 1-methyl-3-hexadecylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid crystal as a neat lubricant and as an additive of liquid paraffin. *Tribol. Lett.*, **2012**, 46, 49-54; e) Iwahashi, T.; Nishi, T.; Yamane, H.; Miyamae, T.; Kanai, K.; Seki, K.; Kim, D.; Ouchi, Y. Surface structural study on ionic liquids using metastable atom electron spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, **2009**, 113(44), 19237-19243.
- [20] Bonhote, P. P.; Dias, A. P.; Papageorgiou, N.; Kalyanasundaram K.; Gratzel, M. Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorg. Chem.*, **1996**, 35(5), 1168-1178.