



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA**

***Desarrollo de nuevos procesos  
biotecnológicos basados en el uso de  
líquidos iónicos, fluidos supercríticos y  
tecnología de membranas***

Memoria que presenta

**FRANCISCO JOSÉ HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**

Ingeniero Químico, para optar al  
Grado de Doctor por la Universidad de Murcia

**2008**

**D<sup>a</sup>. Maria Gloria Villora Cano**, Profesora Titular de Universidad del Área de Ingeniería Química en el Departamento de Ingeniería Química

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos basados en el uso de líquidos iónicos, fluidos supercríticos y tecnología de membranas*” realizada por D. Francisco José Hernández Fernández, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Ingeniería Química, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 17 de Enero de 2007

**D<sup>a</sup>. Antonia Pérez de los Ríos**, Doctora en Ingeniería Química por la Universidad de Murcia

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos basados en el uso de líquidos iónicos, fluidos supercríticos y tecnología de membranas*” realizada por D. Francisco José Hernández Fernández, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Ingeniería Química, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 17 de Enero de 2007

**D. Antonio Bódalo Santoyo**, Catedrático de Universidad del Área de Ingeniería Química y Director del Departamento de Ingeniería Química

**INFORMA:**

Que la Tesis Doctoral titulada “*Desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos basados en el uso de líquidos iónicos, fluidos supercríticos y tecnología de membranas*” ha sido realizada por D. Francisco José Hernández Fernández, bajo la inmediata dirección y supervisión de D<sup>a</sup>. Maria Gloria Villora Cano y D<sup>a</sup>. Antonia Pérez de los Ríos, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 17 de Enero de 2007

Trabajo presentado para optar al Grado  
de Doctor en Ingeniería Química por  
la Universidad de Murcia.

Modalidad: Doctorado Europeo

Murcia, a 17 de Enero de 2008

Francisco José Hernández Fernández  
*Ingeniero Químico*

El siguiente trabajo ha sido subvencionado, a través de los proyectos CICYT PPQ2002-03549 y CICYT CTQ2005-09238/PPQ, por el Ministerio de Educación y Ciencia y a través del proyecto PB/75/FS/02 por la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de Murcia.

Durante la ejecución del presente trabajo, su autor, Francisco José Hernández Fernández, ha disfrutado de una beca F.P.U. (Formación del Personal Universitario) de la Universidad de Murcia y de una beca de Investigación de la Fundación Cajamurcia.

Por todo ello, expresamos nuestro más sincero agradecimiento hacia dichas instituciones.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. María Gloria Villora Cano por la eficaz dirección de la presente memoria, por su inestimable ayuda, comprensión y confianza, pero sobre todo por la entrañable amistad que me ha ofrecido durante todos estos años. Todo lo que pueda decir no sería suficiente para expresarte mi gratitud.

Deseo también agradecer a la Dra. Antonia Pérez de los Ríos, codirectora de la presente Tesis, por su incansable ayuda en la realización de esta Tesis, por sus continuos y buenos consejos, pero sobre todo por todo lo que he aprendido de ella en estos últimos años.

D. Demetrio Gómez Pérez, por su gran ayuda en el montaje de los equipos utilizados en la Tesis, además por su inestimable apoyo y estímulo.

Quiero darle las gracias a D. Manuel Rubio por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su grupo de investigación, y sobre todo por sus enriquecedores consejos, apoyo y su confianza.

También deseo expresar mi agradecimiento a Dña. Paquita Tomás por su gran ayuda y su continua motivación, pero de un modo especial por brindarme su amistad. Muchas gracias por todo.

A los doctores Roger Sheldon y Fred van Rantwijk del grupo de investigación Biocatálisis y Química Orgánica de la Universidad Tecnológica de Delft (Holanda), por su atención, sus consejos y por hacerme sentir *como en casa* durante mi estancia en sus laboratorios.

Quiero también expresar mi agradecimiento a D. Jose Luis Iborra por darme la oportunidad de realizar parte del presente trabajo en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, y a D. Pedro Lozano por iniciarme en el campo de la biotecnología.

Quiero también dar las gracias a todos los profesores de las Licenciaturas de Ingeniero Químico y Química que han contribuido a mi formación, por haberme aportado las herramientas necesarias para mi desarrollo profesional. De un modo especial a D. José Vicente Soler y D. María Teresa Chicote Olalla por iniciarme en el apasionante mundo de la investigación, y sobre todo por su amistad y confianza.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química. Habéis sido mi *familia* más cercana en los últimos cuatro años.

A Antonio Bódalo, José Luis Gómez, Elisa Gómez y Pepa Bastida por su continuo apoyo y estímulo desde el inicio de mi Tesis doctoral.

A Enrique González por cedernos amablemente el uso de su cromatógrafo de gases durante la primera etapa de realización de esta Tesis. Gracias por tu ayuda.

A Agustín Miñana, Pepe Sáez y Antonio López por sus continuos y agradables saludos que hacen sentir que estás.

A Maribel Aguilar, Juan Ortuño, Víctor Meseguer y Fuensanta Máximo por su ayuda y enseñanza en mis primeros pasos en la docencia, tanto en Murcia como en Cartagena. Me lo habéis puesto muy fácil. Ha sido todo un placer compartir prácticas con vosotros. Muchas gracias por todo.

A Mercedes Lloréns y Toñi Baeza, muchísimas gracias por vuestra ayuda, gracias por alegraros de las cosas buenas que me pasan, y por vuestros consejos y ánimos. Gracias por ser como sois.

A Joaquín Quesada, gracias por compartir el laboratorio conmigo y por tus ánimos en el arduo trabajo de investigación.

A Claudia y Asunción Hidalgo por su motivación y buenos consejos.

A Joaquín Herráiz por estar siempre dispuesto a prestarme su ayuda cuando le he necesitado.

A María Dolores Riquelme por su simpatía y la eficaz gestión de todos los asuntos que han surgido en el transcurso de mi Tesis. Muchas gracias.

También quiero dar las gracias a todas las personas con las que he compartido la mayor parte del tiempo durante este periodo doctoral: Toñi, Ana Belén, María, María Dolores, Javi, Antonio, Vicente, Angel, Maria González, Pepe, Carmen, Juan, Emilio, Alberto, María Jiménez, Juani, Irene, Esther, Imma, Eric, Noelia, Gloria, etc. Gracias por los buenos momentos que hemos compartido y los que nos quedan por compartir. Especialmente me gustaría dar las gracias a Ana Belén, a María y a Maria Dolores por estar siempre dispuestas a echarme una mano cuando lo he necesitado y ser tan buenas “compañeras de viaje”. Gracias por vuestra amistad. Os deseo lo mejor. Os lo merecéis.

Quiero dar también las gracias a mis nuevos compañeros del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Politécnica de Cartagena, Beatriz Miguel, Juan Ignacio Moreno, Mercedes Alacid, José María Obón, Chari Castellar, Carlos Godínez, Luis Javier Lozano, José Antonio Fernández, José Antonio Cascales, Isidro Ibarra, María José Martínez, Gerardo León, Diego Juan, Javier Bayo, José Manuel Moreno, etc., por vuestro trato tan amable cuando llegué, por hacerme sentir como en casa y por estar siempre dispuestos a ayudarme. Muchísimas gracias por todo.



Sin duda alguna, no habría sido capaz de finalizar mi Tesis sin el constante apoyo y estímulo de MI FAMILIA:

A mis padres, Paco y Lola, habéis sido el pilar de mi desarrollo personal. Siempre alentadores y reconfortantes en los momentos bajos, habéis sabido darme siempre lo que he necesitado. Gracias por animarme a hacer lo que realmente me gusta. Gracias también por transmitirme los valores de esfuerzo, responsabilidad y paciencia, que han sido sin duda los artífices de que este trabajo haya llegado a buen término. Es imposible pagar vuestro cariño como os lo mereceis. Os quiero mucho.

A mis hermanos, Maria Luisa, Jesús y Maria Carmen, habéis sido “mis segundos padres”, me habéis motivado a interesarme por “las cosas”, me habéis apoyado en todo momento y en cualquier proyecto nuevo que he emprendido y lo más importante me habéis dado vuestro cariño incondicional. Os quiero mucho.

A mis cuñados Pedro, Juli por su apoyo y cariño .

A mi sobrina “Chiquinquira” (Carmen), gracias por venir, eres sin duda lo mejor que me ha pasado estos años. Gracias por todas las alegrías y las nuevas ilusiones que has traído a nuestras vidas. Te quiero muchísimo.

A mis abuelos (Jesús, Carmen, José y María Luisa) por todo el cariño que me profesaron.

A José Antonio Dehesa, por los buenos momentos que hemos compartido y por tu enseñanza de vida.

A Mateo, Toñi, Juanjo, Mentxu y Laura, por todo el cariño que me han demostrado estos años. Gracias por vuestra continua ayuda, motivación y estímulo. Por estar siempre a nuestro lado. Os quiero mucho.

A todos mis amigos, gracias por vuestra amistad y por los buenos momentos que compartimos.

A todos los gatos y perros (Blanca, Churra, Chapis, Eli, etc.) que me han hecho más agradables las largas horas de trabajo.

Por último quisiera dar las gracias a TOÑI. Gracias por los intensos 9 años que hemos compartido. Contigo los obstáculos se han convertido en retos y los cambios en ilusiones. Gracias por todo lo que me has enseñado a nivel profesional pero principalmente a nivel personal. Gracias por tu apoyo incondicional, sin ti todo esto hubiera sido impensable. Gracias por ayudarme a alcanzar mis anhelos. TE QUIERO MUCHÍSIMO. MUCHAS GRACIAS.

*A mis padres*

## ÍNDICE:

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL TRABAJO.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Objetivos.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Estructura del trabajo.....</b>	<b>7</b>
<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Las enzimas en biocatálisis.....</b>	<b>13</b>
3.1.1. Definición y propiedades de las enzimas.....	13
3.1.2. Nomenclatura y clasificación de las enzimas.....	14
3.1.3. Lipasas.....	16
3.1.3.1. Clasificación de las lipasas.....	16
3.1.3.2. Aplicaciones de las lipasas.....	17
3.1.3.3. Propiedades moleculares y mecanismo de catálisis de las lipasas.....	18
3.1.4. Penicilina acilasas.....	24
3.1.3.1. Clasificación de las penicilina acilasas.....	24
3.1.3.2. Aplicaciones de las penicilina acilasas .....	25
3.1.3.3. Propiedades moleculares y mecanismo de catálisis de las penicilina acilasas.....	25
<b>3.2. Medios no convencionales de reacción en biocatálisis .....</b>	<b>28</b>

<b>3.3. Los líquidos iónicos</b> .....	32
3.3.1. Definición de líquido iónico .....	33
3.3.2. Obtención de los líquidos iónicos .....	34
<i>3.3.2.1. Reacciones de cuaternización</i> .....	35
<i>3.3.2.2. Reacciones de intercambio del anión</i> .....	37
3.3.3. Propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos.....	40
3.3.4. Toxicidad y biodegradabilidad de los líquidos iónicos .....	47
3.3.5. Aplicaciones generales de los líquidos iónicos.....	47
3.3.5.1. Los líquidos iónicos como medios no convencionales en reacciones biocatalíticas .....	48
3.3.5.2. Los líquidos iónicos como disolventes en reacciones químicas.....	52
3.3.5.3. Los líquidos iónicos como catalizadores.....	54
3.3.5.4. Los líquidos iónicos como co-catalizadores.....	55
3.3.5.5. Otros usos de los líquidos iónicos.....	55
<b>3.4. Los fluidos supercríticos</b> .....	57
3.4.1. Definición de fluido supercrítico.....	57
3.4.2. Propiedades y aplicaciones de los fluidos supercríticos.....	58
3.4.3. El dióxido de carbono supercrítico.....	62
3.4.4. El dióxido de carbono supercrítico como medio de reacción.....	64
<b>3.5. Los sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico</b> .....	66
3.5.1. Propiedades de los sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico: Comportamiento de fases. ....	67
3.5.2. Aplicaciones de los sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico.....	69
<i>3.5.2.1. Catálisis organometálica</i> .....	70
<i>3.5.2.2. Biocatálisis</i> .....	73

<b>3.6. Tecnología de membranas</b> .....	74
3.6.1. Membranas .....	74
<i>3.6.1.1. Clasificación de las membranas</i> .....	75
<i>3.6.1.2. Procesos de membrana</i> .....	78
3.6.2. Membranas líquidas .....	82
<i>3.6.2.1. Membranas de volumen líquido</i> .....	83
<i>3.6.2.2. Membranas líquidas emulsionadas</i> .....	84
<i>3.6.2.3. Membranas líquidas inmovilizadas o soportadas</i> .....	84
3.6.3. Membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos.....	90
3.6.4. Reactores enzimáticos de membrana.....	92
<i>3.6.4.1. Clasificación de los reactores enzimáticos de membrana</i> .....	92
3.6.4.2. Reactores de membrana con enzima inmovilizada.....	94
<b>3.7. Bibliografía</b> .....	99

<b>4. AUMENTO DE LA ACTIVIDAD Y SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA EN REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN CATALIZADAS POR LIPASAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS MEDIANTE EL USO DE ADITIVOS.....</b>	<b>121</b>
<b>4.1. Introducción.....</b>	<b>123</b>
<b>4.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>125</b>
4.2.1. Enzima y materiales.....	125
4.2.2. Purificación de los líquidos iónicos.....	127
4.2.3. Equilibración de los líquidos iónicos con disoluciones acuosas de sales.....	127
4.2.4. Ensayos de actividad enzimática.....	127
4.2.5. Métodos analíticos.....	128
4.2.5.1. <i>Análisis cromatográfico</i> .....	128
4.2.5.2. <i>Análisis de resonancia magnética nuclear</i> .....	131
4.2.6. Determinación de la actividad y selectividad enzimática.....	131
<b>4.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>133</b>
4.3.1. Purificación de los líquidos iónicos.....	133
4.3.2. Reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas en líquidos iónicos .....	134
4.3.3. Efecto de diferentes tratamientos en la actividad y selectividad enzimática en reacciones de transesterificación en [bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ].....	136
4.3.4. Efecto de la adición de una cantidad catalítica de trietilamina en la actividad y selectividad enzimática en reacciones de transesterificación en líquidos iónicos.....	138
<b>4.4. Conclusiones.....</b>	<b>139</b>
<b>4.5. Bibliografía.....</b>	<b>140</b>

<b>5. DESARROLLO DE UN NUEVO DERIVADO ENZIMÁTICO DE LIPASA B DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> ACTIVO EN LÍQUIDOS IÓNICOS DESNATURALIZANTES .....</b>	143
<b>5.1. Introducción.....</b>	145
<b>5.2. Materiales y métodos.....</b>	147
5.2.1. Enzima y materiales.....	147
5.2.2. Preparación de derivados enzimáticos entrecruzados de lipasa B de <i>Candida antarctica</i> .....	148
5.2.3. Síntesis de líquidos iónicos.....	148
5.2.4. Ensayos de actividad enzimática.....	150
5.2.5. Métodos analíticos.....	151
5.2.5.1. <i>Análisis de resonancia magnética nuclear</i> .....	151
5.2.5.2. <i>Test de determinación de cloruros</i> .....	151
5.2.5.3. <i>Análisis cromatográfico</i> .....	151
<b>5.3. Resultados y discusión.....</b>	153
5.3.1. Resolución de <i>rac</i> -1-feniletanol.....	153
5.3.2. Resolución de <i>rac</i> -1-feniletilamina.....	154
<b>5.4. Conclusiones.....</b>	155
<b>5.5. Bibliografía.....</b>	156

<b>6. DESARROLLO DE NUEVOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS DE LIPASA B DE <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> ACTIVOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS DESNATURALIZANTES.....</b>	159
<b>6.1. Introducción.....</b>	161
<b>6.2. Materiales y métodos.....</b>	163
6.2.1. Enzima y materiales.....	163
6.2.2. Estabilidad enzimática en líquidos iónicos.....	163
6.2.3. Hidrólisis enzimática de penicilina G.....	164
6.2.4. Análisis cromatográfico.....	164
<b>6.3. Resultados y discusión.....</b>	166
<b>6.4. Conclusiones.....</b>	173
<b>6.5. Nomenclatura.....</b>	174
<b>6.6. Bibliografía.....</b>	175



<b>7. RESOLUCIÓN RACÉMICA DE <i>RAC</i>-1-FENILETANOL MEDIANTE UN PROCESO INTEGRADO DE REACCIÓN/SEPARACIÓN USANDO MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS.....</b>	<b>179</b>
<b>7.1. Introducción.....</b>	<b>181</b>
<b>7.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>183</b>
7.2.1. Enzima y materiales.....	183
7.2.2. Síntesis química de laurato de <i>rac</i> -feniletilo.....	184
7.2.3. Preparación de membranas líquidas soportadas.....	184
7.2.4. Dispositivo experimental.....	185
7.2.5. Estudios de transporte.....	187
7.2.6. Estudios de reacción.....	191
7.2.7. Estudios de reacción/separación.....	191
7.2.8. Métodos analíticos.....	192
7.2.8.1. <i>Análisis cromatográfico</i> .....	192
7.2.8.2. <i>Determinación del contenido en agua</i> .....	197
<b>7.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>197</b>
7.3.1. Selección de la membrana líquida soportada.....	197
7.3.2. Resolución cinética de <i>rac</i> -1-feniletanol en n-hexano: efecto del éster vinílico y del contenido en agua.....	203
7.3.3. Proceso de reacción/separación para la resolución cinética de <i>rac</i> -1-feniletanol.....	206
7.3.3.1. <i>Efecto de la concentración de enzima</i> .....	206
7.3.3.2. <i>Efecto de los ésteres vinílicos</i> .....	209
<b>7.4. Conclusiones.....</b>	<b>212</b>
<b>7.5. Nomenclatura.....</b>	<b>213</b>
<b>7.6. Bibliografía.....</b>	<b>214</b>

---

<b>8. RESOLUCIÓN RACÉMICA DE <i>RAC</i>-2-PENTANOL MEDIANTE UN BIORREACTOR DE MEMBRANA USANDO MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS.....</b>	<b>217</b>
<b>8.1. Introducción.....</b>	<b>219</b>
<b>8.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>220</b>
8.2.1. Enzima y materiales.....	220
8.2.2. Síntesis química de propionato de <i>rac</i> -2-pentilo.....	220
8.2.3. Preparación de membranas líquidas soportadas.....	221
8.2.4. Dispositivo experimental.....	221
8.2.5. Estudios de transporte.....	221
8.2.6. Estudios de reacción.....	223
8.2.7. Estudios de reacción/separación.....	223
8.2.8. Métodos analíticos.....	224
8.2.8.1. <i>Análisis cromatográfico</i> .....	224
8.2.8.2. <i>Determinación del contenido en agua</i> .....	227
<b>8.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>227</b>
8.3.1. Selección de la membrana líquida soportada.....	227
8.3.2. Resolución cinética de <i>rac</i> -2-pentanol en n-hexano: efecto del éster vinílico y del contenido en agua.....	231
8.3.3. Proceso de reacción/separación para la resolución cinética de <i>rac</i> -2-pentanol.....	235
<b>8.4. Conclusiones.....</b>	<b>238</b>
<b>8.5. Nomenclatura.....</b>	<b>239</b>
<b>8.6. Bibliografía.....</b>	<b>240</b>

<b>9. NUEVO REACTOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA CON RECIRCULACIÓN PARA LA SÍNTESIS DE ESTERES EN SISTEMAS BIFÁSICOS LÍQUIDO IÓNICO/DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.....</b>	<b>241</b>
<b>9.1. Introducción.....</b>	<b>243</b>
<b>9.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>245</b>
9.2.1. Enzima y materiales.....	245
9.2.2. Purificación del preparado enzimático.....	246
9.2.3. Preparación de las membranas con enzima inmovilizada.....	246
9.2.4. Preparación de membranas enzimáticas recubiertas con líquidos iónicos.....	249
9.2.5. Ensayos de actividad enzimática en líquidos iónicos y en n-hexano.....	249
9.2.6. Ensayos de actividad enzimática en sistemas bifásicos líquido iónico/hexano.....	250
9.2.7. Ensayos de actividad enzimática en dióxido de carbono supercrítico y en sistemas bifásicos líquido iónico/ dióxido de carbono supercrítico.....	251
9.2.7.1. <i>Dispositivo experimental</i> .....	251
9.2.7.2. <i>Ensayos de actividad enzimática</i> .....	253
9.2.8. Determinación experimental de los coeficientes de reparto de los sustratos y producto de reacción entre los líquidos iónicos y n-hexano.....	257
9.2.9. Análisis cromatográfico.....	257

<b>9.3. Resultados y discusión</b> .....	259
9.3.1. Síntesis de propionato de butilo catalizada por membranas enzimáticas en dióxido de carbono supercrítico .....	259
9.3.2. Modelo cinético para la síntesis de propionato de butilo catalizada por membranas enzimáticas en dióxido de carbono supercrítico.....	260
9.3.3. Síntesis de propionato de butilo en líquidos iónicos catalizada por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> .....	265
9.3.4. Síntesis de propionato de butilo catalizada por membranas enzimáticas en sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico.....	266
9.3.5. Síntesis de propionato de butilo catalizada por <i>lipasa B de</i> <i>Candida antarctica</i> libre en sistemas bifásicos líquido iónico/hexano.....	270
<b>9.4. Conclusiones</b> .....	272
<b>9.5. Nomenclatura</b> .....	273
<b>9.6. Bibliografía</b> .....	274

<b>10. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	275
<b>11. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	281
<b>12. ANEXOS</b> .....	285
<b>Anexo 1. Pendientes iniciales de los perfiles de concentración de butirato de butilo y ácido butírico en la síntesis de butirato de butilo catalizada por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en líquidos iónicos a 30 °C</b> .....	287
<b>Anexo 2. Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético en la reacción de hidrólisis de penicilina G catalizada por penicilina G acilasa de <i>Escherichia coli</i> en líquidos iónicos a 40 °C</b> .....	289
<b>Anexo 3. Representación de la linealización de la 1ª Ley de Fick para el cálculo de las permeabilidades de los compuestos a través de membranas líquidas soportadas</b> .....	297
<b>Anexo 4. Pendientes iniciales de los perfiles de concentración de ésteres de (R)-1-feniletilo y de ácidos carboxílicos en la resolución cinética de <i>rac</i>-1-feniletanol catalizada por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en n-hexano a 30 °C</b> .....	327
<b>Anexo 5. Perfiles de concentración de los sustratos y productos implicados en la resolución cinética de <i>rac</i>-1-feniletanol catalizadas por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en el proceso integrado de reacción/separación</b> .....	329

<p><b>Anexo 6. Pendientes iniciales de los perfiles de concentración de ésteres de (R)-2-pentilo y de ácidos carboxílicos en la resolución cinética de <i>rac</i>-2-pentanol catalizada por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en n-hexano a 30 °C.....</b></p>	333
<p><b>Anexo 7. Perfiles de concentración de los sustratos y productos implicados en las resolución cinética de <i>rac</i>-2-pentanol catalizadas por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en el proceso integrado de reacción/separación.....</b></p>	335
<p><b>Anexo 8. Pendientes iniciales de los perfiles de concentración de propionato de butilo y ácido propiónico en la síntesis de propionato de butilo catalizada por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en líquidos iónicos a 50 °C.....</b></p>	337
<p><b>Anexo 9. Pendientes iniciales de los perfiles de concentración de propionato de butilo y ácido propiónico en la síntesis de propionato de butilo catalizada por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en dióxido de carbono supercrítico a 80 bar y 50 °C.....</b></p>	339
<p><b>Anexo 10. Pendientes iniciales de los perfiles de concentración de propionato de butilo y ácido propiónico en la síntesis de propionato de butilo catalizada por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico a 80 bar y 50 °C.....</b></p>	341
<p><b>Anexo 11. Pendientes iniciales de los perfiles de concentración de propionato de butilo y ácido propiónico en la síntesis de propionato de butilo catalizada por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en sistemas bifásicos líquido iónico/hexano a 50 °C....</b></p>	343
<p><b>13. RESUMEN EN INGLÉS DE LA TESIS DOCTORAL .....</b></p>	345

# 1

## Introducción





### 1. INTRODUCCIÓN

El sistema económico basado en la máxima producción, el consumo, la explotación ilimitada de recursos y el beneficio como único criterio de la buena marcha económica es insostenible. Un planeta limitado no puede suministrar indefinidamente los recursos que esta explotación exigiría. Por esto se ha impuesto la idea de que hay que ir a un desarrollo real, que permita la mejora de las condiciones de vida, pero compatible con una explotación racional del planeta que cuide el ambiente. Es el llamado *desarrollo sostenible*.

El término *desarrollo sostenible* se aplica al desarrollo socio-económico y fue formalizado por primera vez en el documento conocido como Informe Brundtland (1987), fruto de los trabajos de la Comisión Mundial de Medio Ambiente y Desarrollo de Naciones Unidas, creada en Asamblea de las Naciones Unidas en 1983. Dicha definición se asumiría en el Principio 3.º de la Declaración de Río (1992) “*Satisfacer las necesidades de las generaciones presentes sin comprometer las posibilidades de las del futuro para atender sus propias necesidades*”.

El concepto de sostenibilidad o desarrollo sostenible puede ser promovido desde una amplia variedad de disciplinas y todas ellas pueden aportar sus avances para conseguir un mismo objetivo. En este marco han surgido la “*Química Verde*” y la “*Ingeniería Química Verde*”. La *Química Verde* está orientada al uso de la Química para la prevención de la contaminación a nivel molecular. Por su parte, la *Ingeniería Química Verde* tiene la misión de promover las innovaciones de las tecnologías químicas para reducir o eliminar el uso o generación de sustancias tóxicas o peligrosas en el diseño, manufactura y uso de procesos y productos químicos.

En 1998, P. Anastas y J.C. Warner promulgaron una serie de pautas “*verdes*” concretadas en Doce Principios, los cuales engloban los siguientes aspectos:

1. El diseño de procesos que incorporen al máximo en el producto final todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos.
2. El uso de sustancias seguras y respetuosas con el medio ambiente ( disolventes, reactivos etc).
3. El diseño de procesos energéticamente eficientes.

El continuo desarrollo tecnológico que se está llevando a cabo en todas las áreas, y en particular en la química, va orientado a la obtención de nuevos y mejores procesos que sean más respetuosos con el medio ambiente, que resulten más económicos, que utilicen menos cantidades de energía y de materias primas. En definitiva, lo que se pretende es la optimización de los mismos para alcanzar los máximos rendimientos posibles con los menores impactos sobre el medio ambiente.

El dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>) y los líquidos iónicos a temperatura ambiente (ILs), se han revelado recientemente como prometedores disolventes respetuosos con el medio ambiente. Son energéticamente eficientes, selectivos y capaces de reducir los residuos, siendo una alternativa a los disolventes orgánicos. La utilización de estos medios alternativos de reacción permite trabajar en condiciones más respetuosas con el medio ambiente, incluso aumentando considerablemente la eficacia de los procesos. En la misma línea, los reactores de membrana constituyen el medio donde los procesos de reacción, separación y/o concentración se integran en una única etapa con unos costes energéticos mínimos. Por lo tanto, los líquidos iónicos, el CO<sub>2</sub> supercrítico y la tecnología de membranas aparecen como uno de los marcos más eficientes y limpios donde se podrán desarrollar los futuros procesos industriales.

El presente trabajo de Tesis tiene como finalidad el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a procesos de Química Fina y Farmacéutica dentro del ámbito de la “*Química Verde*” o Química respetuosa con el medio ambiente y que se fundamentan en diseñar métodos de síntesis basados en la utilización de condiciones de reacción que generen o utilicen sustancias que tengan menor toxicidad que en la síntesis tradicional, tales como sustituir los disolventes orgánicos por líquidos iónicos o fluidos supercríticos, catalizadores que puedan recuperarse y reutilizarse, y en la integración de procesos de reacción y separación en una sola etapa, todo ello para obtener productos de alto valor añadido. Así, en este trabajo se han desarrollado nuevos bioprocesos basados en el uso de líquidos iónicos, dióxido de carbono supercrítico y tecnología de membranas con el fin de mejorar la eficiencia de los procesos y minimizar la generación de residuos.

# 2

## **Objetivos y estructura del trabajo**



## **2. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL TRABAJO**

### **2.1. OBJETIVOS**

El objetivo global de este trabajo es el desarrollo de nuevos bioprocesos basados en el uso de líquidos iónicos, dióxido de carbono supercrítico y tecnología de membranas como medios de reacción y/o separación.

Para alcanzarlo se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Aplicar nuevos tratamientos a los líquidos iónicos para mejorar la eficacia catalítica de la enzima lipasa B de *Candida antarctica* en estado libre en estos medios.
2. Desarrollar nuevos derivados inmovilizados de lipasa B de *Candida antarctica* que mantengan su actividad catalítica en líquidos iónicos desnaturalizantes y que permitan una separación más eficiente del biocatalizador.
3. Evaluar la adecuación del uso de líquidos iónicos como medios de reacción en procesos catalizados por la enzima penicilina G acilasa en estado libre.
4. Desarrollar un nuevo proceso integrado de reacción/separación para la resolución racémica de *rac*-1-feniletanol y *rac*-2-pentanol basado en la utilización de líquidos iónicos soportados en membranas.
5. Desarrollar un nuevo proceso para la síntesis de ésteres en sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico en un reactor enzimático de membrana con recirculación.

### **2.2. ESTRUCTURA DEL TRABAJO**

De acuerdo con estos objetivos específicos, el trabajo se va a articular en los siguientes capítulos:

En el *Capítulo 3* se incluye una revisión del estado del arte de las propiedades y aplicaciones de los líquidos iónicos, fluidos supercríticos y reactores de membranas haciendo especial hincapié en su empleo en procesos de reacción y/o separación en síntesis química y bioquímica.

Los **Capítulos 4, 5** están dedicados a desarrollar distintos procedimientos que mejoren la eficacia catalítica de la enzima lipasa B de *Candida antarctica* en medios líquido iónico para la síntesis de ésteres mediante reacciones de transesterificación. Así, en el **Capítulo 4** se aplican nuevos tratamientos a los líquidos iónicos, tales como la equilibración con disoluciones acuosas de NaHCO<sub>3</sub> ó Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, o la adicción de trietilamina, para mejorar la eficacia catalítica de la enzima lipasa B de *Candida antarctica* en estado libre en estos medios. Dado que es conocido que los líquidos iónicos miscibles con agua desnaturalizan la enzima libre, disminuyendo por tanto su eficacia catalítica, en el **Capítulo 5** se ha desarrollado un derivado enzimático entrecruzado de lipasa B de *Candida antarctica* y se ha evaluado su eficacia catalítica en líquidos iónicos desnaturalizantes para la resolución rracémica de *rac*-1-feniletanol y *rac*-1-feniletilamina, con el fin de comprobar si este tipo de inmovilización enzimática hace posible la estabilización de la enzima.

En el **Capítulo 6** se evalúa la adecuación del uso de líquidos iónicos como medios de reacción en procesos catalizados por la enzima penicilina G acilasa en estado libre. Para ello se determina la estabilidad de esta enzima en una amplia variedad de líquidos iónicos en presencia y ausencia de sustrato.

En los **Capítulos 7 y 8** se aborda el desarrollo y estudio de un proceso integrado de reacción/separación basado en la utilización de líquidos iónicos soportados en membranas para la resolución de mezclas rracémicas de alcoholes de alto valor añadido. Así, en el **Capítulo 7** estos nuevos procesos se aplican a la resolución rracémica de *rac*-1-feniletanol, cuyo enantiómero S es utilizado como intermedio quiral en la industria de Química Fina y Farmacéutica. Con el fin de optimizar el proceso, se estudia la influencia de las variables que afectan al bioreactor tales como la naturaleza del líquido iónico soportado en la membrana, el contenido de agua del medio de reacción, la cantidad de enzima utilizada y la naturaleza de los ésteres vinílicos utilizados como dadores de acilo. En el **Capítulo 8**, se aplica esta nueva tecnología a la resolución rracémica de *rac*-2-pentanol, cuyo enantiómero S es utilizado como intermedio quiral en la síntesis de varios potenciales fármacos anti-Alzheimer, estudiándose las mismas variables de proceso que afectan al bioreactor.

En el **Capítulo 9** se desarrolla y estudia un nuevo proceso para la síntesis de ésteres en sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico en un reactor enzimático de membrana con recirculación. Con el fin de entender el comportamiento de la enzima en estos sistemas, las reacciones biosintéticas se han llevado a cabo también en medio scCO<sub>2</sub>, en medio líquido iónico y en sistemas bifásicos IL/hexano y se han determinado los coeficientes de reparto IL/hexano de los compuestos para analizar los fenómenos de transporte.

## **2. Objetivos y estructura del trabajo**

---

Por último, en el **Capítulo 10** se recogen las principales conclusiones extraídas de los capítulos anteriores y en el **Capítulo 11** se presenta una revisión de las perspectivas futuras de las nuevas tecnologías presentadas.

Cada uno de los capítulos presenta al final la bibliografía adecuada para sentar las bases del tema objeto de estudio y para contrastar los resultados con los obtenidos por otros autores en el mismo ámbito científico.





# 3

## **Antecedentes**



## 3. ANTECEDENTES

### 3.1. LAS ENZIMAS EN BIOCATÁLISIS

#### 3.1.1. Definición y propiedades de las enzimas

Las enzimas son proteínas que tienen la función de catalizar las reacciones químicas en los sistemas vivos, acelerando la velocidad de las mismas hasta cientos de miles de veces, y haciéndolas más efectivas, ya que se requiere muy poca cantidad de una enzima para producir altos grados de transformación. Para ello, la energía de activación enzimática debe ser significativamente menor que la de la reacción no enzimática.

Las enzimas poseen una estructura tridimensional que determina las sustancias específicas sobre las que pueden actuar lo que generalmente hace de ellas unos catalizadores muy selectivos, permitiendo incluso la distinción entre los componentes de una mezcla racémica.

Algunas de las propiedades generales de las enzimas se citan a continuación:

- No alteran el equilibrio de las reacciones sobre las que actúan, ni reaccionan químicamente sobre los sustratos que intervienen en ellas; únicamente aumentan la velocidad con la que éstas se consumen.
- No modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aceleran su consecución. Además, tienen una gran capacidad para acoplar reacciones que tienen sustratos y productos muy diferentes, lo que permite que reacciones energéticamente poco favorables se acoplen con otras que sí lo son y alcancen conversiones razonables en el caso de la primera.
- Son altamente específicas, lo que las hace actuar sobre sólo una forma de un compuesto activo, aún cuando tengamos una mezcla de formas quirales.
- Tienen una selectividad muy elevada. Tanto que en algunos casos su acción se centra en un tipo de enlace de un determinado grupo funcional dentro de una molécula que tenga varias posiciones modificables. Presentan enantio-selectividad, regio-selectividad, estereo-selectividad y quimio-selectividad.
- La acción de las enzimas se suele caracterizar por la formación de un complejo entre la enzima y uno de los sustratos, dando lugar a un estado de transición antes de que éste reaccione con el segundo sustrato, generándose el producto de la reacción y liberándose de nuevo la enzima:



Esta unión de la enzima y el sustrato se produce a través de interacciones débiles como puentes de hidrógeno, electrostáticas, hidrófobas, etc., en un lugar específico de la enzima denominado “centro activo” que está constituido por una serie de aminoácidos capaces de interactuar con el sustrato.

- Al estar destinadas a comportarse como catalizadores biológicos, han sido concebidas para actuar en medios acuosos y en condiciones muy suaves de presión, temperatura, pH, etc. No obstante, se han usado con éxito en condiciones “no convencionales”, como los medios orgánicos y sobre sustratos artificiales.

#### **3.1.2. Nomenclatura y clasificación de las enzimas**

Muchas enzimas se han designado añadiendo el sufijo *-asa* al nombre del sustrato sobre el que se ejerce la acción catalítica, por ejemplo, la *ureasa* cataliza la hidrólisis de la urea, y la *fosfatasa* la de los ésteres fosfóricos. Las que controlan la *hidrólisis* de proteínas se denominan *proteasas*. Algunas, como las *proteasas tripsina* y *pepsina*, conservan los nombres utilizados antes de que se adoptara esta nomenclatura.

Debido a que muchos de estos nombres no proporcionan la suficiente información química, y a que el número de enzimas conocidas está aumentando rápidamente, la *Comisión Internacional de Enzimas* ha recomendado una nomenclatura sistemática, en la cual cada enzima se designa por un nombre recomendado, un nombre sistemático, que indica la reacción que cataliza, y un número de clasificación. Esta clasificación se realiza de acuerdo con el tipo de reacción de transferencia, el grupo dador y el grupo aceptor, reconociéndose 6 grupos principales con sus respectivas subclases.

Estos grupos y sus principales subclases son:

##### *1. OXIDORREDUCTASAS:*

Son enzimas de óxido-reducción que catalizan la transferencia de átomos de H. (*transferencia de electrones*).

*Subclases:*

- 1.1. Corresponde a las enzimas que actúan sobre >CH-OH
- 1.2. Actúan sobre >C=O
- 1.3. Actúan sobre >C=CH-
- 1.4. Actúan sobre >CH-NH<sub>2</sub>, etc.

#### 2. TRANSFERASAS:

Son las enzimas que catalizan la transferencia de grupos funcionales distintos del H entre un par de sustratos (*transferencia de grupos*).

*Subclases:*

- 2.1. Grupos con un átomo de carbono.
- 2.2. Funciones aldehído o cetona.
- 2.3. Grupos acilo (*aciltransferasas*).
- 2.4. Grupos glucosilo (*glucosiltransferasas*), etc.

#### 3. HIDROLASAS:

Enzimas que actúan hidrolizando determinados enlaces de numerosos compuestos (*reacciones de hidrólisis o transferencia de grupos funcionales al agua*)

*Subclases:*

- 3.1. Actúan sobre enlaces éster.
- 3.2. Actúan sobre enlace glicosídicos.
- 3.4. Actúan sobre enlaces peptídicos.
- 3.6. Actúan sobre anhídridos de ácido, etc.

#### 4. LIASAS:

Catalizan la separación de grupos químicos del sustrato por vía no hidrolítica (*adición de grupos a dobles enlaces*).

*Subclases:*

- 4.1. Actúan sobre enlaces  $>C=C<$
- 4.2. Actúan sobre enlaces  $>C=O$
- 4.3. Actúan sobre enlaces  $>C=NH-$

#### 5. ISOMERASAS:

Actúan catalizando la interconversión de isómeros estructurales, de posición u ópticos, de una a otra forma (*transferencia de grupos en el interior de la molécula para originar formas isoméricas*).

*Subclase:*

- 5.1. Racemasas y epimerasas.

#### 6. LIGASAS:

Catalizan la unión de dos compuestos, mediante la energía liberada en la ruptura de una molécula de ATP (*forman diversos enlaces acoplados a la ruptura de ATP*).

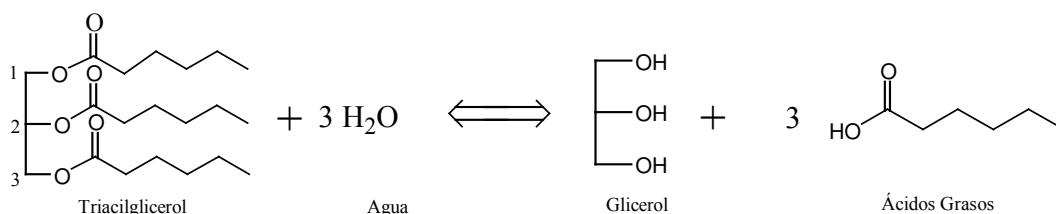
*Subclases:*

- 6.1. Formación de enlaces C-O
- 6.2. Formación de enlaces C-S
- 6.3. Formación de enlaces C-N
- 6.4. Formación de enlaces C-C

En el presente trabajo de Tesis se van a emplear dos enzimas hidrolasas, concretamente la lipasa B de *Candida antarctica* y la penicilina G acilasa de *Escherichia coli*, cuyas particularidades se comentan en detalle en los apartados siguientes.

#### 3.1.3. Lipasas

Las lipasas pertenecen a la clase de enzimas hidrolasas (E.C. 3), que son las enzimas más utilizadas en biocatálisis, y actúan sobre los enlaces éster (E.C. 3.1) de ésteres carboxílicos (E.C. 3.1.1). La reacción sobre la que la que actuaban originalmente se muestra esquematizada en la **Figura 3.1**, por lo que también se las conoce como glicerol éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.3.). Además de los animales y las plantas, numerosos microorganismos (naturales o genéticamente modificados) son capaces de sintetizarlas de forma endógena o exógena [1].



**Figura 3.1.** Esquema de la reacción catalizada por lipasa sobre triacilglicerol.

##### 3.1.3.1. Clasificación de las lipasas

Las lipasas se pueden clasificar dentro de las tres categorías que se indican a continuación [2]:

- Lipasas no específicas. Éstas catalizan la hidrólisis del grupo éster, cualquiera que sea su posición sobre el esqueleto del glicerol o la naturaleza del ácido graso liberado. Catalizan la hidrólisis completa de triglicéridos en ácidos grasos, pero también conducen a la producción de productos intermedios tales como los diglicéridos. Dentro de este grupo se encuentra la lipasa B de *Candida antarctica*, usada en este trabajo.
- Lipasas que catalizan específicamente los ácidos grasos en posición 1 y 3 sobre el glicerol. Dan lugar a productos de hidrólisis como 1,2-diglicérido, 2,3-diglicérido y 2-monoglicérido. Éstos son muy inestables químicamente y sufren migración de los grupos acilo. Bajo la acción de la enzima, el triglicérido puede ser totalmente hidrolizado a ácidos grasos y glicerol.

- Lipasas que muestran especificidad ligada a la naturaleza del ácido graso y la longitud de cadena. Para una misma longitud de cadena, la velocidad de hidrólisis aumenta con el número de insaturaciones y el efecto es más acusado cuanto mayor es la temperatura.

#### 3.1.3.2. Aplicaciones de las lipasas

Comercialmente, el principal campo de aplicación de las lipasas es su adición a detergentes, que generalmente se destinan a uso doméstico y a lavaderos industriales. Esta aplicación constituye el 30% de la comercialización total de enzimas [3]. Un elevado número de detergentes comercializados contienen la lipasa de *Termomyces lanuginosa*, que es producida por Novozymes y vendida bajo distintos nombres comerciales.

Las lipasas son también ampliamente usadas en la industria alimentaria en el procesado de grasas y aceites [4]. Estas enzimas son capaces de transformar materias primas económicas en grasas de alto valor añadido. Un ejemplo de ello es la producción de mantequilla de cacao. La mantequilla de cacao es un ingrediente caro del chocolate que le confiere a éste un agradable brillo, temperatura de fusión y consistencia [3]. Sustitutos de esta apreciada mantequilla de cacao han sido producidos mediante reacciones de transferencia de grupo acilo entre grasas económicas catalizadas por la lipasa de *Rhizopus niveus* (Amano).

También son utilizadas en la industria del papel y la pasta. Éste es otro campo de creciente interés en el uso de lipasas y se aplican para separar la pasta de papel de lo que se conoce como brea, que es un conjunto de componentes hidrofóbicos procedentes de la madera, como ceras y triglicéridos, que causan graves problemas en la manufactura.

Las lipasas han encontrado también aplicación en la industria cosmética, principalmente en la síntesis de aromas y en la industria farmacéutica. En esta última, las lipasas microbianas se emplean para enriquecer en ácidos grasos poliinsaturados los lípidos de animales y de plantas. Estos ácidos grasos poliinsaturados libres y sus derivados mono y diglicéridos se usan para obtener una amplia variedad de productos farmacéuticos como anticolesterolémicos, anti-inflamatorios, y trombolíticos [5].

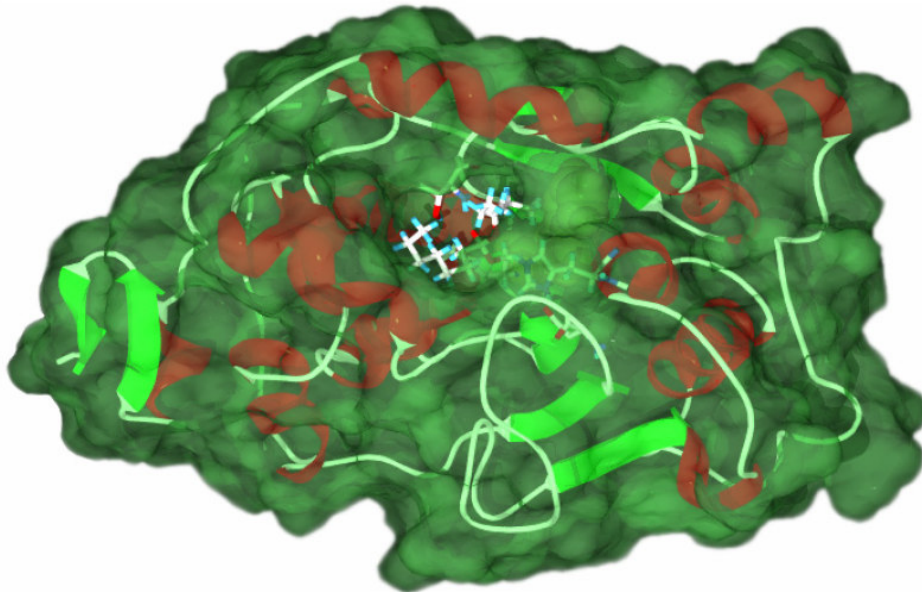
También son utilizadas en la industria de química fina. La mayoría de las lipasas que se utilizan en ésta son de origen microbiano, y están en un proceso de rápida expansión gracias a la posibilidad de la catálisis enantioselectiva a escala industrial. Los tipos más comunes proceden de bacterias (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *B. cepacia*, *C. viscosum*, *B. subtilis*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Serratia marcescens*) y de hongos (*C. antarctica* y *C. rugosa*).

En el futuro parece ser que una aplicación interesante será el tratamiento de residuos incluyendo la destrucción, prevención o limpieza de sólidos, películas y efluentes con un alto contenido en grasas.

#### 3.1.3.3. Propiedades moleculares y mecanismo de catálisis de las lipasas

Entre todas las lipasas, la lipasa B de *Candida antarctica* es una de las más utilizadas y de la que se han descrito numerosas aplicaciones [6]. La levadura de *Candida antarctica* fue originalmente aislada en la Antártida y se encontró que producía dos variantes de lipasa (CaLA y CaLB) [7].

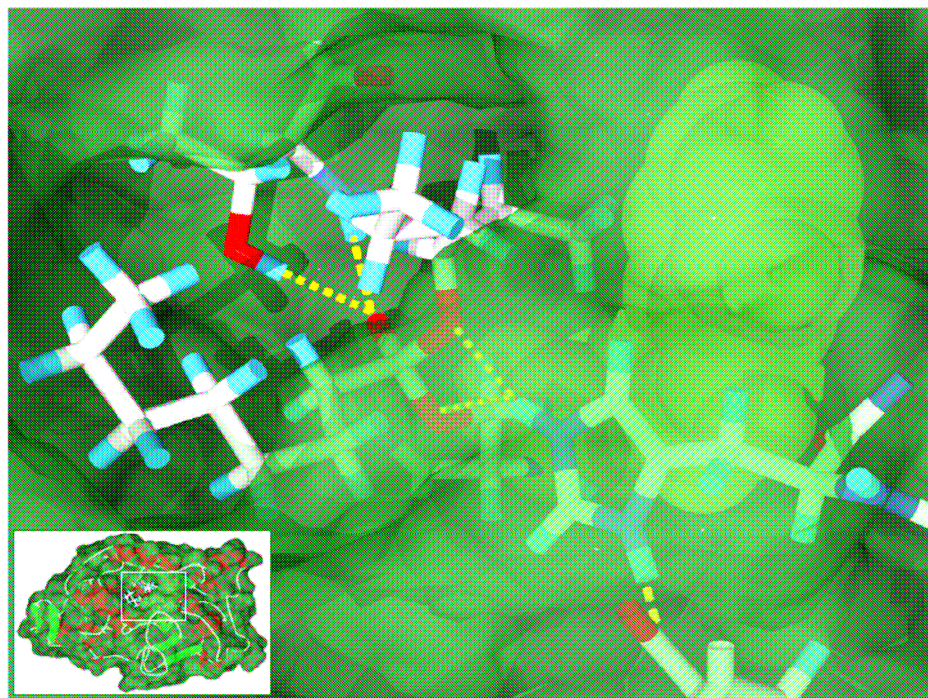
La estructura de CaLB fue resuelta en 1994 y se muestra en la **Figura 3.2** [8,9]. A pesar de ser diversas las fuentes de dónde proceden y de que sus tamaños pueden ser muy diferentes, todas las lipasas tienen una estructura básica común, compuesta por una lámina  $\beta$  central formada por más de 8 hebras  $\beta$  paralelas y unidas entre sí por más de 6 hélices  $\alpha$  [10].



**Figura 3.2.** Estructura de la lipasa B de *Candida antarctica*. Las hélices  $\alpha$  se muestran en rojo, las láminas  $\beta$  en verde claro y la superficie de la enzima en verde oscuro. Se puede apreciar como el final de las cadenas acilo y alcohol de los sustratos están en la estrecha entrada del centro activo.



CaLB, que pertenece a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas-plegadas [11], se compone de 317 amino ácidos y tiene un peso molecular de 33kDa. El centro activo se muestra en la **Figura 3.3**.



**Figura 3.3.** Centro activo de CaLB.

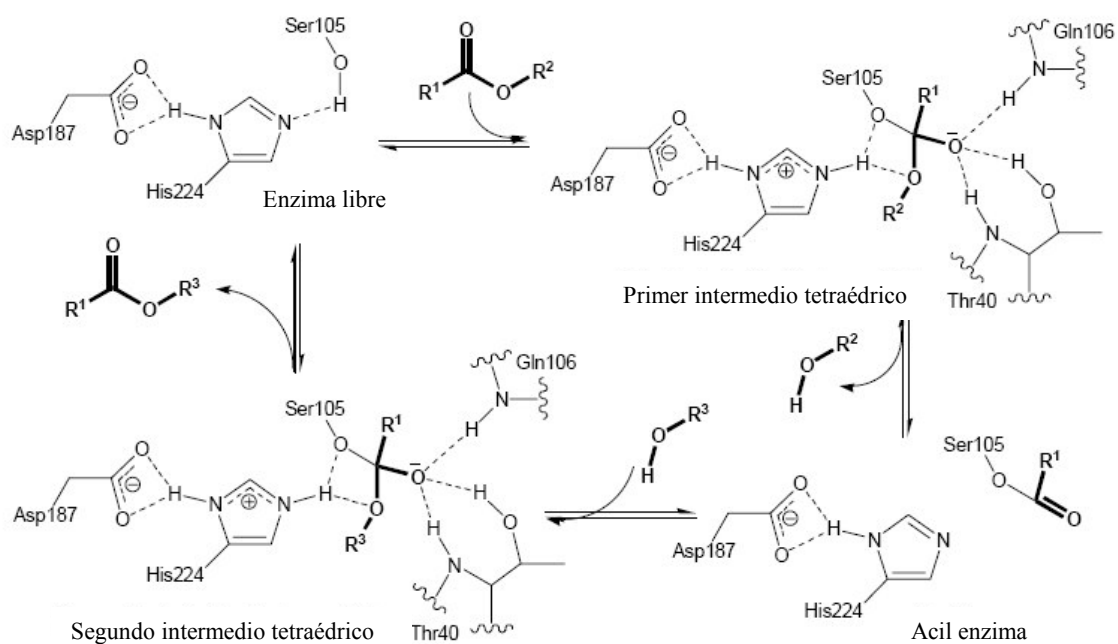
Los aminoácidos que componen el centro activo son una triada catalítica, Ser105-His224-Asp187, común a todas las serinas hidrolasas. El residuo nucleofílico de la Ser se localiza en el carbono terminal de la hebra  $\beta_5$  en un pentapéptido GX SXG altamente protegido, formando un característico motivo tipo  $\beta$ -giro- $\alpha$ , llamado “codo nucleofílico”.

Generalmente el centro activo de las lipasas no es accesible al sustrato, ya que está recubierto de un bucle que lo hace totalmente inaccesible al disolvente. Esto se da en todas las lipasas excepto en la cutinasa. El hecho de que la actividad de las lipasas sea mayor con sustratos insolubles en agua que forman emulsión 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 [12]. Las lipasas son las únicas enzimas que requieren esta activación interfacial para un pleno rendimiento catalítico [1]. 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 dicho bucle [8,12]. Esto hace que, por ejemplo, una lipasa B de *Candida*

### 3. Antecedentes

*antarctica* esté mejor adaptada a los medios orgánicos que una lipasa de *Thermomyces lanuginosa*, ya que la primera no posee un bucle convencional, sino más bien una hélice de gran movilidad que actúa como tal, y la estructura parece estar en una conformación abierta con el centro activo accesible [13].

El mecanismo descrito para las reacciones de transferencia de acilo catalizadas por CaLB es el mecanismo ping-pong bi bi que se ilustra en la **Figura 3.4**.



**Figura 3.4.** Reacciones catalizadas por CaLB siguiendo un mecanismo ping-pong bi bi.

El mecanismo es el siguiente: 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 3.4**, CaLB puede catalizar reacciones de transferencia de acilo entre varios compuestos. Así, dependiendo de los grupos R que aparecen en la figura, la reacción puede ser la hidrólisis de un éster, una esterificación o una transesterificación. El segundo sustrato también puede ser una amina, lo que resultaría en una aminólisis. En las reacciones de hidrólisis o transesterificación el primer sustrato (dador de acilo) puede ser también un tioéster.

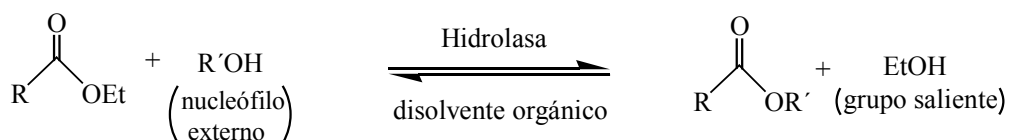
Centraremos nuestro interés en las reacciones de transesterificación ya que son objeto de estudio en la presente memoria.

#### Reacciones de transesterificación

Las reacciones de acilación catalizadas por lipasas pueden llevarse a cabo por esterificación directa entre un ácido y un alcohol o por transesterificación entre un éster y un alcohol.

La esterificación directa entre un ácido y un alcohol es generalmente muy lenta (a pesar de la catálisis enzimática) y reversible con una constante de equilibrio cercana a la unidad [14]. Para desplazar el equilibrio se suele recurrir a la eliminación del agua producida durante la reacción (grupo saliente) mediante evaporación a alto vacío, destilación azeotrópica o empleo de agentes desecantes como los tamices moleculares. Este método se emplea generalmente cuando los sustratos son baratos (no preocupa demasiado su pérdida).

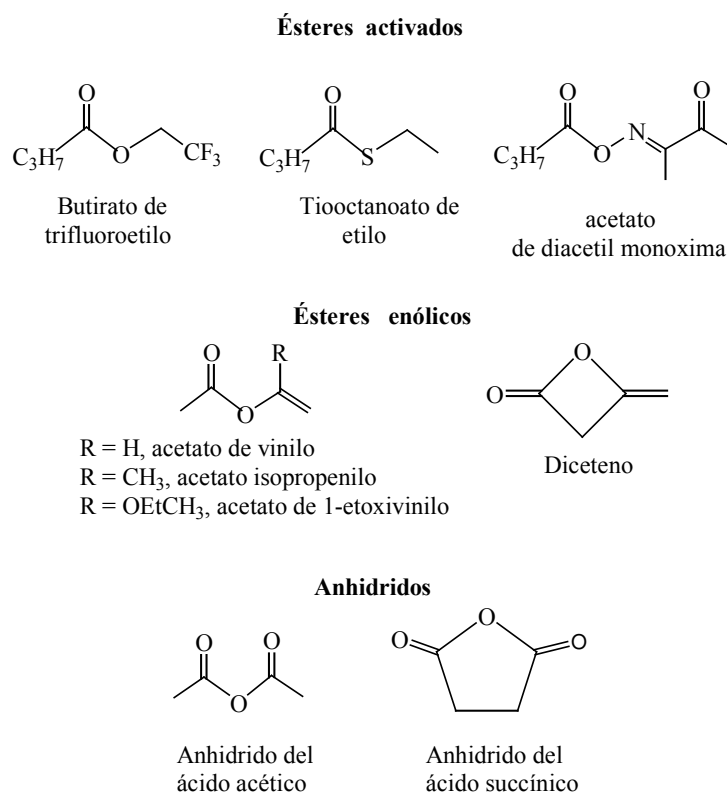
Sin embargo, en el campo de la química fina (donde en general los sustratos son más caros y el valor añadido del producto es mayor), es preferible recurrir a reacciones de transesterificación para llevar a cabo una acilación biocatalizada. Como estas reacciones no liberan agua durante el curso de la reacción, son generalmente más sencillas de manipular. Contrariamente a las reacciones hidrolíticas en las que el nucleófilo externo (agua) está siempre en exceso (55M), la concentración de alcohol a acilar en las reacciones de transesterificación siempre es limitada. Las transesterificaciones en las que se emplean ésteres normales (metilo, etilo) como dadores de acilo son reversibles. Esto es debido a que la nucleofilicidad del nucleófilo externo y el grupo saliente (metanol, etanol) es muy similar y por tanto ambos compiten por el intermedio acil-enzima en ambos sentidos de la reacción (**Figura 3.5**).



**Figura 3.5.** Transesterificación catalizada por CaLB empleando un éster etílico como dador de acilo.

Esto conduce a velocidades de reacción lentas que pueden provocar una pérdida importante de selectividad por razones cinéticas. Para desplazar el equilibrio de la reacción en el sentido que nos interesa se pueden emplear tres alternativas: usar exceso de agente acilante, evaporar el metanol o etanol producidos por evaporación a alto vacío (no aplicable si se usa un disolvente orgánico de bajo punto de ebullición que también se evaporará), o bien emplear dadores de acilo “activados” que favorezcan que la reacción sea más o menos irreversible. Esta última alternativa es la que se suele emplear.

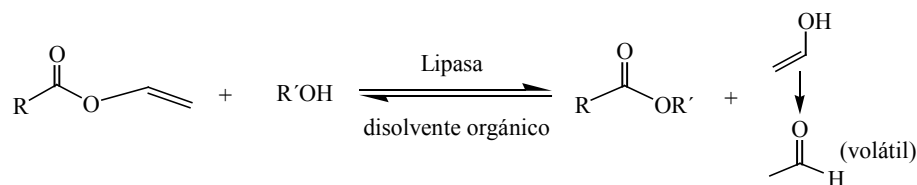
Aunque la transferencia de acilo empleando dadores activados es un proceso teóricamente reversible, la posición del equilibrio está tan desplazada hacia la formación de producto que a efectos preparativos se puede considerar como un proceso irreversible. La **Figura 3.6** muestra los distintos tipos de dadores de acilo comúnmente empleados en laboratorio.



**Figura 3.6.** Ejemplo de dadores de acilo activados para la acilación irreversible de alcoholes.

Los trihaloetil ésteres y entre ellos, los trifluoroetil ésteres son uno de los ejemplos típicos. El grado de activación del éster es bastante alto, y el trifluoroetanol que se produce se puede eliminar por evaporación, lo que facilita el procesado de la reacción. Los anhídridos de ácido también se han empleado para acilar alcoholes [15]. La enzima no se modifica químicamente por el anhídrido pero el ácido carboxílico que se libera puede hacer que disminuya la enantioselectividad de la reacción.

Se considera a los enol ésteres como los dadores de acilo activados más útiles [14]. El alcohol que se produce como grupo saliente tautomeriza al correspondiente compuesto carbonílico, que ya no es nucleófilo, desplazando el equilibrio de la reacción en el sentido que interesa. Además en el caso de los ésteres vinílicos (acetato de vinilo por ejemplo) el producto de tautomerización (acetaldehído) es volátil convirtiendo el proceso virtualmente en irreversible y facilitando aún más el aislamiento del producto de la reacción (**Figura 3.7**). El grupo de Wong fue el primero en aplicar esta metodología para transesterificaciones catalizadas por lipasas [16]. En la presente memoria se han empleado ésteres vinílicos como agentes acilantes en reacciones de transesterificación de alcoholes catalizadas por CaLB.



**Figura 3.7.** Transesterificación irreversible catalizada por CaLB empleando un éster vinílico como dador de acilo.

La transesterificación de alcoholes catalizada por CaLB empleando dadores de acilo activados (fundamentalmente enol ésteres como el acetato de vinilo) es una de las principales técnicas enzimáticas de protección de grupos funcionales en síntesis orgánica [17] debido fundamentalmente a la quimioselectividad, muy útil para casos como el de los aminoalcoholes, y sobre todo al alto nivel de regioselectividad en el caso de compuestos polihidroxilados. También, es ésta una reacción básica para la resolución cinética de mezclas racémicas de alcoholes secundarios [18,19]. Otras de las aplicaciones potenciales de CaLB son la producción de polilactonas [20,21] y la producción de poliésteres [22].

CaLB además es una enzima muy estable que ha sido utilizada hasta a 150°C [23], en disolventes orgánicos de alta polaridad como acetonitrilo y dimetilsulfóxido y en fluidos supercríticos [24,25]. Con estos precedentes, esta enzima es una candidata idónea para ser utilizada en medios líquido iónico.

#### 3.1.4. Penicilina acilasas

Las penicilina acilasas (EC 3.5.1.11), también conocidas como Penicilina amidohidrolasas, pertenecen también a la clase de enzimas hidrolasas (E.C. 3). Son un grupo de enzimas capaces de romper la cadena acilo de las penicilinas, y dar como productos el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y el ácido orgánico correspondiente [26].

##### 3.1.4.1. Clasificación de las penicilina acilasas

Basándonos en su especificidad frente a los sustratos podemos distinguir tres tipos de penicilina acilasas (PA): Penicilina G acilasas (PGAs), Penicilina V acilasas (PVAs) y Ampicilina acilasas (AEHs). Aún así, esta clasificación no se puede establecer como cerrada ante la posibilidad de la aparición de nuevas PA. Las PAs, aunque poseen cierta especificidad hacia penicilina G, penicilina V y ampicilina, pueden hidrolizar otros tipos de penicilinas alifáticas como penicilina F, penicilina dihidroF y penicilina K (**Figura 3.8**)

- PGAs. Preferencialmente hidrolizan la penicilina G, mostrando una alta especificidad frente a este sustrato. Se encuentra en multitud de bacterias como *Alcaligene faecalis*, *Arthrobacter viscosus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila* y *Providencia rettgeri*.
- PVAs. Hidrolizan penicilina V de forma preferente, aunque no poseen una especificidad tan alta como la anterior. Se encuentra en muchos microorganismos como *Achromobacter sp.* NCIB 9424, *Actinoplanes sp.*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *Cryptococcus sp.*, *Erwinia aroideas*, *Fusarium sp.*, *Micrococcus ureae*, *Penicilium chrysogenum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pseudomonas acidovorans*, *Rhodotorula glutinis*, y *Streptomyces lavendulae*.
- AEHs. Estas enzimas hidrolizan antibióticos  $\beta$ -lactámicos que contienen un grupo amino libre localizado en el carbono  $\alpha$  al grupo acilo (Ampicilina, cefalexina). Se encuentran en *Pseudomonas melanogenum* IFO 12020, *Acetobacter turbidans* ATCC 9325, y *Xanthomonas citri* IFO 3835.

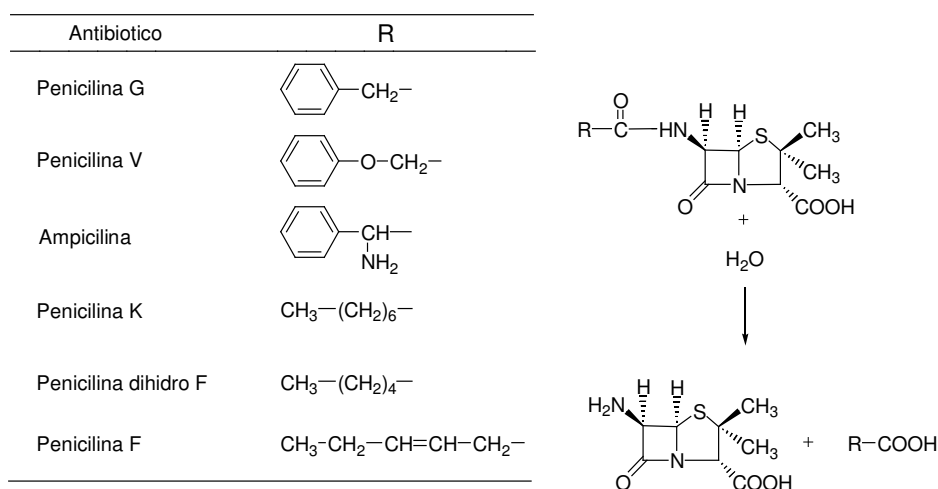


Figura 3.8. Principales reacciones catalizadas por Penicilina acilasas

### 3.1.3.2. Aplicaciones de las penicilina acilasas

La Penicilina G acilasa está fundamentalmente implicada en la síntesis de 6-APA, abarcando hasta un 88% de la producción, mientras que el resto es producido por PVA inmovilizada. Esta última posee mayor estabilidad que la PGA en medio acuoso a pH bajos, y permite realizar los procesos con concentraciones mayores de penicilina G, obteniéndose conversiones prácticamente del 100%. Además su rango de pH óptimo reduce la necesidad de tamponar el medio. Sólo el 15% del 6-APA producido industrialmente utiliza PVA. Esta diferencia está basada principalmente en el coste más elevado de la penicilina V.

La selectividad de PGA frente a otros sustratos ha suscitado el interés de los investigadores desde 1969, cuando Cole describió las propiedades selectivas de la Penicilina G acilasa de *Escherichia coli*. Estudios posteriores han demostrado que esta enzima es susceptible de hidrolizar una gran variedad de sustratos como amidas y ésteres que contienen algunos compuestos aromáticos de interés. También se han obtenido resultados similares en estudios sobre la síntesis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en medios acuosos y la resolución de aminoácidos y aminas [27].

### 3.1.4.3. Propiedades moleculares y mecanismo de catálisis de las penicilina acilasas

Estas enzimas son producidas por microorganismos, tales como bacterias, hongos y levaduras, tanto de forma endógena como exógena [28,29]. Sus orígenes y sus tamaños pueden ser muy diferentes, pero todas las Penicilina acilasas presentan una base

estructural común en el entorno del centro catalítico. El plegamiento característico de estas enzimas consiste en dos láminas  $\beta$  antiparalelas unidas entre sí por una capa de hélices  $\alpha$  ( $\alpha\beta\beta\alpha$ ) [30].

La Penicilina G acilasa de *Escherichia coli* es una enzima intracelular periplasmática y heterodimérica, formada por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , con pesos moleculares de 20.5 y 69 KDa, respectivamente. El núcleo catalítico lo compone principalmente una molécula de serina, localizada en el extremo N-terminal de la subunidad  $\beta$ . La especificidad por los distintos sustratos la confiere la subunidad  $\alpha$ . Lo anterior determina que ambas subunidades sean necesarias para que la enzima presente actividad catalítica [31,32]. Algunos autores han sugerido la existencia de otros centros catalíticamente activos en la subunidad  $\alpha$ , que sólo quedan accesibles cuando la enzima está dissociada en sus subunidades [33]. La estructura molecular de Penicilina G acilasa se puede observar en la **Figura 3.9**.

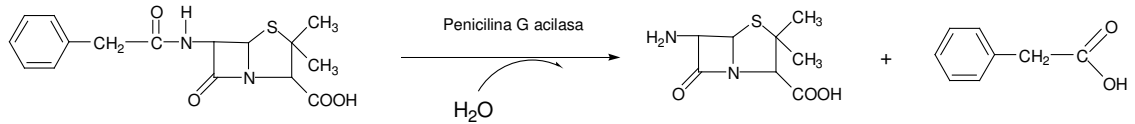


**Figura 3.9.** Estructura de Penicilina G acilasa con penicilina G en el centro activo.

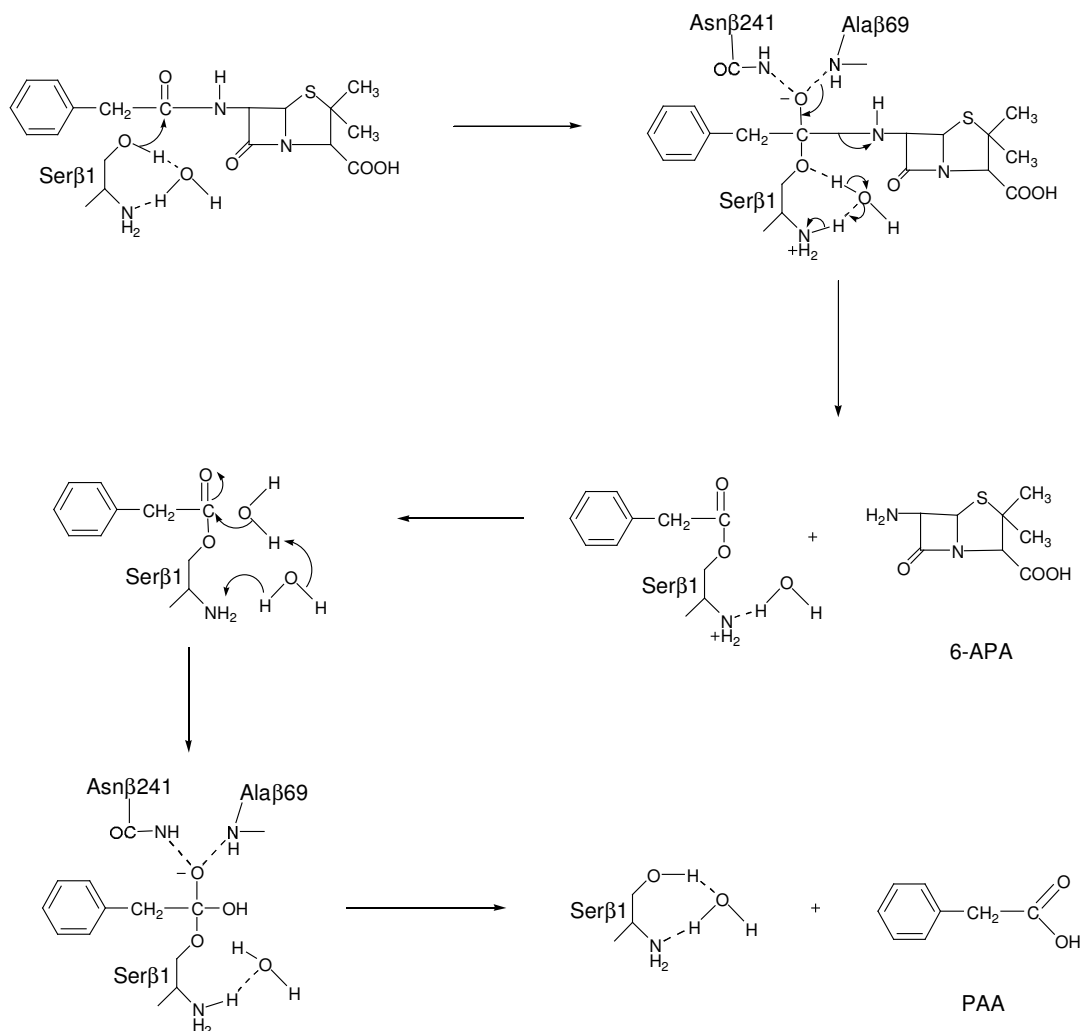


### 3. Antecedentes

En la reacción de hidrólisis de penicilina G (**Figura 3.10**), el mecanismo de reacción de PGA (**Figura 3.11**) implica la formación de un intermedio covalente.



**Figura 3.10.** Reacción de hidrólisis de penicilina G.



**Figura 3.11.** Mecanismo de reacción de PGA en la hidrólisis de penicilina G.

Tras el ataque sobre el carbono carbonílico del enlace amida por el residuo nucleófilo del centro activo, se forma un complejo covalente enzima-acilo, pasando por un estado de transición tetraédrico, en el cual, la carga negativa del oxianión resultante es estabilizada por formación de enlace por puente de hidrógeno con los residuos Asn $\beta$ 241 y Ala $\beta$ 69 del centro activo de la enzima. El mecanismo de reacción descrito presenta una gran especificidad, sin aparición de reacciones secundarias o paralelas. Tras la expulsión del grupo saliente del centro activo, el complejo enzima-acilo es desacilado mediante agua u otro nucleófilo, dando lugar al producto de transacilación y a la enzima libre.

#### 3.2. BIOCATÁLISIS EN MEDIOS NO CONVENCIONALES

Las enzimas son proteínas diseñadas por los sistemas biológicos para realizar una función catalítica sobre todas las reacciones que tienen lugar en el interior de las células de los seres vivos en las que se encuentran presentes. El disolvente predominante en el interior de las células es el agua, aunque las enzimas no son capaces de funcionar correctamente en medios formados únicamente por agua pura; sino que en su ambiente nativo lo hacen en entornos compuestos por lípidos, proteínas y otras especies iónicas, además del agua [34]. De acuerdo con lo anterior, el medio acuoso podría definirse como el “*medio convencional*” en el que las enzimas desarrollan su acción. Cuando se emplea el término “*medios no convencionales*” se hace referencia a medios no acuosos.

Durante los últimos años, el empleo de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa muy atractiva respecto a los métodos químicos convencionales. En efecto, las enzimas presentan a menudo una alta quimio-, regio-, y enantioselectividad que las convierte en valiosos catalizadores en el campo de la química fina. Además, las reacciones catalizadas por enzimas normalmente se llevan a cabo en condiciones suaves, como temperatura ambiente y pH neutro. Las enzimas son biocatalizadores muy eficaces, capaces de aumentar las velocidades de reacción  $10^{12}$  veces. Además, es de reseñar que los procesos biocatalíticos son menos peligrosos, contaminantes, y consumen menos energía que las metodologías químicas convencionales.

Todas estas razones han hecho de los biocatalizadores un tema de investigación muy popular tanto en el mundo académico como en la industria. El tremendo potencial de las enzimas como catalizadores está ampliamente reconocido. Sin embargo, cuando su empleo se restringe a su medio natural acuoso, su utilidad y alcance está limitado por una serie de consideraciones. La mayoría de los compuestos orgánicos son insolubles en agua [35], y en ella pueden tener lugar reacciones colaterales no deseadas (hidrólisis, racemizaciones, etc.). El equilibrio termodinámico de muchos procesos es desfavorable en agua [36], y la recuperación de los productos no es trivial (el agua es un disolvente difícil de eliminar por su alto punto de ebullición y calor de vaporización). Además, el agua puede dar lugar a numerosas reacciones de desactivación enzimática irreversible,

por lo que contar con medios no acuosos o de actividad de agua reducida previene contra esta desactivación y contribuye a aumentar la estabilidad de la enzima [37]. Así, se ha comprobado experimentalmente que determinadas lipasas funcionan como catalizadores en un medio prácticamente anhidro y que esta deshidratación les hace adquirir nuevas propiedades, volviéndose extremadamente termoestables y teniendo un carácter más selectivo [38].

Por todo ello, ha habido un creciente interés en la utilización de disolventes no acuosos (no convencionales) en reacciones biocatalíticas, entre los que cabe destacar los disolventes orgánicos. Independientemente del medio utilizado, la expresión de la actividad catalítica de la enzima necesita del mantenimiento de su estructura nativa tridimensional, para lo cual se requiere la presencia de un contenido mínimo o crítico de agua. En muchos de estos casos no hay más que una fase acuosa microscópica disuelta, correspondiente a aquella que está unida al biocatalizador y le permite al mismo adoptar dicha conformación activa, sin la cual no podría funcionar [39].

El interés por los medios orgánicos comenzó en la década de los 70, cuando se comprobó que altas proporciones de agua/líquido orgánico inmiscible eran compatibles con una buena actividad de los biocatalizadores [35]. El trabajo de *Zaks y Klibanov* [40] puso de manifiesto la viabilidad de utilizar las enzimas en medios orgánicos hidrófobos, aunque ésto suponía una reducción drástica de la velocidad de reacción [41]. El éxito de estos nuevos medios de reacción radica en que en ellos las enzimas hidrolasas pueden desarrollar reacciones sintéticas, tal y como la acilación enantioselectiva de alcoholes y aminas, las cuales son algunas de las aplicaciones más importantes a nivel industrial [42]. A partir de este momento, se desarrollaron tecnologías que incluían únicamente disolventes orgánicos como medio de reacción.

Los medios orgánicos presentan la ventaja de permitir el desarrollo de procesos que, ya sea por factores cinéticos o termodinámicos, son totalmente imposibles de realizar en medios acuosos. Esto aumenta el alcance potencial en cuanto a aplicaciones y dispara el impacto económico de la biocatálisis [38].

La elección del disolvente orgánico adecuado debe hacerse considerando una serie de factores, dado que en todos los sistemas biocatalíticos que contienen un disolvente, la naturaleza del mismo influye considerablemente sobre la actividad y la estabilidad de las enzimas. Un factor de gran importancia es su constante dieléctrica, ya que un aumento en la constante del medio implica un aumento de las interacciones electrostáticas con los residuos cargados de la enzima, lo que puede conducir a una pérdida de flexibilidad interna de ésta última. En consecuencia, dado que para los fenómenos catalíticos se requiere una cierta flexibilidad, una limitación de ésta causada por el disolvente implicaría una reducida actividad catalítica de la enzima [43].

Si los cambios en la constante dieléctrica son lo suficientemente grandes como para modificar el pK de todos los residuos ionizables en la superficie de la enzima, situados cerca o en el centro activo, la unión y/o la conversión de los sustratos se puede ver alterada. Por último, si este cambio es drástico, se puede llegar a afectar la estructura tridimensional de la enzima de forma irreversible, provocando su desactivación.

Muchas enzimas siguen siendo activas al suspenderlas en disolventes orgánicos no polares que contienen muy poca agua. Las disoluciones altamente no polares no son disolventes para las proteínas y no interactúan con la enzima o con el agua de su superficie. Además, los disolventes no polares son, con frecuencia, pobres disolventes para sustratos de interés.

Frente a los no polares, los disolventes orgánicos polares proporcionan un mejor medio de reacción para muchas aplicaciones de tipo industrial y sintético. No obstante, los disolventes orgánicos polares de interés práctico, como la acetona o la dimetilformamida, interactúan fuertemente con la enzima y las moléculas de agua asociadas a la misma, reduciendo o destruyendo totalmente su actividad catalítica, por lo que se buscan otras alternativas. No todas las enzimas responden de la misma manera al ser suspendidas en medios no acuosos y este hecho parece estar fuertemente relacionado con la capacidad del medio para separar las moléculas de agua de la superficie proteica [38].

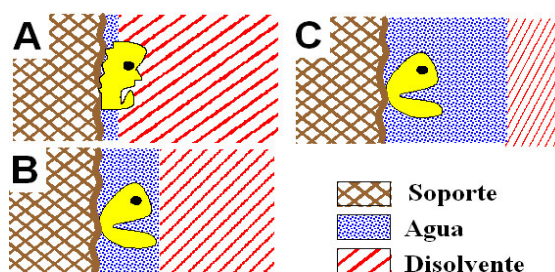
Desafortunadamente, no existe una relación directa entre la pérdida de actividad enzimática en disolventes no acuosos y la polaridad del disolvente. En general, al aumentar la polaridad del disolvente orgánico disminuye la actividad enzimática. Una medida que se usa a menudo para racionalizar la influencia de los disolventes en los sistemas biocatalíticos es el parámetro  $\log K_{ow}$ , que se define como el logaritmo del coeficiente de partición de una sustancia en el seno de un sistema bifásico estándar 1-octanol/agua [44].

El principal factor en el efecto que tienen los disolventes orgánicos sobre los biocatalizadores no es su interacción directa con las moléculas de enzima, sino con el agua unida a las mismas [44].

Cuando se realiza un proceso biocatalítico sintético catalizado por hidrolasas en un medio orgánico, el contenido en agua del mismo debe conducir a una situación de compromiso entre la actividad de la enzima, ya que el agua desempeña un papel fundamental en la estructura tridimensional de las proteínas y es importante para su estabilidad y su activación, y una baja actividad hidrolítica, ya que el agua es el nucleófilo en estas reacciones, disminuyendo la eficacia catalítica hacia los productos de síntesis [45]. Aunque ha quedado claro que las enzimas necesitan una cantidad mínima de agua de hidratación para adoptar una conformación activa, y considerando lo anterior, la cantidad óptima que debe haber en el medio es difícil de determinar, y

depende de numerosos factores, tales como el disolvente, la enzima, el soporte, los sustratos y las condiciones de reacción [46,47].

Considerando un medio totalmente deshidratado y otros a los que se les ha añadido pequeñas cantidades de agua, se puede observar que la actividad aumenta al hacerlo la cantidad de agua presente hasta alcanzar una determinada cantidad, y a partir de ahí comienza a decrecer conforme sigue aumentando la cantidad de agua. Esto se debe a que si hay mucha agua presente, la enzima puede hidratarse totalmente y rodearse por varias capas de agua que dificultan el acceso de los sustratos hidrofóbicos al centro activo [48]. En la **Figura 3.12** se pueden ver esquematizadas las posibilidades descritas anteriormente.



**Figura 3.12.** Situación esquemática de la enzima en un medio no convencional en función de la cantidad de agua.

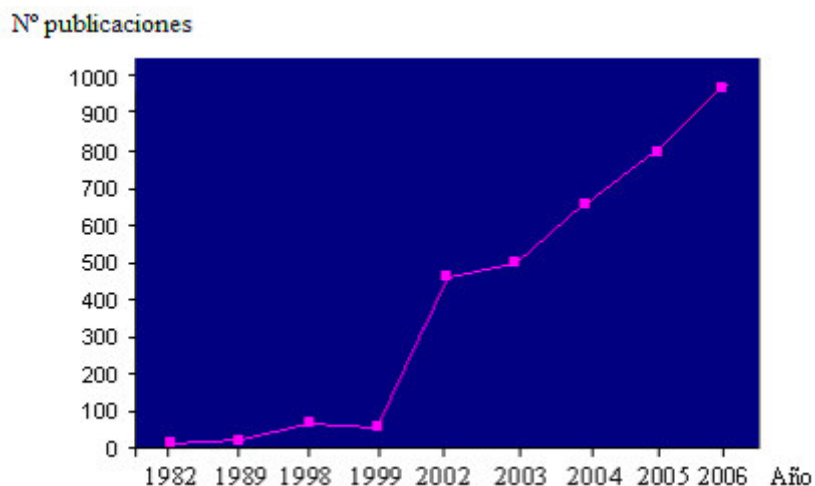
En el caso A se aprecia cómo la cantidad de agua no es suficiente para que la enzima sea activa, viéndose afectada su conformación estructural. El caso B es el ideal, ya que la cantidad de agua es la justa para que la enzima adopte su conformación activa y los sustratos presentes en el disolvente orgánico puedan difundir hasta ella. En el caso C existe un exceso de agua, lo que no afecta a la estabilidad de la enzima, pero el gran espesor de la capa acuosa formada en torno a ella supone una resistencia al transporte de materia y dificulta la difusión de los sustratos hasta el centro activo.

Sin embargo, a pesar de las ventajas que presenta el medio orgánico frente al medio acuoso se han detectado problemas a la hora de recuperar los productos (se requieren procesos posteriores de purificación), además de los efectos negativos del disolvente sobre la actividad y estabilidad de las enzimas [49]. Respecto a estos últimos, se ha comprobado que los disolventes apróticos miscibles con agua ejercen un efecto desactivador importante sobre la  $\alpha$ -quimotripsina para concentraciones superiores al 30% [47]. Otros de los inconvenientes de la utilización de disolventes orgánicos son su inflamabilidad y toxicidad, por lo que deben ser exploradas otras alternativas que permitan su sustitución cuando sea posible. En este contexto, los líquidos iónicos a

temperatura ambiente (ILs) y el dióxido de carbono supercrítico ( $\text{scCO}_2$ ) se han revelado recientemente como prometedores disolventes respetuosos con el medio ambiente alternativos a los disolventes orgánicos convencionales en procesos de catálisis enzimática.

### 3.3. LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

Las grandes posibilidades científico-técnicas que presentan los líquidos iónicos han suscitado un enorme interés en la comunidad científica tal y como se pone de manifiesto en el crecimiento exponencial del número de publicaciones sobre este tema en los últimos años [50]. Así, si se realiza una búsqueda bibliográfica del término líquido iónico, pueden encontrarse unos 60 artículos en el año 1995, número que creció hasta 300 en el 2001 y hasta casi 1000 en el año 2006, tal y como se puede observar en la Figura 3.13, en la cual se ha representado el número de artículos publicados sobre líquidos iónicos en revistas de reconocido prestigio entre los años 1982 y 2006.



**Figura 3.13.** Artículos publicados sobre líquidos iónicos en los últimos años.

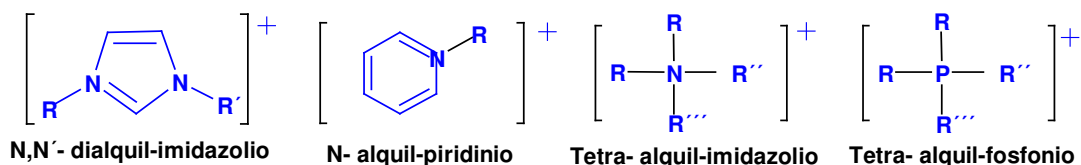
La ventaja más importante de los líquidos iónicos es su presión de vapor prácticamente nula, por lo que son considerados disolventes benignos comparados con los disolventes orgánicos volátiles. Además, presentan una alta estabilidad química y térmica, lo que permite que puedan ser utilizados a altas temperaturas [51].

### 3.3.1. Definición de líquido iónico

Los líquidos iónicos se pueden definir como sales cuya temperatura de fusión está por debajo de 100°C. Realmente la mayoría de los líquidos iónicos que aparecen en la literatura son líquidos a temperatura ambiente. La diferencia de los líquidos iónicos con las sales fundidas se encuentra en que los líquidos iónicos se presentan líquidos a temperaturas mucho menores que las sales fundidas. La principal característica de los líquidos iónicos, que comparten con las sales fundidas, es el amplio intervalo de temperatura en el que se presentan líquidos.

La definición dada hasta ahora se basa únicamente en la temperatura de fusión. Respecto a su composición química puede afirmarse, de forma general, que están compuestos por un catión orgánico siendo los más comunes los de tetraalquilamonio, tetraalquilfosfonio, N-alquilpiridina y N,N'-dialquilimidazolio y un anión poliatómico entre los que destacan el hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida (bistriflimida), trifluoroacetato y triflato (Figura 3.14).

#### Cationes



#### Aniones

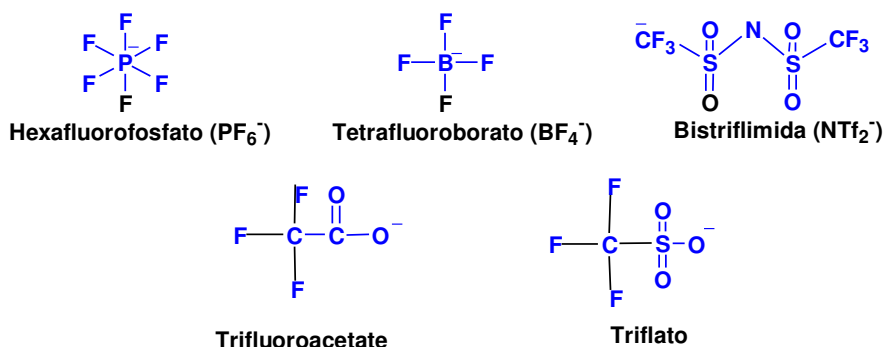


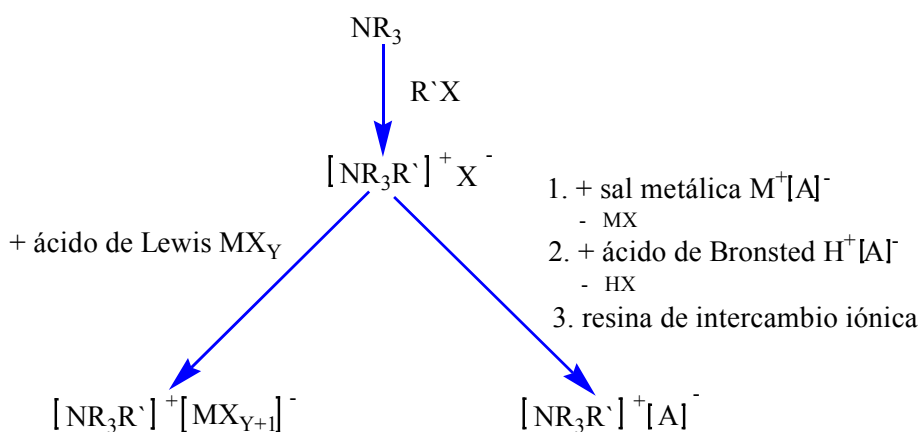
Figura 3.14. Cationes y aniones más comunes que componen los líquidos iónicos

Dado el gran número de aniones y cationes que potencialmente pueden constituir un líquido iónico pueden formularse un extenso número de ellos, dando lugar así a multitud de líquidos iónicos con propiedades muy distintas, que pueden ser usados en aplicaciones concretas. Así, descubrir un nuevo líquido iónico es relativamente fácil, sin embargo determinar su utilidad como disolvente requiere un profundo estudio de sus propiedades fisico-químicas. Lo ideal, en todos los casos, sería encontrar un método que nos predijese la composición de un líquido iónico y las propiedades intrínsecas del mismo. Para ello sería necesario un mejor entendimiento de la relación entre las propiedades de los líquidos iónicos y su estructura, así como el desarrollo de mejores herramientas de cálculo.

### 3.3.2. Obtención de los líquidos iónicos

Los primeros líquidos iónicos que se sintetizaron basados en nitratos de alquilamonio [52] se prepararon mediante la adición de ácido nítrico a alquilaminas. Así, un método simple para obtención de líquidos iónicos es la protonación de determinados compuestos tales como aminas y fosfinas. Sin embargo, este método sólo puede ser utilizado para un pequeño número de sales, ya que muchas descomponen mediante desprotonación.

En general, la síntesis de líquidos iónicos supone dos etapas bien diferenciadas: la formación del catión que constituirá el líquido iónico (reacciones de cuaternización), y la reacción de intercambio iónico que generará el producto deseado. Para el caso de las sales de amonio se muestra el esquema general de reacción en la **Figura 3.15**.

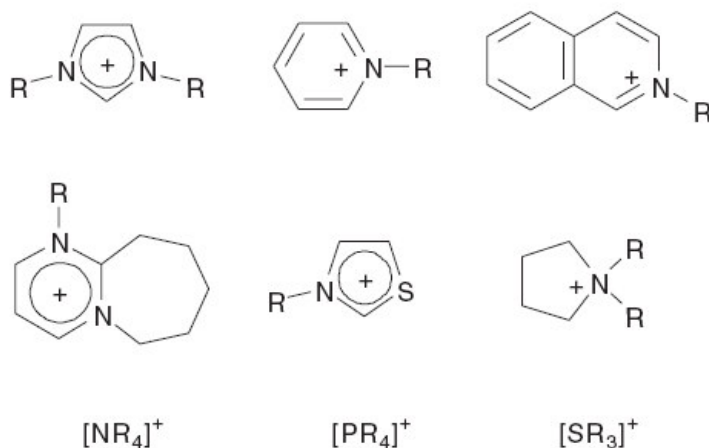


**Figura 3.15.** Síntesis general de líquidos iónicos.



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

Aunque al principio las sales de 1-alkilpiridinio fueron las más utilizadas, la susceptibilidad de éstas a experimentar procesos redox impone algunas limitaciones. Por este motivo posteriormente fueron sustituidas por sales basadas en el catión imidazolio, que además poseen menor punto de fusión. En el presente trabajo se utilizarán líquidos iónicos basados en el catión 1,3-dialquilimidazolio, y por ello la revisión bibliográfica se centrará en la preparación de estos líquidos iónicos, aunque las técnicas que se presentan a continuación son aplicables a otros tipos de cationes como los que se indican en la **Figura 3.16**.



**Figura 3.16.** Ejemplos de cationes usados para la síntesis de líquidos iónicos.

#### 3.3.2.1. Reacciones de cuaternización

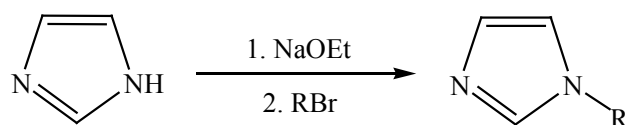
La formación de los cationes que posteriormente constituirán los líquidos iónicos, puede ser llevada a cabo por protonación con un ácido o por cuaternización de una amina o una fosfina, principalmente con un haloalcano.

Las reacciones de protonación se usan para la síntesis de sales tales como el nitrato de etilamonio, en la cual se adiciona ácido nítrico 3M a una disolución acuosa enfriada de etilamina [53]. La pequeña cantidad de amina que queda en el medio de reacción puede ser eliminada, al igual que el agua, calentando a 60 °C a vacío. Este procedimiento general puede ser aplicado para la preparación de otras sales del mismo

tipo. Cuando la amina es de alto peso molecular se puede correr el riesgo de contaminación por la amina residual. Un método similar se utiliza para la síntesis de sales de bajo punto de fusión tales como cloratos, nitratos y tetrafluoratos de 1-alquilimidazolio con sustituyentes de larga longitud de cadena [54]. En estos casos se emplea un ligero exceso de ácido y los productos obtenidos son generalmente cristalinos a temperatura ambiente.

Las reacciones de cuaternización consisten en polisustituir una amina o una fosfina hasta conseguir hacerla cuaternaria, mediante reacción con un haluro de alquilo. Los procesos de cuaternización poseen como ventajas el amplio rango de haloalcanos disponibles a bajo precio y el hecho de que las reacciones transcurran a temperaturas relativamente suaves. Además, las sales formadas pueden ser transformadas en sales de otros aniones. En general, la reacción puede ser llevada a cabo mediante cloroalcanos, bromoalcanos y iodoalcanos. Las condiciones de reacción se convierten más suaves en el orden  $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$ , tal y como es de esperar en reacciones de sustitución nucleófila. Las sales de fluoruros no se pueden formar mediante este camino sintético.

En principio las reacciones de cuaternización son muy simples de llevar a cabo; en ellas, la amina, tal y como se muestra en la **Figura 3.17**, o la fosfina se mezclan con un determinado haloalcano y la mezcla de reacción se agita y calienta.



**Figura 3.17.** Síntesis de alquilimidazoles.

Las reacciones de cuaternización de 1-alquilimidazoles, que son los productos de partida más utilizados en la síntesis de los líquidos iónicos, son similares a las de otras aminas tales como la piridina [55], la isoquinoleína [56], 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undeceno [57], 1-metilpirrolidina [58] y trialquilaminas [59], así como para fosfinas.

Las posibles impurezas presentes en las sales obtenidas pueden ser productos de partida que no han reaccionado y disolvente. Las sales de haluro generalmente se usan como fuente del catión y deben ser eliminadas para la mayor parte de las aplicaciones, por lo que se ha de asegurar mediante RMN que el líquido iónico final está libre de estos compuestos.

#### 3.3.2.2. Reacciones de intercambio del anión

Otro de los procedimientos de síntesis consiste en llevar a cabo reacciones de intercambio del anión. Dentro de este tipo de reacciones, se puede distinguir entre aquellas que consisten en el tratamiento directo de las sales del haluro con ácidos de Lewis y las que se conocen como reacciones de metátesis aniónica. Esa división en dos categorías radica en que los métodos experimentales utilizados para cada una de éstas son diferentes.

➤ Tratamiento con ácidos de Lewis

La formación de líquidos iónicos por tratamiento de las sales de haluro con ácidos de Lewis (especialmente con  $\text{AlCl}_3$ ) fue la principal vía de síntesis de líquidos iónicos durante los primeros años de su desarrollo.

En términos generales, el tratamiento de haluros de sales cuaternarias  $\text{Q}^+\text{X}^-$  con ácidos de Lewis  $\text{MX}_n$  conduce a la formación de más de una especie aniónica, dependiendo de las proporciones relativas de  $\text{Q}^+\text{X}^-$  y  $\text{MX}_n$ . Esta reacción es generalmente bastante exotérmica. Aunque estas sales son relativamente estables, el exceso local de calor puede dar lugar a la descomposición del líquido iónico. La sensibilidad al agua de la mayor parte de los reactantes al igual que el líquido iónico, supone que la reacción tiene que llevarse a cabo en ausencia de trazas de agua. Del mismo modo, es conveniente que después de su síntesis los líquidos iónicos sean almacenados en un desecador a vacío.

Los cloroaluminatos no son los únicos líquidos iónicos preparados por esta vía. También se pueden emplear otros ácidos de Lewis tales como  $\text{AlEtCl}_2$  [60,61],  $\text{BCl}_3$  [62],  $\text{CuCl}$  [63], y  $\text{SnCl}_2$  [64].

➤ Reacciones de metátesis

La primera preparación de líquidos iónicos basados en cationes 1,3-alquilmetilimidazolio relativamente estables al agua y al aire (a veces conocidos como segunda generación de líquidos iónicos) fue descrita por Wilkes y Zaworotko [65] en 1992. La preparación de estos nuevos líquidos iónicos era llevada a cabo mediante reacciones de metátesis entre [emim]I y una serie de sales de plata ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{AgNO}_2$ ,  $\text{AgBF}_4$ ,  $\text{Ag}[\text{CO}_2\text{CH}_3]$ , y  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ), utilizando como disolvente metanol o disoluciones acuosas de metanol. La baja solubilidad del yoduro de plata en estos disolventes permite su separación por simple filtración. La posterior eliminación del disolvente permite aislar los líquidos iónicos con altos rendimientos y purezas. Este método es considerado como el más eficiente para la síntesis de líquidos iónicos miscibles con agua, aunque está limitado por el alto coste de las sales de plata y las grandes cantidades de subproducto sólido formado. Posteriormente se publicó la primera síntesis de un

líquido iónico inmiscible con agua,  $[\text{emim}^+][\text{PF}_6^-]$ , obtenido por la reacción entre  $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$  y  $\text{HPF}_6$  en una disolución acuosa [66].

La síntesis de *líquidos iónicos inmiscibles con agua* es considerablemente más sencilla que sus análogos solubles en agua. La solubilidad en agua de los líquidos iónicos depende de la naturaleza del anión y del catión de los que se compone, y en general decrece con el incremento del carácter orgánico del catión. La forma más común para la preparación de líquidos iónicos inmiscibles con agua consiste en preparar en primer lugar una disolución acuosa de la sal de haluro del catión. Sobre la disolución anterior se añade el anión en su forma ácida, como sal alcalina o de amonio, teniendo entonces lugar la reacción de intercambio aniónico. Métodos alternativos de síntesis suponen el uso de plata [65] o sales de plomo [67]. Cuando se utiliza como fuente del anión la forma ácido del mismo, la reacción se ve favorecida, liberándose al medio  $\text{HCl}$ ,  $\text{HBr}$ , ó  $\text{HI}$  como subproducto que puede ser eliminado mediante lavado con agua. Se recomienda en estos casos que estas reacciones sean llevadas a cabo con enfriamiento de la disolución de la sal de haluro mediante un baño de hielo, ya que las reacciones de metátesis son a menudo exotérmicas. En los casos en los que la forma ácido no esté disponible o la presencia de trazas de ácido pudiera causar problemas, se podría sustituir por un metal alcalino o una sal de amonio sin mayor problema. Cuando se utiliza la forma ácido como fuente del anión, el lavado de los líquidos iónicos sintetizados debería continuar hasta que las aguas de lavado fueran neutras, ya que las trazas de ácido pueden causar la descomposición de los líquidos iónicos con el tiempo. Este es el caso de las sales basadas en el anión  $[\text{PF}_6^-]$ , ya que tienen el problema particular de la formación lenta de  $\text{HF}$ , especialmente por calentamiento si el líquido iónico no está completamente libre de ácido. Cuando se opta por usar un metal alcalino o una sal de amonio, es recomendable realizar un lavado con agua del líquido iónico y después analizar las aguas de lavado con el fin de detectar la presencia de aniones haluro, en el caso de que la reacción no se completase del todo, por ejemplo mediante una valoración con nitrato de plata. Respecto a la purificación mediante lavado, la alta viscosidad de los líquidos iónicos hace difícil que este proceso se pueda llevar a cabo de manera eficiente. Algunos autores han recomendado recientemente la disolución de éstos en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  o  $\text{CHCl}_3$ , con el fin de disminuir la viscosidad del líquido iónico. Otra de las ventajas de este procedimiento es que la mezcla disolvente orgánico/líquido iónico, puede ser almacenada sobre un agente desecante tal como  $\text{MgSO}_4$  antes de eliminar el disolvente orgánico, con el fin de reducir la cantidad de agua en el producto final. Métodos similares a los anteriormente comentados han sido utilizados para la preparación de sales basadas en aniones  $[\text{PF}_6^-]$  y  $[\text{NTf}_2^-]$  [68,69].

En la preparación de *líquidos iónicos miscibles con agua* el proceso de purificación es más complejo. El uso de sales de plata descrito anteriormente permite la preparación de una gran cantidad de líquidos iónicos de alta pureza, pero el proceso es muy caro para la producción de líquidos iónicos a gran escala. El método más común es llevar a cabo el intercambio con una disolución acuosa de la forma ácido del anión, la sal de amonio o la

sal de un metal alcalino. Cuando se usa este método sintético es importante que el líquido iónico pueda ser aislado sin contaminación de subproductos que contengan haluros. Lancaster *et al.* [70] han sugerido un método sintético para la preparación de  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ . En esta síntesis, que podría en principio, ser adaptada a cualquier sistema miscible con agua, el líquido iónico se forma por la metátesis entre  $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$  y  $\text{HBF}_4$  en una disolución acuosa. El producto de reacción es extraído en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y la fase orgánica obtenida se extrae a su vez con pequeños volúmenes de agua desionizada hasta que el agua de lavado sea de pH neutro. La presencia de trazas de iones haluro se puede detectar mediante un análisis con  $\text{AgNO}_3$ . Posteriormente al tratamiento, el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  es eliminado por evaporación en rotavapor. Si se desea un mayor grado de purificación del líquido iónico, se puede mezclar con carbón activo durante 12 horas. Finalmente, el líquido iónico se filtra a través de una columna de alúmina ácida o neutra y se seca con calentamiento a vacío. El rendimiento obtenido mediante el procedimiento descrito es de alrededor del 70% cuando la síntesis se realiza a gran escala. De forma alternativa, las reacciones de metátesis pueden llevarse a cabo en un disolvente orgánico tal como  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , como describen Cammarata *et al.* [71] o en acetona, como señalan Fuller *et al.* [72]. En ambos sistemas los materiales de partida no son totalmente solubles en el medio de reacción, por lo que permanecen como una suspensión. En el caso de utilizar  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como disolvente, la reacción se lleva a cabo por agitación de la sal de haluro de 1-alkil-3-metilimidazolio con la sal del metal a temperatura ambiente durante 24 h. Después de transcurrido este tiempo, las sales de haluro que se obtienen como subproductos insolubles son eliminados por filtración. Aunque los subproductos tienen una solubilidad limitada en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , son mucho más solubles en mezclas líquido iónico/  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Así, cuando se emplea este método, es importante que los extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sean lavados con agua con el fin de minimizar el contenido en haluro del producto final. Este procedimiento supone una disminución del rendimiento final por lo que hay adoptar la precaución de que el volumen de agua utilizado sea pequeño. La disminución de la temperatura del agua hasta valores próximos a 0 °C puede también reducir la cantidad de líquido iónico que se pierde. El producto final obtenido es purificado por agitación con carbón activo y posteriormente por su paso a través de una columna de alúmina. Con este procedimiento sintético se obtienen unos rendimientos que oscilan entre un 70 y 80 % y se puede usar para la preparación de líquidos iónicos que contengan una amplia variedad de aniones tales como:  $[\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{SbF}_6^-]$ ,  $[\text{BF}_4^-]$ ,  $[\text{ClO}_4^-]$ ,  $[\text{NTf}_2^-]$ ,  $[\text{NO}_3^-]$  y  $[\text{CF}_3\text{CO}_2^-]$ .

Un método alternativo para la preparación de líquidos iónicos de alta pureza, propuesto por Wasserscheid y Keim [73], se basa en el uso de resinas de intercambio iónico. En este sentido, Lall *et al.* [74], han realizado la síntesis de líquidos iónicos basados en aniones fosfato con cationes de poliamonio basándose en esta metodología.

#### 3.3.3. Propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos

Además de la baja presión de vapor de estos compuestos, que los hacen especialmente atractivos como sustitutos de los tradicionales disolventes orgánicos volátiles, poseen otra serie de propiedades que los hacen muy interesantes y que se citarán a continuación. Pero, desde el punto de vista de sus propiedades y como consecuencia de sus aplicaciones potenciales, lo que hace a los líquidos iónicos realmente valiosos es la posibilidad de modular sus propiedades físicas y químicas variando la naturaleza de los cationes y aniones presentes en sus estructuras específicas [75,76].

Algunas de estas propiedades y la relación con su estructura son las que se exponen a continuación.

- Baja presión de vapor. A diferencia de las sales fundidas, los líquidos iónicos presentan una débil interacción coulombica entre iones, que limita la formación de pares iónicos necesarios para que se produzca la volatilización de las sales, por lo que estas sustancias tienen presión de vapor muy baja o indetectable. Esta característica los hace fácilmente manejables, al no evaporarse, y permite la utilización de la destilación para recuperar los productos o sustratos disueltos en ellos en los procesos donde sean usados, ya sea en catálisis, extracciones líquido-líquido, etc.
- Estabilidad térmica. Los líquidos iónicos se encuentran en estado líquido en un intervalo de temperaturas mayor que los disolventes moleculares convencionales. El límite superior de temperatura está determinado normalmente por la temperatura de descomposición térmica del mismo, que normalmente se encuentra entre 350 y 400°C en líquidos iónicos que contienen cationes orgánicos. La temperatura de descomposición depende de la naturaleza de los iones, catión y anión, que conforman el líquido iónico. Así, la temperatura de descomposición es menor en el caso de sales de tetralquilamonio que en aquellas basadas en el catión imidazolio; como ejemplos de éstos últimos se exponen los casos del [emim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], que es estable hasta los 300°C, y del [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], hasta los 400° C [68]. Para las sales basadas en cationes [Rmim<sup>+</sup>] la estabilidad para los diferentes aniones disminuye en la serie [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] > [BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] > [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [AsF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [I<sup>-</sup>], [Br<sup>-</sup>] y [Cl<sup>-</sup>]. Así, los líquidos iónicos que contienen aniones más débilmente coordinados son más estables a la descomposición a altas temperaturas [68,77,78-80].
- Estabilidad química. Los líquidos iónicos basados en el catión 1,3-dialquilimidazolio son compuestos no inflamables [81] y químicamente inertes [82], a diferencia de los líquidos iónicos basados en cloro-aluminatos que son muy sensibles a la humedad y, por tanto, necesitan ser escrupulosamente protegidos de ella y de otras impurezas de óxido. Estas sales

reaccionan de manera muy exotérmica con el agua, produciendo HCl y un precipitado blanco, que se redissuelve por agitación [83]. Además, muchos complejos de metales de transición y sustratos orgánicos no son inertes a los cloro-aluminatos, pudiendo reaccionar con ellos.

- Bajo punto de fusión. Los líquidos iónicos tienen un bajo punto de fusión, normalmente por debajo de la temperatura ambiente, pudiendo en algunos casos ser de  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El punto de fusión depende de forma muy importante del tamaño de líquido iónico, de su simetría, de su carga y de la distribución de la misma, tal y como se puede observar en la Tabla 3.1. Así, al aumentar el tamaño del anión y del catión disminuye el punto de fusión. En el caso de cationes imidazolios con sustituyentes alquilo, un incremento en la longitud de cadena del mismo 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 sustituyentes. Del mismo modo, un incremento en la simetría de los iones, supone un aumento del punto de fusión ya que permite un mayor empaquetamiento de los mismos. En relación a la dependencia del punto de fusión con la carga se puede decir, de forma general, que la existencia de puentes de hidrógeno y la deslocalización de carga conducen a un aumento del punto de fusión.
- Densidad superior a la del agua. Los valores de densidad para los líquidos iónicos medidos hasta el momento varían entre  $1.12\text{ g/cm}^3$  para  $[(n\text{-C}_8\text{H}_{17})(\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{N}]^+[\text{NTf}_2]^-$  y  $2.24\text{ g/cm}^3$  para  $[(\text{CH}_3)_3\text{S}]\text{Br}/\text{AlBr}_3$  (34/66 mol%). Es importante destacar que la densidad es la propiedad física menos sensible a la variación de la temperatura. Además, la presencia de impurezas tiene mucha menos influencia en los valores de esta propiedad que en la viscosidad. Para un catión determinado, la densidad para los diferentes aniones varía en la serie  $[\text{CH}_3\text{SO}_3]^- \approx [\text{BF}_4]^- < [\text{CF}_3\text{CO}_2]^- < [\text{CF}_3\text{SO}_3]^- < [\text{C}_3\text{F}_7\text{CO}_2]^- < [(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$ . Para el caso de los cationes, la densidad aumenta cuando el tamaño del anión se incrementa [84,85].
- Viscosidad elevada. En general, los líquidos iónicos tienen una viscosidad mayor que la de los disolventes moleculares convencionales y está comprendida entre 10-500cP. Para dar idea del orden de magnitud, la viscosidad del agua a temperatura ambiente es de 0.890cP. La viscosidad en los líquidos iónicos presenta una fuerte dependencia con la temperatura [86] y se afecta por la presencia de impurezas que contenga el líquido iónico [87]. Para el mismo catión, el cambio del anión afecta de manera muy importante a la viscosidad, disminuyendo su valor en la serie  $[\text{Cl}]^- > [\text{PF}_6]^- > [\text{BF}_4]^- \approx [\text{NO}_3]^- > [\text{NTf}_2]^-$ . 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 tipo van der Waals, incrementando la interacción electrostática a través de puentes de hidrógeno. Los valores de viscosidad en los líquidos iónicos también se ven afectados por la naturaleza del catión orgánico. Esta tendencia no está correlacionada con el tamaño del anión, ya que le afectan otros fenómenos como el establecimiento de puentes de hidrógeno con el catión. Aunque la influencia del catión en la viscosidad es menor, se ha observado que un aumento en la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión imidazolio supone un aumento en los valores de viscosidad, pudiendo ser ésta disminuida por el uso de cadenas muy ramificadas [88].

- Buenas propiedades electroquímicas. Los líquidos iónicos poseen una serie de propiedades que los hacen ser disolventes adecuados en procesos electroquímicos, tales como gran estabilidad a la oxidación/reducción, resistiendo un amplio rango de potenciales y relativamente buena conductividad eléctrica. Además permanecen en estado líquido en un amplio intervalo de temperaturas, como ya se ha comentado [89].
- pH variable. Su acidez varía de unos a otros, pudiendo encontrar líquidos iónicos ácidos, neutros o básicos.
- Color. Son incoloros en estado puro. A veces presentan ciertas tonalidades, siendo ciertas impurezas con frecuencia las causantes de las mismas.

En la **Tabla 3.1** se muestran valores medidos por diversos autores de las propiedades anteriormente descritas.



Tabla 3.1. Efecto de la naturaleza del líquido iónico en las propiedades fisico-químicas del mismo.

Líquido Iónico	Punto fusión (°C)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Viscosidad (20°C) (cP)	Conductividad (S/m)	pH	T <sub>descomposición</sub> (>°C)
[bmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	65 <sup>[89]</sup>	1.10 <sup>[89]</sup>	-	-	-	-
[bmim <sup>+</sup> ][CF <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ]	-40 <sup>[89]</sup>	1.21 <sup>[89]</sup>	73 <sup>[89]</sup>	0.32 <sup>[89]</sup>	-	-
[bmim <sup>+</sup> ][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	16 <sup>[89]</sup>	1.29 <sup>[89]</sup>	90 <sup>[89]</sup>	0.37 <sup>[89]</sup>	-	200 <sup>[90]</sup>
[emim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	15 <sup>[91]</sup>	1.279 <sup>[92]</sup> (25°C)	32 <sup>[92]</sup> (25°C)	1.4 <sup>[92]</sup> (25°C)	-	-
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	-82 <sup>[89]</sup>	1.17 <sup>[89]</sup>	233 <sup>[89]</sup>	0.17 <sup>[89]</sup>	-	300 <sup>[90]</sup>
[hmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	-82 <sup>[90]</sup>	1.14 <sup>[90]</sup> (20 °C)				
[bdmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	38 <sup>[90]</sup>	1.20 <sup>[90]</sup>	-	-		200 <sup>[90]</sup>
[emim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	62 <sup>[92]</sup>	-	-	0.52 <sup>[93]</sup> (26°C)	-	-
[bdmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]		1.20 <sup>[94]</sup>			3 <sup>[90]</sup> (20 °C)	
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	15 <sup>[95]</sup>	1.3650 <sup>[95]</sup> (20 °C)	195.9 <sup>[95]</sup> (25 °C) – 385 <sup>[90]</sup>	0.134 <sup>[95]</sup>	5.77 <sup>[95]</sup>	300 <sup>[90]</sup>
[hmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	-80 <sup>[95]</sup>	1.2965 <sup>[95]</sup> (20 °C)	712 <sup>[90]</sup> (20 °C) – 3477 <sup>[95]</sup> (25°C)	-	5.91 <sup>[89]</sup>	-
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	-82 <sup>[95]</sup>	1.23 <sup>[95]</sup> (20°C)	3600 <sup>[95]</sup> (25°C) – 1007.9 <sup>[90]</sup> (20 °C)	0.0237 <sup>[95]</sup>	5.73 <sup>[95]</sup>	270 <sup>[90]</sup>
[emim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	-3 <sup>[59]</sup>	1.518 <sup>[96]</sup> (25°C)	31 <sup>[96]</sup> (25°C)	0.57 <sup>[96]</sup> (25°C)	-	-
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	-4 <sup>[59]</sup>	1.43 <sup>[89]</sup>	52 <sup>[89]</sup>	0.39 <sup>[89]</sup>	-	-
[hmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	-50 <sup>[90]</sup>	1.38 <sup>[90]</sup> (20 °C)	89.1 <sup>[90]</sup> (20 °C)	-	6 <sup>[90]</sup> (20°C)	300 <sup>[90]</sup>
[omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	-	1.33 <sup>[90]</sup> (20 °C)	120.8 <sup>[90]</sup> (20 °C)	-	-	-

- Elevado poder de disolución. Los líquidos iónicos son considerados como disolventes polares. Las medidas solvatocrómicas indican que poseen una polaridad similar a los alcoholes de cadena corta u otros disolventes apróticos polares como DMSO (dimetilsulfóxido) ó DMF (dimetilformamida). Ésta suele ser intermedia entre la del agua y la de los disolventes orgánicos clorados y varía dependiendo de la naturaleza del líquido iónico. Así, pueden ser utilizados en multitud de aplicaciones pues solvatan un amplio número de especies, tanto orgánicas, inorgánicas como organometálicas [97,98,68,75,89,99].
- Solubilidad de líquidos iónicos basados en el catión imidazolio en disolventes orgánicos. La solubilidad de los líquidos iónicos en los disolventes orgánicos depende de la constante dieléctrica del disolvente; cuando ésta es mayor de 6, exceptuando el caso del agua, el disolvente orgánico suele ser miscible con el líquido iónico. En la **Tabla 3.2** se exponen los valores de la constante dieléctrica para distintos disolventes junto a su capacidad de solubilizar o no el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

**Tabla 3.2.** Solubilidad del [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] en distintos disolventes.

Disolvente	$\epsilon$	[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]
Agua	80.1	Inmiscible
Carbonato de propileno	64.4	Miscible
Metanol	33.0	Miscible
Acetonitrilo	26.6	Miscible
Acetona	20.7	Miscible
Cloruro de metileno	8.93	Miscible
Tetrahidrofurano	7.58	Miscible
Tricloroetileno	3.39	Inmiscible
Disulfuro de carbono	2.64	Inmiscible
Tolueno	2.38	Inmiscible
n-Hexano	1.90	Inmiscible

- Solubilidad de gases. La solubilidad de gases, como por ejemplo H<sub>2</sub>, CO y O<sub>2</sub>, es generalmente buena en líquidos iónicos y los hace disolventes atractivos para llevar a cabo hidrogenaciones catalíticas, carbonilaciones, hidroformilaciones y oxidaciones aeróbicas [51].
- Hidroflicidad/hidrofobicidad. La miscibilidad de los líquidos iónicos con agua, es una propiedad particularmente interesante. Todos los líquidos iónicos descritos hasta la fecha son higroscópicos. Mientras algunos son miscibles con agua en todas las proporciones, como es el caso de [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], otros se saturan con agua, formando entonces un sistema bifásico [100]. En este grupo se encuentran [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]. La solubilidad de los líquidos iónicos con agua depende en gran medida de la naturaleza del anión, debido a la fuerte interacción por puentes de hidrógeno que se produce entre éste y el agua; el catión tiene un efecto secundario en esta propiedad [71]. Aun así, la lipoflicidad de las sales de dialquilimidazolio, se puede incrementar mediante el aumento en la longitud de cadena de los grupos alquílicos [101,78]. El logaritmo del coeficiente de reparto de un líquido iónico entre el 1-octanol, y el agua (log K<sub>ow</sub>), se suele emplear como método de medida relativa de la hidrofobicidad de los líquidos iónicos. Este tipo de medidas puede resultar muy interesante en la utilización de líquidos iónicos como medios de reacción en síntesis enzimática. Así, Laane *et al.* [44] pusieron de manifiesto la presencia de actividad enzimática en disolventes orgánicos con un log K<sub>ow</sub> superior a 4. En la **Tabla 3.3** se muestra el log K<sub>ow</sub> de distintos líquidos iónicos y del n-hexano, un disolvente orgánico habitualmente usado en este tipo de reacciones.

**Tabla 3.3.** Valor del Log  $K_{ow}$  de distintos líquidos iónicos y de n-hexano.

Disolvente	Log $K_{ow}$
n-Hexano	3.5 <sup>[44]</sup>
[omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.80 – 1.05 <sup>[102]</sup>
[hmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.15 – 0.22 <sup>[102]</sup>
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	-0.21 – -0.96 <sup>[102]</sup>
[emim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	-1.05 – -0.96 <sup>[102]</sup>
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	-1.66±0.03 <sup>[102]</sup> – -2.39±0.27 <sup>[103]</sup>
[bmim <sup>+</sup> ][Cl <sup>-</sup> ]	-2.40±0.07 <sup>[102]</sup>
[bmim <sup>+</sup> ][NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	-2.42±0.02 <sup>[102]</sup> – -2.90±0.01 <sup>[104]</sup>
[bmim <sup>+</sup> ][Br <sup>-</sup> ]	-2.48 ±0.13 <sup>[102]</sup>
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	-2.52±0.06 <sup>[102]</sup>
[bmim <sup>+</sup> ][CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> ]	-2.77±0.11 <sup>[103]</sup>

Según la propuesta de Laane et al. [44] ninguno de los líquidos iónicos que se presentan en la **Tabla 3.3** sería adecuado como disolvente en reacciones biocatalíticas. Actualmente se sabe que no es así, ya que algunos de estos líquidos iónicos han sido utilizados como disolventes en biotransformaciones con excelentes resultados. Sin embargo, si bien el valor de log  $K_{ow}$  de cada uno de los líquidos iónicos no es muy fiable a la hora de establecer qué medio de reacción es mejor que otro, sí se ha observado que, en general, cuanto más hidrofóbico es un líquido iónico más adecuado es como disolvente en reacciones de síntesis biocatalíticas.

- Nucleofilicidad. La nucleofilicidad de algunos líquidos iónicos ha sido medida a través de la variación de  $\lambda_{max}$  del reactivo solvatocrómico [Cu(acac)(tmem)][BPh<sub>4</sub>] (acac=acetilacetona; tmem= N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) [99]. De las medidas realizadas se deduce que el valor de  $\lambda_{max}$  es únicamente dependiente del anión. El orden de nucleofilicidad para algunos de los aniones de los líquidos iónicos es el siguiente: [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] < [TfO<sup>-</sup>]. Así, mientras la carga en el anión [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] se encuentra más deslocalizada, la estructura cristalina de las sales de imidazolio basadas en el anión [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] sugieren que en éste la carga negativa está localizada a lo largo de enlace S-N-S, aumentando así el poder nucleófilo del mismo. No se dispone de valores para el

anión  $[\text{BF}_4^-]$ , pero Irimescu y Kato [105], proponen que el orden de nucleofilidad es el siguiente  $[\text{PF}_6^-] < [\text{BF}_4^-] < [\text{TfO}^-]$ , atendiendo a los valores del número donador de  $[\text{BF}_4^-]$  y de  $[\text{TfO}^-]$ .

#### **3.3.4. Toxicidad y biodegradabilidad de los líquidos iónicos**

Para un uso seguro de los líquidos iónicos es necesario conocer su toxicidad y biodegradabilidad. Aunque estos datos no han sido determinados para muchos líquidos iónicos, la volatilidad prácticamente nula de éstos reduce las potenciales vías de exposición, siendo el contacto directo con la piel y la ingestión las únicas vías posibles. La mayoría de los líquidos iónicos que se han investigado son irritantes y tienen una toxicidad comparable a los disolventes orgánicos convencionales [106]. No obstante, algunos estudios han mostrado que es posible el diseño de líquidos iónicos no tóxicos mediante la adecuada selección del catión y el anión constituyentes. Por los tests biológicos que se han realizado a algunos líquidos iónicos parece ser que la toxicidad de éstos viene fundamentalmente determinada por el tipo de catión. Así se ha observado que los líquidos iónicos con sustituyentes alquílicos más cortos en el catión normalmente presentan menores toxicidades [106,107]. También se ha encontrado que algunos líquidos iónicos son biodegradables, especialmente cuando presentan un grupo éster en la cadena alquílica lateral del catión [107-109]. Además, recientemente se ha obtenido un líquido iónico a partir de materias primas bio-renovables [110].

Así, aunque no se puede afirmar con rotundidad que los líquidos iónicos sean totalmente “verdes”, lo que si es cierto es que los procesos químicos basados en el empleo de estos nuevos disolventes presentan notables beneficios medioambientales al reducir la generación de residuos (eliminando las pérdidas de disolvente por evaporación y mediante la reutilización del IL) y el consumo de energía (en la recuperación de los productos se elimina la etapa de evaporación de disolvente que lleva asociada un alto consumo de energía). Además, como se ha comentado con anterioridad, es posible el diseño de líquidos iónicos no tóxicos y biodegradables mediante la adecuada selección del catión y el anión.

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

Los primeros líquidos iónicos fueron sintetizados con fines electroquímicos para utilizarlos en baterías, ya que se caracterizan por tener un amplio rango de estabilidad electroquímica, altas conductividades, alta estabilidad térmica y un punto de fusión relativamente bajo. La constatación posterior de que éstos presentaban una gran utilidad como medios de reacción tanto en procesos químicos como bioquímicos, suscitó un interés creciente, consolidando su estudio, y potenciando el desarrollo de nuevos líquidos iónicos. Así, los líquidos iónicos han sido utilizados como disolventes en reacciones nucleofílicas [111,112] y electrofílicas [112,113] catalizadas tanto por ácidos como por complejos de metales de transición. También se han revelado como

excelentes medios de reacción en biosíntesis [114,115] presentando además en estos casos una gran capacidad para la estabilización enzimática en operaciones continuas [116]. Esta aplicación constituye uno de los focos de interés del presente trabajo de investigación y por tanto será revisada con mayor profundidad en el apartado siguiente.

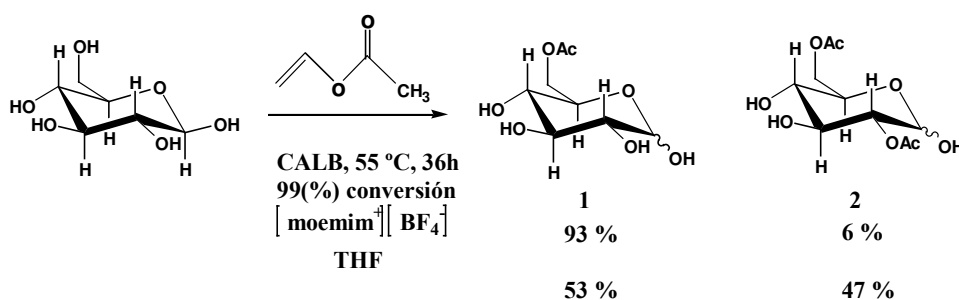
#### 3.3.5.1. Los líquidos iónicos como medios no convencionales en reacciones biocatalíticas

Magnusson *et al.* [117] comprobaron en 1984 que la enzima *fosfatasa alcalina* era relativamente estable en una mezcla de nitrato de etilamonio y agua (4:1). Así, con la intención de mejorar la velocidad de reacción de los procesos catalíticos en medios orgánicos surgen los líquidos iónicos como nuevos medios anhidros de reacción donde llevar a cabo reacciones biosintéticas. Durante los 10 últimos años, el empleo de los líquidos iónicos en las reacciones enzimáticas está atrayendo un enorme interés, ya que están apareciendo como los sustitutos más adecuados a los disolventes orgánicos, al no causar problemas de desactivación enzimática, y evitar los efectos medioambientales derivados de la alta volatilidad de estos últimos.

La primera biotransformación con éxito que se llevó a cabo en líquidos iónicos fue la síntesis de *Z*-aspartamo por la enzima *termolisina* en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] con un 5% (v/v) de contenido en agua [118].

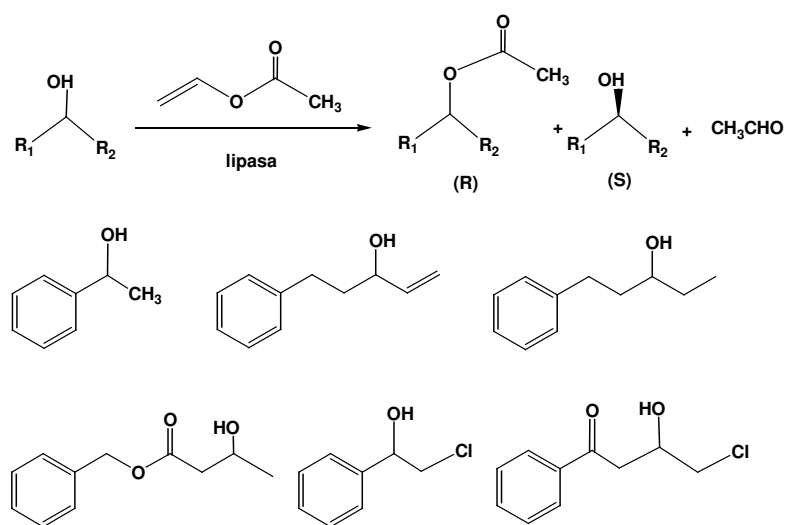
Las *lipasas*, que poseen una importante tolerancia a los disolventes orgánicos, son las candidatas más obvias a ser utilizadas en líquidos iónicos. De hecho, la lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) [119-122] y de *Pseudomonas cepacia* (PcL) [119,120,123] resultaron catalíticamente activas en líquidos iónicos basados en los cationes 1-alkil-3-metilimidazolio y 1-alkilpiridinio. En este sentido, las reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas en líquidos iónicos transcurren con una eficacia comparable al *t*-butil alcohol [121], dioxano [124] o tolueno [123]. CaLB se mostró 10 veces más activa en [bmpy<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] y [bmim<sup>+</sup>][Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>] que en diisopropil eter [122], mientras que la lipasa de páncreas de cerdo, la única lipasa de mamífero que ha sido estudiada en líquidos iónicos como medio de reacción, no mostró actividad en los mismos. Las lipasas no presentan capacidad catalítica en todos los líquidos iónicos. Así, no han mostrado actividad sintética en [mmim<sup>+</sup>][MeSO<sub>4</sub><sup>-</sup>] [122], [bmim<sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] [bmim<sup>+</sup>][lactato<sup>-</sup>] ó [EtNH<sub>3</sub><sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] [114], siendo importante destacar que todos estos líquidos iónicos son miscibles con agua. Al parecer en estos casos los aniones metilsulfato, nitrato, y lactato tienden a solvatar la lipasa, mediante interacciones fuertes que la desnaturalizan. De hecho, se ha observado mediante espectroscopia de fluorescencia la desnaturalización de una lisozima al disolverse en [EtNH<sub>3</sub><sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] [125].

La enzima CaLB ha catalizado también la esterificación selectiva de glucosa en  $[\text{emim}^+][\text{BF}_4^-]$ , reacción que se lleva a cabo con dificultad en otros disolventes orgánicos tales como tetrahidrofurano (THF), debido a que la solubilidad del reactivo es mucho más alta que la del producto, generándose el diéster con facilidad (**Figura 3.18**). La esterificación de glucosa fue más rápida cuando se utilizó  $[\text{moemim}^+][\text{BF}_4^-]$  como medio de reacción, donde la solubilidad de la glucosa es de  $5 \text{ g l}^{-1}$ , 10 veces más que en acetona [123].



**Figura 3.18.** Acilación regioselectiva de glucosa en líquidos iónicos y THF.

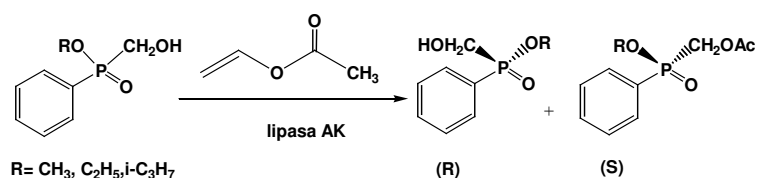
La resolución de alcoholes quirales mediante acilación enantioselectiva es una de las mayores aplicaciones industriales de las lipasas [42]. Los líquidos iónicos también se han utilizado con éxito en este tipo de reacciones, en concreto como medios de reacción para resoluciones de arilalcoholes catalizadas por CaLB y PcL (**Figura 3.18**) [120,122,123,126]. La resolución racémica de estos compuestos se consigue con una selectividad de buena a excelente en los disolventes orgánicos convencionales, quedando un pequeño margen de mejora para los nuevos medios. A pesar de ello la relación enantiomérica (E) [120] de algunas de estas resoluciones mejora considerablemente cuando la reacción se lleva a cabo en un líquido iónico. Así, la enantioselectividad de la resolución racémica del rac-feniletanol llevado a cabo por PsL fue casi total en  $[\text{bmim}^+][\text{TfO}^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ , obteniéndose valores considerablemente inferiores en TBME (tert-butilmetileter) [122]. Del mismo modo, Kim *et al.* [120] estudiaron la transesterificación de alcoholes en presencia de acetato de vinilo usando la lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB inmovilizada) y la lipasa *Pseudomonas cepacia* (PCL nativa) como catalizadores enzimáticos en  $[\text{emim}^+][\text{BF}_4^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ , comprobando que las lipasas eran 25 veces más enantioselectivas en los líquidos iónicos que en los disolventes orgánicos convencionales.



**Figura 3.18.** Resolución racémica de alcoholes quirales por la enzima lipasa.

La alta termoestabilidad de las lipasas en líquidos iónicos, ha incentivado la investigación en resoluciones racémicas a alta temperatura [128]. Así, se estudió la resolución racémica de rac-1-feniletanol por PsL en  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$  a diferentes temperaturas, observándose que la enantioselectividad ( $E$ ) se mantenía en unos valores altos desde 200 hasta 150 al aumentar la temperatura de 25 a 90°C. Sin embargo, cuando se utilizó como medio de reacción el TBME el valor de  $E$  disminuyó rápidamente de 200 a 4 (a 55°C, temperatura de ebullición del TBME) [128].

La resolución de alcoholes primarios fósforo-sustituidos (**Figura 3.19**) catalizada por la lipasa *Pseudomonas fluorescens* (lipasa AK), se llevó a cabo con una alta enantioselectividad en  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ , mayor que en diisopropiléter. Sin embargo, la enantioselectividad resultó ser insignificante en  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$  [129].



**Figura 3.19.** Acilación enantioselectiva de alcoholes primarios fósforo sustituidos.



También se ha llevado a cabo la resolución rracémica de *rac*-2-pentanol [130] y *rac*-glicidol [131] en líquidos iónicos basados en el catión imidazolio con excelente enantioselectividad. La actividad de CaLB para la resolución de *rac*-2-pentanol en [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] resultó ser 2.5 veces mayor que en n-hexano y transcurrió con una enantioselectividad del 99,99%. La resolución rracémica de *rac*-glicidol fue catalizada por lipasas de *Candida antarctica* (CaLA y CaLB) y *Mucor miehei* (MML). Todas las enzimas catalizaron la síntesis de ésteres de glicidilo en líquidos iónicos, siendo la actividad en éstos 95 veces mayor que en tolueno.

Recientemente se ha estudiado la esterificación enantioselectiva de (±)-mentol catalizada por la lipasa *Candida rugosa* (CRL) en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] [132]. La actividad enzimática y la enantioselectividad en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] fueron comparables a las obtenidas en n-hexano. También se ha investigado la acilación enantioselectiva catalizada por lipasas de aminas tales como la 1-feniletilamina y la 2-fenil-1-fenilamina en diferentes líquidos iónicos basados en el catión imidazolio. La resolución cinética de 1-feniletilamina se llevó a cabo de forma eficiente en 1-butil-2,3-dimetilimidazolio trifluorometanosulfonato [105].

También ha sido estudiada la actividad de la enzima *α*-quimotripsina en la reacción de transesterificación de ésteres de N-acetil-L-aminoácidos, utilizando como medios de reacción líquidos iónicos basados en cationes 1-alkil-3-metilimidazolio con un contenido en agua del 0.5 % [133-135]. Cuando los líquidos iónicos utilizados como medio fueron el [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] o [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], las velocidades de transesterificación fueron similares a las obtenidas cuando el medio de reacción fue isoootano o acetonitrilo [134]. Sin embargo en [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], (en unas condiciones de reacción ligeramente diferentes) la velocidad de reacción fue cerca de un orden de magnitud superior [135].

Las *glicosidasas* son a menudo utilizadas en mezclas de agua con un disolvente orgánico por lo que es interesante el estudio de las mismas en mezclas agua-líquido iónico. Sin embargo, la tolerancia de estas enzimas a estos medios no es muy buena. Así, la *β*-galactosidasa de *Escherichia coli* solamente mantiene el 6% de su actividad inicial en mezclas al 50% de agua/[bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] [119]. La enzima *formato deshidrogenasa* tolera las mezclas líquido iónico-agua mucho mejor que las galactosidasas. Esta enzima mantiene el 98% de su actividad inicial en una mezcla [mmim<sup>+</sup>][MeSO<sub>4</sub><sup>-</sup>] / tampón al 75% en el líquido iónico [136].

Respecto a la estabilidad térmica de las enzimas cabe destacar que ésta es en general mayor en medios orgánicos con baja actividad de agua que en medios acuosos, por lo tanto cabe esperar que los líquidos iónicos mantengan este efecto. Así, la pérdida de actividad de la *termolisina* resultó ser menor en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] que en acetato de etilo [118]. Del mismo modo, la vida media de *α*-quimotripsina en líquidos iónicos fue

aproximadamente 10 veces mayor que en 1-propanol [135]. Lozano *et al.* [116] compararon la estabilidad de CaLB, en presencia de un 2% de agua en una serie de líquidos iónicos respecto al 1-butanol y n-hexano, encontrando que ésta era igual o superior a los medios orgánicos empleados. La estabilidad térmica de la enzima CaLB libre (Novozym SP525) o absorbida (Novozym 435) también ha sido determinada, mediante incubación en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] a 80°C [114]. La actividad en la enzima libre aumentó un 120% a las 20 horas. En contraste, se observó una desactivación lineal cuando la enzima fue incubada en alcohol t-butílico. La actividad de Novozym 435 aumentó un 350% a las 40 horas, disminuyendo su valor hasta un 250% a las 120 h. Sin embargo, la incubación de CaLB CLEA (*cross-linked enzyme aggregates*) a 80°C en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] supuso una pérdida de actividad progresiva. Por todo lo anterior, parece ser que el líquido iónico induce a la enzima a adquirir una conformación más activa en la enzima libre, lo cual no es posible en las CLEAs.

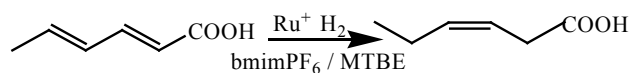
#### 3.3.5.2. Los líquidos iónicos como disolventes en reacciones químicas

Éste es el uso que mayoritariamente se ha investigado con los líquidos iónicos. Así, se han utilizado como disolventes en reacciones de hidrogenación, hidroformilación y oxidación.

##### ➤ Hidrogenaciones:

Chauvin *et al.* [137] fueron los primeros que llevaron a cabo una hidrogenación catalítica, en concreto la hidrogenación de 1-penteno, en medios líquido iónico. Para ello utilizaron el complejo [Rh(nbd)(Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] [(nbd)= norbonadieno], el cual, disuelto en [bmim][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] o [bmim][SbF<sub>6</sub><sup>-</sup>] resultó ser un catalizador efectivo para esta hidrogenación. La velocidad de reacción fue 5 veces más rápida que cuando se utilizó acetona como disolvente.

En estos medios también se han realizado hidrogenaciones estereoselectivas, como la catalizada por rutenio en un sistema bifásico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]/MTBE para obtener el ácido *cis*-3-hexanoico con una selectividad del 90% (**Figura 3.20**) [138].

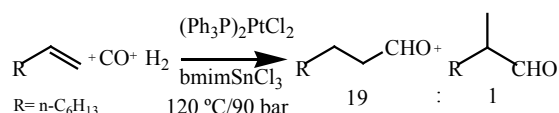


**Figura 3.20.** Síntesis del ácido 3-hexanoico mediante hidrogenación estereoselectiva.

➤ Hidroformilaciones:

La hidroformilación de olefinas es una reacción de gran importancia industrial. Así, la hidroformilación de propeno en un sistema bifásico acuoso, catalizada por rodio soluble en agua, se está llevando a cabo a nivel industrial para la fabricación de butanal [139]. Desafortunadamente, el uso del agua como fase polar limita este proceso a las olefinas C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, debido a su baja solubilidad en agua. Sin embargo, se puede prever que el uso de un líquido iónico apropiado puede proporcionar la base para llevar a cabo la hidroformilación bifásica de olefinas de cadena más larga.

Así, más recientemente, Waffenschmidt y Wassercheid [140] han estudiado la hidroformilación de 1-octeno catalizada por platino en [bmim<sup>+</sup>][SnCl<sub>3</sub><sup>-</sup>] (**Figura 3.21**), en la cual, a pesar de la limitada solubilidad del 1-octeno en el líquido iónico, se observaron altas actividades y una notable regio-selectividad.

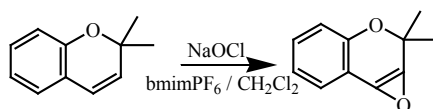


**Figura 3.21** Hidroformilación regioselectiva de 1-octeno.

➤ Oxidaciones:

Considerando la importancia comercial de las oxidaciones catalíticas y el hecho de que los líquidos iónicos son relativamente inertes a la auto-oxidación con O<sub>2</sub>, sorprende que sea muy poca la atención que se le ha prestado a estas reacciones en líquidos iónicos.

Un ejemplo es la epoxidación estereoselectiva usando un complejo quiral de Jacobsen [Mn<sup>III</sup>] como catalizador, en una mezcla de [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4) (**Figura 3.22**). En este caso se consiguió una conversión del 86% en dos horas, gracias a la considerable activación del catalizador por el líquido iónico [141].



**Figura 3.22.** Epoxidación estereoselectiva de alquenos.

➤ Alcoxicarbonilaciones:

La realización de estas reacciones en líquidos iónicos ha atraído mucho menos interés. Un ejemplo de ellas es la alcoxicarbonilación bifásica de estireno, catalizada por paladio, en  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ -ciclohexano [142]. Más recientemente, han sido descritas la alcoxicarbonilación y amidocarbonilación de yoduros y bromuros de arilo, catalizadas por paladio, en  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$  encontrando que las reactividades aumentaban con respecto a las llevadas a cabo en medios convencionales y que, además, el conjunto líquido iónico-catalizador podían ser reciclados [143].

#### 3.4.5.3 Los líquidos iónicos como catalizadores

Los líquidos iónicos no sólo pueden actuar como medios de reacción sino también como catalizadores, es decir, acelerando la velocidad de la reacción, manteniendo su naturaleza física-química después del proceso. El comportamiento como catalizador puede ser debido a un efecto de polaridad, o una interacción o reacción específica entre el líquido iónico y un co-catalizador [144].

Los líquidos iónicos basados en cloroaluminatos ( $[\text{AlCl}_4^-]$ ,  $[\text{AlCl}_7^-]$ ) son ácidos de Lewis fuertes. Esto, asociado con el hecho de que son relativamente fáciles de manejar, hacen que estos compuestos se presenten como alternativas no volátiles a los catalizadores ácidos de Lewis convencionales, tales como  $\text{AlCl}_3$  y a los ácidos de Brønsted tan peligrosos como el HF. Las primeras reacciones que se estudiaron en los líquidos iónicos fueron las acilaciones y las alquilaciones Friedel-Crafts. Boon et al. [145] demostraron que los líquidos iónicos derivados de la reacción entre  $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$  y  $\text{AlCl}_3$  poseen un grado de acidez que depende de la relación de reactantes. Si ésta es 1:1 se genera el  $[\text{emim}^+][\text{AlCl}_4^-]$  que no tiene la capacidad de actuar como catalizador de Friedel-Crafts. Cuando la relación de reactantes es 1:2 se genera el  $[\text{emim}^+][\text{AlCl}_7^-]$ , fuertemente ácido y activo en las alquilaciones y acilaciones de Friedel-Crafts. Utilizando este último catalizador, Adams et al. [146] estudiaron la acilación de Friedel-Crafts de tolueno, clorobenceno y anisol con cloruro de acetilo.

Una síntesis Friedel-Craft de gran interés en la industria farmacéutica es la de pravadolina. Esta síntesis se ha ensayado en  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ , eliminando así la necesidad de incorporar un ácido de Lewis y la generación de residuos de aluminio, que habitualmente se forman en este tipo de mecanismos. La reacción da lugar a altos rendimientos con escasos residuos y además con la ventaja de que el líquido iónico se puede reciclar y reutilizar [147].

Varios autores han estudiado las reacciones de Diels-Alder en líquidos iónicos. El primer ejemplo publicado fue la cicloadición de ciclopentadieno con metacroleína, como dienófilo, en sales de dialquilimidazolio. Los resultados demostraban claramente que el líquido iónico actuaba como un ácido de Lewis, permitiendo llevar a cabo la

reacción a baja temperatura y conduciendo a una alta selectividad endo:exo, con la ventaja añadida de que el líquido iónico se podía recuperar y reciclar [148].

#### 3.4.5.4. Los líquidos iónicos como co-catalizadores

La dimerización de olefinas de cadena corta, catalizada por níquel, en líquidos iónicos basados en aniones cloroaluminato, es probablemente la reacción más estudiada en líquidos iónicos. A principios de 1990, el grupo de Chauvin y colaboradores, en el Instituto Francés del Petróleo, estudiaron la dimerización de propeno catalizada por níquel en  $[\text{bmim}^+][\text{AlCl}_4^-]$ . El precursor del catalizador consistía en un complejo de níquel del tipo  $\text{L}_2\text{NiCl}_2$  ( $\text{L}=\text{Ph}_3\text{P}$  o piridina) el cual, en combinación con el líquido iónico ternario ( $\text{bmimCl}-\text{AlCl}_3-\text{EtAlCl}_2 = 1:1.2:0.25$ ), daba lugar a la forma activa del catalizador, que era un complejo de Ni(II),  $[\text{LNiCH}_2\text{CH}_3^+][\text{AlCl}_4^-]$ . A  $5^\circ\text{C}$  y presión atmosférica se obtuvieron unas productividades mucho más altas que las que se obtenían con los disolventes orgánicos convencionalmente usados ( $> 250$  kg de dímeros por g de Ni) [63,137,149].

Estas dimerizaciones, como reacciones bifásicas en líquidos iónicos, ofrecen importantes beneficios: una mejor selectividad de dimerización (debido a la baja miscibilidad de los dímeros en el líquido iónico), un mejor uso de los componentes del catalizador y, además, una reducción de los costes de venta, provocada por la reducción del tamaño del reactor y la ausencia de corrosión [63].

#### 3.4.5.5. Otros usos de los líquidos iónicos

Los líquidos iónicos a baja temperatura han sido ampliamente usados con éxito como electrolitos en las baterías recargables de Litio. Las conductividades obtenidas en éstas pueden ser cinco veces más altas que las obtenidas mediante las combinaciones de sales y disolventes no acuosos [150]. Los líquidos iónicos basados en los cationes triflato y bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida también han sido utilizados como conductores inertes en células solares [151]. El uso de líquidos iónicos como electrolitos en estos sistemas, esta basado en la resistencia a la oxidación/reducción, elevada conductividad, alta estabilidad térmica. Otras de las propiedades que los hacen compatibles con su uso en células electrolíticas son su baja presión de vapor su hidrofobicidad y la compatibilidad con las resinas epoxi usadas.

Otro campo de investigación reciente en el que los líquidos iónicos han encontrado aplicación es en procesos de separación y purificación [152]. Los líquidos iónicos son capaces de extraer selectivamente un compuesto específico de una mezcla gaseosa o líquida [69,152-154]. Así, el empleo de líquidos iónicos ha permitido la eliminación de dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno de un gas natural [153] mediante extracción selectiva. Algunos ejemplos de extracciones líquidas son la eliminación de compuestos orgánicos de corrientes acuosas de residuos y la separación de compuestos aromáticos

de alquenos [69,154]. Más recientemente los líquidos iónicos han sido utilizados en membranas líquidas soportadas con propósitos de separación [155,156]. Esta última aplicación también es objeto de interés en este trabajo y por tanto se abordará en profundidad posteriormente apartado 3.6.3.

La gran estabilidad térmica que presentan los líquidos iónicos, pues soportan temperaturas superiores a los 300° C sin descomponerse, ha hecho que se empleen como lubricantes, y concretamente el [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] ha demostrado ser un lubricante muy versátil aplicado a contactos acero/acero, acero/cerámica, acero/cobre, acero/aluminio, etc., [81].

Algunos de los líquidos iónicos más comunes, tales como las sales de dialquilimidazolio, presentan dos características que les permiten ser considerados como una buena alternativa a los fluidos de intercambio de calor. Esas son el amplio rango en el que se encuentran en estado líquido y la elevada estabilidad térmica. Por ello, los líquidos iónicos poseen el potencial para competir en el mercado de los fluidos de transferencia de calor, frente a los fluidos orgánicos sintéticos y los basados en siliconas de mayor éxito. Algunas medidas preliminares sugieren que las capacidades caloríficas de los líquidos iónicos son similares a las de los hidrocarburos petrolíferos pesados y a las de los disolventes orgánicos convencionales (en el orden de 1-2 J g<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>). Sin embargo, en general, todavía es necesario alcanzar un conocimiento más profundo en materia de capacidades caloríficas, conductividades térmicas, corrosividad, toxicidad, velocidades de descomposición en función de la temperatura, y el efecto de impurezas, como el agua, en todas esas propiedades [152].

Otra de las aplicaciones de los líquidos iónicos es su empleo como fase estacionaria en cromatografía de gases [157].

En cuanto a la comercialización de los líquidos iónicos, ha habido un considerable progreso en los últimos cinco años. Así ya son numerosas las empresas que comercializan estos nuevos disolventes (Merck [97], Solvent Innovation [102], Strem Chemicals [158], Sigma-Aldrich-Fluka [159], Degussa [160], Cytec Industries [161]). Gracias a ello el precio de los líquidos iónicos está disminuyendo notablemente (economía de escala) [97]. Además, ha crecido la demanda de nuevos líquidos iónicos debido a las nuevas aplicaciones industriales que éstos han encontrado. La primera aplicación industrial la llevó a cabo la empresa BASF (Alemania), que implantó el proceso BASIL<sup>®</sup> a escala comercial. El Proceso BASIL<sup>®</sup> (Biphasic Acid Scavenging using Ionic Liquids) utiliza N-metilimidazol para eliminar el ácido que se forma en la producción de alcoxifenilfosfina, produciendo al mismo tiempo un líquido iónico [162].

Otra aplicación industrial es el almacenamiento de arsina, trifluoruro de boro y fosfina en líquidos iónicos (GASGUARD<sup>®</sup> Sub-Atmospheric Systems), desarrollado por la empresa Air Products [163]. El Instituto Francés del Petróleo (IFP) también ha patentado uno de sus procesos (DIFASOL<sup>®</sup>) con líquidos iónicos para la fabricación de

PVC por dimerización de olefinas de cadena corta [164]. También se han sintetizado líquidos iónicos basándose en los principios químicos de Hurley y Weir [165-167] para su aplicación en procesos industriales basados en la reacción de Diels-Alder (Industria Petroquímica y Farmacéutica) o la reacción de Friedel-Crafts. En estos momentos ya se está en condiciones de su incorporación a procesos a escala comercial.

#### 3.4. LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

##### 3.4.1. Definición de fluido supercrítico

Tradicionalmente se ha considerado que, en función de las condiciones de presión y temperatura, la materia podía encontrarse en tres estados (sólido, líquido y gaseoso); pero desde hace algún tiempo se han introducido a esta lista dos nuevos estados, el plasma y los fluidos supercríticos.

El *plasma* se define como un gas ionizado compuesto por electrones, protones y neutrones libres. Se puede obtener por calentamiento de un gas o sometiendo el mismo a grandes campos magnéticos. Aunque no se encuentre de forma natural en la Tierra, el 99% de la materia del universo se encuentra en estado de plasma, siendo el Sol un claro ejemplo.

Si tenemos un líquido en un recipiente cerrado y en reposo, en el interior del recipiente se establecerá un equilibrio entre las fases líquida y gaseosa que dependerá de la presión de vapor de la sustancia considerada. Si a este sistema le aplicamos energía en forma de calor, el líquido aumentará su temperatura hasta entrar en ebullición y la presión en el interior irá en aumento. Considerando el fenómeno de expansión térmica del líquido hasta llegar a su temperatura de ebullición y el proceso de evaporación (por el que partículas del líquido pasan al gas), la densidad del líquido disminuirá mientras que la del gas aumentará. Si continuamos con el proceso se llega a un punto en el que las densidades de ambas fases se hacen iguales y no es posible diferenciar la fase líquida de la gaseosa. A este punto se le denomina *punto crítico*, y viene caracterizado por una presión, temperatura y volumen molar críticos ( $P_c$ ,  $T_c$  y  $V_{mc}$ ). Sobre un diagrama de fases (**Figura 3.23**), las líneas representan los distintos equilibrios que pueden darse entre las mismas. Así se tiene la curva de sublimación (para equilibrios sólido-gas); la curva de fusión (para equilibrios sólido-líquido) y la curva de vaporización (para equilibrios líquido-gas). El punto de corte de todas se denomina *punto triple*, y representa las condiciones en las que coexisten las tres fases. El Punto Crítico se sitúa al final de la línea de equilibrio líquido-gas, y cuando se superan esas condiciones se le denomina *fluido supercrítico* (FSC).

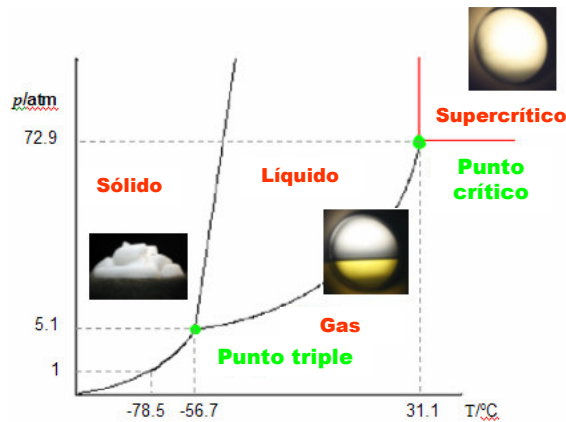


Figura 3.23. Diagrama de fases incluyendo el estado supercrítico.

Al encontrarnos en estado supercrítico se puede variar la densidad modificando las condiciones ya que en la zona supercrítica la densidad aumenta continuamente. En estado supercrítico la materia es compresible y se comporta como un gas, aunque tiene una densidad similar a la de los líquidos (0.1 a 1.0 g/cm<sup>3</sup>). Esta propiedad ha hecho que a los fluidos supercríticos también se los denomine *gases densos*. Cuando se consideran operaciones de extracción con fluidos supercríticos se habla de *gases con poder solvente dependiente de la densidad*. Es decir, que el poder como disolvente de una sustancia en estado supercrítico depende altamente de su densidad y, por tanto, de su presión y temperatura [168].

### 3.5.2 Propiedades y aplicaciones de los fluidos supercríticos

Son numerosas las sustancias comúnmente empleadas como fluidos supercríticos. En la siguiente tabla se muestran algunas de ellas y sus propiedades:



**Tabla 3.4.** Propiedades físicas de algunos fluidos supercríticos.

FLUIDO	T <sub>c</sub> (°C)	P <sub>c</sub> (bar)	δ <sub>c</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	ρ a 400bar (g/cm <sup>3</sup> )	ρ del líquido (g/cm <sup>3</sup> )
Xe	16.6	58.4	1.10	2.30	3.08 (sat., 111.7°C)
CHF <sub>3</sub>	25.9	46.9	0.52	-	1.51 (sat., -100°C)
CO <sub>2</sub>	31.3	72.9	0.47	0.96	0.93 (63.4bar, 25°C)
N <sub>2</sub> O	36.5	72.5	0.45	0.94	0.91 (sat., 0°C)
SF <sub>6</sub>	45.5	37.1	0.74	1.61	1.91 (sat., -50°C)
CCl <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	111.8	40.7	0.56	1.12	1.53 (sat., -45.6°C)
NH <sub>3</sub>	132.5	112.5	0.24	0.40	0.60 (10.5bar, 25°C)
Butano	152.0	37.5	0.23	0.50	0.58 (sat., 20°C)
Pentano	196.6	33.3	0.23	0.51	0.75 (1bar, 25°C)

En general, los valores de ciertas propiedades de los fluidos supercríticos son intermedias entre las de los líquidos y las de los gases (**Tabla 3.5**).

**Tabla 3.5.** Valores típicos de algunas propiedades de los fluidos supercríticos.

Propiedad	Gas	FSC	Líquido
Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	1	100-800	1000
Viscosidad (cP)	0.01	0.05-0.1	0.5-1.0
Difusividad (mm <sup>2</sup> /s)	1-10	0.01-0.1	0.001

Desde el punto de vista industrial, los FSCs presentan una serie de características particulares que los hacen muy interesantes para diversas aplicaciones.

➤ Sus propiedades como *disolventes* hacen que puedan sustituir al agua y a los disolventes orgánicos en numerosos procesos, permitiendo así reducir su consumo. Esto supone un gran beneficio para el medio ambiente porque los disolventes orgánicos se consumen en grandes cantidades y son sustancias volátiles y contaminantes [169]. En particular, se destaca el CO<sub>2</sub> en estado líquido o supercrítico, por sus expectativas a nivel mundial.

Además los FSCs presentan numerosas ventajas sobre los disolventes convencionales:

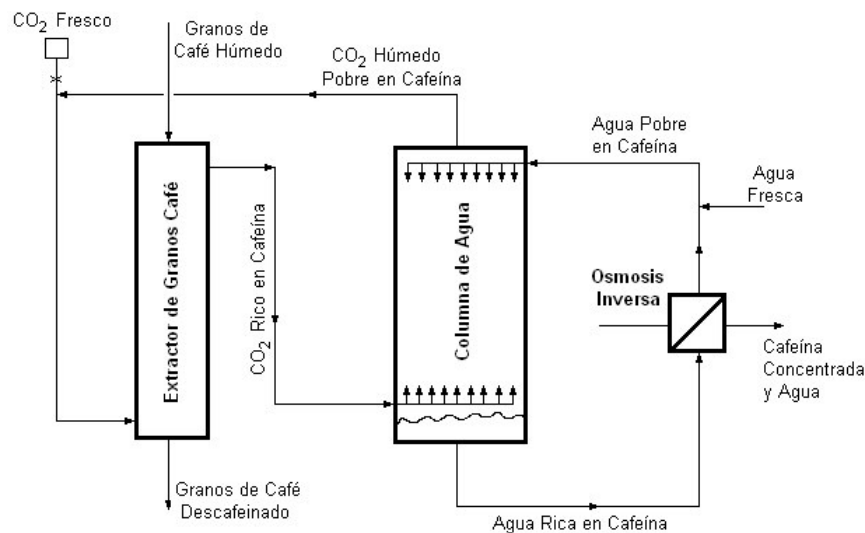
- Tienen menos resistencia a la transferencia de materia que los disolventes orgánicos convencionales.
- La solubilidad de la mayoría de los compuestos orgánicos en SCFs es mayor que en fase gaseosa y comparable con los disolventes líquidos.
- Su densidad y poder solvente puede modularse ajustando presión y temperatura dentro de la zona supercrítica, por lo que podemos variar sus propiedades modificando tan sólo sus condiciones de operación y sin tener que cambiar el medio.
- También poseen las altas difusividades propias de los gases (uno o dos órdenes de magnitud mayores que las de los líquidos) y bajas viscosidades (un orden de magnitud inferior a los disolventes líquidos), lo que contribuye a mejorar los procesos de transferencia de materia.
- Los procesos que trabajan con tecnología supercrítica consumen menos energía que aquellos basados en disolventes orgánicos, ya que no requieren trabajar a altas temperaturas ni las transiciones entre destilación y condensación.
- Una buena elección del fluido supercrítico elimina los inconvenientes desde el punto de vista medioambiental y de seguridad de los disolventes orgánicos como la volatilidad, residuos, inflamabilidad y toxicidad.

➤ Otra aplicación muy interesante de los FSCs es la de usarlos como *agentes de extracción*, ya que los productos así obtenidos son cómodamente recuperables y el disolvente puede ser fácilmente reutilizado. Gracias a estas propiedades de extracción, los FSCs se aplican en la obtención de productos como el té o el café descafeinado, tabaco sin nicotina, productos farmacéuticos, aromas, pinturas, antioxidantes, polímeros, etc.

Mediante una simple descompresión se puede provocar que el FSC pase a estado gaseoso, produciéndose una separación de fases y la precipitación de la sustancia extraída (ya sea ésta sólida o líquida). En un proceso en el que se llevaran a cabo

sucesivas etapas de descompresión en serie se podría efectuar una precipitación fraccionada de los productos extraídos en caso de que éstos fueran varios.

Cuando se trata de grandes procesos de extracción (como la extracción de la cafeína), la descompresión hasta presión atmosférica encarece la reutilización del disolvente, ya que los procesos de compresión son energéticamente costosos. Por ello, lo que se suele hacer es una extracción líquido-líquido con agua (como se muestra en la **Figura 3.24**), de forma que no sea necesario reducir tanto la presión para retirar el producto deseado. Además, el CO<sub>2</sub> supercrítico con agua que se recircula presenta mejores propiedades de extracción que el CO<sub>2</sub> seco [170].



**Figura 3.24.** Proceso esquemático para la extracción de cafeína usando CO<sub>2</sub> supercrítico.

➤ Otro tipo de aplicación de los FSCs es el *lavado de prendas textiles o de piezas de máquinas*; aunque, de momento, esto plantea ciertos inconvenientes al tener que trabajar de forma discontinua. Respecto a este campo de aplicación, los principales esfuerzos se están centrando en conseguir introducir y retirar las piezas de un recipiente a presión sin necesidad de abrirlo [171].

➤ El *tratamiento de residuos tóxicos* (donde se puede usar agua supercrítica en lugar de incinerar) y la *descontaminación de suelos* también se encuentran como otras posibles aplicaciones, aunque menos extendidas.

En cuanto al tipo de operación conveniente para todas estas aplicaciones; se puede afirmar que en los procesos basados en fluidos supercríticos, la operación en continuo resulta claramente ventajosa frente a la operación por etapas. Ésto se debe a que así se pueden usar equipos pequeños (que también son mucho más económicos) manteniendo una elevada productividad. En el caso de la cafeína se trabaja de forma semicontinua con dos columnas de forma que una está extrayendo mientras la otra se vacía y se llena de nuevo con granos de café.

La tecnología supercrítica requiere equipos con especificaciones especiales, lo que conlleva un elevado coste inicial de las instalaciones; tanto por los equipos principales de operación como por los equipos auxiliares de control, prevención y protección.

El tener una alta presión como punto de partida supone problemas a la hora de trabajar con procesos exotérmicos, ya que un aumento de temperatura podría elevar la presión peligrosamente y por tanto sería necesario un control riguroso del proceso. Además, algunas sustancias como el amoníaco son tóxicas e inflamables, y su uso a altas presiones y temperaturas eleva el riesgo de que se produzcan accidentes.

Este tipo de inconvenientes hace que la mayoría de gobiernos no autorice la creación de grandes instalaciones industriales que trabajen con tecnología supercrítica, y que la inmensa mayoría de plantas de este tipo se encuentre concentrada en dos países: China e India.

#### **3.5.3 El dióxido de carbono supercrítico**

El CO<sub>2</sub> es un gas que se encuentra en abundancia en la atmósfera terrestre, y es producto de la respiración de animales y plantas. Además, se origina en grandes cantidades en los procesos de combustión y su acumulación está dando lugar al efecto invernadero y al calentamiento global.

Desde el punto de vista de la “química verde” o química respetuosa con el medio ambiente, lo más interesante sería tomarlo de la atmósfera o de los citados procesos de combustión (i.e. en centrales térmicas), aunque en la práctica, casi todo el CO<sub>2</sub> que se destina a uso comercial se obtiene como un subproducto del proceso de fabricación de amoníaco, tras ser debidamente purificado [172].

Sus parámetros críticos, tal cómo se muestra en la **Tabla 3.6**, son de 31.3°C y 72.9 bar; que son fácilmente alcanzables. Esto, junto a su facilidad de transporte y no tener que trabajar a muy elevadas presiones o temperaturas (lo que aumentaría la peligrosidad del proceso y el precio del equipo) lo convierten en una opción relativamente barata y segura, en comparación con el resto de FSCs.

Dentro de sus propiedades, las que han hecho que se convierta en uno de los FSCs más utilizados en el mundo son: su no-toxicidad, el hecho de no dejar residuos y su temperatura crítica relativamente baja, que lo hace apto para trabajar con sustancias que no soportan temperaturas elevadas; haciéndolo todo ello aplicable en la industria alimentaria y farmacéutica [48, 173].

El scCO<sub>2</sub> ofrece muy buenas características como disolvente, tales como su baja reactividad, su alta densidad como los líquidos, gran poder de solvatación, baja viscosidad, alta difusividad y baja tensión superficial, lo cual reduce las limitaciones difusionales de los sustratos. Por todo ello, el scCO<sub>2</sub> ofrece grandes ventajas en la purificación de productos, evitando así los caros y complejos procesos de separación.

Además de las aplicaciones anteriores (las más importantes), el CO<sub>2</sub> supercrítico se emplea en hidrogenaciones, reduciendo la inflamabilidad y previniendo el ensuciamiento del catalizador (al disolver compuestos que contribuyen a la formación de coque); en la producción de policarbonatos (como alternativa a la vía del fosgeno); en la producción de partículas finas; en la obtención de ciertos polímeros; en el espumado de termoplásticos y como agente extintor.

Entre las desventajas de la utilización de scCO<sub>2</sub> se pueden citar las siguientes:

\* La baja constante dieléctrica hace que se encuentren problemas para disolver sustratos polares, aunque esto se puede evitar añadiendo un co-solvente polar como etanol, acetona, o agua, que aumentarían la polaridad del disolvente mediante formación de puentes de hidrógeno (a pesar de que la presencia de otro compuesto puede complicar las reacciones o tener efectos indeseables). Otra opción sería complejar los sustratos polares con ácido fenil-borónico y la posterior recuperación mediante extracción por contacto con fase acuosa [174].

\* El CO<sub>2</sub> es un ácido de Lewis, por lo que puede reaccionar con bases fuertes como aminas, fosfinas o aniones alquilo, lo que complica bastante su uso en reacciones donde aparecen estos compuestos.

\* El CO<sub>2</sub> denso produce bajos pHs (en torno a 2.85) si se encuentra en presencia de agua, ya que da lugar a la formación de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Esto puede suponer problemas si se trabaja con enzimas, ya que algunas de ellas se desnaturalizan en esas condiciones. Este inconveniente puede transformarse en ventaja cuando se quiere utilizar H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como reactivo, dado que no se requiere el uso posterior de una base para neutralizar, sino sólo descomprimir.

\* El CO<sub>2</sub> supercrítico cuando se encuentra en presencia de metales nobles puede reducirse produciendo CO, que es un veneno para la mayoría de catalizadores metálicos.

#### 3.5.4 El dióxido de carbono supercrítico como medio de reacción

La viabilidad del CO<sub>2</sub> supercrítico como medio en reacciones de catálisis inorgánica tales como hidrogenación, hidroformilación u oxidación, ha sido ampliamente demostrada. El uso de este medio no sólo supone la eliminación del disolvente orgánico, sino también produce un aumento de la selectividad de las reacciones [171].

Respecto al uso de CO<sub>2</sub> supercrítico en biocatálisis, ya en 1985 se demostró que muchas enzimas son activas y estables en fluidos supercríticos desde entonces hasta la actualidad son muchos los estudios que se han realizado al respecto. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico (scCO<sub>2</sub>), ya que sus propiedades lo convierten en el fluido supercrítico más adecuado [49].

Algunas de las enzimas cuya actividad ha sido probada en scCO<sub>2</sub> son: lipasa [175], polifenol oxidasa [176], fosfatasa alcalina [34] y colesterol oxidasa [177].

Hay muchas evidencias en la bibliografía, sobre la viabilidad del scCO<sub>2</sub> como medio para reacciones catalizadas por *lipasas*. Así, Goddard et al. [101] estudiaron la esterificación de ácido oleico con etanol en scCO<sub>2</sub> catalizada por Lipozyme IM60 inmovilizada en duolita. La cinética fue modelada ajustándola a una cinética de Michaelis-Menten, encontrándose una fuerte inhibición por el sustrato etanol. Posteriormente, se han estudiado otras reacciones de esterificación catalizadas por lipasas como la del ácido mirístico en etanol, obteniéndose una mayor conversión cuando el medio de reacción era scCO<sub>2</sub> frente a la utilización de acetonitrilo como tal [173]. Al igual que en el caso anterior se observó inhibición por el sustrato etanol. En los estudios realizados por Lozano et al. [23] sobre la síntesis de butirato de butilo catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en un reactor discontinuo en scCO<sub>2</sub>, se apuntaron como factores claves a controlar el contenido en agua y la densidad del scCO<sub>2</sub>, comprobando que una disminución en el valor de ambos parámetros incrementaba la actividad sintética y la selectividad. Recientemente se ha llevado a cabo la síntesis de acetato de isoamilo catalizada por Novozym 435 de *Candida antarctica* y Lipozyme RM-IM de *Rhizomucor miehei* en medio supercrítico. Los valores de velocidad inicial para esta síntesis resultaron ser mayores en scCO<sub>2</sub> que en n-hexano, alcanzando un 100% de conversión para la reacción catalizada por Novozym 435 cuando se utilizó el anhídrido acético como dador de acilo [178]. Celia et al. [179], han experimentado en este medio la acilación enantioselectiva de 1-feniletanol con acetato de vinilo como dador de acilo catalizada por lipasa de *Pseudomonas capaces*. La enzima mostró en este caso altas velocidades de reacción, siendo muy selectiva hacia uno de los isómeros.

Los efectos que produce la presencia de agua en este tipo de sistemas son los mismos que los observados en los sistemas con disolventes orgánicos, pero para apreciar el mismo efecto cuantitativo se requiere una mayor cantidad de agua en el caso del CO<sub>2</sub>.

El CO<sub>2</sub> supercrítico presenta una mayor hidrofiliidad que los disolventes orgánicos; por lo que desplaza el coeficiente de partición del agua hacia el medio en lugar de hacia el soporte, tendiendo a retirarla de la enzima [180].

Las principales ventajas que proporcionan estos medios sobre el medio acuoso se enumeran a continuación:

- i. Poseen unas propiedades para la transferencia de materia mucho mejores que el medio acuoso.
- ii. Permiten procesar compuestos inmiscibles con agua en una sola fase.
- iii. La actividad del agua y el equilibrio termodinámico de ciertas reacciones se puede modificar cambiando el contenido en agua del CO<sub>2</sub>.
- iv. Las enzimas son insolubles en el scCO<sub>2</sub>, por lo que no hay pérdidas de enzima por solubilización y no se requiere inmovilización (por ejemplo en reactores de lecho fijo).

El uso de sistemas a alta presión no tiene ningún efecto negativo sobre las enzimas causado por el contacto directo con el fluido supercrítico, aunque sí presenta un serio inconveniente a la hora de realizar las etapas de descompresión, ya que éstas han demostrado ser el factor más importante en la pérdida de actividad. Este efecto es consecuencia de modificaciones en sus propiedades superficiales y es más acusado cuando hay gran cantidad de agua de hidratación alrededor de la enzima. En enzimas estabilizadas por enlaces puente disulfuro, S-S, la modificación estructural se debe a la liberación de CO<sub>2</sub> desde el agua de hidratación que las rodea [181]. Por otro lado, el scCO<sub>2</sub> puede tener un efecto adverso sobre la enzima bien por una disminución del pH del microambiente de la enzima, por una modificación covalente de los grupos amino de la superficie de la proteína para formar carbamatos o por procesos de desactivación por ciclos de presurización/despresurización [182,183].

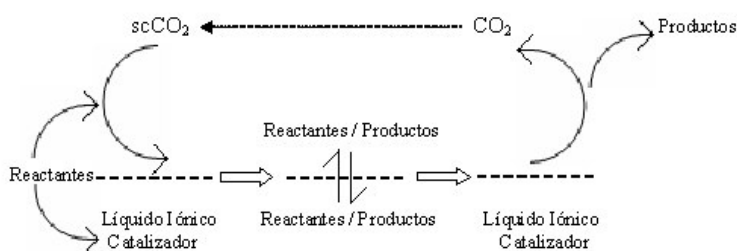
Otro aspecto importante, es el conocimiento sobre cómo afectan las variaciones en las condiciones de reacción en medio supercrítico sobre la estabilidad de las enzimas es de gran interés a la hora de seleccionar la situación óptima. Un aumento en la presión tiende a estabilizar la enzima, mientras que un aumento en la temperatura produce el efecto contrario (probablemente debido a fenómenos de desnaturalización térmica). El efecto producido por sucesivos aumentos de presión no se debe directamente al aumento de la presión, sino a la modificación de la solubilidad del agua en el medio [184]. Para poder contrastar de forma más sencilla el efecto estabilizante o desnaturalizante del medio supercrítico, se considera su densidad; observándose para los casos estudiados un aumento de la estabilidad al aumentar la densidad [47].

### 3.5. LOS SISTEMAS BIFÁSICOS LÍQUIDO IÓNICO/DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el  $\text{scCO}_2$  está recibiendo una atención creciente debido a que resulta ser un disolvente benigno, desde el punto de vista medioambiental, y versátil para gran variedad de aplicaciones [185,186]. La alta volatilidad y baja polaridad de  $\text{scCO}_2$  le hacen interesante para su combinación con un disolvente no volátil y bastante polar como son los ILs. Las diferentes miscibilidades de  $\text{scCO}_2$  y de los ILs conducen a sistemas de dos fases que encuentran aplicación en varias áreas. El éxito de estos sistemas bifásicos está basado en la alta solubilidad del  $\text{scCO}_2$  en el IL, que está controlada por la presión y la insolubilidad del IL en  $\text{scCO}_2$ , a diferencia de los disolventes orgánicos moleculares [187].

La mayor parte de la investigación en el campo de los IL ha estado orientada hacia su aplicabilidad como disolvente y medio de reacción, mientras que el desarrollo de métodos de separación de los productos disueltos en ellos permanece mucho más inexplorado. La destilación (o evaporación) es uno de los métodos más comunes pero no puede utilizarse para compuestos térmicamente lábiles o de baja volatilidad. La extracción con disolventes tiene el inconveniente del uso de compuestos orgánicos volátiles. Para IL inmiscibles con agua y compuestos solubles en ella la extracción con agua es una opción interesante. Para ILs miscibles con agua o cuando ésta sea inadecuada por el tipo de reacción deseada, la opción de implicar extracción con  $\text{scCO}_2$  puede ser la más idónea.

El principal interés por estos sistemas reside en la combinación de las buenas propiedades por parte de los ILs, como disolventes donde llevar a cabo numerosas reacciones, y las buenas cualidades del  $\text{scCO}_2$  como agente de extracción; lo que permite realizar cualquier reacción en un líquido iónico y recuperar los productos disueltos en el  $\text{CO}_2$  de una forma sencilla, rápida y limpia (**Figura 3.25**).



**Esquema 3.25.** Representación de una reacción en un sistema bifásico líquido iónico/ $\text{CO}_2$  supercrítico.



#### **3.5.1 Propiedades de los sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico: Comportamiento de fases**

La investigación en el campo de los sistemas bifásicos ILs/scCO<sub>2</sub> se enfoca en este momento principalmente hacia la aplicabilidad de los ILs como disolventes en reacciones químicas ó bioquímicas y la extracción de los productos de reacción de los mismos usando CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas como segunda fase. El éxito de este sistema bifásico se basa en la alta solubilidad del scCO<sub>2</sub> en la fase del líquido iónico, mientras que el mismo líquido iónico no muestra solubilidad detectable en la fase scCO<sub>2</sub>. El sistema permanece bifásico incluso a elevadas presiones de dióxido de carbono. Este peculiar comportamiento no tiene precedente en los sistemas comunes líquido/CO<sub>2</sub> y hace que este proceso de extracción sea extremadamente atractivo. Los resultados de numerosas investigaciones han demostrado que scCO<sub>2</sub> se puede utilizar para extraer sustancias orgánicas de ILs sin ninguna contaminación del extracto con el líquido iónico [188, 189].

Los estudios básicos de comportamiento de las fases y la obtención de datos de solubilidad y equilibrio son importantes para el diseño de nuevos procesos y aplicaciones, así como para evaluar la viabilidad de los procesos de separación. Entre los que se han realizado cabe destacar el estudio del comportamiento de las fases del sistema binario scCO<sub>2</sub>/tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]). Se ha observado experimentalmente que este sistema presenta una región de dos fases líquido-vapor que se extiende hasta muy altas presiones [190]. También se ha estudiado el sistema binario scCO<sub>2</sub>/tetrafluoroborato de 1-octil-3-metilimidazolio ([omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]), observándose que un aumento en la longitud de la cadena del grupo alquilo del catión conduce a solubilidades más altas del dióxido de carbono en el líquido iónico [191].

La solubilidad de CO<sub>2</sub> en el sistema binario se ha medido a varias presiones y temperaturas, observándose que la fracción molar de dióxido de carbono en el líquido iónico aumenta drásticamente cuando se incrementa la presión. Como era de esperar el incremento de temperatura tiene un efecto opuesto aunque éste es mucho menos pronunciado que el de la presión. El aumento de la solubilidad en el IL se refleja en una reducción de la viscosidad del líquido [188].

Se ha comprobado además que la solubilidad del CO<sub>2</sub> en los ILs está influenciada por la presencia de agua en el líquido iónico de modo que disminuye al aumentar la concentración de agua en el medio [189]. Este comportamiento no debe sorprender si se atiende a las bajas solubilidades mutuas de CO<sub>2</sub> y agua incluso a elevadas presiones. Además, la formación de ácido carbónico resultante de la reacción de CO<sub>2</sub> y agua tiene como consecuencia una disminución del pH. Por lo tanto, considerando las potenciales aplicaciones catalíticas de sistemas IL/CO<sub>2</sub>, debe tenerse la precaución de secar el IL

antes de su utilización ya que es un factor muy importante para obtener buenos resultados en catálisis.

La alta solubilidad de CO<sub>2</sub> en los líquidos iónicos parece ser una característica general de estos sistemas. En general, los ILs con aniones fluorados exhiben altas solubilidades en CO<sub>2</sub>. Dentro de éstos, los líquidos iónicos con el anión [PF<sub>6</sub>]<sup>-</sup> presentan mayores solubilidades de CO<sub>2</sub> que las medidas con líquidos iónicos basados en el anión [BF<sub>4</sub>]<sup>-</sup> (alrededor del 10% menos). La solubilidad de los líquidos iónicos en CO<sub>2</sub> también ha sido investigada mediante espectrofotometría UV-VIS, no encontrándose pico apreciable de absorción correspondiente al catión imidazolio, indicando una solubilidad inferior a 5.10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> en la fase rica en CO<sub>2</sub> [189]. Esta observación ha sido de fundamental importancia para la aplicación de estos sistemas a la catálisis bifásica con separación de productos.

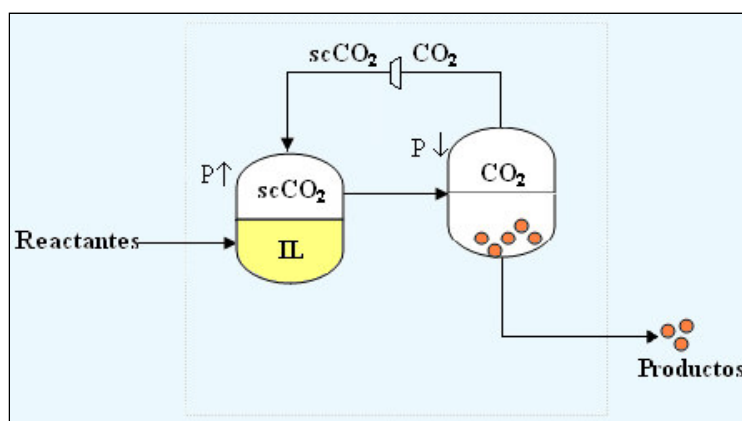
También se han llevado a cabo estudios con sistemas ternarios. Entre los primeros estudiados cabe destacar el sistema ternario CO<sub>2</sub> + [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazolio) + naftaleno, utilizando un método estático mediante detección ultravioleta de alta presión en línea [192]. Se hallaron los datos de solubilidad de naftaleno en ambas fases y su dependencia con las condiciones de operación y se observó que la concentración de naftaleno en la fase rica de CO<sub>2</sub> disminuía regularmente con la disminución de naftaleno en la fase líquida. Los datos de solubilidad fueron correlacionados por el modelo de asociación de Chrastils con un elevado grado de aproximación, ofreciendo una interesante herramienta para la predicción de solubilidades. La extracción discontinua de naftaleno desde [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] con scCO<sub>2</sub> también ha sido estudiada. La extracción del hidrocarburo aromático no sólo se realizó eficientemente con el dióxido de carbono sino que el IL se recuperó con su pureza original, después de la extracción y la despresurización. Posteriormente, el uso de estos sistemas bifásicos se ha extendido a una gran variedad de reactantes polares y no polares, alifáticos y aromáticos.

Otra propiedad física interesante de los sistemas bifásicos IL/CO<sub>2</sub> es su comportamiento volumétrico. La dilatación de un líquido resultante de la disolución de un gas es un fenómeno bien conocido. Por ejemplo, el sistema tolueno/CO<sub>2</sub> a 40°C y 70 bar produce un aumento de volumen del 134% de la fase orgánica líquida comparada con el mismo disolvente en ausencia de CO<sub>2</sub> [188]. Los líquidos iónicos, en cambio, sólo muestran un pequeño aumento de volumen cuando se presurizan con CO<sub>2</sub>.

Altas presiones de CO<sub>2</sub> también inducen una reducción de la temperatura de fusión de los líquidos iónicos. Por ejemplo, [C<sub>16</sub>mim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] tiene un punto de fusión de 75°C, a cuya temperatura se forma una fase líquida cristalina. Presurizando la sal con CO<sub>2</sub> se produce una reducción hasta un valor del punto de fusión de 50°C. Este comportamiento también abre nuevos caminos para la modulación de las propiedades de los líquidos iónicos para aplicaciones concretas en sistemas bifásicos con base no sólo a su

naturaleza química, sino también a sus propiedades en relación a los cambios de temperatura y de presión.

Teniendo en cuenta las propiedades de los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub> un sistema de reacción donde intervinieran éstos se podría diseñar tal y como se recoge en la **Figura 3.26**:



**Figura 3.26.** Sistema de reacción bifásico IL/scCO<sub>2</sub>.

Los reactantes se disuelven en la fase líquido iónico donde tiene lugar su transformación a productos mediada por un catalizador. El CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas, que forma un sistema bifásico con el líquidos iónico, será el encargado de extraer los productos de reacción de la fase líquido iónico. Posteriormente, el scCO<sub>2</sub> se despresuriza en un tanque situado a continuación, precipitando los productos de reacción disueltos en él. Estos se obtienen no contaminados por la fase líquido iónico ya que la solubilidad del IL en la fase scCO<sub>2</sub> es prácticamente despreciable. La fase CO<sub>2</sub> puede ser reutilizada como fase extractora mediante su recompresión.

#### **3.5.2 Aplicaciones de los sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico**

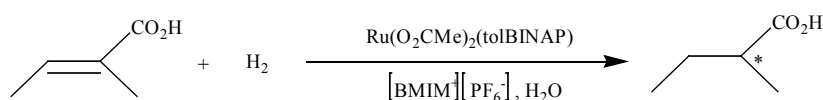
En los últimos años estos sistemas han cobrado un enorme interés desde el punto de vista de la investigación, y la cantidad de bibliografía que aparece sobre ellos va en aumento día a día. El mayor campo de aplicación de los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub> se encuentra en la catálisis organometálica y en la biocatálisis.

### 3.5.2.1. Catálisis organometálica

Tanto el  $\text{scCO}_2$  como los ILs han recibido un interés creciente por parte de los investigadores como nuevos sistemas bifásicos para la catálisis organometálica. Ambos disolventes han sido extensamente usados por separado para diversas reacciones, aunque ambos presentan limitaciones. Cuando se usan combinadamente, su diferente miscibilidad conduce a sistemas cuyo éxito para aplicaciones catalíticas se basa en la diferencia en las solubilidades mutuas.

Se han utilizado sistemas bifásicos basados en líquidos iónicos y en dióxido de carbono supercrítico para llevar a cabo reacciones químicas tales como hidrogenaciones [193,194], hidroformilaciones [191,196] y reacciones de hidrovilación [197].

En procesos de catálisis organometálica se han publicado trabajos tanto para procesos continuos como discontinuos. Entre ellos cabe destacar la catálisis quiral de rutenio basada en ligandos de tipo BINAP mediante hidrogenación selectiva de ácidos  $\alpha,\beta$ -insaturados en  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ , según la reacción de la **Figura 3.27** [193]. Para los mismos sustratos, el resultado de la reacción está fuertemente influenciado por la adición de cosolventes próticos tales como agua o isopropanol. El  $\text{CO}_2$  se usó para extraer los productos y reciclar el catalizador metálico que se mostró estable en actividad durante al menos cinco ciclos.

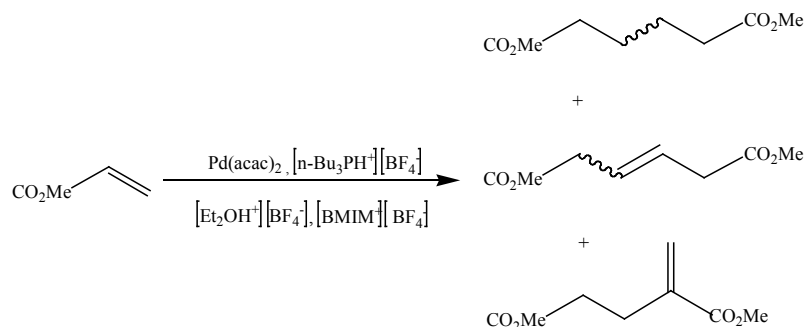


**Figura 3.27.** Hidrogenación enantioselectiva de ácido dimetil acrílico en IL en presencia de agua.

El catalizador de Wilkinson  $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$  se ha utilizado en el sistema bifásico  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]/\text{scCO}_2$  para la hidrogenación de 1-deceno y ciclohexeno [194]. La mezcla de reacción consistió en una fase de  $\text{CO}_2$  incolora por encima del líquido iónico amarillo. Se consiguió la recuperación del producto y el catalizador de rodio fue reciclado hasta cuatro veces sin pérdida de actividad. Además, la hidrogenación de  $\text{CO}_2$  en presencia de dialquilaminas para dar  $N,N$ -dialquilformamidas se llevó a cabo en IL/ $\text{CO}_2$  usando complejos de rutenio [194]. La selectividad de la reacción aumentó en relación con el uso de  $\text{scCO}_2$  como único medio de reacción.

El líquido iónico  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$  se usó en combinación con  $\text{CO}_2$  para la dimerización, catalizada por paladio, de acrilato de metilo siguiendo la **Figura 3.28** [198]. Se estudió la distribución de productos entre las fases y la capacidad de extracción del  $\text{CO}_2$ . La alta

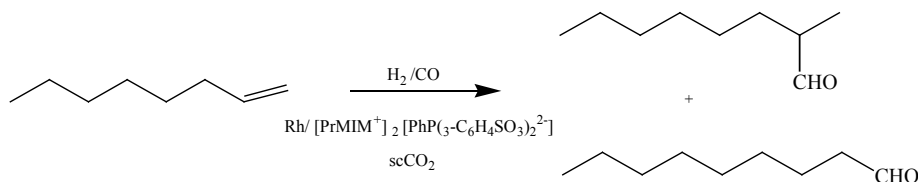
solubilidad de los dímeros en  $scCO_2$  para presiones superiores a 150 bar abrió la posibilidad de investigar la reacción bajo condiciones de flujo continuo.



**Figura 3.28.** Dimerización de acrilato de metilo catalizada por paladio.

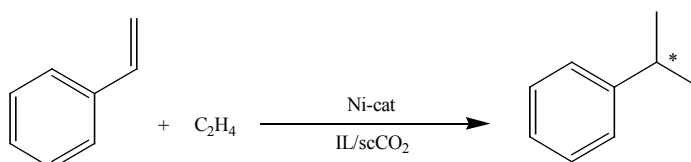
También se han obtenido resultados en estas condiciones de flujo continuo en reacciones catalizadas por metales: la hidroformilación de alquenos de cadena larga [191,196] y la hidrovilación de estireno con el complejo de Wilke [197].

En el caso de la hidroformilación, se ha llevado a cabo la reacción usando  $[bmim^+][PF_6^-]$  y trifenoxifosfina como ligando de rodio (**Figura 3.29**). Estos ligandos resultaron ser incompatibles con el líquido iónico debido a que las pequeñas cantidades de HF producidas en la reacción del anión con el agua provocan la desactivación del catalizador [191]. El uso de trifenilfosfinas, para las cuales ambos, ligandos y complejos de rodio, no son solubles en  $scCO_2$ , mostraron baja actividad debido a la baja solubilidad en el IL. Finalmente, el uso de sales de imidazolio de trifenilfosfina monosulfonada, por ejemplo  $[bmim^+][Ph_2P(m-C_6H_4SO_3)]$ , que combina la elevada estabilidad química con la alta solubilidad en líquidos iónicos tales como el  $[bmim^+][PF_6^-]$  han abierto nuevos caminos para una catálisis eficiente para la hidroformilación en sistemas IL/ $scCO_2$ .

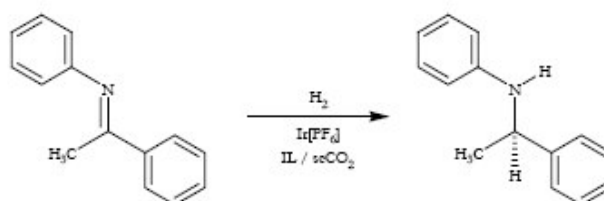


**Figura 3.29.** Hidroformilación de 1-octeno en sistema IL/ $scCO_2$  en flujo continuo.

En estos sistemas bifásicos también se ha comprobado que se puede activar o modular la actividad de los catalizadores organometálicos [199]. Este hecho se ha puesto de manifiesto en el estudio de dos reacciones: hidrovinilación de estireno (**Figura 3.30**) e hidrogenación de imina, en particular de N-(feniletilden)anilina (**Figura 3.31**)



**Figura 3.30.** Hidrovinilación enantioselectiva de estireno en IL/scCO<sub>2</sub>



**Figura 3.31.** Hidrogenación enantioselectiva de imina con un catalizador Ir[PF<sub>6</sub>] en IL/CO<sub>2</sub>.

En el sistema bifásico IL/CO<sub>2</sub>, la solubilidad del hidrógeno se ha encontrado que se incrementa sustancialmente, permitiendo una eficiente reacción de hidrogenación. Para estas reacciones también se ha comprobado que la actividad y la selectividad del catalizador depende en gran medida del anión del IL, comprobándose que el IL actúa como un co-catalizador y no sólo como un mero disolvente. El sistema también se ha ensayado para flujo continuo en la reacción de hidrovinilación de estireno y se ha comprobado que el catalizador permanece activo al menos 60 horas.

Estos ejemplos ponen de manifiesto que se abren nuevas perspectivas mediante este nuevo sistema para inmovilizar catalizadores homogéneos a través del líquido iónico y mejorar el diseño de disolventes iónicos y de catalizadores. Al mismo tiempo, los conocimientos de ingeniería de la reacción, el uso de dispositivos electrónicos para mejor control de los procesos, el uso de métodos analíticos en línea, etc., son de gran importancia para optimizar y extender los campos de aplicación de esta nueva tecnología.

#### 3.5.2.2. Biocatálisis

Estudios recientes también han demostrado la posibilidad de llevar a cabo procesos biocatalíticos en sistemas bifásicos basados en líquidos iónicos y fluidos supercríticos [200]. Como en otras reacciones catalíticas, el éxito de este tipo de sistemas bifásicos está basado en la alta solubilidad del  $\text{scCO}_2$  en la fase líquido iónico, mientras que éste no presenta solubilidad detectable en la fase  $\text{scCO}_2$  y en el hecho demostrado de que el  $\text{scCO}_2$  puede extraer sustancias orgánicas del líquido iónico, sin contaminación del extracto por este último [188,189], mientras que la enzima, libre o inmovilizada, se puede separar del líquido iónico mediante un proceso de filtración. Por lo tanto, la extracción con  $\text{CO}_2$  supercrítico es una técnica también muy prometedora para reacciones enzimáticas en las que la destilación no es muy conveniente para sustancias con alto punto de ebullición ó que se descomponen con facilidad a altas temperaturas o la extracción líquido-líquido, que implicaría llevar a cabo sucesivas etapas de extracción [201], y el uso de disolventes orgánicos con las consiguientes desventajas medioambientales.

Como se ha comentado anteriormente, el principal interés por estos sistemas reside en la combinación de las buenas propiedades por parte de los ILs, como disolventes donde llevar a cabo numerosas reacciones enzimáticas en condiciones de operación severas, con la estabilización de la enzima y las buenas cualidades del  $\text{scCO}_2$  como agente de extracción; lo que permite realizar cualquier reacción en un líquido iónico y recuperar los productos disueltos en el  $\text{CO}_2$  de una forma sencilla, rápida y limpia.

El desarrollo de procesos biosintéticos en estos sistemas ha demostrado la posibilidad de operación en modo continuo mediante la combinación de enzimas, líquidos iónicos y  $\text{CO}_2$  supercrítico utilizando un lecho fijo de lipasa inmovilizada y utilizando líquidos iónicos basados en cationes imidazolio combinados con el anión bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida [25], poniendo de manifiesto su aplicabilidad a procesos a escala industrial.

Estos sistemas también pueden operar de forma semicontinua, consistente en llevar a cabo la reacción en el seno del líquido iónico, mientras se hace pasar constantemente  $\text{CO}_2$  a través del sistema para extraer con él los productos y recogerlos en una trampa fría [200].

Se ha demostrado que en este tipo de sistemas se pueden llevar a cabo reacciones enzimáticas en condiciones extremas ( $150^\circ\text{C}$  y 100 bar) con buenas velocidades de reacción y altas selectividades. Esto parece deberse a que el líquido iónico es capaz de proporcionar el microambiente necesario para la acción catalítica de la enzima y al mismo tiempo actuar como soporte de inmovilización, contribuyendo a mantener la conformación activa de la misma ante esas condiciones tan desnaturalizantes [23].

Recientemente se ha estudiado el uso de líquidos iónicos basados en cationes de amonio cuaternario y aniones bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida en reacciones de transesterificación catalizada por CaLB. Los sistemas bifásicos generados para cada uno de los líquidos iónicos resultaron adecuados para las reacciones de esterificación estudiadas. Así, la resolución racémica del rac-feniletanol en (5-cianopentil)-trimetilamonio se consiguió con una selectividad del 94.9%. Además todos los líquidos iónicos se comportaron como agentes estabilizantes con respecto al n-hexano [202].

### 3.6. TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS

Los procesos biocatalíticos se utilizan comúnmente en la producción farmacéutica y alimentaria. Generalmente estos procesos enzimáticos, se desarrollan en reactores discontinuos en donde las enzimas se usan en su forma soluble. Sin embargo esta clase de reactores suponen altos costes en mano de obra debido a las operaciones de arranque y parada de los mismos, baja productividad y pérdida de actividad. Además son necesarias etapas de separación para la recuperación de los productos de reacción [203]. En este sentido, los reactores de membrana constituyen un intento de integrar procesos de reacción, separación y/o concentración y recuperación del catalizador en una sola operación [204].

#### 3.6.1. Definición de membrana

El nombre de membrana designa a un sistema cuyo espesor es muy pequeño comparado con su superficie, que separa dos fases macroscópicas, sobre las que ejerce un control selectivo de las transferencias de materia y energía entre ellas. El estudio de los fenómenos que tienen lugar a través de las membranas se basa en el análisis de los flujos de las especies que están separadas por aquellas (flujos salinos, iónicos, de volumen, etc.), y las fuerzas termodinámicas que los producen (gradientes de presión, potencial eléctrico, concentración, etc.).

Una de las principales finalidades del estudio de los fenómenos de transporte a través de membranas es el diseño, desarrollo y optimización de aplicaciones muy variadas en procesos industriales, de separación o purificación, etc.

El campo de investigación en tecnología de membranas es relativamente reciente, datando su desarrollo de los años cincuenta, aunque aparecen estudios precursores de procesos con membranas desde el siglo XVIII, como los llevados a cabo por Nollet (1748), Graham (1866) y Van't Hoff. (1887). Ya en el siglo pasado, destacan investigadores como Donnan (1911), que estableció su conocida ley de distribución, y otros como Teorell, Meyers y Sievers, que años más tarde expusieron su teoría para el estudio del potencial de membrana, conocida como TMS, en honor a sus iniciales [205].



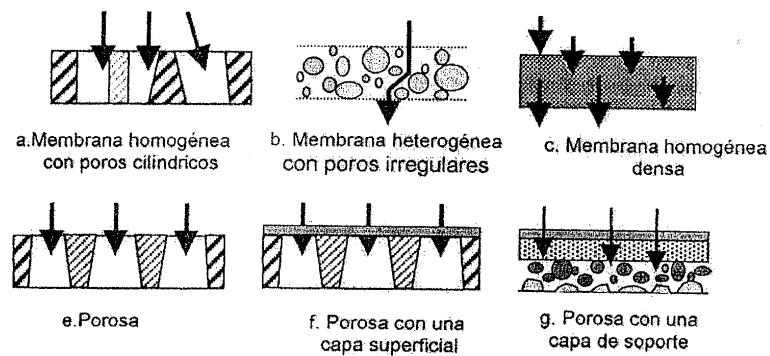
Como consecuencia de la rápida consolidación de los estudios de membranas, todos los países industrializados han prestado un creciente interés en el desarrollo de proyectos de investigación, a través de instituciones gubernamentales, universitarias y privadas, e incluso organizaciones internacionales, sobre el campo de aplicación de los procesos que implican el uso de membranas. Como ejemplo de esto cabe destacar que la UNESCO decidió crear en 1992 el Centro de Ciencia y Tecnología de Membranas, a fin de promover su aplicación para mejorar la calidad de vida, fundamentalmente de los países en vías de desarrollo.

### 3.6.1.1 Clasificación de las membranas

Por lo general, los parámetros a tener en cuenta en la elección de una determinada membrana para un proceso industrial son numerosos y van desde su resistencia y espesor, hasta su porosidad, sin olvidar el precio, parámetro decisivo en toda elección industrial.

En la elección de la membrana intervienen tanto el flujo que la atraviesa como la selectividad. La gama de variables en cuanto a tamaño o densidad de poros puede ser muy amplia según la aplicación. La selectividad en la separación de sustancias puede depender del tamaño de poro (membrana porosa), de las diferencias de solubilidad (membrana densa) o de las interacciones químicas o electrostáticas entre solutos y membrana (membrana de intercambio iónico).

En la siguiente ilustración (**Figura 3.32**) se recogen algunos de los tipos de membranas:



**Figura 3.32.** Tipos de membranas. (a), (b) y (c) son estructuras simétricas; (e), (f) y (g) son estructuras asimétricas.

Las membranas también presentan una gran variedad en lo referente a su origen, natural o artificial.

Las membranas sintéticas se pueden clasificar en distintos tipos, tal y como muestra la **Tabla 3.6.**

Tabla 3.6. Clasificación de las membranas sintéticas.

ATENDIENDO A	TIPO	
Espesor	Gruesas (>1 $\mu\text{m}$ ) Delgadas (<1 $\mu\text{m}$ )	
Estructura	Porosas Densas	Simétricas Asimétricas
Composición	Homogéneas Heterogéneas	
Carga	Intercambiadoras de aniones (+) Intercambiadoras de cationes (-)	

- Atendiendo al *espesor* de las membranas, se pueden clasificar en **gruesas**, que tienen un espesor macroscópico, mientras que las **delgadas** pueden tener espesores comparables a las dimensiones moleculares. Como ejemplo de estas últimas membranas, están las bicapas lipídicas obtenidas artificialmente, y que sirven de modelo para el estudio de las membranas biológicas.
- En cuanto a su *estructura*, pueden ser **densas** y **porosas**. Las membranas **porosas** consisten en una matriz sólida con orificios definidos o poros; éstas representan la forma más simple de membrana, en lo que se refiere a propiedades de transporte y modo de separación, que se efectúa estrictamente por tamización por los poros en relación al tamaño de las partículas. Este tipo de membranas se fabrica en diferentes materiales, como óxidos metálicos, grafito o polímeros, siendo las más sencillas de vidrio sinterizado preparado a partir de óxidos de silicio o de aluminio, pudiendo también conseguirse con polímeros pulverizados.
- Atendiendo al *tamaño de sus poros*, las membranas se clasifican como de **poro ancho** (diámetro de poro entre 10 nm y 50  $\mu\text{m}$ ), y de **poro fino** (diámetro entre 1 y 10 nm). Algunas de estas membranas poseen poros cilíndricos casi perfectos y paralelos entre sí, y se obtienen a partir de una capa polimérica, de espesor entre 10 y 20  $\mu\text{m}$ , que se somete a la acción de un haz excitado de partículas, que dejan

a su paso una traza sensibilizada, la cual se convierte posteriormente en poro en un baño ácido.

En las membranas **densas**, el permeante debe pasar a través de la materia, que constituye la membrana propiamente dicha, por lo que se produce una separación a nivel molecular entre las especies disueltas. Se les llama también **membranas semipermeables o permeoselectivas**, y se emplean para separar mezclas de gases o de líquidos, y también en los procesos de desalinización por ósmosis inversa.

- También desde el punto de vista *estructural*, las membranas pueden catalogarse como **simétricas** o **asimétricas**. Las primeras exhiben las mismas características físico-químicas en cualquier parte de ellas. Las asimétricas se emplean fundamentalmente en procesos que involucran gradientes de presión elevados, y su estructura consiste en una capa polimérica muy delgada, situada sobre una capa gruesa altamente porosa, que actúa exclusivamente como soporte, sin afectar para nada a las características separadoras del sistema. Estas membranas presentan una ventaja muy importante respecto de las simétricas, consistente en que la retención de las partículas tiene lugar sobre la superficie, sin que penetren en su estructura interna, de modo que pueden ser retiradas de allí, mediante desplazamiento de disolución tangencialmente a la membrana.
- Atendiendo a su *composición*, existen membranas **homogéneas** y **heterogéneas**. Una membrana se dice homogénea cuando toda ella participa en el proceso de permeación de una sustancia; mientras que se califica como heterogénea, cuando el componente activo que propicia el proceso de transporte está anclado sobre un soporte adecuado para **membranas sólidas**, o disuelto en una fase líquida, que puede presentarse como tal, o estar embebida en una matriz polimérica. Estos dos últimos casos corresponden a las llamadas **membranas líquidas** (de capa o emulsionadas en el primer caso, y soportadas en el segundo). A veces las capas líquidas desprovistas de portadores específicos pueden actuar como películas homogéneas que permean exclusivamente por efectos de solubilidad, pudiéndose emplear para separar especies químicas de tamaño similar, siempre y cuando su solubilidad en la película difiera significativamente. Este tipo de membranas es el que se utiliza en el presente trabajo y por ello será revisado en profundidad en el apartado 3.6.2.
- Clasificándolas en función de su *carga*, se puede distinguir entre membranas **intercambiadoras** o **selectivas**. Así, aquellas que poseen carga positiva actúan como **intercambiadoras de aniones**, pues contienen grupos catiónicos fijos en su matriz, que ligan a los aniones de los fluidos en contacto con ella; por el contrario, si los grupos cargados fijos en la membrana son de tipo aniónico, la membrana actúa como **intercambiadora de cationes**. Así pues, los procesos de separación

con este tipo de membranas, se basan en la exclusión de los iones cuya carga es del mismo signo que la carga de la membrana.

Las membranas **selectivas** están constituidas por una matriz polimérica, a la que se han unido de forma covalente grupos ionizables, los cuales deben estar suficientemente disociados para crear una carga eléctrica neta sobre la matriz. Poseen espesores típicos entre 100 y 500  $\mu\text{m}$ .

Las principales membranas utilizadas en procesos de filtración son de carácter asimétrico, y constan de un soporte macroporoso de buena resistencia mecánica, una capa intermedia mesoporosa de unión y una capa activa de pequeño espesor que asegura unas buenas condiciones de flujo y selectividad.

Es interesante destacar los principales materiales empleados en la constitución de las membranas sólidas, entre los que cabe citar:

- Materiales orgánicos: sulfonas, poliamidas, y materiales celulósicos fundamentalmente. Ofrecen una resistencia aceptable al pH, pero no son adecuados para temperaturas superiores a los 100 °C, y además son sensibles a determinados tensoactivos, disolventes orgánicos y oxidantes.
- Materiales inorgánicos: suelen tratarse de un soporte poroso inorgánico, como carbono o alúmina, recubierto de una capa de superficie selectiva, como  $\text{ZrO}_2$  o  $\text{TiO}_2$ . La resistencia de estas membranas ante condiciones de pH y temperatura, disolventes orgánicos, etc, es sensiblemente mayor que la de las anteriores, aunque también lo es su coste.

#### 3.6.1.2 Procesos de membrana

Los procesos industriales generan una gran variedad de productos, los cuales precisan de separación, concentración y purificación. Las técnicas de separación convencionales como son extracción, destilación, cristalización, etc., requieren elevadas cantidades de energía por lo que ha habido un creciente interés en el desarrollo de procesos con menores requerimientos energéticos, tales como los basados en membranas.

La tecnología de separación con membranas tiene como principio que los componentes de las mezclas líquidas o gaseosas, de acuerdo con sus características moleculares, pueden pasar selectivamente a través de una membrana determinada, bajo ciertas condiciones operacionales, de modo que los procesos basados en esta tecnología, permiten la separación (o la concentración) a nivel molecular y de pequeñas partículas.

Inicialmente tan sólo se consideraban como membranas las de tipo poroso, a cuyo través la separación de componentes se efectúa exclusivamente en función de su tamaño físico. Posteriormente, y en muchas aplicaciones, se han ido imponiendo las membranas no porosas, donde el efecto de separación está basado en las propiedades físicas y químicas de las disoluciones, influyendo en muy poca medida el tamaño de los componentes.

En los procesos de separación con membranas, se pueden emplear dos métodos de filtración desde el punto de vista del modo de operación:

- *Filtración convencional o frontal*, donde ésta se efectúa perpendicularmente al medio filtrante (*dead-end membrane filtration*), de manera que toda la disolución a tratar atraviesa la membrana, generando una única corriente de salida (**Figura 3.33a**). La principal desventaja de este modo de operación estriba en que a lo largo del tiempo se forma depósito en la superficie del medio poroso que hace que se deba suministrar más presión para obtener un caudal de filtrado igual al inicial. Éste es el gran inconveniente para su aplicación industrial [206].
- *Filtración tangencial*, en la cual una corriente de alimentación presurizada fluye tangencialmente a la superficie de la membrana (*cross-flow membrane filtration*); una parte de esta corriente atraviesa la membrana y es el permeado o producto, mientras que la otra genera una corriente de concentrado y es el rechazo, que contiene las partículas no filtradas (**Figura 3.33b**). En este segundo caso, y debido al flujo continuo paralelo a la membrana, la acumulación de soluto rechazado sobre ésta se minimiza, evitando considerablemente su pérdida de eficacia por colmatación. Este tipo de filtración es mucho más utilizada a nivel industrial, ya que tras un cierto grado de colmatación, el caudal se estabiliza rápidamente alcanzándose el estado estacionario. Las interesantes características de estos procesos de filtración donde existe una eficaz interacción entre los solutos y las membranas han hecho que estos sistemas se hayan utilizado como reactores químicos [203].

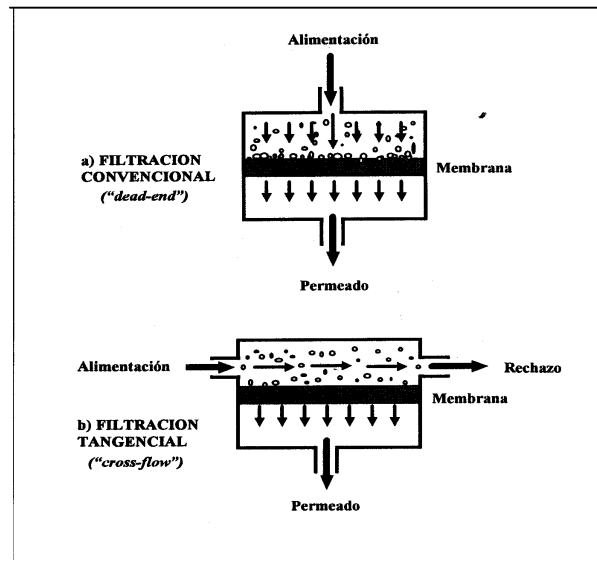


Figura 3.33. Esquema de la filtración convencional o frontal y tangencial.

En general, la corriente de alimentación se somete al efecto de una fuerza generalizada, bajo cuya influencia las membranas permiten el paso de algunos componentes e impiden el de otros.

Algunos de los procesos que ya han alcanzado nivel de aplicación industrial son los siguientes: microfiltración, ultrafiltración, ósmosis inversa, diálisis, electrodiálisis, permeación de gases y pervaporación. En la **Tabla 3.7** se caracterizan éstos y otros procesos atendiendo a la fuerza impulsora que provoca la separación, a la naturaleza de la membrana y a las aplicaciones para las que se utilizan:

### 3. Antecedentes

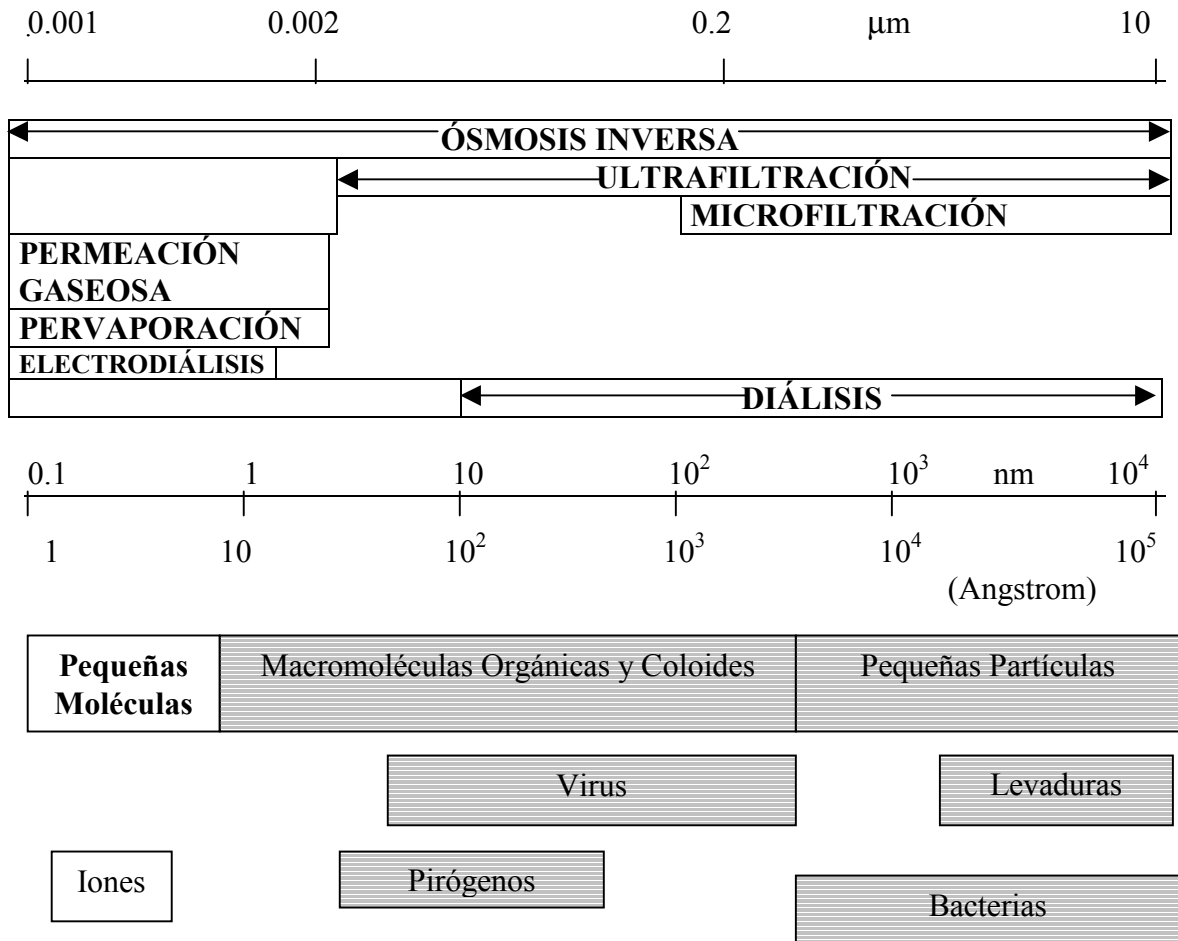
**Tabla 3.7.** Principales procesos de separación con membranas y materiales [207].

Proceso	Tipo membrana	Fuerza impulsora	Aplicaciones
<b>Microfiltración</b>	Simétrica y asimétrica microporosa	Presión hidrostática	Clarificación, esterilización de aguas
<b>Ultrafiltración</b>	Asimétrica microporosa	Presión hidrostática	Separación de soluciones macromoleculares
<b>Nanofiltración</b>	Asimétrica	Presión hidrostática	Separación de pequeños compuestos orgánicos y sales desde disoluciones
<b>Ósmosis inversa</b>	Asimétrica, compuesta con piel homogénea	Presión hidrostática	Separación de micro-solutos y sales desde disoluciones
<b>Permeación gas</b>	Asimétrica o compuesta, polimérica homogénea o porosa	Presión hidrostática, gradiente de concentración	Separación de mezclas gaseosas
<b>Diálisis</b>	Simétrica microporosa	Gradiente de concentración	Separación de micro-solutos y sales desde soluciones macromoleculares
<b>Pervaporación</b>	Asimétrica, compuesta no porosa	Gradiente de concentración, presión de vapor	Separación de mezclas de líquidos volátiles
<b>Permeación vapor</b>	Compuesta no porosa	Gradiente de concentración	Separación de vapores volátiles de gases y vapores
<b>Destilación con membrana</b>	Microporosa	Temperatura	Separación de agua de solutos no volátiles
<b>Electrodiálisis</b>	Intercambiadora de iones, polimérica microporosa u homogénea	Potencial eléctrico	Separación de iones de agua y solutos no iónicos
<b>Electrofiltración</b>	Membrana cargada microporosa	Potencial eléctrico	Lavado y filtración de soluciones de sólidos suspendidos
<b>Membranas líquidas</b>	Microporosa, disolvente	Concentración	Separación de solutos de disoluciones

Los procesos de separación llevados a cabo mediante tecnología de membranas poseen en muchos casos un menor consumo energético, y pueden llevarse a cabo con temperaturas moderadas, lo que implica una menor degradación de los productos y una mejor separación. Con frecuencia son procesos más económicos, eficientes y rápidos que los procesos convencionales.

### 3. Antecedentes

En la **Figura 3.32** se indica el orden de los tamaños de las partículas a separar en los distintos procesos de separación con membranas:



**Figura 3.32.** Tamaños de impurezas y rangos de aplicación de las tecnologías de membranas [205].

#### 3.6.2. Membranas líquidas

Una “membrana líquida” no es más que una película líquida que separa dos fases macroscópicas, sobre las que ejerce un control selectivo de la transferencia de materia y energía entre ellas.

Los procesos de separación usando membranas líquidas pueden asemejarse a las técnicas de extracción y recuperación con disolventes convencionales, con la particularidad de que en este caso una delgada película líquida es usada para transportar el soluto desde la fase de alimentación a la fase de los productos. La fuerza conductora



generalmente es un gradiente de potencial químico, que puede ser expresado también en términos de concentración. La separación, por su parte, ocurre debido a diferencias no sólo de difusividad, sino también de solubilidad en la película líquida.

El uso de películas o membranas líquidas ofrece la posibilidad de obtener porcentajes de separación mucho más altos que con las membranas poliméricas, debido a que presentan coeficientes de difusión más altos que estas últimas. El valor del coeficiente de difusión en líquidos es al menos tres o cuatro órdenes de magnitud mayor que el que presentan las membranas inorgánicas o poliméricas [208,209].

Además de ello, uno de los beneficios de utilizar una membrana líquida es el hecho de que pueden llegar a ser altamente selectivas con el uso de portadores que tengan alta afinidad por uno de los solutos de la fase inicial de alimentación.

Hay tres tipos genéricos de membranas líquidas: membranas de volumen líquido, membranas líquidas emulsionadas y membranas líquidas soportadas.

#### 3.6.2.1. Membranas de volumen líquido

Consiste en una célula de tubo en U en la que se vierte en la parte baja del tubo algún tipo de portador disuelto en una fase orgánica. Esa es la fase de membrana orgánica. En los brazos del tubo en U se depositan dos fases acuosas, flotando sobre la membrana orgánica y se agita ligeramente la fase orgánica. Este tipo de sistema ha sido utilizado para el transporte de especies aniónicas y neutras.

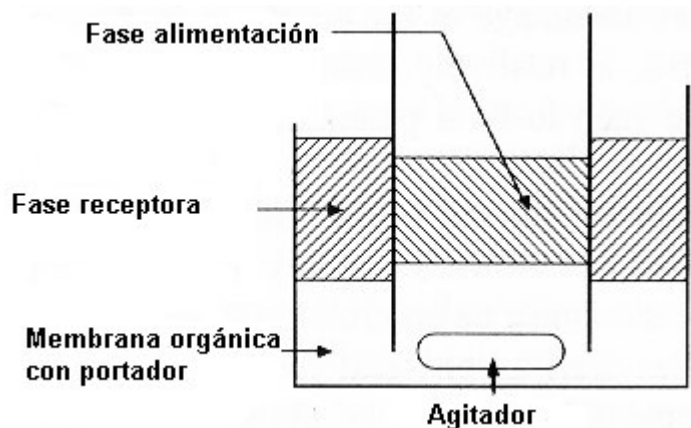


Figura 3.34. Membrana de volumen líquido.

### 3.6.2.2. Membranas líquidas emulsionadas

Otro tipo de membrana líquida es la llamada **membrana líquida emulsionada** (ELM, *emulsion liquid membrane*) y consiste en dispersar un líquido, de manera que se generan minúsculas gotas discontinuas de una emulsión. Así los solutos son transportados hacia el interior de dichas gotículas.

Este sistema consta de una membrana de espesor muy delgado y gran área superficial por unidad de volumen de la fase de alimentación, lo cual permite una elevada velocidad de transporte a través de la misma [210]. El problema es la necesidad de formar la emulsión antes de llevar a cabo el proceso de transporte. Estas membranas emulsionadas deben ser, por un lado, lo suficientemente estables para reducir las pérdidas al mínimo, y por otro, no serlo en exceso, de modo que se pueda romper la emulsión después del proceso de separación, permitiendo así la recuperación de las especies transportadas y la reutilización de la fase receptora. Por lo tanto, el proceso consta de varias unidades de operación y, tecnológicamente, no llega a ser muy atractivo.

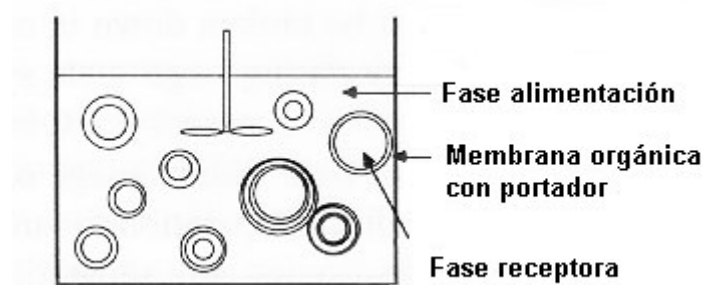


Figura 3.35. Membrana líquida emulsionada.

### 3.6.2.3. Membranas líquidas inmovilizadas o soportadas

Recibe el nombre de **membrana líquida inmovilizada** (ILM, *immobilized liquid membrane*) o **membrana líquida soportada** (SLM, *supported liquid membrane*).

El principio de operación de las SLMs es relativamente sencillo. Consta de dos fases homogéneas, una de ellas es la fase fuente (o de alimentación) y la otra es la fase receptora, ambas separadas por una tercera fase, que es la membrana. Ésta consiste en un disolvente, que puede contener o no un portador, inmovilizado en un soporte sólido poroso (polimérico o cerámico). Los poros de la delgada membrana sólida se encuentran completamente rellenos de la fase de membrana líquida, de modo que esta

impregnación produce una membrana heterogénea sólido/ líquido relativamente estable. La fase membrana líquida tiene como propiedad indispensable ser inmisible y prácticamente insoluble en las otras dos fases (alimentación y receptora). Las características diferenciales de las membranas líquidas soportadas que las hacen atractivas en los procesos de separación son:

- Mayor rapidez de difusión molecular a su través que la existente a través de membranas sólidas estándares. Con una pequeña cantidad de líquido se pueden producir grandes áreas interfaciales. Así por ejemplo, un volumen de  $10 \text{ cm}^3$  con un espesor de  $20 \text{ }\mu\text{m}$  y una porosidad del 50% produce un área interfacial de  $1 \text{ m}^2$ .
- Pueden diseñarse con una alta selectividad del disolvente embebido hacia un componente en particular.
- No se necesitan procesos multietapa, pues las fuerzas impulsoras son máximas.
- El disolvente ocluido puede seleccionarse en un amplio rango de disolventes “verdes”.

Como contrapartida, cabe destacar la complejidad de fijación del líquido en los poros, así como la dificultad añadida de mantener su estabilidad.

#### ➤ Configuraciones

Se han descrito varias configuraciones para este tipo de membranas:

##### 1) *Membranas líquidas soportadas en lámina fina.*

Son las más simples en diseño. Esencialmente consisten en una membrana polimérica porosa, cuyos poros están rellenos con el líquido orgánico (con o sin portador), dispuesta entre la fase de alimentación y la fase receptora, las cuales se encuentran agitadas.

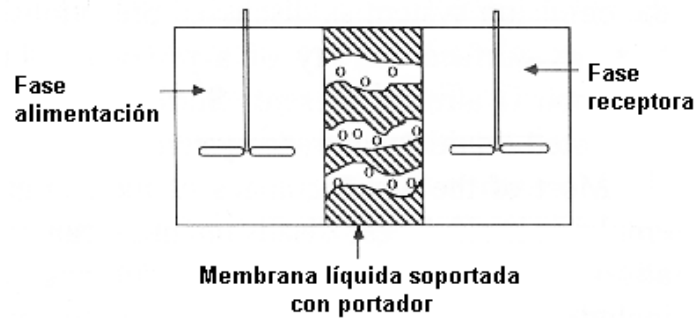


Figura 3.36. Membrana líquida soportada en lámina fina.

2) *Membranas líquidas soportadas en un módulo de fibras huecas.*

El diseño de este tipo de membranas es semejante al de un largo cable eléctrico. Constan de una carcasa externa, hecha de un material no poroso, a través de la cual no hay transporte. En el interior hay multitud de fibras delgadas recorriendo la longitud de la carcasa. La fase de alimentación es transportada por el interior de las fibras cuyos poros han sido rellenados inicialmente con la fase que contiene el portador. La fase receptora se hace circular por el exterior de las fibras huecas produciéndose el transporte de ciertos compuestos desde la fase de alimentación a la fase receptora a través de los poros de dichas fibras huecas. La fase receptora es forzada a salir por los laterales de la carcasa mientras que la alimentación sale por el otro extremo de la carcasa.

Entre los beneficios de usar este sistema cabe mencionar que el área superficial y el grosor de la membrana proporcionan un transporte rápido, así como la mayor facilidad a la hora de recuperar ambas fases, en comparación con el sistema en emulsión. Por otra parte, también presenta algunos problemas, tales como la necesidad de limpiar las fibras entre usos, y su elevado coste.

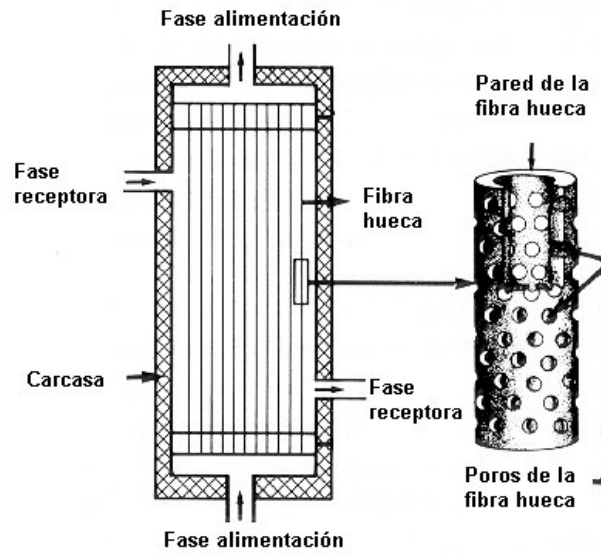


Figura 3.37. Membrana líquida soportada en un módulo de fibras huecas.

3) *Membranas líquidas soportadas en dos módulos de fibras huecas.*

En un esfuerzo para eliminar los problemas debidos a una baja estabilidad de la fase orgánica en los poros de las fibras, se diseñó este otro tipo de sistemas, en los que la fase de alimentación es transportada a través de un canal de fibras huecas y la fase receptora por otro, con una fase de membrana agitada en contacto con ambas, permaneciendo constante el disolvente orgánico contenido en los intersticios de ambos juegos de fibras huecas microporosas.

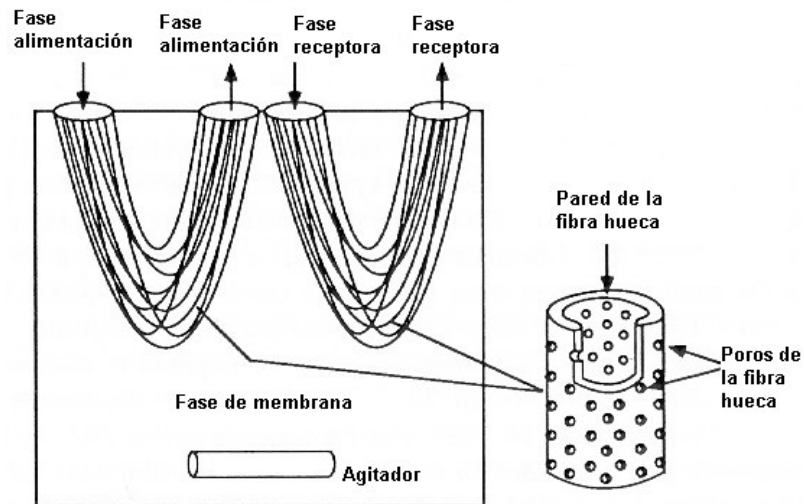


Figura 3.38. Membrana líquida soportada en dos módulos de fibras huecas.

4) Otros

Hay otros muchos tipos de membranas, pero el más empleado es el de membrana de módulo en espiral. Básicamente se trata de una membrana plana tipo *sandwich* enrollada en un tubo perforado, a través del cual la corriente de efluente sale de la membrana. Este *sandwich* consta de cuatro capas: una membrana, un canal de alimentación, otra membrana y un canal permeable que fuerza a todos los compuestos separados hacia el tubo central perforado.

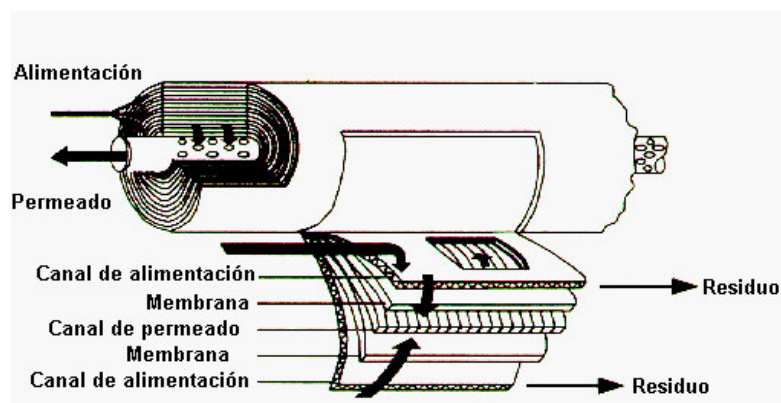


Figura 3.39. Membrana líquida soportada de módulo en espiral.

Cuando la SLM no es estable y el líquido orgánico no permanece en los poros, una posible alternativa es colocar la fase de membrana líquida entre dos soportes sólidos porosos. En ese caso, se emplean celdas con tres compartimentos, donde dos soportes porosos de la misma o distinta naturaleza separan la fase orgánica de las fases acuosas. Además, en este caso la solución con el portador puede ser agitada con objeto de reducir la resistencia a la transferencia de materia. Los soportes típicos usados suelen ser no sólo finas láminas, sino también fibras huecas, fabricados con polímeros capaces de ser mojados por la membrana líquida, y dando lugar a las configuraciones típicas de las SLMs que hemos comentado.

#### ➤ *Aplicaciones*

El primer uso comercial de las membranas líquidas soportadas fue la extracción de cromo de aguas residuales, bajo la marca **SLiM**, llevado a cabo por la empresa Commodore Separation Technologies, Inc. [211].

Recientemente, las membranas líquidas soportadas han sido aplicadas con éxito en una gran diversidad de procesos de separación, incluidas las bioseparaciones [212,213]. Así, Tbeur *et al.* [214] han llevado a cabo el transporte selectivo de cuatro tipos de alditoles, como son eritritol, treitol, ribitol y xilitol, a través de una membrana líquida soportada basada en una delgada película de politetrafluoroetileno microporoso impregnado con un portador de resorcinareno en  $\text{CCl}_4$ , comprobando que la membrana era excepcionalmente permeable, permitiendo el transporte completo de todos los alditoles en un período de 12-15 horas. Estos autores concluyen que los resultados obtenidos abren una nueva perspectiva en los procesos con membranas para la separación de mezclas acuosas de carbohidratos.

Otros investigadores como Barboiu *et al.* [215] han llevado a cabo el transporte selectivo de ácidos orgánicos de interés biológico como son el ácido aspártico, succínico y tartárico, a través de membranas de heteropolisiloxano basadas en éteres macrocíclicos inmovilizados sobre soportes de polietersulfona. Estas membranas simulaban el transporte de compuestos orgánicos biológicos en membranas celulares, consiguiendo prometedores flujos de transporte y selectividades del ácido aspártico desde la mezcla de los tres ácidos anteriormente mencionados. Las interacciones de carga entre el grupo carboxilato de los ácidos orgánicos y los grupos amonio poliméricos, actuando en conjunción con la capacidad complejante de los éteres macrocíclicos, eran las responsables del incremento de la selectividad en el transporte del ácido aspártico a través de la membrana.

Otros autores han estudiado el transporte selectivo del ión plata a través de membranas líquidas soportadas basadas en aza-tioéteres corona que contienen subunidades de 1,10-fenantrolina. Para ello utilizaban una membrana delgada y microporosa de polipropileno, como soporte, impregnada de aza-tioéter corona disuelto en nitrofenil

octil éter, como fase líquida soportada, para llevar a cabo el transporte del ión plata. La separación ocurría, casi cuantitativamente, después de tres horas de experimentación, en presencia de tiosulfato como ión metálico aceptor en la fase receptora [216].

Happel *et al.* [217] han llevado a cabo la separación de estroncio e itrio (Sr/Y) a través de membranas líquidas soportadas. El objetivo del estudio era preparar un generador de Y-90, fácil de mantener y de bajo coste, para producir disoluciones de Y-90 de pureza suficiente para su aplicación en terapia radionuclear.

Otra aplicación de las membranas líquidas soportadas es la separación de intermedios quirales [218]. Esta separación es muy importante en muchos campos y, hoy en día, está adquiriendo mucha importancia en el campo de la industria farmacéutica.

Venkateswaran y Palanivelu [219] han estudiado la recuperación de fenoles de disoluciones acuosas usando membranas líquidas soportadas basadas en aceites vegetales y Matsumoto *et al.* [220] han realizado la separación selectiva de hidrocarburos aromáticos, benceno, tolueno y p-xileno, utilizando líquidos iónicos como fase soportada, obteniendo unos resultados satisfactorios.

#### **3.6.3. Membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos**

A pesar de las numerosas aplicaciones que se han desarrollado con membranas líquidas soportadas, el uso industrial de éstas es todavía limitado, principalmente debido a aspectos relacionados con la estabilidad de las mismas y el rendimiento a largo plazo [221,222]. Las membranas líquidas soportadas basadas en líquidos convencionales se acaban deteriorando debido a la evaporación del líquido, la disolución en las fases en contacto, y el desplazamiento de éste de la estructura porosa bajo gradientes de presión reducidos (<10 kPa).

El uso de los líquidos iónicos a temperatura ambiente como fase líquida en SLMs es particularmente interesante debido a que hace posible la obtención de SLMs más estables gracias a su carácter no volátil, a la posibilidad de minimizar la solubilidad en las fases circundantes mediante la adecuada selección del catión y del anión constituyentes del líquido iónico [223] y a la alta fuerza capilar asociada a su alta viscosidad, que permite reducir el desplazamiento del líquido iónico de los poros bajo presión. Todo ello hace posible obtener membranas líquidas soportadas muy estables, sin pérdida observable de líquido iónico a la atmósfera o a las fases en contacto. Otras propiedades interesantes de los líquidos iónicos para ser utilizados en membranas líquidas soportadas son su elevada estabilidad térmica [68], su alta conductividad iónica [68] y su nula inflamabilidad. Además, son capaces de disolver una amplia variedad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos [169,189] a la vez que son immiscibles con numerosos compuestos orgánicos [69] e incluso con agua.



Esa estabilidad e integridad de las membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos ha sido comprobada por investigadores como R. Fortunato *et al.* [224-226], quienes han caracterizado, mediante espectroscopia de rayos X e impedancia eléctrica, membranas de polivinilideno (PVDF) basadas en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [dmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] en contacto prolongado con dos fases acuosas, demostrando que durante el período inicial de utilización escapa el ligero exceso de líquido iónico presente en la superficie de la membrana pero sin tener lugar el desplazamiento del líquido iónico contenido en los poros.

Recientemente este tipo de membranas han sido aplicadas con éxito en diversos procesos de separación. Así, Branco *et al.* [227] han llevado a cabo el estudio del transporte selectivo de especies orgánicas a través de membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos, concretamente en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. Estos autores comprobaron que para conseguir altos porcentajes de transporte, el soluto no sólo tiene que interactuar con el líquido iónico, sino también difundir rápidamente hacia la fase receptora o de otra manera podría acumularse en la fase de líquido iónico. Los resultados a los que llegaron ponían de manifiesto que los compuestos de mayor peso molecular eran los que se transportaban con mayor rapidez, pudiendo ésto ser explicado por las interacciones que cada uno de estos solutos establecía con el líquido iónico en la fase de membrana. En segundo lugar, pudieron comprobar que el tamaño de la cadena alquílica tenía un efecto más fuerte sobre el transporte que la presencia de grupos hidroxilo. También pusieron de manifiesto que la naturaleza del soporte de membrana afectaba enormemente al fenómeno de transporte.

Otra utilidad es la separación de gases usando membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos con el anión hexafluorofosfato PF<sub>6</sub><sup>-</sup> [228]. Los líquidos iónicos conocidos hasta la fecha son higroscópicos, y permiten eliminar eficientemente el vapor de agua de mezclas gaseosas [100]. Además, se ha comprobado que la solubilidad del CO<sub>2</sub> en este tipo de medios es notablemente elevada [100,188]. Así por ejemplo, a 40°C, y únicamente 50 bares de presión, la solubilidad del CO<sub>2</sub> en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] está en torno a 0.5 en fracción molar. Además, la solubilidad de un gas en un líquido iónico puede ser modulada eligiendo el catión, el anión y los sustituyentes del líquido iónico. De ese modo, y en base a las diferencias de solubilidad de diversos gases y vapores, se considera que los líquidos iónicos tienen un alto potencial para ser empleados en separaciones de gases [229]. Además, los líquidos iónicos son capaces de absorber grandes cantidades de gases a baja temperatura, para ser luego regenerados a alta temperatura o baja presión.

En resumen, cabe esperar que la gran variedad, tanto de soportes de membrana como de ILs, permita el diseño de sistemas de membrana altamente selectivos para la separación de mezclas específicas de compuestos.

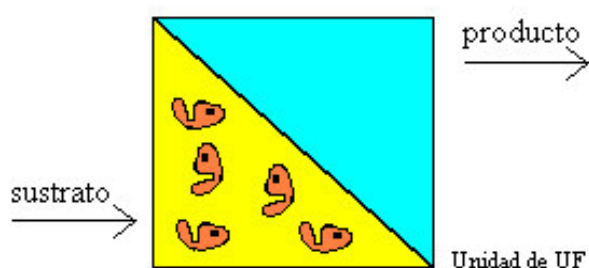
### 3.6.4. Reactores enzimáticos de membrana

Básicamente el concepto de reactor enzimático de membrana se refiere al dispositivo donde la enzima se separa de los sustratos o productos a través de una membrana semipermeable que crea una barrera selectiva. La separación se produce entonces mediante la acción de fuerzas impulsoras que dan lugar a flujos significativos de materia y corresponden a diferencias de presión, de concentración y de potencial eléctrico a través de la membrana. Sin embargo la membrana también se puede usar en un reactor exclusivamente como una matriz para la inmovilización enzimática. Prazeres y Cabral [204] proponen clasificar los reactores de membrana en función del mecanismo por el cual se ponen en contacto las enzimas y los sustratos. Así los dividen:

#### 3.6.4.1 Clasificación de los reactores enzimáticos de membrana

➤ *Reactores de membrana de contacto directo*

En este tipo de reactor (**Figura 3.40**) se promueve el contacto directo entre la enzima y el sustrato, y solamente los productos atraviesan la membrana. El transporte de moléculas se puede mejorar estableciendo una diferencia de presión transmembranaria (transporte convectivo) que induzca una transferencia de moléculas mucho más rápida que la propia difusión. La enzima puede encontrarse en su forma libre o inmovilizada. Se distinguen dos tipos de reactores de contacto directo, de filtración frontal y filtración tangencial. Los primeros son esencialmente utilizados a nivel de laboratorio dadas a las bajas áreas membranarias puestas en juego y a la rápida disminución de los flujos debido a los fenómenos de colmatación. En el caso de los reactores de filtración tangencial el sustrato circula en paralelo a la superficie de filtración y sólo una fracción atraviesa la membrana.



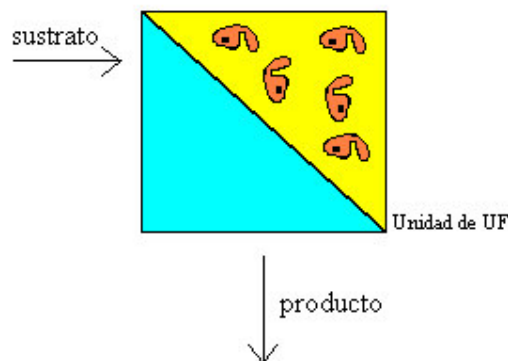
**Figura 3.40.** Reactor de membrana de contacto directo.

Este tipo de sistemas ha sido utilizado para llevar a cabo la hidrólisis enantioselectiva del 2,2,2,-trifluoroetil tioester naproxeno para generar S-naproxeno [230]. El racemato disuelto en medio isooctano es hidrolizado por una lipasa inmovilizada sobre polvo de

polipropileno que se mantiene en suspensión en la fase orgánica. El producto de hidrólisis (S-naproxeno) pasa entonces a través de la membrana a la fase acuosa, recuperándose en la misma.

➤ Reactores de membrana de difusión

En este segundo tipo de reactores el sustrato y la enzima se encuentran separados por medio de una membrana tal y como se muestra en la **Figura 3.41**. El contacto entre ambos se produce después de un proceso de difusión pasiva a través de los microporos de la membrana hasta el compartimento adyacente donde la enzima está localizada. El mayor inconveniente de este sistema es la presencia de sustrato no transformado en los productos de reacción. A pesar de sus numerosas aplicaciones la transferencia de reactivos por difusión no es suficiente para esperar altas conversiones en un sistema continuo. Se ha experimentado la inducción de flujos convectivos en estos sistemas con el fin de soslayar los problemas relativos a los fenómenos de transferencia de materia.



➤ Reactores de membrana multifásicos

Este tipo de reactores incluyen a aquellos que promueven un contacto interfacial entre la enzima y el sustrato en la matriz de la membrana (**Figura 3.42**). A este último caso, que es el utilizado en el presente trabajo, se le prestará especial atención.

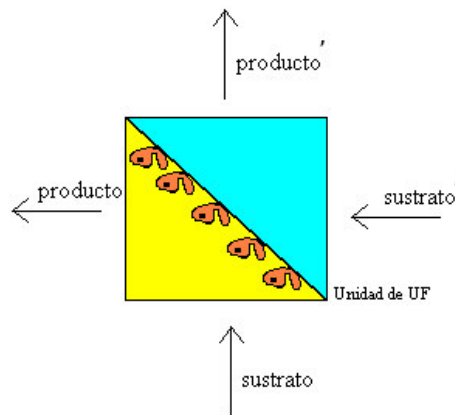


Figura 3.42. Reactor de membrana de multifase.

#### **3.6.4.2 Reactores de membrana con enzima inmovilizada**

Las enzimas presentan una gran cantidad de ventajas que hacen su uso interesante desde el punto de vista industrial, pero existen ciertas limitaciones en su aplicación: son fácilmente desnaturalizadas y a menudo requieren cantidades estequiométricas de cofactores (coenzimas, como un adenosíntrifosfato ATP). Estas limitaciones se han resuelto, en primer lugar inmovilizando la enzima y en segundo lugar, incorporando esquemas de regeneración de los cofactores dentro del proceso de resolución enzimática [231].

La inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos presenta ciertas ventajas: separarlas de una suspensión resulta sencillo por mera sedimentación, evitándose que pequeñas cantidades contaminen el producto y permite reutilizar la enzima. Generalmente, la inmovilización también hace más estable a las enzimas frente a la desactivación en medios acuosos. Desde el punto de vista industrial, lo anterior es muy interesante porque permite la reutilización de la enzima inmovilizada, antes de que deba ser remplazada [232].

En este tipo de reactores la elección del material de la membrana donde se soporta la enzima es muy importante y depende del uso de la misma. Éste puede ser cerámico o polimérico, recomendándose el primero en aquellas aplicaciones donde sea imprescindible una alta resistencia química, mecánica, y térmica. La unión de la enzima a la superficie de la membrana puede llevarse a cabo mediante enlace químico [233], adsorción física [234] ó interacciones electroestáticas [235].

Frente a reactores donde se tenga la enzima en forma soluble, los reactores con enzima inmovilizada son una alternativa más interesante, ya que, como ocurre en el caso de las lipasas, mejoran la relación coste/efectividad [1]. Entre los distintos tipos de reactores usados pueden citarse el reactor tanque agitado discontinuo (BSTR), el reactor de lecho fijo (PBR), el de lecho fluidizado (FBR) y el de membrana.

➤ Técnicas de inmovilización enzimática

Las técnicas de inmovilización enzimática son diversas y variadas pero desde un punto de vista general se puede clasificar como sigue [236].

1) *Inmovilización por adsorción física*

La adsorción física se basa en la adsorción de las moléculas de la enzima en la superficie de una matriz sólida, para ello se pone en contacto una disolución acuosa de la enzima y el soporte. En la movilización por adsorción se establecen enlaces débiles entre la enzima y el soporte mediante fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Sin embargo, dada la naturaleza de la unión, la enzima puede ser desorbida fácilmente del soporte con la consiguiente pérdida de la actividad y la contaminación de los productos. Además, el proceso de adsorción no es específico, de tal forma, que otras sustancias se pueden enlazar con dicho soporte.

2) *Inmovilización por enlaces iónicos*

Se basa en la unión de las moléculas de enzima por fuerzas de naturaleza electrostática, a soportes sólidos que contienen restos cambiadores de iones. Se puede considerar un tipo de inmovilización por adsorción debido al carácter débil de los enlaces enzima-soporte.

3) *Quelatación o unión metálica*

Esta técnica implica el uso de metales de transición como forma de activar la superficie del soporte, permitiendo el acoplamiento directo de la enzima, a través de la formación de quelatos. A pesar del tipo de unión se puede producir la desorción de la proteína, sobre todo durante el almacenamiento prolongado.

4) *Inmovilización por enlace covalente*

Esta técnica consiste en la inmovilización por enlace covalente entre los grupos funcionales de la enzima y del soporte, a la que se unen fenómenos de adsorción electrostática que consolida la fijación. Esta técnica puede necesitar una etapa de activación del soporte por vía química con la ayuda de agentes entrecruzantes ó

activadores (i.e. glutaraldehído, CNBr, SOCl<sub>2</sub>). Este tipo de inmovilización conduce a enlaces estables, resistentes a factores de desnaturalización, pero dicha estabilidad puede llegar a ser la causa de una limitación importante de la enzima si no tiene un cierto grado de flexibilidad para su funcionamiento [237].

#### 5) *Inmovilización por oclusión ó atrapamiento*

Se basa en la localización de la enzima dentro de la red espacial de una matriz polimérica o de una membrana, de forma que se evita la liberación de la proteína/célula sin impedir la libre difusión del sustrato y el producto. Esta metodología supone una mínima pérdida de actividad del catalizador.

#### 6) *Inmovilización por agentes de entrecruzamiento*

Se basa en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de enzima, mediante reactivos bifuncionales ó multifuncionales que dan lugar a la formación de agregados tridimensionales entrecruzados totalmente insolubles en agua y que no requieren de soportes adicionales.

Uno de los agentes entrecruzantes más populares es el glutaraldehído, cuyos grupos funcionales son capaces de reaccionar con los grupos amino libres de las enzimas, mediante la formación de bases de Schiff.

#### ➤ *Reactores de membrana con enzima inmovilizada en medios acuosos*

Magna et al. [238] han llevado a cabo la reacción de hidrólisis de acetato de butilo por CaLB en un reactor de membrana, verificando que el procedimiento de elaboración era reproducible y la actividad de las membranas preparadas se mantiene después de 54 días de almacenamiento.

#### ➤ *Reactores de membrana con enzima inmovilizada en medios no convencionales*

Las membranas formadas por el depósito de polímeros solubles en agua sobre soportes cerámicos porosos han exhibido excelentes propiedades en procesos enzimáticos continuos en medios orgánicos [239] en dióxido de carbono supercrítico [183] y en medios bifásicos hexano/líquido iónico [240]. Las membranas enzimáticas obtenidas mediante este proceso tienen la ventaja de ser biocompatibles, fáciles de preparar y regenerar [238]. Un número importante de reactores de membrana enzimáticos utilizan lipasas como biocatalizadores. Esto se debe al hecho de que las lipasas son activadas por y actúan en las interfases, lo que hace de ellas perfectos biocatalizadores para ser usados en reactores de membrana, los cuales promueven el contacto interfacial entre las enzimas y los sustratos [204]. Así, CaLB ha sido ampliamente usada como biocatalizador para llevar a cabo reacciones químicas sintéticas en disolventes

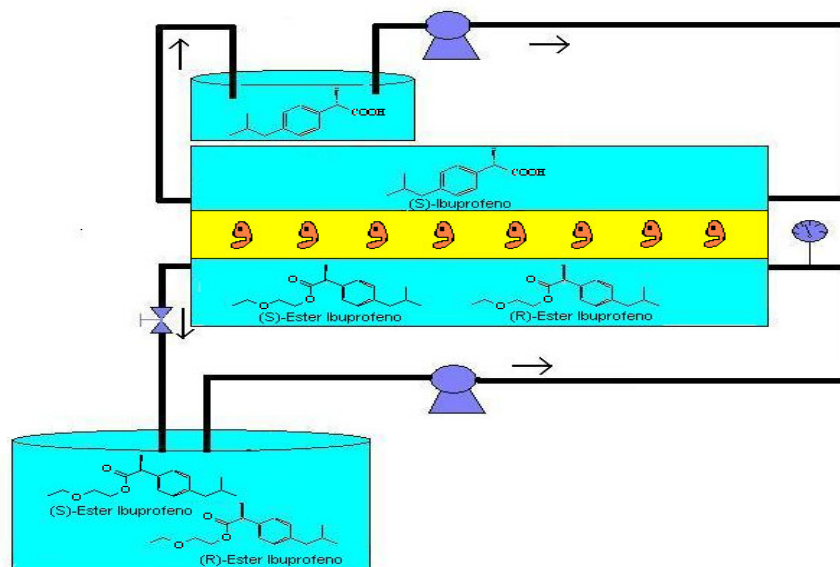
orgánicos, ILs y scCO<sub>2</sub>, debido a sus altos valores de actividad, selectividad y estabilidad en estos medios [239,238,240].

En este tipo de reactores se ha llevado a cabo la síntesis de kiotorfina [203] y butirato de butilo [239] catalizada por  $\alpha$ -quimotripsina y CaLB respectivamente inmovilizadas sobre membranas de  $\alpha$ -alúmina en disolventes orgánicos como medios de reacción. En ambos casos se pone de relieve la estabilidad operacional de las membranas generadas por inmovilización de la enzima que previene el efecto desnaturalizante de los disolventes orgánicos donde se desarrolla la reacción de síntesis.

En este mismo sentido, Lozano et al. [183] han realizado la síntesis de butirato de butilo por CaLB inmovilizada en  $\alpha$ -alúmina en medio scCO<sub>2</sub>. La actividad del derivado inmovilizado se vió ensalzada en este medio con respecto a cuando se utilizaron medios orgánicos. Además, la membrana enzimática presentó una alta estabilidad operacional en medio scCO<sub>2</sub>.

Mori et al. [240] han efectuado el estudio de nuevos reactores de membrana basados en la utilización de líquidos iónicos como agentes inmovilizantes de la enzima. La síntesis de laurato de butilo en n-hexano, fue catalizada por la enzima CaLB disuelta en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] ó [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] y ocluida en la membrana. Las membranas así preparadas se mostraron activas y estables durante meses.

Una de las aplicaciones más importantes de los reactores de membrana es la resolución cinética de racematos mediante biocatalizadores. Éstas suelen ser llevadas a cabo mediante reacciones biosintéticas (esterificación ó transesterificación) seguidas de procesos de hidrólisis. Así, como procedimiento general, la enzima inmovilizada se pone en contacto con la fase orgánica que actúa como fuente del éster del compuesto que se pretenden resolver y el producto de la hidrólisis pasa a la fase acuosa a través de la membrana. Utilizando como base el modelo de reactor anteriormente expuesto, Sakaki et al. [241] han estudiado la resolución racémica del ácido 2-hidroxi octanoico mediante el uso de lipasa de *Candida rugosa* y *Pseudomonas cepacia*. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* permitió obtener una pureza óptica del 0.95 para el isómero R y 0.99 para el S. Del mismo modo, Long et al. [242] estudiaron la resolución racémica del ácido (S)-Ibuprofeno catalizada por lipasa en un reactor de membrana hueca tal y como se muestra en la **Figura 3.43**. El exceso enantiomérico para el sustrato menos reactivo fue del 13.31 % y para el producto fue del 85%. Cuando el reactor de membrana enzimático operaba con recirculación el sistema fue modelado como un reactor agitado de flujo continuo.



**Figura 3.43.** Resolución racémica del ácido (S)-ibuprofeno en un reactor de membrana.

El uso de membranas como soporte de inmovilización enzimática comparados con otros posibles soportes, como partículas porosas, presentan ciertas ventajas que pueden superar el inconveniente causado por el alto coste asociado a las membranas. Una de las más importantes es la de poder integrar procesos catalíticos con procesos de separación. Además la configuración de ciertos reactores de membrana, minimiza las limitaciones a la transferencia de materia que ocurre en reactores de lecho fijo o fluidizado. En este sentido, los procesos de difusión en partículas pueden ser reducidos al operar en un sistema donde los mecanismos convectivos superan a los difusivos. De esta forma, tanto los reactivos como los sustratos, pueden ser fácilmente transportados hacia las enzimas y arrebatados de ellas, fenómeno que puede ser especialmente importante en las enzimas inhibidas por el producto de reacción [243]. Las menores limitaciones a la transferencia de masa en estos sistemas puede ser responsable del incremento en la productividad de los reactores de membrana comparado con los reactores de columna con la enzima inmovilizada en partículas. Los reactores de lecho fijo convencionales pueden tener otro tipo de desventaja tales como el taponamiento de los poros causado por las impurezas de los sustratos y la formación de caminos preferentes en el seno del reactor [244,245].



### 3.7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] V.M. Balçao, A.L. Paiva, F.X. Malcata, Bioreactors with immobilized lipases: State of the art, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 392-416.
- [2] A.R. Macrae, Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60 (1983) 291-294.
- [3] A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, Lipases and their industrial applications. An overview, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118 (2004) 155-170.
- [4] R. Sharma, Y.Chisti, U.C. Banerjee, Production, purification, characterization and applications of lipases, *Biotechnol. Advanc.* 19 (2001) 627-662.
- [5] S. Gayot, X. Santarelli, D. Coulon, Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content, *J. Biotechnol.* 1001 (2003) 29-36.
- [6] E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal. Biotransform.* 16 (1998) 181-204.
- [7] O. Kirk, M.W. Christensen, Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin, *Org. Proc. Research Develop.* 6 (2002) 446-451.
- [8] J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T.A. Jones, Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*, *J. Mol. Biol.* 235 (1994) 790-792.
- [9] J. Uppenberg, N. Öhrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T.A. Jones, Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols, *Biochem.* 34 (1995) 16838-16851.
- [10] D.M. Lawson, A.M. Brzozowski, S. Rety, C. Verma, G.G. Dodson, Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling, *Prot. Eng.* 7 (1994) 543-550.
- [11] D.L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J.L. Sussman, Verschueren, K.H.G.A. Goldman, The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold, *Protein Engineering* 5 (1992) 197-211.

- [12] R. Verger, Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts, *TIBTECH* 15 (1997) 32-38.
- [13] A. Salis, I. Svensson, M. Monduzzi, V. Solinas, P. Adlercreutz, The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*, *Biochim. Biophys. Acta* 1646 (2003) 145-151.
- [14] U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis: Regio- and stereoselective biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2005.
- [15] D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, Anhydrides as acylating agents in lipase catalyzed stereoselective esterification of racemic alcohols, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 5531-5534.
- [16] Y-F. Wang, J.L. Lalonde, M. Momongan, D.E. Bergbreiter, C-H. Wong, Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol ester as acylating reagents: Preparative enantio- and regioselective synthesis of alcohols, glycerol derivatives, sugar and organometallics, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 7200-7205.
- [17] D. Kadereit, H. Waldmann, Enzymatic protecting group techniques, *Chem. Rev.* 101 (2001) 3367-3396.
- [18] T. Ohtani, H. Nakatsukasa, M. Kamezawa, H. Tachibana, Y. Naoshima, Enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase for some synthetic substrates including aliphatic secondary alcohols, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 4 (1998) 53-60.
- [19] D. Rotticci, J. Ottosson, T. Norin, K. Hult, *Candida antarctica* lipase B: A tool for the preparation of optically active alcohols, *Methods Biotechnol.* 15 (2001) 261-276.
- [20] A. Córdova, A. Hult, K. Hult, H. Ihre, T. Iversen, E. Malmström, Synthesis of a poly( $\epsilon$ -caprolactone) monosubstituted first generation dendrimer by lipase catalysis, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 13521-13522.
- [21] H. Uyama, S. Suda, H. Kikuchi, S. Kobayashi, Extremely efficient catalysis of immobilized lipase in ring-opening polymerization of lactones, *Chem. Lett.* (1997) 1109-1110.

- [22] F. Binns, P. Harffey, S.M. Roberts, A. Taylor, Studies of lipase-catalyzed polyesterification of an unactivated diacid/diol system, *J. Polymer Sci.- Part A: Polymer Chem.* 36 (1998) 2069-2080.
- [23] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra, Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150°C, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 380-382.
- [24] J. Ottosson, L. Fransson, J.W. King, K. Hult, Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity, *Biochim. Biophysic. Acta* 1594 (2002) 325-334.
- [25] P. Lozano, T. de Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra, Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide, *Chem. Commun.* (2002) 692-693.
- [26] J.G. Shewale, H. SivaRaman, Penicillin acylase: enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA, *Process Biochem.* 24 (1989) 146-154.
- [27] A. Basso, L. De Martin, C. Ebert, L. Gardossi, P. Linda, Selectivity of penicillin G acylase towards phenylacetic acid derivatives in amide bond synthesis in toluene, *J. Mol. Catal.* 16 (2001) 73-80.
- [28] V.K. Sudhakaram, P.S. Borkar, Microbial transformation of  $\beta$ -lactám antibiotics: enzymes from bacteria, sources and study - A summary, *Hind Antibiot. Bull.* 27 (1985) 63-119.
- [29] V.K. Sudhakaram, P.S. Borkar, Phenoxyethyl penicillin acylases: sources and study - A summary, *Hind Antibiot. Bull.* 27 (1985) 44-62.
- [30] C. Oinonem, J. Rouvinen, Structural comparison of Ntn-hydrolases, *Protein Sci.* 9 (2000) 2329-2337.
- [31] D. Lindsay, H. Pain, The folding and solution conformation of penicillin G acylase, *Eur. J. Biochem.* 192 (1990) 133-140.
- [32] G.O. Daumy, D. Danley, A.S. McColl, Role of protein subunits in *Proteus rettgeri* penicillin G acylase, *J. Bacteriol.* 16 (1985) 1279-1281.
- [33] V.E. Kabakov, N.L. Klyachko, A.V. Levashov, Revealing active site on the light subunit of Penicillin acylase, *Biochem. Molec. Biol. Intern.*, 35 (1995) 441-446.

- [34] T.W. Randolph, H.W. Blanch, J.M. Prausnitz, C.R. Wilke, Enzymatic catalysis in a supercritical fluid, *Biotechnol. Lett.* 5 (1985) 325-328.
- [35] J.S. Dordick, Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 194-211.
- [36] Y.L. Khmel'nitski, A.V. Levashov, N.L. Klyachko, K. Martinek, Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content, *Enzyme Microb. Technol.* 10 (1988) 710-724.
- [37] F.H. Arnold, Engineering enzymes for non-aqueous solvents, *TIBTECH* 8 (1990) 244-249.
- [38] A. Zaks, A.M. Klivanov, Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 (1985) 3192-3196.
- [39] P.J. Halling, Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 178-206.
- [40] A. Zaks, A.M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1983) 3196-3392.
- [41] A.M. Klivanov, Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 97-101.
- [42] A. Schmidt, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* 409 (2001) 258-268.
- [43] M.C. Almeida, R. Ruivo, C. Maia, L. Freire, T. Correa de Sampaio, S. Barreiros, Novozym 435 activity in compressed gases. Water activity and temperature effects, *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998) 494-499.
- [44] C. Laane, S. Boeren, V. Kees, C. Veeger, Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1986) 81-87.
- [45] R.H. Valivety, P.J. Halling, A.R. Macrae, Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media, *Biotechnol. Lett.* 15 (1993) 1133-1138.
- [46] W. Chulalaksananukul, J.-S.M. Condoret, D. Combes, Kinetics of geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in *n*-hexane, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 293-298.

- [47] P. Lozano, T. De Diego, J.L. Iborra, Influence of water-miscible aprotic solvents on  $\alpha$ -chymotrypsin stability, *Biotechnol. Prog.* 12 (1996) 488-493.
- [48] T. Dumont, D. Barth, C. Corbier, G. Branlant, Enzymatic reaction kinetic: Comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide, *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992) 329-333.
- [49] W. Chulalaksananukul, J.-S.M. Condoret, D. Combes, Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 691-698.
- [50] M.P. Atkins, P. Davey, G. Fitzwater, O. Rouher, K.R. Seddon, J. Swindall, (QUILL), Ionic liquids: A map for industrial innovation, <http://quill.qub.ac.uk/map/tant>
- [51] R.A. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.
- [52] P. Walden, *Bull. Acad. Imper. Sci. (St. Petersburg)* (1914) 1800.
- [53] D.F. Evans, A. Yamouchi, G.J. Wei, V.A. Bloomfield, Micelle size in ethylammonium nitrate as determined by classical and quasi-elastic light scattering, *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 3537-3541.
- [54] C.K. Lee, H.W. Huang, I.J.B. Lin, Simple amphiphilic liquid crystalline N-alkylimidazolium salts. A new solvent system providing a partially ordered environment, *Chem. Commun.* (2000) 1911-1912.
- [55] C.M. Gordon, J.D. Holbrey, A.R. Kennedy, K.R. Seddon, Ionic liquid crystals: Hexafluorophosphate salts, *J. Mater. Chem.* 8 (1998) 2627-2636.
- [56] A.E. Visser, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Hydrophobic ionic liquids incorporating *n*-alkylisoquinolinium cations and their utilization in liquid-liquid separations, *Chem. Commun.* (2001) 2484-2485.
- [57] T. Kitazume, F. Zulfiqar, G. Tanaka, Molten salts as a reusable medium for the preparation of heterocyclic compounds, *Green Chem.* 2 (2000) 133-136.
- [58] D.R. MacFarlane, P. Meakin, J. Sun, N. Amini, M. Forsyth, Pyrrolidinium imides: A new family of molten salts and conductive plastic crystal phases, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 4164-4170.

- [59] A.J. Sun, M. Forsyth, D.R. MacFarlane, Room-temperature molten salts based on the quaternary ammonium ion, *J. Phys. Chem. B.* 102 (1998) 8858-8864.
- [60] Y. Chauvin, S. Einloft, H. Olivier, Catalytic dimerization of propene by nickel-phosphine complexes in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride/AlEt<sub>x</sub>Cl<sub>[3-x]</sub> (x = 0, 1) ionic liquids, *Ind. Eng. Chem. Res.* 34 (1995) 1149-1155.
- [61] B. Gilbert, Y. Chauvin, H. Olivier, F. DiMarco-van Tiggelen, Disproportionation of polynuclear chloroethylaluminate anions in acidic 1-butyl-3-methylimidazolium chloride-AlEtCl<sub>2</sub> molten salts in the presence of a hydrocarbon phase, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1995) 3867-3871.
- [62] S.D. Williams, J.P. Schoebrechts, J.C. Selkirk, G. Mamantov, A new room temperature molten salt solvent system: organic cation tetrachloroborates, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 2218 -2219.
- [63] Y. Chauvin, H. Olivier-Bourbigou, Nonaqueous ionic liquids as reaction solvents, *CHEMTECH* 25 (1995) 26 -30.
- [64] G.W. Parshall, Catalysis in molten salt media, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 8716-8719.
- [65] J.S. Wilkes, M.J. Zaworotko, Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquid, *Chem. Commun.* 13 (1992) 965- 967.
- [66] J. Fuller, R.T. Carlin, H.C DeLong, D Haworth, Structure of 1-ethyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate-model for room-temperature molten-salts, *Chem. Commun.* (1994) 299-300.
- [67] B. Ellis, WO 9618459 (to BP Chemicals Limited, UK), *Chem. Abstr.* 125, 114635, 1996.
- [68] P. Bonhôte, A.P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient temperature molten-salts, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168 -1178.
- [69] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatowski, A.E. Visser, R.D. Rogers, Room temperature ionic liquids as novel media for clean liquid-liquid extraction, *Chem. Commun.* (1998) 1765-1766.
- [70] N.L. Lancaster, T. Welton, G.B. Young, Quality aspects and other questions, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2 (2001) 2267-2270.

- [71] L. Cammarata, S.G. Kazarian, P.A. Salter, T. Welton, Molecular states of water in room temperature ionic liquids, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 (2001) 5192-5200.
- [72] J. Fuller, R.T. Carlin, Facile preparation of tetrafluoroborate and trifluoromethanesulfonate room-temperature ionic liquids, *Proc. Electrochem. Soc.* 98 (1999) 227-230.
- [73] P. Wasserscheid, W. Keim, Ionic liquids - "New solutions" for transition metal catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39 (2000) 3772-3789.
- [74] S.I. Lall, D. Mancheno, S. Castro, V. Behaj, J.L.I. Cohen, R. Engel, Polycations. Part X. LIPs, A new category of room temperature ionic liquid based on polyammonium salts, *Chem. Commun.* (2000) 2413-2414.
- [75] A.J. Carmichael, K.R. Seddon, Polarity study of some 1-alkyl-3-methylimidazolium ambient-temperature ionic liquids with the solvatochromic dye, Nile red, *J. Phys. Org. Chem.* 13 (2000) 591-595.
- [76] R. Hagiwara, Y. Ito, Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions, *J. Fluorine Chem.* 105 (2000) 221-227.
- [77] J.D. Holbrey, K.R. Seddon, Ionic Liquids, *Clean Prod. Processes I*, 1 (1999) 223-236.
- [78] J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, *Green Chem.* 4 (2001) 156-164.
- [79] H.L. Ngo, K. LeCompte, L. Hargens, A.B. McEwan, Thermal properties of imidazolium ionic liquids, *Thermochim. Acta.* 357-358 (2000) 97-102.
- [80] S. Takahashi, N. Koura, S. Kohara, M.-L. Saboungi, L.A. Curtiss, Technological and scientific issues of room-temperature molten salts, *Plasmas & Ions* 2 (1999) 91-105.
- [81] Y. Chenfeng, L. Weimin, C. Yunxia, Y. Laigui, Room-temperature ionic liquids: A novel versatile lubricant, *Chem. Commun.* (2001) 2244-2245.
- [82] C.M. Gordon, New developments in catalysis using ionic liquids, *Appl. Catal. A. General* 222 (2001) 101-107.

- [83] T.A. Zawodzinski, R.A. Osteryoung, Oxide and hydroxide species formed on addition of water in ambient-temperature chloroaluminate melts: An  $^{17}\text{O}$  NMR study, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 2842-2847.
- [84] M. Ma, K.E. Johnson, In *Proceedings of the Ninth International Symposium on Molten Salts*, C.L. Hussey, D.S. Newman, G. Mamantov, Y. Ito, eds., The Electrochemical Society: Pennington NJ, 94-13, 1994, 179-186.
- [85] A.J. Sun, M. Forsyth, D.R. MacFarlane, Room temperature molten salts based on quaternary ammonium cations, *Molten Salt Forum*, 585 (1998) 5-6.
- [86] S.N. Baker, G.A. Baker, M.A. Kane, F.V. Bright, The cybotactic region surrounding fluorescent probes dissolved in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate: Effects of temperature and added carbon dioxide, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 9663 -9668.
- [87] K.R. Seddon, A. Stark, M.-J. Torres, Ionic liquid for clean technology, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 2275 -2287.
- [88] D. Swartling, L. Ray, S. Compton, D. Ensor, Preliminary investigation into modification of ionic liquids to improve extraction parameters, *Bull. Biochem. Biotechnol.* 13 (2000) 1-7.
- [89] M. Koel, Physical and chemical properties of ionic liquids based on the dialkylimidazolium cation, *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* 49 (2000) 145-155.
- [90] Ionic liquids database Merck, Ionic liquids: New materials for new applications, <http://ilddb.merck.de/ionicliquids/en/startpage.htm>
- [91] J. D. Holbrey, K. R. Seddon, The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates: Ionic liquids and ionic liquid crystals, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1999) 2133-2140.
- [92] A. Noda, K. Hayamizu, M. Watanabe, Pulsed-Gradient spin-echo  $^1\text{H}$  and  $^{19}\text{F}$  NMR ionic diffusion coefficient, viscosity, and ionic conductivity of non-chloroaluminate room-temperature ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 4603-4610.
- [93] A.B. McEwen, H.L. Ngo, K. LeCompte, J.L. Goldman, Electrochemical properties of imidazolium salt electrolytes for electrochemical capacitor applications, *J. Electrochem. Soc.* 146 (1999) 1687-1695.



- [94] R. Goddard, J. Bosley, B. Al-Duri, Lipase-catalysed esterification of oleic acid and ethanol in a continuous packed bed reactor, using supercritical CO<sub>2</sub> as solvent: approximation of system kinetics, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75 (2000) 715-721.
- [95] Ionic liquids database Solvent Innovation, [http://www.solventinnovation.com/tech\\_properties.php](http://www.solventinnovation.com/tech_properties.php)
- [96] A. Noda, M. Watanabe, In *Proceedings of the Twelfth International Symposium on Molten Salts*, P.C. Trulove, H.C. De Long, G.R. Stafford, S. Deki, eds., The Electrochemical Society: Pennington NJ, 99-41 (2000) 202-208.
- [97] S.N.V.K. Aki, J.F. Brennecke, A. Samanta, How polar are room-temperature ionic liquids, *Chem. Commun.* (2001) 413-414.
- [98] D. Behar, C. Gonzalez, P. Neta, Reaction kinetics in ionic liquids: pulse radiolysis studies of 1-butyl-3-methylimidazolium salts, *J. Phys. Chem. A* 105 (2001) 7607-7614.
- [99] M.J. Muldoon, C.M. Gordon, I.R. Dunkin, Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2001) 433-435.
- [100] J.L. Anthony, E.J. Magnin, J.F. Brennecke, Solution thermodynamics of imidazolium-based ionic liquids and water, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 10942- 10949.
- [101] S.V. Dzyuba, A. Bartsch, New room-temperature ionic liquids with C<sub>2</sub>-symmetrical imidazolium cations, *Chem. Commun.* 16 (2001) 1466-1467.
- [102] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green. Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [103] J. L. Kaar, A. M. Jesionowski, J. A. Berberich, R. Moulton, J. Russell, The impact of ionic liquid physical properties on enzyme activity and stability, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4125-4131.
- [104] A.E. Visser, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, Liquid/liquid extraction of metal ions in room temperature ionic liquids, *Chem. Commun.* (2001) 2484-2485.

- [105] R. Irimescu, K. Kato, Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 30 (2004) 189-194.
- [106] K.M. Docherty, C.F. Jr. Kulpa, Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 185-189.
- [107] N. Gathergood, M.T. Garcia, P.J. Scammells, Biodegradable ionic liquids. Part I. Concept, preliminary targets and evaluation, *Green Chem.* 6 (2004) 166-175.
- [108] M.T. Garcia, N. Gathergood, P.J. Scammells, Biodegradable ionic liquids. Part II. Effect of the anion and toxicity, *Green Chem.* 7 (2005) 9-14.
- [109] N. Gathergood, P.J. Scammells, M.T. Garcia, Biodegradable ionic liquids. Part III. The first readily biodegradable ionic liquids, *Green Chem.* 8 (2006) 156-160.
- [110] S.T. Handy, M. Okello, G. Dickenson, Solvents from bio-renewable sources: Ionic liquids based on fructose, *Org. Lett.* 5 (2003) 2513-2515.
- [111] F.D'Anna, V. Frenna, R. Noto, V. Pace, D. Spinelli, Can the absence of solvation of neutral reagents by ionic liquids be responsible for the high reactivity in base-assisted intramolecular nucleophilic substitutions in these solvents, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 2828-2831.
- [112] C. Chiappe, D. Pieraccini, Ionic liquids: Solvent properties and organic reactivity, *J. Phys. Org. Chem.* 18 (2005) 275-297.
- [113] J. Ross, J. Xiao, Friedel-Crafts acylation reactions using metal triflates in ionic liquid, *Green Chem.* 4 (2002) 129-133.
- [114] R.A. Sheldon, R.M. Lau, M.J. Sorgedraeger, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, Biocatalysis in ionic liquids, *Green Chem.* 4 (2002) 147-151.
- [115] N. Jain, A. Kumar, S. Chauhan, S.M.S. Chauhan, Chemical and biochemical transformations in ionic liquids, *Tetrahedron* 61 (2005) 1015-1060.
- [116] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra, Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis, *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 1529-1533.

- [117] D.K. Magnusson, J.W. Bodley, D.F. Adams, The activity and stability of alkaline phosphatase in solutions of water and the fused salt ethylammonium nitrate, *J. Sol. Chem.* 13 (1984) 583-587.
- [118] M. Erbedinger, A.J. Mesiano, A.J. Russell, Enzymatic catalysis of formation of z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents, *Biotechnol. Prog.* 16 (2000) 1129-1131.
- [119] T.L. Husum, C.T. Jorgensen, M. W. Christensen, O. Kirk, Enzyme catalysed synthesis in ambient temperature ionic liquids, *Biocatal. Biotransform.* 19 (2001) 331-338.
- [120] K-W. Kim, B. Song, M.Y. Choi, Biocatalysis in ionic liquids: Markedly enhanced enantioselectivity of lipase, *Org. Lett.* 3 (2001) 1507-1509.
- [121] R.M. Lau, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, R.A. Sheldon, Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Org. Lett.* 2 (2000) 4189-4191.
- [122] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzyme catalysis in ionic liquids: Lipase catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* 5 (2001) 425-426.
- [123] S. Park, R.J. Kazlauskas, Improved preparation and use of room temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8395-8401.
- [124] S.J. Nara, J.R. Harjani, Manikrao M. Salunkhe, Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: A comparative study, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 2979-2982.
- [125] F. van Rantwijk, R. Madeira Lau, R. A. Sheldon, Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 131-138.
- [126] T. Itoh, E. Akasaki, K. Kudo, S. Shirakami, Lipase-catalyzed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system: Reaction of enzyme anchored to the solvent, *Chem. Lett.* (2001) 262-263.
- [127] C-S. Chem, S.H. Wu, G. Girdaukas, C.J. Sih, Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294-7299.
- [128] M. Eckstein, At low water activity  $\alpha$ -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 867-872.

- [129] P. Kielbasinski, M. Albrycht, J. Luczak, M. Mikolajczyk, Enzymatic reactions in ionic liquids: lipase-catalysed kinetic resolution of racemic, P-chiral hydroxymethanephosphinates and hydroxymethylphosphine oxides, *Tetrahedron Asymmetry* 13 (2002) 735-738.
- [130] M. Noël, P. Lozano, M. Vaultier, J.L. Iborra, Kinetic resolution of *rac*-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 301-306.
- [131] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra, Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide, *J. Mol. Catal. A: Chemical* 214 (2004) 113-119.
- [132] Y. Yuan, S. Bai, Y. Sun, Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of ( $\pm$ )-menthol in ionic liquids and organic solvents, *Food Chem.* 97 (2006) 324-330.
- [133] M. Eckstein, At low water activity  $\alpha$ -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 867-872.
- [134] J.A. Laszlo, D.L. Compton,  $\alpha$ -Chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 181-186.
- [135] P. Lozano, T. De Diego, J.P. Guegan, M. Vaultier, J.L. Iborra, Stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 563-569.
- [136] N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the  $\beta$ -galactosidase catalysed synthesis of *N*-acetyllactosamine, *Org. Proc. Res. Dev.* 6 (2002) 553-557.
- [137] Y. Chauvin, L. Mussmann, H. Olivier-Bourbigou, A novel class of versatile solvents for two-phase catalysis: hydrogenation, isomerization, and hydroformylation of alkenes catalyzed by rhodium complexes in liquid 1,3-dialkylimidazolium salts, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1996) 2698-2700.
- [138] S. Steines, B. Drießen-Hölscher, P. Wassercheid, An ionic liquid as catalyst medium for stereoselective hydrogenations of sorbic acid with ruthenium complexes, *J. Prakt. Chem.* 342 (2000) 348-354.
- [139] E.G. Kuntz, Homogeneous catalysis in water, *CHEMTECH* 17 (1987) 570-575.

- [140] H. Waffenschmidt, P. Wassercheid, Ionic liquids into regioselective, platinumcatalysed hydroformylation, *J. Mol. Catal. A: Chemical* 164 (2000) 61-67.
- [141] C.E. Song, E.J. Roh, Practical method to recycle a chiral(salten)Mn epoxidation catalyst by using an ionic liquid, *Chem. Commun.* 10 (2000) 837-838.
- [142] D. Zim, R.F. De Souza, J. Dupont, A.L. Monteiro, Regioselective synthesis of 2-arylpropionic esters by palladium-catalyzed hydroesterification of styrene derivatives in molten salts media, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 7071-7074.
- [143] E. Mizushima, T. Hayashi, M. Tanaka, Palladium-catalysed carbonylation of aryl halides in ionic liquid media: high catalyst stability and significant rate-enhancement in alkoxy carbonylation, *Green Chem.* 3 (2001) 76-79.
- [144] T. Welton, Ionic liquids in catalysis, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 2459-2477.
- [145] J.A. Boon, J.A. Levisky, J.L. Pflug, J.S. Wilkes, Friedel-Crafts reactions in ambient-temperature molten salts, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 480-483.
- [146] C.J. Adams, M.J. Earle, G. Roberts, K.R. Seddon, Friedel-Crafts reactions in room temperature ionic liquids, *Chem. Commun.* (1998) 2097-2098.
- [147] M.J. Earle, P.B. McCormac, K.R. Seddon, Ruthenium-catalyzed olefin metathesis in ionic liquids, *Green Chem.* 2 (2000) 261-262.
- [148] J. Howarth, K. Hanlon, D. Fayne, P. McCormac, Moisture stable dialkylimidazolium salts as heterogeneous and homogeneous lewis acids in the Diels-Alder reaction, *Tetrahedron Lett.* 38 (17) (1997) 3097-3100.
- [149] Y. Chauvin, B. Gilbert, I. Guibard, Catalytic dimerization of alkenes by nickel complexes in organochloroaluminate molten salts, *Chem. Commun.* 23 (1990) 1715-1716.
- [150] J. Caja, T.D.J. Dunstan, D.M. Ryan, V. Katovic, In Proceeding of the 39th Power Sources Conference (2000) 124-127.
- [151] P. Bonhôte, A.-P. Dias, US Patent 5683832 (1997).
- [152] J.F. Brennecke, E.J. Maginn, Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.

- [153] J.L. Anthony, S.N.V.K. Aki, E.J. Maginn, J.F. Brennecke, Feasibility of using ionic liquids for carbon dioxide capture, *Int. J. Environ. Technol. Manage.* 4 (2004) 105-115.
- [154] H. Zhao, S. Xia, P. Ma, Use of ionic liquids as green solvents for extractions, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 1089-1096.
- [155] R. Fortunato, C.A.M. Afonso, M.A.M. Reis, J.G. Crespo, Supported liquid membranes using ionic liquids: Study of stability and transport mechanisms, *J. Membrane Sci.* 242 (2004) 197-209.
- [156] M. Matsumoto, Y. Inomoto, K. Kondo, Selective separation of aromatic hydrocarbons through supported liquid membranes based on ionic liquids, *J. Membrane Sci.* 246 (2005) 77-81.
- [157] D.W. Armstrong, L. He, Y.S. Liu, Examination of ionic liquids and their interactions with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3873-3876.
- [158] Strem Chemicals Inc., <http://www.strem.com/code/index.ghc>
- [159] Sigma-Aldrich-Fluka, <http://www.sigmaaldrich.com>
- [160] Degussa, Product information on Ionic Liquids, <http://productkaleidoscope.degussa.com/productkaleidoscope/en/productkaleidoscope.html>
- [161] Cytec Industries, Cytec's Phosphine and Phosphorus Specialties (Ionic Liquids), <http://www.cytec.com/business/Phosphine/Applications/IonicLiquids.shtm>
- [162] BASF, Proceso BASIL (Biphasic Acid Scavenging using Ionic Liquids), [http://www.basf.com/corporate/051004\\_ionic.htm](http://www.basf.com/corporate/051004_ionic.htm)
- [163] Air Products, GASGUARD Sub-Atmospheric Systems (SAS), <http://www.airproducts.com/NR/rdonlyres/9D919AAD-DE4F-4614-B3C4-E923C6BF786E/0/GasguardSAS.pdf>
- [164] Y. Chauvin, H. Olivier, C.N. Wyrvalski, L.C. Simon, R.F. De Souza, Oligomerization of n-butenes catalyzed by nickel complexes dissolved in organochloroaluminate ionic liquids, *J. Catal.* 165 (1997) 275-278.
- [165] F.H. Hurley, U.S. Patent, 4, 446, 331, 1948.
- [166] T.P. Jr. Wier, U.S. Patent, 4, 446, 350, 1948.
- [167] T.P. Jr. Wier, F. H. Hurley, U.S. Patent, 4, 446, 349, 1948.

- [168] M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, M.T. Tena, Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico, Ed. Reverté, Barcelona, España, 1993, 47-51.
- [169] T. Welton, Room-temperature ionic liquids, Solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2083.
- [170] M.A. McHugh, V.J. Krukoniš, *Supercritical Fluid Extraction. Principles and Practice*, Second Ed., Butterworth-Heinemann, Boston, MA, EE.UU, 1994.
- [171] E.J. Beckman, Supercritical and near-critical CO<sub>2</sub> in green chemical synthesis and processing, *J. Supercrit. Fluids* 28 (2003) 121-191.
- [172] K. Weissemel, H.-J. Arpe, *Industrial Organic Chemistry*, Third Ed., Wiley, VCH-Weinheim, Germany, 1997.
- [173] S. Srivastava, G. Madras, J. Modak, Esterification of myristic acid in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 27 (2003) 55-64.
- [174] E. Castillo, A. Marty, D. Combes, J.S. Condoret, Polar substrates for enzymatic reactions in supercritical CO<sub>2</sub>: how to overcome the solubility limitation, *Biotechnol. Lett.* 16(2) (1994) 169-174.
- [175] K. Nakamura, Y.M. Chi, Y. Yamada, T. Yano, Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide. *Chem. Eng. Commun.* 45 (1986) 207-212.
- [176] D.A. Hammond, M. Karel, A.M. Klibanov, V.J. Krukoniš, Enzymatic reactions in supercritical gases, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 11 (1985) 178-206.
- [177] J.C. Erickson, P. Schyns, C.L. Cooney, Effect of pressure on an enzymatic reaction in a supercritical fluid, *AIChE J.* 36 (1990) 299-301.
- [178] M.D. Romero, L. Calvo, C. Alba, M. Habulin, M. Primožic, Z. Knez, Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 33 (2005) 77-84.
- [179] E. Celia, E. Cernia, C. Palocci, S. Soro, T. Turchet, Tuning *Pseudomonas cepacea* lipase (PCL) activity in supercritical fluids, *J. Supercrit. Fluids* 33 (2005) 193-199.
- [180] A. Marty, W. Chulalaksananukul, J.-S. Condoret, R.M. Willemot, G. Durand, Comparison of lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane, *Biotechnol. Lett.* 12 (1990) 11-16.

- [181] O. Aaltonen, M. Rantakylä, Biocatalysis in Supercritical CO<sub>2</sub>, *CHEMTECH* (1991) 240-248.
- [182] B. Al-Duri, R. Goddard, J. Bosley, Characterisation of a novel support for biocatalysis in supercritical carbon dioxide, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 11 (2001) 825-834.
- [187] P. Lozano, G. Villora, D.Gómez, A.B. Gayo, J.A. Sánchez-Conesa, M. Rubio, J.L. Iborra, Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids*, 29 (2004)121-128.
- [184] S.V. Kamat, B. Iwaskewycz, E.J. Beckman, A.J. Russell, Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids: Tuning enzyme activity by changing pressure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2940-2944.
- [185] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, J. Hernández, G. Villora, Los fluidos supercríticos como sustitutos de los disolventes orgánicos convencionales en la industria química (I): Ventajas de los fluidos supercríticos frente a los disolventes convencionales, *Ingeniería Química* (2008) Aceptado.
- [186] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, J. Hernández, G. Villora, Los fluidos supercríticos como sustitutos de los disolventes orgánicos convencionales en la industria química (II): Cómo abordar el proceso de sustitución, *Ingeniería Química* (2008) Aceptado.
- [187] S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, Expanding the polarity range of ionic liquids, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.
- [188] L.A. Blanchard, Z. Gu, J.F. Brennecke, High-pressure phase behaviour of ionic liquid/CO<sub>2</sub> systems, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 2437-2444.
- [189] L.A. Blanchard, J.F. Brennecke, Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287-292.
- [190] M.C. Kroon, A. Shariati, M. Costantini, J. van Spronsen, G. Witkamp, R.A. Sheldon, C. J. Peters, High-pressure phase behavior of systems with ionic liquids: Part V. The binary system carbon dioxide + 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, *J. Chem. Eng. Data* 50 (2005) 173-176.
- [191] K.I. Gutkowski, A. Shariati, C.J. Peters, High-pressure phase behavior of the binary ionic liquid system 1-octyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate + carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 39 (2006) 187-191.



- [192] D. Fu, X. Sun, Y. Qiu, X. Jiang, S. Zhao, High-pressure phase behavior of the ternary system CO<sub>2</sub> + ionic liquid [bmim][PF<sub>6</sub>] + naphthalene, *Fluid Phase Equilib.* 251 (2007) 114-120.
- [193] R.A. Brown, P. Pollet, E. McKoon, C.A. Eckert, C.L. Liotta, P.G. Jessop, Asymmetric hydrogenation and catalyst recycling using ionic liquid and supercritical carbon dioxide, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1254-1255.
- [194] F. Liu, R.T. Baker, M.B. Abrams, W. Tumas, Phase-separable catalysis using room temperature ionic liquids and supercritical carbon dioxide, *Chem. Commun.* 5 (2001) 433-434.
- [195] M.F. Sellin, P.B. Webb, D.J. Cole-Hamilton, Continuous flow homogeneous catalysis: Hydroformylation of alkenes in supercritical fluid-ionic liquid biphasic mixtures, *Chem. Commun.* (2001) 781-782.
- [196] P.B. Webb, M.F. Sellin, T.E. Kunene, S. Williamson, A.M.Z. Slawin, D.J. Cole-Hamilton, Continuous flow hydroformylation of alkenes in supercritical fluid-ionic liquid biphasic systems, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 15577-15588.
- [197] A. Bösmann, G. Francio, E. Janssen, M. Solinas, W. Leitner, P. Wasserscheid, Activation tuning and immobilization of homogeneous catalysts in an ionic liquid/compressed CO<sub>2</sub> continuous-flow system, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 40 (2001) 2697-2699.
- [198] D. Ballivet-Tkatchenko, M. Picquet, M. Solinas, G. Francio, P. Wasserscheid, W. Leitner, Acrylate dimerisation under ionic liquid-supercritical carbon dioxide conditions, *Green Chem.* 5 (2003) 232-235.
- [199] M. Solinas, Institut Max-Planck and Institut for Technology and Macromolecular Chemistry (2004).
- [200] M.T. Reetz, W. Wiesenhöfer, G. Franciò, W. Leitner, Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous-flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase, *Chem. Commun.* (2002) 992-993.
- [201] A.M. Scurto, S.N.V.K. Aki, J.F. Brennecke, CO<sub>2</sub> as a separation switch for ionic liquid/organic mixtures, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 10276-10277.
- [202] P. Lozano, T. de Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J.L. Iborra, Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 661-669.

- [203] M.P. Belleville, P. Lozano, J.L. Iborra, G.M. Ríos, Preparation of hybrid membranes for enzymatic reaction, *Sep. Purif. Technol.* 25 (2001) 229-233.
- [204] D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, Enzymatic membrane bioreactors and their applications, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 738-750.
- [205] J.A. Ibáñez, L.M. Berná, R. Valerdi, *Desalación por membranas*, Secretariado de publicaciones, Universidad de Murcia, Murcia, España, 1989.
- [206] B.J. Dutka, *Membrane filtration: Applications, techniques and problems*, Marcel Dekker, Nueva York, EEUU, 1981, 253-264.
- [207] K. Scott, *Handbook of industrial membranes*, 2ª Ed. Elsevier Advanced Technology, Amsterdam, Holanda, 1998.
- [208] W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt, *Handbook of chemical property estimation methods: Environmental behaviour of organic compounds*, McGraw-Hill, Nueva York, EEUU, 1982.
- [209] P.E. Liley, R.C. Reid, E. Buck, Physical and Chemical Data. In: R.H. Perry, D. Green, (Eds.), *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, McGraw-Hill Book Co, Singapore, 1984, 98.
- [210] N.N. Li, Liquid surfactant membranes, U.S. Patent No. 3, 410, 794, 1968.
- [211] Commodore Separation Technologies Inc. [http://www.business.com/directory/energy\\_and\\_environment/waste\\_management/commodore\\_separation\\_technologies\\_inc/](http://www.business.com/directory/energy_and_environment/waste_management/commodore_separation_technologies_inc/)
- [212] R. Bloch, Hydrometallurgical separations by solvent membranes, In: J.E. Flynn, (Ed.), *Membrane Science and Technology*, Plenum Press, Nueva York, EEUU, 1970.
- [213] R. Anil Kumar, F. Hadad, F.J. Alguacil, A.M. Sastre, Comparative performance of non-dispersive solvent extraction using a single module and the integrated membrane process with two hollow fiber contactors, *J. Membr. Sci.* 248 (2004) 1-14.
- [214] N. Tbeur, T. Rhilalou, M. Hlaïbi, D. Langevin, M. Métayer, J.F. Verchère, Molecular recognition of carbohydrates by a resorcinarene. Selective transport of alditols through a supported liquid membrane, *Carbohydr. Research.* 329 (2000) 409-422.

- [215] M. Barboiu, C. Guizard, C. Luca, N. Hovnanian, J. Palmeri, L. Cot, Facilitated transport of organics of biological interest: II. Selective transport of organic acids by macrocyclic fixed site complexant membranes, *J. Membr. Sci.* 174 (2000) 277-286.
- [216] M. Shamsipur, S. Y. Kazemi, K. Niknam, H. Sharghi, A new PVC-membrane sensor based on thia-substituted macrocyclic diamide for selective potentiometric determination of silver ion, *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (2002) 53-58.
- [217] S. Happel, R. Streng, P. Vater, W. Ensinger, Strontium/Yttrium separation by supported liquid membranes based on nuclear track microfilters, *Radiat. Measur.* 36 (2003) 761-766.
- [218] J. D. Clark, B. Han, A. S. Bhowan, S. R. Wickramasinghe, Amino acid resolution using supported liquid membranes, *Sep. Purif. Technol.* 42 (2005) 201-211.
- [219] P. Venkateswaran, K. Palanivelu, Recovery of phenol from aqueous solution by supported liquid membrane using vegetable oils as liquid membrane, *J. Hazardous Material* 131 (2005) 146-152.
- [220] M. Matsumoto, Y. Inomoto, K. Kondo, Selective separation of aromatic hydrocarbons through supported liquid membranes based on ionic liquids, *J. Membr. Sci.* 246 (2004) 77-81.
- [221] M. Teramoto, Sakaida, S.S. Fu, N. Ohnishi, H. Matsuyama, T. Fukui, K. Arai, Attempt for the stabilization of supported liquid membrane, *Sep. Purif. Technol.* 21 (2000) 137-142.
- [222] A.J.B. Kemperman, D. Bargeman, T. Boomgaard and H. Strathmann, Stability of supported liquid membranes: State of the art, *Sep. Sci. Technol.* 31 (1996) 2733-2762.
- [223] L.C. Branco, J.G. Grespo, C.A.M. Afonso, Studies on the selective transport of organic compounds by using ionic liquids as a novel supported liquid membranes, *Chem. Eur. J.* 8 (2002) 3865-3871.
- [224] R. Fortunato, C.A.M. Afonso, M.A.M. Reis, J.G. Crespo, Supported liquid membranes using ionic liquids: Study of stability and transport mechanism, *J. Membr. Sci.* 242 (2004) 197-209.

- [225] R. Fortunato, C.A.M. Afonso, J. Benavente, E. Rodriguez-Castellón, J.G. Crespo, Stability of supported ionic liquid membranes as studied by X-ray photoelectron spectroscopy, *J. Membr. Sci.* 256 (2005) 216-223.
- [226] R. Fortunato, L.C. Branco, C.A.M. Afonso, J. Benavente, J.G. Crespo, Electrical impedance spectroscopy characterisation of supported ionic liquid membranes, *J. Membr. Sci.* 270 (2006) 42-49.
- [227] L.C. Branco, J.G. Crespo, C.A.M. Afonso, High selective transport of organic compounds by using supported liquid membranes based on ionic liquids, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 2771-2773.
- [228] P. Scovazzo, J. Kieft, D.A. Finan, C. Koval, D. DuBois, R. Noble, Gas separations using non-hexafluorophosphate anion supported ionic liquid membranes, *J. Membr. Sci.* 238 (2004) 57-63.
- [229] J.L. Anthony, E.J. Maginn, J.F. Brennecke, Gas solubilities in 1-n-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, in *Ionic Liquids: Industrial Applications to Green Chemistry*, R. D. Rogers and K. R. Seddon, (eds), ACS Symposium Series, 818, 2002, 260-269.
- [230] C. Lu, Yu. Cheng, S. Tsai, Integration of reactive membrane extraction with lipase-hydrolysis dynamic kinetic resolution of naproxen 2,2,2- trifluoroethyl thioester in isooctane, *Biotechnol. Bioeng.* 79 (2002) 200-210.
- [231] G.M. Whitesides, C-H. Wong, *Aldrichim. Acta* 16 (1985) 27-34.
- [232] E. Conn, P. Stumpf, G. Bruening, R. Doi, Bioquímica fundamental, LIMUSA, 5ª Ed., Mexico, 1996, 131-161.
- [233] P. Lozano, A. Manjón, M. Romojaro, M. Canovas, J.L. Iborra, Cross-flow reactor with immobilized pectolytic enzymes for juice clarification, *Biotechnol. Lett.* 9 (1987) 875-880.
- [234] F.X. Malcata, C.G. Hill, C.H. Amundson, Use of a lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butteroil, *Biotechnol. Bioeng.* 38 (1991) 853-868.
- [235] S. Furusaki, T. Nozawa, S. Nomura, Membrane enzyme reactor with simultaneous separation using electrophoresis, *Bioprocess Eng.* 5 (1990) 73 -78.

- [236] J.R. Prenosil, T. Hediger, Performance of membrane fixed biocatalyst reactors. 1. Membrane reactor systems and modeling, *Biotechnol. Bioeng.* 31 (1988) 913-921.
- [237] P. Lozano, A. Manjón, F. Romojaro, M. Cánovas, J.L. Iborra, Kinetic and operational study of a cross flow reactor with immobilized pectolytic enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 12 (1990) 499-505.
- [238] E. Magna, I. Catarino, D. Paolucci-Jeanjean, L. Preziosi-Belloy, M. Belleville, Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability, *J. Membrane Sci.* 241 (2004)161-166.
- [239] P. Lozano, A.B. Pérez-Marín, T. de Diego, D. Gómez, D. Paolucci-Jeanjean, M.P. Belleville, G.M. Rios, J.L. Iborra, Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media, *J. Membrane Sci.* 201 (2002) 55-64.
- [240] M. Mori, R. Gomez Garcia, M.P. Belleville, D. Paolucci-Jeanjean, J. Sanchez, P. Lozano, M. Vaultier, G.M. Rios, A new way to conduct enzymatic synthesis in an active membrane using ionic liquids as catalyst support, *Catal. Today* 104 (2005) 313-317.
- [241] K. Sakaki, S. Hara, N. Itoh, Optical resolution of racemic 2-hydroxy octanoic acid using biphasic enzyme membrane reactor, *Desalination* 149 (2002) 247-252.
- [242] W-S Long, A. Kamaruddin, S. Bhatia, Chiral resolution of racemic ibuprofen ester in an enzymatic membrane reactor, *J. Membrane Sci.* 247 (2005) 185-200.
- [243] G. Belfort, Membranes and bioreactors: a technical challenge in Biotechnology, *Biotechnol. Bioeng.* 79 (1989) 1047-1066.
- [244] M. Nakajima, A. Watanabe, N. Jimbo, K. Nishizawa, S. Nakao, Forced-flow bioreactor for sucrose inversion using ceramic membrane activated by silanization, *Biotechnol. Bioeng.* 33 (1989) 856-861.
- [245] M. Nakajima, K. Nishizawa, H.A. Nabetani, *Bioproc. Eng* 9 (1993) 31-35.



# 4

**Aumento de la actividad y selectividad enzimática en reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas en líquidos iónicos mediante el uso de aditivos**





#### **4. AUMENTO DE LA ACTIVIDAD Y SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA EN REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN CATALIZADAS POR LIPASAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS MEDIANTE EL USO DE ADITIVOS**

##### **4.1. INTRODUCCIÓN**

El uso de biocatalizadores en medios no acuosos ha recibido un interés creciente en las últimas dos décadas debido a las ventajas que ofrece, tales como la posibilidad de llevar a cabo procesos que son termodinámicamente desfavorables en agua (p.e. reacciones de transesterificación) con la ventaja de aumentar la solubilidad de los sustratos orgánicos y de facilitar la recuperación de los productos y de la enzima [1]. Entre estos medios no convencionales, los líquidos iónicos (ILs) se han revelado recientemente como una alternativa interesante a los disolventes orgánicos convencionales desde el punto de vista medioambiental [2-4]. Esto es debido principalmente a su prácticamente despreciable presión de vapor, su alta estabilidad térmica [5] y a la posibilidad de modular ampliamente las propiedades físico-químicas de los mismos, tales como la polaridad, hidrofobicidad y miscibilidad con disolventes, mediante la adecuada selección del catión y anión constituyentes del líquido iónico [6].

Los líquidos iónicos de las familias 1-alkil-3-metilimidazolio y 1-alkil-piridinio, en combinación con aniones tales como tetrafluoroborato, hexafluorofosfato y bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida han mostrado ser medios adecuados para llevar a cabo reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas, aumentando la actividad sintética y la (enantio)selectividad en relación a disolventes orgánicos convencionales tales como alcohol tert-butílico [7,8], dioxano [9], tolueno [10], y n-hexano [11]. Los resultados de los primeros estudios no siempre fueron consistentes, probablemente debido a la presencia de impurezas resultantes de la preparación de los líquidos iónicos. Por ello, es muy recomendable una etapa previa de purificación [10,12].

Se han descrito diferentes métodos para aumentar la actividad sintética y la (enantio)selectividad de reacciones catalizadas por lipasas. Entre estos métodos, el tratamiento del medio de reacción con un aditivo resulta un modo muy conveniente de mejorar el resultado de la reacción debido a su simplicidad práctica [13]. Algunos autores han empleado bases como la trietilamina como aditivos para mejorar la eficiencia de lipasas de *Candida antarctica* en disolventes orgánicos [14-15].

En el presente capítulo se ha estudiado la capacidad de la lipasa B de *Candida antarctica* en estado libre de catalizar la síntesis de butirato de butilo, comúnmente empleado en la industria de aromas, mediante transesterificación de butirato de vinilo y 1-butanol (ver **Figura 4.1**), como reacción modelo, en siete líquidos iónicos inmiscibles con agua, así como en un disolvente orgánico convencional inmiscible con agua, n-hexano. En todos los

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

casos, se ha aplicado un tratamiento de purificación previo, modificación del sugerido por Park y Kazlauskas [10].

El esquema general de reacción es el siguiente:

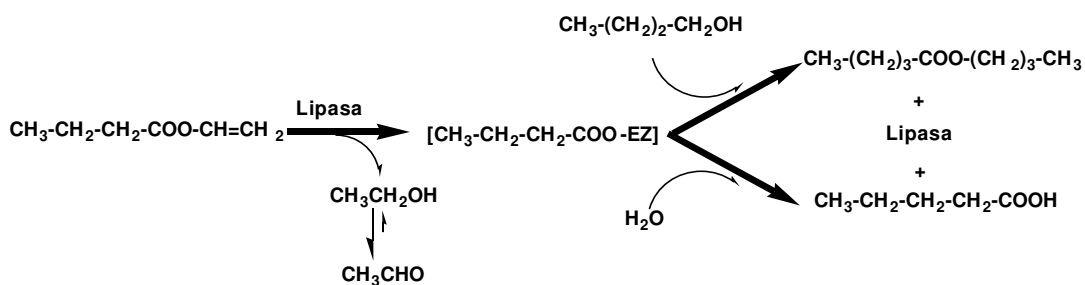


Figura 4.1. Esquema general de reacción.

En primer lugar, el éster vinílico forma con la lipasa un compuesto intermedio denominado “complejo enzima-sustrato”, dando lugar a la liberación del alcohol vinílico. Este alcohol se encuentra en un equilibrio ceto-enólico muy desplazado hacia la forma ceto, por lo que se transforma en acetaldehído en un proceso de tautomerización casi irreversible. Este hecho contribuye a retirar alcohol vinílico del medio y desplazar la reacción hacia la formación del producto de síntesis.

Una vez formado el complejo enzima-sustrato, la reacción puede evolucionar de dos formas distintas:

- **Síntesis:** En este caso, el alcohol reaccionaría con el complejo enzima-sustrato dando lugar a la formación del éster alquílico y a la regeneración de la enzima en su forma natural.
- **Hidrólisis:** Si existe agua presente en el medio, las moléculas de agua pueden dar lugar a la formación del ácido del éster vinílico y la regeneración de la enzima en su estado natural.

De acuerdo con estas dos posibilidades, la presencia de agua en el medio será determinante a la hora de obtener una mayor o menor cantidad del producto deseado. Esto es debido a que la constante de hidrólisis es notablemente mayor que la de síntesis y para que predomine la síntesis sobre la hidrólisis, la concentración del alcohol debe ser considerablemente mayor que la de agua para conseguir favorecer la cinética hacia la síntesis.

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

Tras la purificación de los líquidos iónicos y con el fin de mejorar el rendimiento de los mismos como medios de reacción, se han aplicado diferentes tratamientos al líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], tales como equilibración con disoluciones acuosas de sales, NaHCO<sub>3</sub> o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, o adición de una cantidad catalítica de una base orgánica, trietilamina, al medio de reacción. Entre los métodos ensayados aquel que aumentó en mayor grado la actividad y selectividad de CaLB fue elegido para extender el estudio al resto de líquidos iónicos.

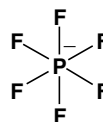
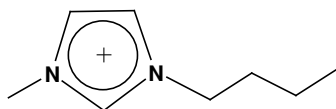
### 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.2.1. Enzima y materiales

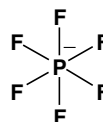
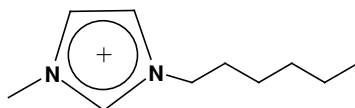
Se utilizó como biocatalizador un preparado comercial de lipasa B de *Candida antarctica* (EC 3.1.1.3) suministrado por Novo España S.A. (Madrid, España). Este preparado, de denominación comercial Lipozym<sup>®</sup> CALB L, consiste en una disolución acuosa de la enzima libre. Para su utilización, la disolución comercial de enzima se diluye 4 veces con tampón fosfato de pH=7. El preparado enzimático resultante contiene 8.5 mg/mL de proteína, según se determinó por el método de Lowry [16].

Los líquidos iónicos utilizados fueron los siguientes:

- [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]: hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio. Suministrado con una pureza del 98% por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania).

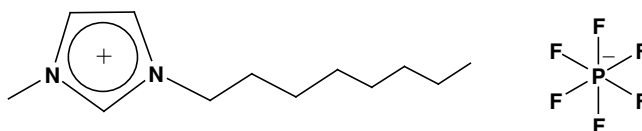


- [hmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]: hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio. Suministrado con una pureza del 98% por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania).



#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

- **[omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]** hexafluorofosfato de 1-metil-3-octilimidazolio. Suministrado con una pureza del 98% por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania).



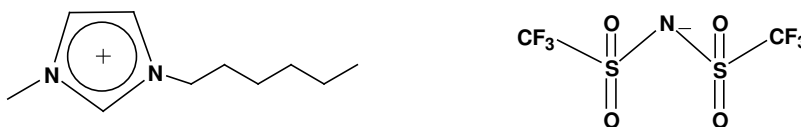
- **[emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]** bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-etil-3-metilimidazolio. Suministrado con una pureza del 99% por Strem Chemical Inc. (Bischheim, Francia).



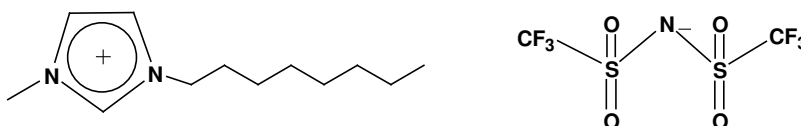
- **[bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]** bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-butil-3-metilimidazolio. Suministrado con una pureza del 98% por Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España).



- **[hmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]** bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-hexil-3-metilimidazolio. Suministrado con una pureza del 99% por Merck KgaA (Darmstadt, Alemania).



- **[omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]** bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-metil-3-octilimidazolio. Suministrado con una pureza del 99% por Merck KgaA (Darmstadt, Alemania).



Todos los líquidos iónicos se utilizaron tras una etapa previa de purificación mediante una modificación del método descrito por Park y Kazlauskas [10].

Los reactivos químicos y disolventes utilizados en este estudio fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España) y fueron de la mayor pureza disponible.

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

Los gases necesarios para el análisis de las muestras por cromatografía de gases (hidrógeno, aire sintético y nitrógeno) fueron suministrados por Abelló-Linde S.A. (Barcelona, España).

##### 4.2.2. Purificación de los líquidos iónicos

Los líquidos iónicos se sometieron a una etapa de purificación mediante una modificación del método descrito por Park y Kazlauskas [10] antes de ser utilizados como medios de reacción. Los líquidos iónicos se diluyeron con diclorometano antes de llevar a cabo la etapa de lavado con el fin de disminuir la elevada viscosidad de algunos de estos líquidos iónicos, aumentando con ello la eficiencia del lavado. Posteriormente se procedió al lavado, en primer lugar con una disolución acuosa de carbonato sódico (250 mM) y después con agua milli-Q hasta alcanzar el pH del agua milli-Q (pH 5.5), asegurando de este modo la completa eliminación del carbonato sódico. Finalmente, los líquidos iónicos se secaron sobre pentóxido de fósforo anhidro aplicando vacío y posteriormente se evaporó el diclorometano a vacío.

##### 4.2.3. Equilibración de los líquidos iónicos con disoluciones acuosas de sales

Uno de los tratamientos aplicados para mejorar la eficiencia de las reacciones enzimáticas en líquidos iónicos consistió en la equilibración del líquido iónico con una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (250 mM). En ambos casos el líquido iónico se diluyó previamente con diclorometano y posteriormente se lavó con las disoluciones de NaHCO<sub>3</sub> o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y posteriormente con agua milli-Q hasta pH neutro. El líquido iónico se secó entonces sobre pentóxido de fósforo anhidro aplicando vacío, procediendo posteriormente a la evaporación del diclorometano a vacío.

##### 4.2.4. Ensayos de actividad enzimática

En un vial de rosca de 1.5 ml se adicionaron 19.2 µL (150 µmol) de butirato de vinilo y 13.8 µL (150 µmol) de 1-butanol, y se completó el volumen de reacción hasta 500 µL con un líquido iónico (457 µL) ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [hmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [hmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]). Cuando las reacciones se llevaron a cabo en presencia de trietilamina, se añadió un 0.4% (v/v) de este compuesto al medio de reacción antes de adicionar los sustratos. El vial de reacción se sumergió entonces en un baño termostataado 30°C (**Figura 4.2**).

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

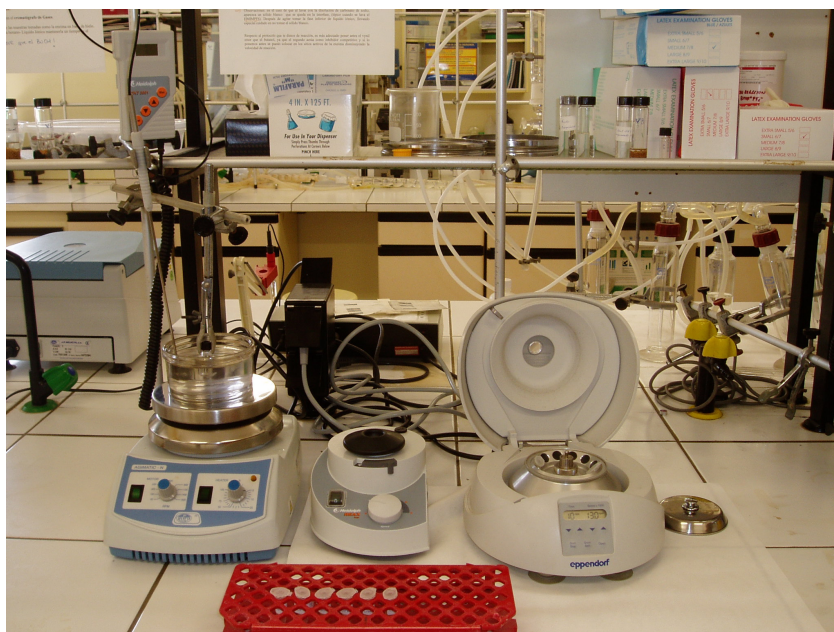


Figura 4.2. Dispositivo experimental.

La reacción comenzó adicionando 10  $\mu\text{L}$  de lipasa B *Candida antarctica* ( $8.5 \text{ mg mL}^{-1}$  en tampón fosfato 20 mM a pH 7). La mezcla de reacción permaneció agitada durante las 2 horas de ensayo y se tomaron periódicamente muestras de 15  $\mu\text{L}$ , que se adicionaron sobre 485  $\mu\text{L}$  de n-hexano. La mezcla bifásica resultante se agitó vigorosamente en un vórtex durante 2 minutos con el fin de extraer todos los sustratos y productos a la fase hexano y se centrifugó durante 1 minuto a 12.000 rpm para separar las dos fases (n-hexano y IL). Posteriormente, a 400  $\mu\text{L}$  de la fase extracto se le adicionó una disolución en n-hexano del estándar interno utilizado para el análisis (100  $\mu\text{L}$ , 30 mM), y 5  $\mu\text{L}$  de la disolución resultante se analizaron por cromatografía de gases, tal y como se describe en el apartado 4.2.5.1. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, recogiendo en la memoria los valores medios. La repetitividad de los ensayos, medida a través de la desviación estándar relativa fue  $< 3\%$ .

#### 4.2.5. Métodos analíticos

##### 4.2.5.1. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras se llevó a cabo por cromatografía de gases en un cromatógrafo Agilent 6890 N equipado con un detector de ionización en llama (FID), un inyector automático de muestras y una columna capilar Nukol<sup>TM</sup> de Supelco, cuyas especificaciones se recogen en la **Tabla 4.1**, utilizando acetato de butilo como estándar interno.

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

Tabla 4.1 Características de la columna capilar.

Columnas NUKOL™ 585701D	
Longitud: 15 m	Espesor de película: 0.50 µm
Diámetro nominal: 0.53 mm	Temperatura máxima: 200° C

En el cromatógrafo se analizan las muestras multicomponentes, de modo que los picos de cada compuesto deben aparecer con tiempos de retención bien diferenciados, optimizando el tiempo de duración del análisis. Para ello, se puede actuar sobre varias variables como la temperatura de la columna y su variación a lo largo del tiempo, el flujo del gas portador, la presión en la cabeza de la columna y la relación de *split*.

En todos los casos, la temperatura en el inyector se fijó en 190 °C, se trabajó con presión constante de 1.89 psi (51 mL /min flujo total) en la cabeza de la columna y con una relación de split de 7:9. En el detector, la temperatura fue de 220 °C y los caudales de gases en el mismo de 400 ml/min de aire sintético de laboratorio, 30 ml/min de hidrógeno y 20 ml/min de nitrógeno. La temperatura de la columna se programó en todos los casos para conseguir la correcta separación de los picos de los distintos componentes de las muestras.

Se obtuvieron rectas de calibrado de cada uno de los compuestos representando la relación entre la concentración de cada compuesto y la del estándar interno frente a la relación de áreas de los mismos. A título de ejemplo se muestra en la **Figura 4.3** la recta de calibrado de uno de los compuestos (butirato de butilo).

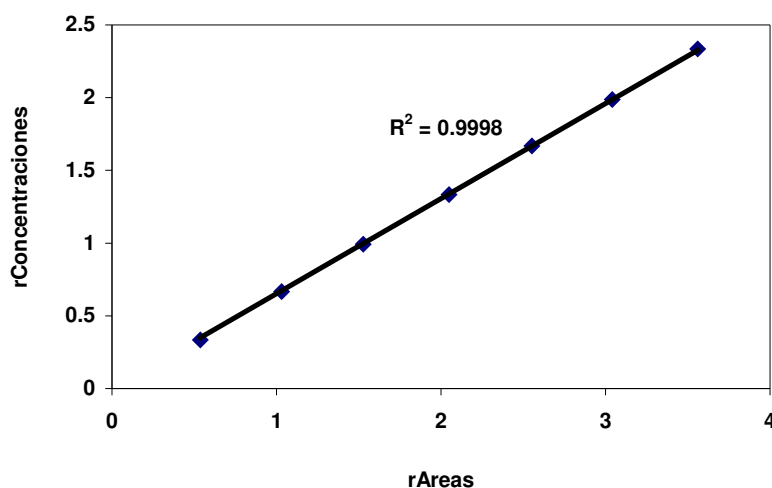


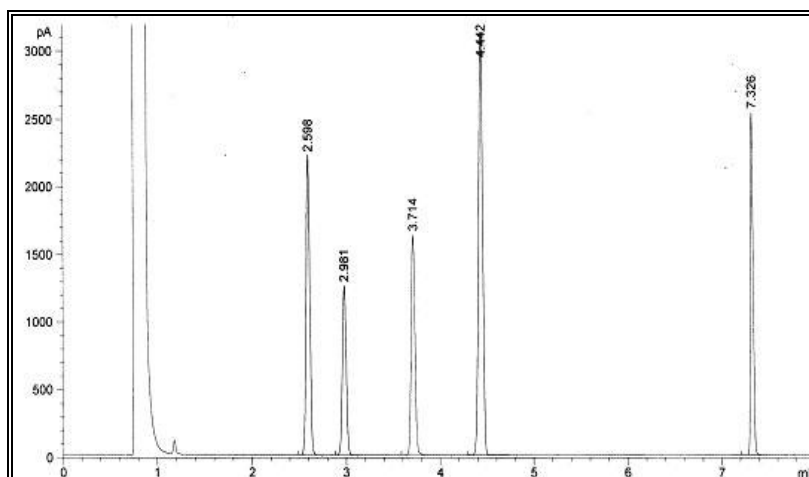
Figura 4.3. Recta de calibrado obtenida para el butirato de butilo.

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos y del valor del cociente entre el área de un determinado compuesto y el área del estándar interno, teniendo en cuenta la concentración del estándar interno y las diluciones efectuadas antes del análisis cuantitativo.

El perfil de temperatura es el siguiente: 40 °C, 1 min; 15 °C/min, 95 °C; 35 °C/min, 160°C; 2 min, 160 °C.

En la **Figura 4.4** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.



**Figura 4.4.** Cromatograma del sistema: butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: n-hexano, 0.9; butirato de vinilo, 2.6 min.; acetato de butilo (estándar interno), 3.0 min.; 1-butanol, 3.7 min.; butirato de butilo, 4.4 min.; ácido butírico, 7.34 min.

En la **Tabla 4.2** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.



#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

**Tabla 4.2.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico.

Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
BUTIRATO VINILO CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOCH=CH <sub>2</sub>	1.0913	0.9995
1-BUTANOL CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	1.4962	0.9984
BUTIRATO BUTILO CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	0.6533	0.9998
ÁCIDO BUTÍRICO CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	1.4404	0.9998

#### 4.2.5.2. Análisis de resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de <sup>19</sup>F de los líquidos iónicos se realizaron en un espectrómetro VARIAN modelo Unity 300, utilizando acetonitrilo-d<sub>1</sub> como disolvente y CFCl<sub>3</sub> como patrón interno de referencia de flúor.

#### 4.2.6. Determinación de la actividad y selectividad enzimática

La eficacia de la acción enzimática se midió a través de dos parámetros: la actividad sintética y la selectividad.

##### *Actividad sintética*

La actividad específica de la enzima se puede definir como unidades de actividad sintética por miligramo de proteína. Se define una unidad de actividad sintética como la cantidad de enzima que es capaz de realizar la síntesis de 1 μmol de éster alquílico por minuto. Así, la actividad específica se calcula a través de la siguiente expresión:

$$A_{Especifica} = \frac{m_{éster} \times 10^6 \times V_{Reaccion}}{C_{CALB} \times V_{CALB}} \quad (4.1)$$

donde:

**m<sub>éster alquílico</sub>** = factor de respuesta o pendiente inicial de la curva de síntesis de éster alquílico (mol · L<sup>-1</sup> · min<sup>-1</sup>) (**Figura 4.5**)

**C<sub>CALB</sub>** = Concentración de proteína en el preparado enzimático (mg · mL<sup>-1</sup>).

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

---

$V_{\text{CALB}}$  = Volumen de disolución de enzima utilizada ( $\mu\text{L}$ ).

$V_{\text{Reacción}}$  = Volumen total de reacción (mL)

#### Selectividad

La selectividad de la reacción se puede definir como el porcentaje de sustrato consumido que se transforma en el producto de síntesis. Empleando las pendientes iniciales de los perfiles de reacción del producto de síntesis y del producto de hidrólisis, se puede determinar la selectividad a partir de la siguiente expresión:

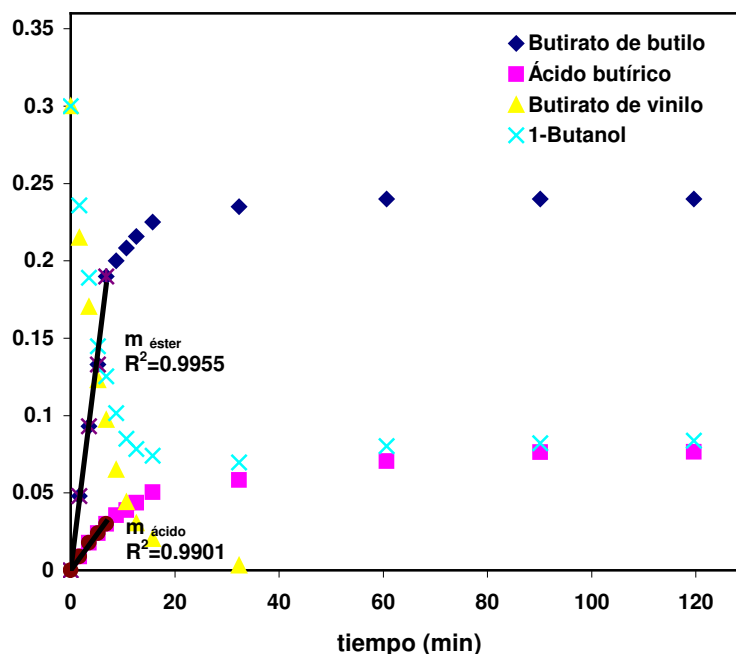
$$\text{Selectividad (\%)} = \frac{m_{\text{éster}}}{m_{\text{éster}} + m_{\text{ácido}}} \times 100 \quad (4.2)$$

donde:

$m_{\text{éster}}$  = pendiente inicial del perfil de concentración del éster alquílico ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) (ver **Figura 4.5**).

$m_{\text{ácido}}$  = pendiente inicial del perfil de concentración del ácido ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) (ver **Figura 4.5**).

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos



**Figura 4.5.** Perfiles de reacción para el producto de síntesis y el producto de hidrólisis en la reacción de transesterificación de 1-butanol con butirato de vinilo en  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  a 30°C y 2%(v/v) de contenido en agua.

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.3.1. Purificación de los líquidos iónicos

Los líquidos iónicos descritos anteriormente fueron utilizados como medios de reacción en la síntesis de butirato de butilo mediante transesterificación de butirato de vinilo con 1-butanol. En algunos de estos líquidos iónicos sin purificar las reacciones catalizadas por lipasas no tuvieron lugar o fueron muy lentas. Por este motivo se pensó que los líquidos iónicos podían contener fluoruro de hidrógeno procedente de su descomposición hidrolítica. La presencia de estas impurezas en los líquidos iónicos podría tener efectos perjudiciales para su empleo como medios de reacción en reacciones biocatalíticas. En este sentido, se ha observado que la disminución del pH en el microambiente de la enzima tiene un efecto adverso directo en la actividad enzimática. Por ello, se chequeó la presencia de fluoruro de hidrógeno en estos líquidos iónicos mediante resonancia magnética nuclear de  $^{19}\text{F}$  (acetronitrilo-d, 300 MHz). Se comprobó que los líquidos iónicos que contenían el anión hexafluorofosfato tenían tendencia a la descomposición hidrolítica, generando fluoruro de hidrógeno, tal y como se reflejó en su  $^{19}\text{F}$ -RMN, donde se observó un singlete a

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

$\delta = -150$  ppm correspondiente al flúor del fluoruro de hidrógeno. Los líquidos iónicos basados en el anión bis((trifluorometil)sulfonyl)imida resultaron mucho más estables a la hidrólisis, ya que no se detectaron impurezas de fluoruro de hidrógeno en este caso, por lo que no fue necesaria su purificación.

Con el objeto de eliminar las trazas de fluoruro de hidrógeno se aplicó una modificación del método de purificación descrito por Park y Kazlauskas [10], tal y como se describe en el apartado 4.2.2. El método de purificación desarrollado hizo posible la utilización de los líquidos iónicos como medios de reacción para la reacción de transesterificación de butirato de vinilo con 1-butanol. Los valores de actividad sintética, obtenidos de las pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones de butirato de butilo (Anexo 1, Tabla 12.1), se recogen en la **Tabla 4.3**. En esta tabla se puede observar cómo se produjo un notable aumento en la actividad sintética de la enzima libre en los líquidos iónicos purificados en relación a la observada en los líquidos iónicos comerciales sin purificar. Así, en los líquidos iónicos comerciales [hmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], CaLB mostró una actividad muy baja o nula, mientras que tras la etapa de purificación la actividad sintética aumentó hasta 57.61 U mg<sup>-1</sup> prot. en [hmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y 116.10 U mg<sup>-1</sup> prot. en [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

**Tabla 4.3.** Actividad sintética exhibida por CaLB en la síntesis de butirato de butilo a 30 °C en líquidos iónicos basados en el anión [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] antes y después del tratamiento de purificación.

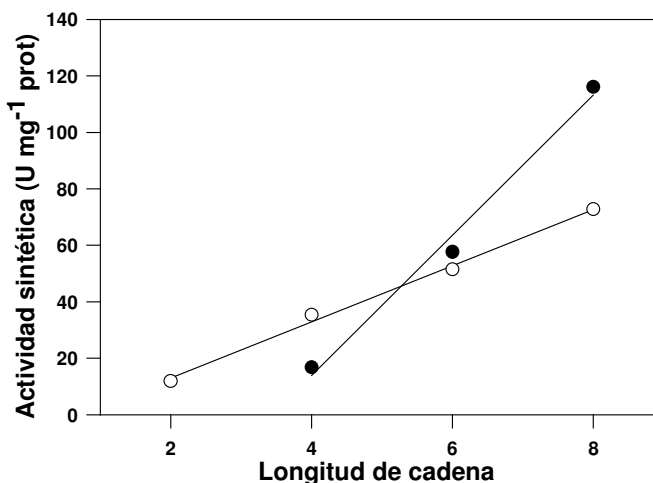
	Actividad sintética en ILs sin purificación (U mg <sup>-1</sup> prot.)	Actividad sintética en ILs tras purificación (U mg <sup>-1</sup> prot.)
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	14.02	16.74
[hmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0.08	57.61
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0	116.10

#### 4.3.2. Reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas en líquidos iónicos

La síntesis de butirato de butilo mediante transesterificación de butirato de vinilo con 1-butanol se llevó a cabo en los líquidos iónicos purificados. La Figura 4.6 muestra la actividad sintética mostrada por la lipasa B de *Candida antarctica* en los diferentes líquidos iónicos al 2% (v/v) de contenido en agua y 30°C. El contenido en agua se controló mediante un valorador Karl-Fischer. Los líquidos iónicos seleccionados para este estudio contenían distintos cationes y aniones con el fin de analizar el efecto de la composición de los mismos en la eficiencia enzimática. Las reacciones enzimáticas se llevaron también a cabo en n-hexano, un disolvente orgánico utilizado habitualmente en la síntesis de ésteres

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

en medios no convencionales [11], con el fin de comparar la eficiencia de los líquidos iónicos para su empleo como medios de reacción. Así se observó que la actividad y selectividad enzimática fue mucho más alta en estos medios que la obtenida en n-hexano (actividad sintética= 7.605 U mg<sup>-1</sup> prot.; Selectividad = 75.3 %), demostrando de este modo la mayor adecuación de estos disolventes neotéricos para la reacción propuesta.



**Figura 4.6.** Efecto de la longitud de cadena del sustituyente alquílico del anillo imidazolio del catión en los líquidos iónicos purificados basados en los aniones [PF<sub>6</sub>]<sup>-</sup> (●) y [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (○) sobre la actividad sintética de CaLB en la síntesis de butirato de butilo a 30 °C.

Para analizar el comportamiento de CaLB en reacciones de transesterificación en líquidos iónicos se consideraron dos propiedades de los disolventes, la hidrofobicidad del catión y la nucleofilicidad del anión, ya que ambas propiedades pueden influenciar la conformación activa de la enzima. Se llevó a cabo un estudio sistemático utilizando líquidos iónicos que contenían el mismo anión, [PF<sub>6</sub>]<sup>-</sup> o [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, y variando solamente la longitud de la cadena alquílica del anillo imidazolio del catión. Como se puede observar en la **Figura 4.6**, la actividad sintética aumentó gradualmente con el aumento de la longitud de cadena del catión para un mismo anión. El aumento de la longitud de cadena del catión ha sido correlacionado por Ropel et al. [17] con el aumento de la hidrofobicidad de los líquidos iónicos, medido a través de los coeficientes de reparto octanol/agua (K<sub>OW</sub>) de los mismos. Por lo tanto, el aumento observado en la actividad sintética de CaLB al aumentar la longitud de cadena del catión para un mismo anión puede ser explicado por el hecho de que el aumento de la hidrofobicidad del medio conlleva una mejor preservación de la capa de agua esencial alrededor de la enzima, reduciendo con ello las interacciones directas entre las proteínas constituyentes de las enzimas y los iones del líquido iónico [18].

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

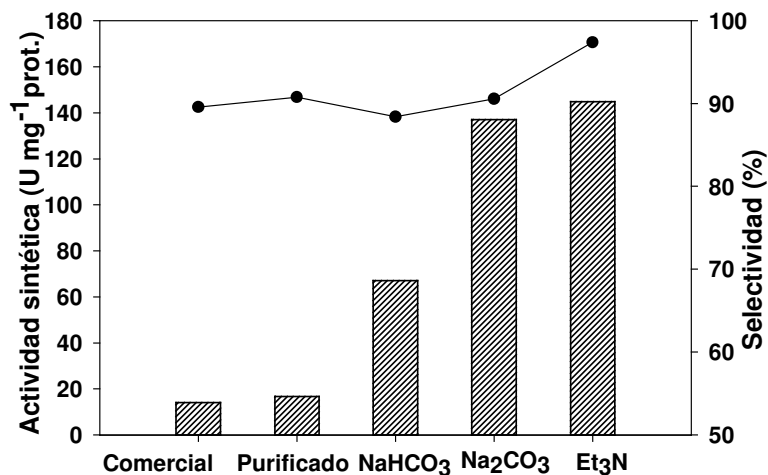
También se observó que los cationes [hmim<sup>+</sup>] y [omim<sup>+</sup>] combinados con el anión [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] conducían a mayores velocidades de reacción que aquellos basados en el mismo catión y [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (**Figura 4.6**). La nucleofilicidad de los líquidos iónicos podría explicar la tendencia observada. En este sentido, Muldoon et al. [19] determinaron la capacidad aceptora de enlaces de hidrógeno, es decir la nucleofilicidad, de una amplia variedad de líquidos iónicos basándose en la medida de la longitud de onda correspondiente a la banda de absorción d-d de menor energía de solvatación de la sal plano-cuadrada [Cu(acac)(tmen)][X] (acac=acetilacetona, tmen= N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina, X=[BPh<sub>4</sub>]). Estos autores concluyeron que la nucleofilicidad de los líquidos iónicos dependía exclusivamente del anión constituyente, estableciendo el siguiente orden de nucleofilicidad: [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]. Por lo tanto, la disminución en la nucleofilicidad de los líquidos iónicos basados en [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] podría explicar el incremento en las velocidades de reacción en estos en relación a los basados en [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], debido a la mayor tendencia de los aniones más nucleofílicos a alterar la conformación activa de la enzima mediante interacción con los centros cargados positivamente de la estructura enzimática [20-21]. Sin embargo, contrariamente a lo que cabría esperar de esta tendencia, la velocidad de reacción en [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] fue mayor que en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. Varios autores han descrito también que las lipasas son más activas en [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] que en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] [11,22].

Por otra parte, las diferencias observadas en la selectividad entre los líquidos iónicos ensayados (datos incluidos en la **Figura 4.9**) podrían atribuirse a las diferentes capacidades de los líquidos iónicos a reducir la actividad de agua (A<sub>w</sub>) en el microambiente de la enzima. En este sentido, un aumento en la hidrofiliicidad del líquido iónico generalmente implica un aumento en las moléculas de agua libres que pueden actuar como posibles nucleófilos en la reacción de transesterificación, rindiendo el producto de hidrólisis y por tanto produciendo una pérdida de selectividad.

#### 4.3.3. Efecto de diferentes tratamientos en la actividad y selectividad enzimática en reacciones de transesterificación en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]

En primer lugar, el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] se empleó como medio de reacción para ensayar diferentes tratamientos orientados a aumentar la eficiencia de la lipasa B de *Candida antarctica*. La **Figura 4.7** muestra el efecto de los diferentes tratamientos en la actividad sintética y selectividad de CaLB a 2% (v/v) de contenido en agua y 30°C. Los valores de actividad sintética y selectividad se obtuvieron de las pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones de butirato de butilo y ácido butírico (Anexo 1, Tabla 12.2).

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos



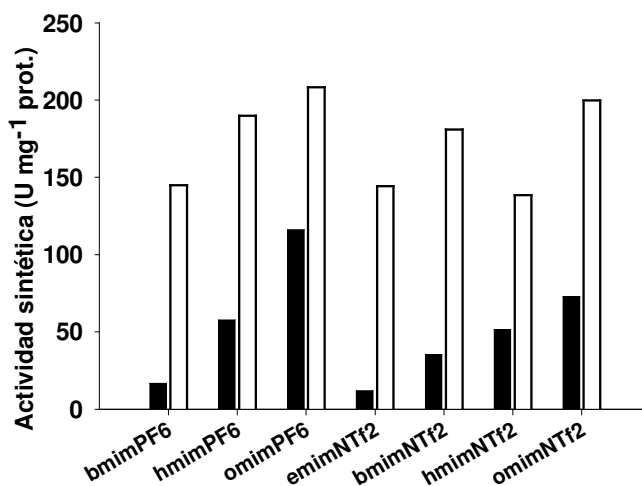
**Figura 4.7.** Efecto de diferentes tratamientos sobre el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] en la actividad sintética (barras) y selectividad (●) de CaLB en la síntesis de butirato de butilo a 2% (v/v) de contenido en agua y 30°C.

Uno de estos tratamientos consistió en la equilibración del líquido iónico con una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, como se describió en el apartado 4.2.3. La actividad sintética mostrada por CaLB en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] tras su equilibración con NaHCO<sub>3</sub> fue cuatro veces mayor que la obtenida para la misma reacción en este líquido iónico purificado como se describió anteriormente. Los resultados fueron incluso mejores cuando la equilibración se llevó a cabo con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, siendo en este caso la actividad sintética ocho veces superior. Estas observaciones hacen intuir que la mejora en las velocidades de reacción en estos casos pueden ser debidas a la presencia de pequeñas trazas de tampón en el líquido iónico. Los mejores resultados se obtuvieron con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> probablemente debido a la mayor basicidad de esta sal. La selectividad no se vió afectada de forma importante en ningún caso.

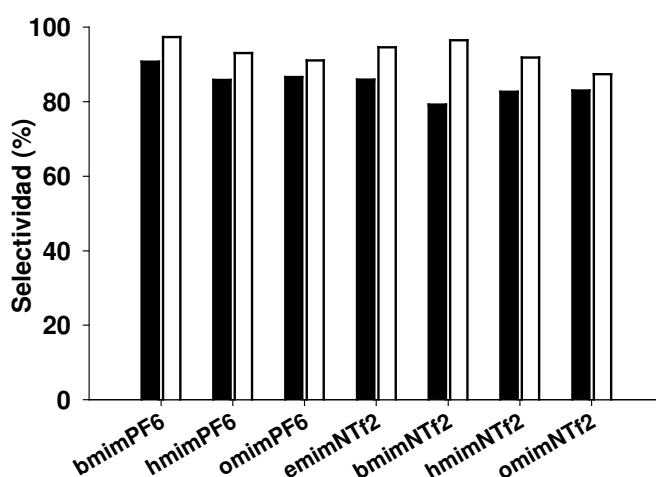
Otra forma alternativa de mejorar la actividad y/o selectividad de CaLB en estos medios es mediante el uso de aditivos. Ciertas bases orgánicas no reactivas han resultado altamente beneficiosas en su empleo como aditivos en medios no convencionales de reacción, aumentando notablemente la actividad catalítica y (enantio)selectividad de las enzimas [23]. Así, cuando se analizó el efecto de una cantidad catalítica de trietilamina (0.4% v/v) en el medio de reacción se comprobó que este aumentaba notablemente la actividad en relación a la misma reacción en ausencia de aditivo. Este efecto puede ser explicado por el hecho de que la trietilamina podría actuar como agente neutralizante, eliminando las trazas de ácidos carboxílicos generadas por reacciones secundarias indeseadas de hidrólisis del éster, lo que protegería a la enzima de la desactivación. Además, el parámetro de selectividad de la reacción fue notablemente mayor en presencia de la cantidad catalítica de trietilamina.

**4.3.4. Efecto de la adición de una cantidad catalítica de trietilamina en la actividad y selectividad enzimática en reacciones de transesterificación en líquidos iónicos**

Dado que la adición de una cantidad catalítica de trietilamina en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] fue la forma más eficiente de aumentar la actividad y selectividad de CaLB, se aplicó este tratamiento al resto de líquidos iónicos: [hmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [hmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] and [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]. En las **Figuras 4.8** y **4.9** se compara la actividad sintética y la selectividad, respectivamente, de las reacciones llevadas a cabo en líquidos iónicos con y sin trietilamina. Los valores de actividad sintética y selectividad se obtuvieron de las pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones de butirato de butilo y ácido butírico (Anexo 1, Tabla 12.3).



**Figura 4.8.** Actividad sintética mostrada por CaLB en la síntesis de butirato de butilo en líquidos iónicos en presencia (barras blancas) y ausencia (barras negras) de trietilamina a 30 °C.



**Figura 4.9.** Selectividad mostrada por CaLB en la síntesis de butirato de butilo en líquidos iónicos en presencia (barras blancas) y ausencia (barras negras) de trietilamina a 30 °C.



#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

---

Como se desprende de las figuras anteriores, se encontró un notable aumento de los valores de actividad catalítica y selectividad de la lipasa en presencia de la cantidad catalítica de trietilamina en todos los líquidos iónicos ensayados, observándose el mayor aumento para [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], cuya actividad aumentó doce veces. En este caso, la selectividad también mostró un notable aumento, de 86% a 95%. En general, los valores de actividad y selectividad para los líquidos iónicos mostraron la misma tendencia que en ausencia de aditivos. La actividad sintética aumentó con el aumento de la longitud de cadena del catión para un mismo anión ([PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] o [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]). Además, se obtuvieron mayores valores de actividad con los líquidos iónicos basados en el anión [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], para un mismo catión.

#### 4.4. CONCLUSIONES

Los líquidos iónicos basados en cationes 1-alkil-3-metilimidazolio en combinación con aniones hexafluorofosfato y bis(trifluorometilsulfonil)imida han mostrado ser excelentes medios para la síntesis de ésteres mediante reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas, en condiciones de bajo contenido en agua, en relación a disolventes orgánicos convencionales como n-hexano.

Se ha analizado el efecto de diferentes tratamientos en el medio de reacción sobre la actividad sintética y selectividad enzimática utilizando la lipasa B de *Candida antarctica* como biocatalizador y el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] como disolvente, observándose un aumento notable en todos los casos de la actividad sintética. La adición de una cantidad catalítica de una base no reactiva, trietilamina, resultó el tratamiento más adecuado para el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], aumentando incluso la selectividad de la reacción. Este aditivo fue utilizado para extender el estudio a toda una serie de líquidos iónicos, consiguiendo un notable aumento en la actividad y selectividad enzimática en todos los casos.

Estos resultados confirman el enorme potencial del empleo de cantidades catalíticas de una base no reactiva, como trietilamina, en reacciones enzimáticas en líquidos iónicos, que haría posible reducir los tiempos de reacción y conseguir de este modo procesos enzimáticos más eficientes.

#### 4.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.M. Klibanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature* 409 (2001) 241-246.
- [2] S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO<sub>2</sub> systems, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.
- [3] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Villora, A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B:Environmental* 67 (2006) 121-126.
- [4] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, M. Rubio, D. Gómez, G. Villora, Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 190-195.
- [5] M. Kosmulski, J. Gustafsson, J.B. Rosenholm, Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited, *Thermochim. Acta* 412 (2004) 47-53.
- [6] J.M. Pringle, J. Golding, K. Baranyai, C.M. Forsyth, G.B. Deacon, J.L. Scott, D.R. MacFarlane, The effect of anion fluorination in ionic liquids-Physical properties of a range of bis(methanesulfonyl)amide salts, *New J. Chem.* 27 (2003) 1504-1510.
- [7] R.M. Lau, F. van Rantwijk, K.R. Seddon, R.A. Sheldon, Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Org. Lett.* 2 (2000) 4189-4191.
- [8] A. Ruiz, A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, M.H.A. Janssen, R. Schoevaart, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, A cross-linked enzyme aggregate of *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1095-1099.
- [9] S.J. Nara, J.R. Harjani, M.M. Salunkhe, Lipase-catalyzed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 2979-2982.
- [10] S. Park, R.J. Kazlauskas, Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8395-8401.
- [11] M. Persson, U.T. Bornscheuer, Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 22 (2003) 21-27.

#### 4. Aumento de la actividad y selectividad de CaLB en ILs mediante el uso de aditivos

---

- [12] K.R. Seddon, A. Stark, M.J. Torres, Influence of chloride, water, and organicsolvents on the physical properties of ionic liquids, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 2275-2287.
- [13] F. Thiel, Enhancement of selectivity and reactivity of lipases by additives, *Tetrahedron* 56 (2000) 2905-2919.
- [14] M. Quiros, M-C. Parker, N.J. Turner, Tuning lipase enantioselectivity in organic media using solid-state buffers, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 5074-5079.
- [15] E. García-Urdiales, F. Rebolledo, V. Gotor, Kinetic resolution of (+/-)-1-phenylbutan-1-ol by means of CaLB-catalyzed aminolyses: A study on the role of the amine in the alcohol resolution, *Adv. Synth. Catal.* 343 (2001) 646-654.
- [16] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [17] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [18] Y. Yuan, S. Bai, Y. Sun, Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of ( $\pm$ )-menthol in ionic liquids and organic solvents, *Food Chem.* 97 (2006) 324-330.
- [19] M.J. Muldoon, C.M. Gordon, I.R. Dunkin, Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes, *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 2* (2001) 433-435.
- [20] T. De Diego, P. Lozano, S. Gmough, M. Vaultier, J.L. Iborra, Understanding structure-stability relationship of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *Biomacromol.* 6 (2005) 1457-1464.
- [21] R.M. Lau, M.J. Sorgedraeger, G. Carrea, F. van Rantwijk, Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: Effects on structure and activity, *Green Chem.* 6 (2004) 483-487.
- [22] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzyme catalysis in ionic liquids II: Lipase catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* 5 (2001) 425-426.
- [23] L. Zheng, S. Zhang, Y. Xiaoqi, L. Zhao, G. Gao, X. Yang, H. Duan, S. Cao, Enhancement of the enantioselectivity in lipase-catalyzed resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine by additives, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 38 (2005) 17-23.



# 5

**Desarrollo de un nuevo derivado  
enzimático de lipasa B de *Candida  
antarctica* activo en líquidos iónicos  
desnaturalizantes**



**5. DESARROLLO DE UN NUEVO DERIVADO ENZIMÁTICO DE LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* ACTIVO EN LÍQUIDOS IÓNICOS DESNATURALIZANTES**

**5.1. INTRODUCCIÓN**

La actividad catalítica de la enzima lipasa B de *Candida antarctica* se ve notablemente disminuida con el empleo de líquidos iónicos miscibles con agua que originan la desnaturalización de la misma [1,2]. Por ello, se consideró la posibilidad de estabilizar la enzima mediante inmovilización enzimática.

La inmovilización es uno de los métodos más comúnmente empleados para estabilizar biocatalizadores [3,4]. Además, el uso de enzimas inmovilizadas es muy ventajoso a nivel industrial ya que permite reducir los costes asociados a los procesos biocatalíticos, al permitir una separación del biocatalizador más eficiente y facilitar su reciclaje y reutilización [5,6].

Las técnicas de inmovilización enzimática son diversas y variadas. Comúnmente se ha llevado a cabo la inmovilización enzimática en soportes sólidos mediante adsorción física o enlace covalente. Sin embargo, en los últimos años ha habido un creciente interés en el desarrollo de técnicas de inmovilización enzimáticas que reduzcan o eliminen el uso de soportes. Entre estas técnicas cabe destacar la inmovilización por agentes de entrecruzamiento.

La inmovilización por agentes de entrecruzamiento se basa en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de enzima, mediante reactivos bifuncionales o multifuncionales que dan lugar a la formación de agregados tridimensionales entrecruzados totalmente insolubles en agua. Uno de los agentes entrecruzantes más populares es el glutaraldehído, cuyos grupos funcionales son capaces de reaccionar con los grupos amino libres de las enzimas, mediante la formación de bases de Schiff. Un procedimiento mixto de inmovilización consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional. Actualmente los métodos más novedosos de inmovilización por entrecruzamiento son la inmovilización de enzimas en forma de cristales entrecruzados covalentemente (cross-linked enzyme crystals, CLECs) [7-9], la inmovilización de enzimas en disolución entrecruzadas covalentemente (cross-linked dissolved enzymes, CLEs) [10,11] y la inmovilización de enzimas como agregados entrecruzados covalentemente (cross-linked enzyme aggregates CLEAs) [12].

## 5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes

Estas nuevas técnicas de inmovilización presentan unas ventajas muy claras sobre las tradicionales:

- Poseen una alta concentración de actividad enzimática. Se evita de este modo la “dilución de la actividad” enzimática que se produce en la inmovilización sobre soportes como consecuencia de las elevadas proporciones de soporte utilizadas (90% a 99.9%) [13].
- Poseen una elevada estabilidad.
- Los costes de producción son menores al eliminar el coste adicional del soporte.

En este capítulo se ha desarrollado un nuevo derivado enzimático entrecruzado de lipasa B de *Candida antarctica* y se ha evaluado su comportamiento en líquidos iónicos miscibles con agua con el fin de comprobar si este tipo de inmovilización enzimática hace posible el mantenimiento de la actividad enzimática ante el efecto desnaturalizante de estos líquidos iónicos.

Los líquidos iónicos empleados para este estudio están basados en el catión 1-butil-3-metilimidazolio y los aniones dicianamida, nitrato, acetato y lactato (Figura 5.1).

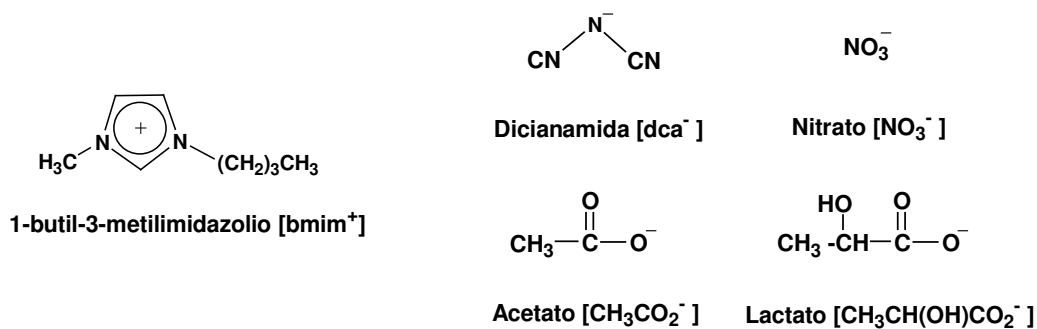


Figura 5.1. Iones constituyentes de los líquidos iónicos estudiados.

Se ha utilizado la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol y de *rac*-1-feniletilamina (Figura 5.2) como reacciones modelo para este estudio.



## 5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes

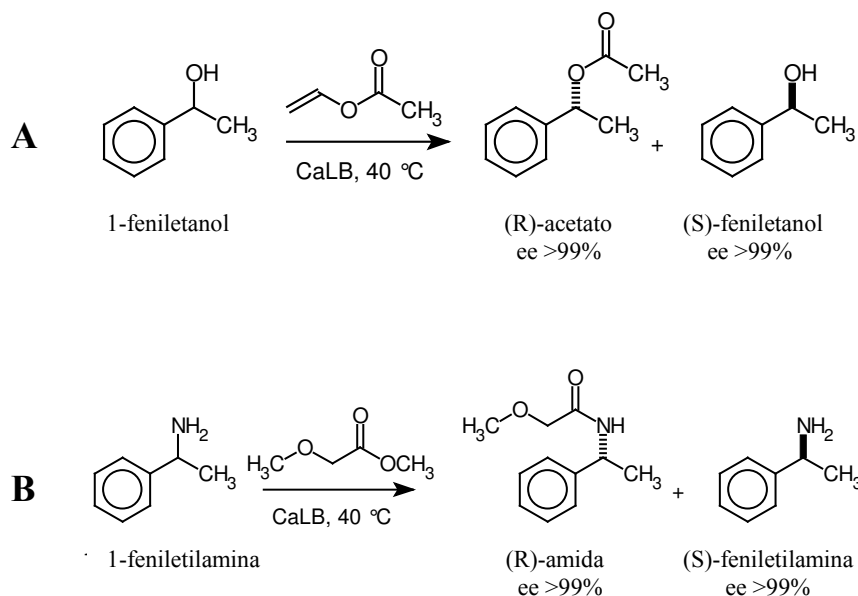


Figura 5.2. Resolución cinética de *rac*-1-feniletanol (A) y de *rac*-1-feniletilamina (B).

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. Enzima y materiales

La enzima lipasa B de *Candida antarctica* (Lipozym<sup>®</sup> CaLB L) fue suministrada por Novozymes (Bagsværd, Dinamarca).

Los reactivos 1-butanol, butirato de etilo y 1,2-dimetoxibenceno y la resina de intercambio aniónico Dowex 1X8-200 fueron suministrados por Acros Organics (Geel, Bélgica).

El soporte Accurel EP 100 (polipropileno microporoso) se obtuvo de Membrana GmbH (Wuppertal, Alemania). La zeolita KA (polvo) fue suministrada por Sigma-Aldrich Chemie B.V. (Zwijndrecht, Holanda) y fue activada a 400 °C antes de su uso. Los disolventes *tert*-butil metil eter (TBME) de grado HPLC y *tert*-butil alcohol fueron suministrados por Acros Organics (Geel, Bélgica) y Riedel-de Haën (Seelze, Alemania), respectivamente, y se secaron sobre zeolita NaA activada (Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, Holanda) antes de su uso.

## 5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes

### 5.2.2. Preparación de derivados enzimáticos entrecruzados de lipasa B de *Candida antarctica* [14]

A temperatura ambiente, la enzima (Lipozym CaLB L) (10 mL) se adicionó sobre el soporte Accurel EP100 (1 g), el cual previamente había sido lavado con 2-propanol y agua. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se adicionó 2-propanol (30 mL). Tras agitar durante 5 minutos, se añadió una disolución de glutaraldehído (25%, 1.5 mL, 100 mM concentración final) y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El derivado enzimático entrecruzado obtenido (CALB-PP CLEA) se decantó, se lavó tres veces con agua y se colocó sobre un tamiz metálico de 150 mm. Posteriormente se secó con acetona y éter dietílico. Rendimiento: 1.3 g (contenido en proteínas del 41%), actividad: 36 kU/g.

### 5.2.3. Síntesis de líquidos iónicos

*Cloruro 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]*: se hizo reaccionar 1-metilimidazolio (98 g, 1.19 mol) con 1-clorobutano (131.00 g, 1.42 mol) a 80 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 5 días (**Figura 5.3**). El exceso de 1-clorobutano se eliminó por evaporación en rotavapor rindiendo un líquido iónico viscoso con una ligera coloración amarilla (208.6 g, 100%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 0.96 (t, 3H), 1.38 (q, 2H), 1.94 (m, 2H), 4.16 (s, 3H), 4.39 (t, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 10.52 (s, 1H). <sup>13</sup>C RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 13.47, 19.38, 32.15, 36.68, 49.72, 122.43, 123.91, 136.93.



**Figura 5.3.** Dispositivo experimental utilizado en la síntesis de [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]

## 5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes

*Dicianamida de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim<sup>+</sup>][dca<sup>-</sup>]:* [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] (100.9 g, 0.58 mol) se disolvió en acetona (100 mL) y se añadió dicianamida de sodio (53.6 g, 0.6 mol). La mezcla se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente, después de mantuvo a -20 °C durante 1 día y se filtró. El filtrado fue evaporado en el rotavapor, rindiendo un líquido iónico con una ligera coloración amarilla (109.2 g, 92%). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 0.99 (t, 3H), 1.41 (m, 2H), 1.92 (m, 2H), 4.03 (s, 3H), 4.26 (t, 2H), 7.50 (m, 2H), 9.17 (s, 1H). Este producto contenía 1440 ppm de cloruros de acuerdo con el análisis realizado por cromatografía iónica. La purificación mediante cromatografía en columna sobre alúmina activa permitió reducir el contenido a 660 ppm.

*Nitrato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim<sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]:* se empaquetó una columna con 250 g de resina de intercambio aniónico, Dowex 1X8-200, y se eluyó cuidadosamente con una disolución 1 M de nitrato sódico (0.5 L) y después con agua Milli-Q. Posteriormente se disolvió [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] (17.5 g, 0.1 mol) en agua Milli-Q (200 mL) y la disolución resultante se hizo pasar lentamente a través de la columna y se eluyó con agua Milli-Q (1 L). Se recogió el eluido y se concentró a presión reducida. El residuo se dejó secar a vacío en una atmósfera de pentóxido de fósforo. El [bmim<sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] se obtuvo con un rendimiento casi cuantitativo y contenía <10 ppm de cloruros de acuerdo con el test del cromato de plata que se describe en el apartado 5.2.5.2. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 0.94 (t, 3H), 1.36 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 4.01 (s, 3H), 4.25 (t, 2H), 7.52 (m, 2H), 9.78 (s, 1H).

*Acetato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim<sup>+</sup>][CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>]* se preparó por intercambio iónico del mismo modo que el [bmim<sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] y se obtuvo con un rendimiento casi cuantitativo. El producto contenía <10 ppm de cloruros de acuerdo con el test del cromato de plata que se describe en el apartado 5.2.5.2. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 0.95 (t, 3H), 1.36 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.94 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 4.29 (t, 2H), 7.45 (m, 3H).

*Lactato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim<sup>+</sup>][CH<sub>3</sub>CH(OH)CO<sub>2</sub><sup>-</sup>]* se empaquetó una columna con 250 g de una resina de intercambio aniónico, Dowex 1X8-200, y se eluyó cuidadosamente con una disolución 1 M de lactato sódico (0.5 L) y después con agua Milli-Q. Posteriormente se disolvió [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] (17.5 g, 0.1 mol) en agua Milli-Q (200 mL) y la disolución resultante se hizo pasar lentamente a través de la columna y se eluyó con agua Milli-Q (1 L). Se recogió el eluido y se concentró a presión reducida. El residuo se dejó secar a vacío en una atmósfera de pentóxido de fósforo. El [bmim<sup>+</sup>][CH<sub>3</sub>CH(OH)CO<sub>2</sub><sup>-</sup>] se obtuvo con un rendimiento casi cuantitativo y contenía <10 ppm de cloruros de acuerdo con el test del cromato de plata descrito en el apartado 5.2.5.2. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 0.95 (t, 3H), 1.40 (m, 5H), 1.87 (m, 2H), 4.98 (m, 1H), 4.05 (s, 3H), 4.28 (m, 2H), 4.72 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 10.56 (s, 1H).

## 5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes

### 5.2.4. Ensayos de actividad enzimática

*Resolución cinética de rac-1-feniletanol.* En un vial de rosca de 2 ml se adicionan 18.3 mg (0.15 mmol) de 1-feniletanol, 25.8 mg (27.7  $\mu\text{L}$ , 0.3 mmol) de acetato de vinilo y 8  $\mu\text{L}$  de 1,2-dimetoxibenceno (estándar interno) que se disuelven en el medio de reacción (1.45 mL). Se adicionan a la mezcla de reacción 75 mg de zeolita KA activada (polvo). La reacción comienza adicionando 11.6 mg (40.5 U) de CaLB-PP CLEA. La mezcla de reacción permanece a 40°C con agitación durante 2 horas y periódicamente se toman muestras de 15  $\mu\text{L}$  del medio de reacción, que se adicionan sobre 600  $\mu\text{L}$  de n-hexano. La mezcla bifásica resultante se agita vigorosamente en un vórtex durante 1 minuto con el fin de extraer todos los sustratos y productos a la fase hexano y se centrifuga durante 1 minuto a 12,000 rpm para separar las dos fases. 5  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se analizan por cromatografía de gases, tal y como se describe en el apartado 5.2.5.3.

*Resolución cinética de rac-1-feniletilamina.* En un vial de rosca de 2 ml se adicionan 10  $\mu\text{L}$  (77.5  $\mu\text{mol}$ ) de 1-feniletilamina, 15  $\mu\text{L}$  (0.151 mmol) de metoxiacetato de metilo y 12.9 mg de 1,2,3-trimetoxibenceno (estándar interno) que se disuelven en el medio de reacción (1.475 mL). Se adicionan a la mezcla de reacción 75 mg de zeolita KA activada (polvo). La reacción comienza adicionando 81 U de CaLB-PP CLEA. La mezcla de reacción permanece a 40°C con agitación durante 2 horas y periódicamente se toman muestras de 15  $\mu\text{L}$  del medio de reacción, que se adicionan sobre 600  $\mu\text{L}$  de TBME (*tert*-butilmetileter). La mezcla bifásica resultante se agita vigorosamente en un vórtex durante 1 minuto y se centrifuga durante 1 minuto a 12,000 rpm para separar las dos fases. A una muestra de 5  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se adicionan 3 gotas de anhídrido trifluoroacético. La mezcla resultante se calienta a 40 °C durante 15 min y se añade etanol (3 gotas). La mezcla se concentra a vacío, se diluye con n-hexano y se analiza mediante cromatografía de gases, tal y como se describe en el apartado 5.2.5.3.

En ambos casos, la eficacia de la acción catalítica se midió a través de tres parámetros, la actividad sintética, la selectividad y la enantioselectividad. Se define una unidad de *actividad sintética* como la cantidad de enzima que es capaz de realizar la síntesis de 1  $\mu\text{mol}$  del éster correspondiente por minuto (ver apartado 4.2.6). La *selectividad* de la reacción tiene en cuenta la reacción competitiva de hidrólisis y se define como el porcentaje de sustrato consumido que se transforma en el producto de síntesis (ver apartado 4.2.6). La *enantioselectividad* se expresa a través del exceso enantiomérico del sustrato (*e.e.<sub>S</sub>*) y de la relación enantiomérica (E), que se determinan a través de las siguientes expresiones:

$$e.e._S(\%) = [(S - R)/(S + R)] \times 100 \quad (5.1)$$

## 5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes

$$E = [\ln \{(1 - C)(1 - e.e.s)\}] / [\ln \{(1 - C)(1 + e.e.s)\}] \quad (5.2)$$

donde R y S representan la concentración de cada una de las formas enantioméricas del sustrato y C el grado de conversión del mismo.

### 5.2.5. Métodos analíticos

#### 5.2.5.1. Análisis de resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los líquidos iónicos sintetizados se realizaron en los espectrómetros VARIAN modelo Unity 300 y VARIAN modelo Inova 400, utilizando cloroformo- $\text{d}_1$  como disolvente y tetrametilsilano ( $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ) como patrón interno de referencia de protón y carbono.

#### 5.2.5.2. Test de determinación de cloruros

El contenido de cloruros en los líquidos iónicos se determinó por un test con cromato de plata. Para ello, una disolución acuosa de cromato potásico (5g/L, 27 mM, indicador) se adicionó sobre una muestra de líquido iónico y la mezcla se valoró con una disolución de nitrato de plata (0.24 g/L, 1.4 mM). El punto final de la valoración se alcanzó cuando se observó la aparición de un precipitado rojo persistente. El límite de detección de este método es aprox. de 100 nmol  $\text{Cl}^-$ .

#### 5.2.5.3. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras de reacción se llevó a cabo por cromatografía de gases en dos cromatógrafos Hewlett-Packard 5890A y Shimadzu 2010 equipados con un detector de ionización en llama (FID), un inyector automático de muestras y una columna capilar Chirasil-Dex CB (25 m x 0.32 mm) de Varian Inc.

*Resolución de 1-feniletanol:* El perfil de temperatura es una isoterma a 110 °C. Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: acetato de (S)-1-feniletilo, 5.3 min; 1,2-dimetoxibenceno (estándar interno), 5.7 min; acetato de (R)-1-feniletilo, 6.4 min; (R)-1-feniletanol, 9.7 min; (S)-1-feniletanol, 10.7 min. Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos, las cuales se muestran en la **Tabla 5.1**.

## 5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes

**Tabla 5.1.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema de reacción: (S)-1-feniletanol, (R)-1-feniletanol, acetato de (S)-1-feniletilo y acetato de (R)-1-feniletilo.

Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
(S)-1-FENILETANOL	45.853	0.9987
(R)-1-FENILETANOL	45.610	0.9911
ACETATO DE (S)-1-FENILETILO	36.207	0.9939
ACETATO DE (R)-1-FENILETILO	36.309	0.9953

*Resolución de 1-feniletilamina:* El perfil de temperatura es el siguiente: 40 min, 75 °C; 10 °C/min, 120 °C; 40 min, 120 °C; 10 °C/min, 180 °C. Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: (S)-1-feniletilamina, 35.3 min; (R)-1-feniletilamina, 37.1 min; 1,2,3-trimetoxibenceno (estándar interno), 40 min; (R)-1-feniletilamida, 54.6 min; (S)-1-feniletilamida, 56.4 min. Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos, las cuales se muestran en la **Tabla 5.2**.

**Tabla 5.2.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema de reacción: (S)-1-feniletilamina, (R)-1-feniletilamina, (S)-1-feniletilamida y (R)-1-feniletilamida.

Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
(S)-1-FENILETILAMINA	1.643	0.9958
(R)-1-FENILETILAMINA	2.024	0.9961
(S)-1-FENILETILAMIDA	0.787	0.9991
(R)-1-FENILETILAMIDA	0.791	0.9909

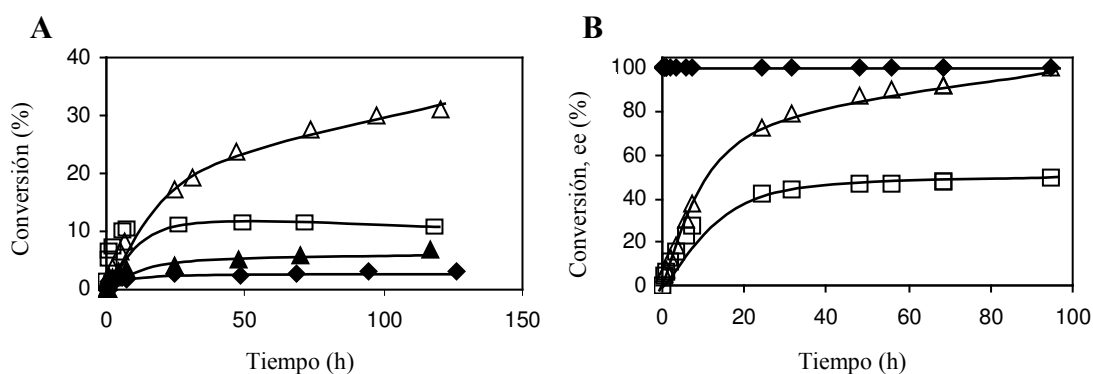
### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.3.1. Resolución de *rac*-1-feniletanol

En primer lugar, el derivado enzimático obtenido (CLEA-PP) se utilizó para la acilación enantioselectiva de *rac*-1-feniletanol con acetato de vinilo (ver **Figura 5.2A**). Cuando la reacción se llevó a cabo en alcohol *tert*-butílico, la reacción fue rápida (velocidad inicial de  $260 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g proteína})^{-1}$ ) y altamente enantioselectiva, con una relación enantiomérica  $E > 500$ .

La resolución cinética de *rac*-1-feniletanol ha sido llevada a cabo satisfactoriamente en líquidos iónicos inmiscibles con agua, tales como  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ , con velocidades de reacción y enantioselectividades comparables e incluso superiores a las obtenidas en disolventes orgánicos convencionales [15,16].

De los líquidos iónicos miscibles con agua ensayados, la reacción tuvo lugar satisfactoriamente en  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ , aunque fue más lenta que en el alcohol *tert*-butílico. La reacción fue inicialmente más rápida en  $[\text{bmim}^+][\text{acetato}^-]$  ( $47 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g proteína})^{-1}$ ), pero en este medio, así como en  $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{lactato}^-]$ , la reacción se paralizó después del 3-11% de conversión (ver **Figura 5.4A**). La velocidad inicial en  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$  fue de  $24 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g proteína})^{-1}$ . La concentración de enzima se aumentó a 68 U/mL para obtener un 50% de conversión en un tiempo razonable (**Figura 5.4B**). Merece la pena destacar que la enantioselectividad permaneció casi cuantitativa.



**Figura 5.4.** Resolución cinética de 1-feniletanol (0.1 M); A: Perfil de reacción en  $[\text{bmim}^+][\text{lactato}^-]$  (♦),  $[\text{dicianimida}^-]$  (▲),  $[\text{acetato}^-]$  (□) y  $[\text{nitrato}^-]$  (Δ) en presencia de CaLB-PP (27 U/mL); B: en  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ , progreso (□) y e.e. del alcohol (Δ) y del éster (♦) con 68 U/mL of CaLB-PP.

### 5.3.2. Resolución de *rac*-1-feniletilamina

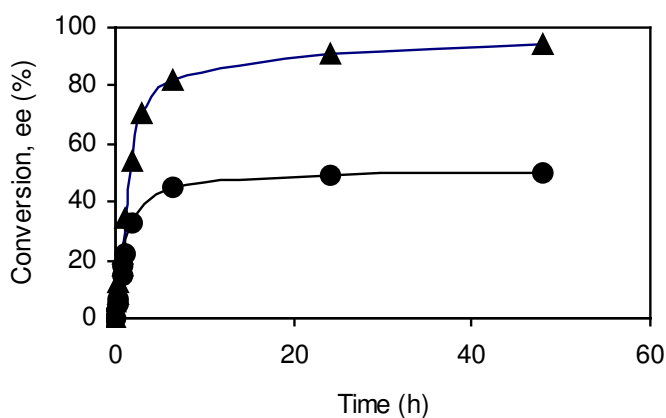
La acilación enantioselectiva de aminas quirales, como 1-feniletilamina (**Figura 5.2B**), se ha extendido rápidamente desde la escala de laboratorio [17] hasta procesos industriales [18]. La resolución de esta amina en concreto se ha conseguido bajo una gran variedad de condiciones, incluyendo en medios líquido iónico [19]. Para este estudio se ha seleccionado como dador de acilo el 2-metoxiacetato de metilo debido a su elevada velocidad de reacción [20,21]. Se comprobó además que no tenía lugar la acilación no enzimática con las concentraciones de sustratos utilizadas.

El derivado enzimático obtenido (CaLB-PP) resultó ser un eficiente biocatalizador de la acilación enantioselectiva de 1-feniletilamina. La velocidad inicial en *tert*-butil metil eter (TBME) fue de  $1.45 \text{ mmol min}^{-1} (\text{g proteína})^{-1}$  y se consiguió un 50 % de conversión a las 24 h empleando una relación proteína/reactantes de aproximadamente 0.12 g/g. La pureza enantiomérica de la amina no convertida (e.e.<sub>s</sub> = 95%) se corresponde con un  $E = 140$ . En alcohol *tert*-butílico la reacción fue más de diez veces más lenta y la carga enzimática tuvo que ser aumentada cuatro veces, pero la enantioselectividad se mantuvo constante.

La resolución de 1-feniletilamina se llevó a cabo también en la serie de líquidos iónicos mencionados anteriormente. En  $[\text{bmim}^+][\text{acetato}^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{lactato}^-]$  la reacción no progresó después de un 15% de conversión, como ocurrió anteriormente con la resolución cinética de 1-feniletanol. Sin embargo, se consiguió una conversión completa (50%) en  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$  con la misma cantidad de enzima que había sido utilizada con alcohol *tert*-butílico. La mayor velocidad de reacción se obtuvo en  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ ; aunque la reacción fue mucho más lenta inicialmente que en alcohol *tert*-butílico ( $30 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g proteína})^{-1}$ ), se mantuvo mejor y se consiguió alcanzar conversión completa a un tiempo de reacción más corto (ver **Figura 5.5**). El exceso enantiomérico de la amina no convertida fue de  $ee_s = 94\%$ , que se corresponde con una relación enantiomérica de  $E = 95$ .



## 5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes



**Figura 5.5.** Resolución de 1-feniletilamina (52 mM) en  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$  catalizada por CaLB-PP (54 U/mL); conversión (●), ee de 1-feniletilamina (▲).

### 5.4. CONCLUSIONES

Se ha obtenido un derivado enzimático de CaLB mediante absorción y entrecruzamiento covalente de la enzima sobre un soporte de polipropileno (CaLB-PP) que permite llevar a cabo la acilación enantioselectiva de 1-feniletanol y 1-feniletilamina con enantioselectividades muy altas, tanto en disolventes orgánicos convencionales como en el líquido iónico  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ .

A la vista de los resultados obtenidos, la inmovilización enzimática por agentes de entrecruzamiento se revela como una técnica de inmovilización prometedora para obtener derivados enzimáticos que mantengan su actividad en líquidos iónicos desnaturalizantes.

### **5.5. BIBLIOGRAFÍA**

- [1] R.A. Sheldon, R. Madeira Lau, M.J. Sorgedragar, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, Biocatalysis in ionic liquids, *Green Chem.* 4 (2002) 147-151.
- [2] R. Madeira Lau, M.J. Sorgedragar, G. Carrea, F. Van Rantwijk, F. Secundo, R.A. Sheldon, Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: Effects on structure and activity, *Green Chem.* 6 (2004) 483-487.
- [3] A. Illanes, Stability of biocatalysts, *Electronic. J. Biotechnol.* 2 (1999) 7-15.
- [4] J.M.S. Cabral, J.F. Kennedy, Immobilisation techniques for altering thermal stability of enzymes, *Thermostability of enzymes*, Berlin: Springer Verlag, Alemania, 1993, 163-179.
- [5] K. Mosbach, *Immobilised enzymes and cells (Part B)*, *Methods of enzymology*, Academic Press, Nueva York, EEUU, 1987.
- [6] W. Hartmeier, *Immobilised biocatalysts*, Berlin: Springer-Verlag, Alemania, 1988.
- [7] F.A. Quioco, F.M. Richards, Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase, *A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52 (1964) 833-839.
- [8] G.M. Alter, D.L. Leussing, H. Neurath, B.L. Vallee, Kinetic properties of carboxypeptidase B in solutions and crystals, *Biochemistry* 16 (1977) 3663-3668.
- [9] N.L. St Clair, M.A. Navia, Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 7314-7316.
- [10] A.F.S.A. Habeeb, Preparation of enzymically active, water insoluble derivatives of trypsin, *Arch. Biochem. Biophys.* 119 (1967) 264-268.
- [11] E.F. Jansen, A.C. Olson, Properties and enzymatic activities of papain insolubilized with glutaraldehyde, *Arch. Biochem. Biophys.* 129 (1969) 221-228.
- [12] L. Cao, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase, *Org. Lett.* 2 (2000) 1361-1364.
- [13] W. Tischer, V. Kasche, Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 326-335.
- [14] R. Schoevaart, L.M. van Langen (CLEA Technologies), Neth. Appl. NL 1027360.

## 5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes

- [15] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* (2001) 425-426.
- [16] K.-W. Kim, B. Song, M.-Y. Choi, M.-J. Kim, Biocatalysis in ionic liquids: Markedly enhanced enantioselectivity of lipase, *Org. Lett.* 3 (2001) 1507-1509.
- [17] V. Gotor, R. Brieva, F. Rebolledo, Enantioselective acylation of amino alcohols by porcine pancreas lipase, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1988) 957-958.
- [18] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, Industrial methods for the production of optically active intermediates, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 788-824.
- [19] R. Irimescu, K. Kato, Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 30 (2004) 189-194.
- [20] F. Balkenbohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation, *J. Prakt. Chem.* 339 (1997) 381-384.
- [21] T. Wagegg, M.M. Enzelberger, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmidt, The use of methoxy acetoxy esters significantly enhances reaction rates in the lipase catalyzed preparation of enantiopure 1-(4-chloro phenyl) ethyl amines, *J. Biotechnol.* 61 (1998) 75-78.

## **5. Desarrollo de un nuevo derivado enzimático de CALB activo en ILs desnaturalizantes**

# 6

## **Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos**



## 6. ESTABILIZACIÓN DE PENICILINA G ACILASA EN ESTADO LIBRE EN LÍQUIDOS IÓNICOS

### 6.1. INTRODUCCIÓN

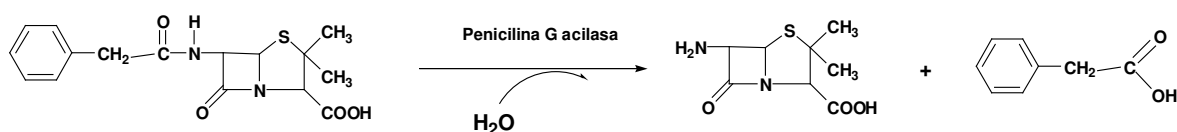
La Penicilina G acilasa (PGA; EC 3.5.1.11) es la enzima empleada en la producción industrial de antibióticos penicilínicos  $\beta$ -lactámicos. Esta enzima hidroliza la cadena lateral de la penicilina G y de otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos relacionados, liberando el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), que resulta indispensable en la manufactura de penicilinas semisintéticas. Esta enzima también puede utilizarse para la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos, catalizando la condensación de un grupo acilo y una molécula de 6-APA.

El empleo de disolventes orgánicos o de mezclas agua-cosolvente ha incrementado la aplicaciones de la enzima PGA en procesos de síntesis enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactámicos [1-2]. El equilibrio termodinámico podría ser desplazado hacia la síntesis mediante el empleo de disolventes hidrofóbicos en el medio de reacción [3]. Así, se ha demostrado que la enzima PGA es altamente activa en disolventes orgánicos apolares, catalizando la resolución y protección de L-aminoácidos, D-aminoácidos y aminas [4-7]. Sin embargo, los disolventes orgánicos volátiles tienen un impacto negativo sobre el medioambiente, y por lo tanto es necesario desarrollar nuevas alternativas para llevar a cabo los procesos de síntesis enzimática en medios respetuosos con el medioambiente [8]. En este contexto, los líquidos iónicos podrían ser una alternativa a los disolventes orgánicos, debido a su presión de vapor prácticamente despreciable, a su estabilidad térmica y química [9] y a la posibilidad de modular las propiedades físico-químicas de los mismos, tales como la polaridad, hidrofobicidad y miscibilidad con disolventes, mediante la adecuada selección del catión y anión constituyentes del líquido iónico [10-11]. Por ello, los líquidos iónicos se denominan con frecuencia “*disolventes de diseño*”.

Los líquidos iónicos más comúnmente empleados son los basados en cationes dialquilimidazolio y tetraalquiamonio en combinación con aniones que poseen una fuerte deslocalización de la carga negativa (p.e. hexafluorofosfato, tetrafluoroborato) [12]. Estos nuevos disolventes se han utilizado como medios de reacción apropiados en algunas reacciones catalizadas por enzimas, entre las que destacan la síntesis de aminoácidos [13] y ésteres alifáticos [14-15], la resolución cinética de alcoholes aromáticos racémicos [16] y la síntesis de ésteres carbohidrato [17]. Estos nuevos medios no sólo tienen una influencia positiva en la actividad enzimática y en la enantioselectividad sino también en la estabilidad de las enzimas.

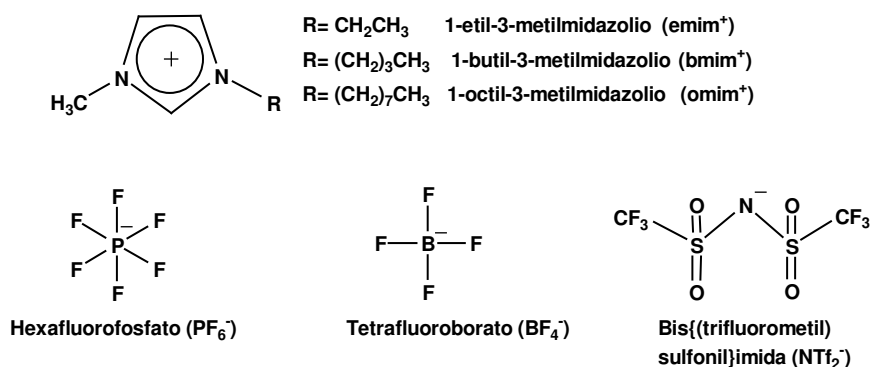
## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos

Hasta el momento solamente un trabajo reciente de Basso et al. [24] ha evaluado la estabilidad de un derivado enzimático inmovilizado de penicilina G amidasa (PGA-450) en varios líquidos iónicos basados en cationes 1-alkil-3-metilimidazolio y aniones  $[\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{BF}_4^-]$  y  $[\text{CH}_3\text{OSO}_3^-]$  a actividad controlada de agua. El objeto del presente capítulo es evaluar la estabilidad de penicilina G acilasa (PGA) de *Escherichia coli* en su estado nativo en líquidos iónicos con un bajo contenido en agua y en ausencia y presencia de sustrato. Como reacción modelo se seleccionó la hidrólisis de penicilina G a ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y a ácido fenilacético (PAA) (**Figura 6.1**).



**Figura 6.1.** Reacción de hidrólisis de penicilina G catalizada por PGA.

Como medios de reacción se utilizaron en este estudio cuatro líquidos iónicos inmiscibles con agua: (i) hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ( $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ), (ii) hexafluorofosfato de 1-metil-3-octilimidazolio ( $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ ), (iii) bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-etil-3-metilimidazolio ( $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ), (iv) bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-butil-3-metilimidazolio ( $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ); y un líquido iónico miscible con agua: (v) tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ( $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ ). Los iones constituyentes de estos líquidos iónicos se presentan en la **Figura 6.2**. Además, se ha llevado a cabo una comparación de la estabilidad en estos nuevos medios con la obtenida en disolventes orgánicos convencionales.



**Figura 6.2.** Iones constituyentes de los líquidos iónicos.



### 6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.2.1. Enzima y materiales

Se utilizó como biocatalizador un preparado comercial de Penicilina G acilasa (EC 3.5.1.11) de *Escherichia coli* suministrado por Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain). Este preparado consiste en un concentrado de 35 mg de proteína/ml, en disolución 0.1 M de fosfato potásico monobásico, con una actividad de 29 U/mg proteína. Estas unidades de actividad (U) fueron determinadas por el fabricante para la hidrólisis de una disolución acuosa al 2 (p/v) de la sal potásica de penicilina G en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y 37 °C .

Los líquidos iónicos [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] fueron suministrados con una pureza > 99% por Solvent Innovation (Cologne, Alemania) (pureza >99%). Los líquidos iónicos [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (pureza >99%) y [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (pureza >99%) están comercialmente disponibles en Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain) y Strem Chemical Inc. (Bischheim, Francia), respectivamente. El contenido en cloruros, medido mediante cromatografía iónica, fue en todos los casos < 100 ppm.

El resto de reactivos químicos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España) y fueron de la mayor pureza disponible.

#### 6.2.2. Estabilidad enzimática en líquidos iónicos

En un vial de rosca de 1.5 mL de volumen total que contiene 490 µl de líquido iónico ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]; [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]; [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]) o 2-propanol, se adicionan 10 µl de una disolución de 35 mg/ml de PGA en tampón fosfato 0.1 M y la mezcla se incuba a 40 °C. A diferentes tiempos, se toman muestras de 30 µL del medio de incubación y se determina la actividad hidrolítica tal y como se describe en el apartado 6.2.3. Cuando la incubación se lleva a cabo en presencia de sustrato, se adicionan 10 µl de una disolución acuosa de penicilina G (500 mM) a 480 µL del medio de incubación. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

Las curvas de desactivación enzimática se obtienen de la representación de la actividad residual frente al tiempo de incubación. La actividad residual se define como el cociente entre la actividad hidrolítica a un tiempo dado (Actividad<sub>t</sub>) y la actividad hidrolítica a t = 0 (Actividad<sub>0</sub>) (Eq. 6.1)

## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos

$$A_R(\%) = \frac{Actividad_t}{Actividad_{t_0}} \times 100 \quad (6.1)$$

### 6.2.3. Hidrólisis enzimática de penicilina G

La reacción comienza adicionando una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  del medio de incubación (PGA incubada en el líquido iónico o en 2-propanol a 40°C como se describió en el apartado 6.2.2) a un vial de rosca de 1.5 mL de volumen total que contiene 470  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de penicilina G (50 mM) en tampón fosfato (0.25 M, pH 8). A diferentes tiempos de incubación, se extraen alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  y se disuelven en 150  $\mu\text{L}$  de HCl (50 mM) para parar la reacción y después 50  $\mu\text{L}$  de esta disolución se añaden a 575  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de resorcinol (estándar interno) (0.72 mM) en tampón fosfato (0.25 mM). Finalmente, 5  $\mu\text{l}$  de la disolución resultante se analizan mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se define una unidad de actividad hidrolítica como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de ácido fenilacético por minuto a 40°C y pH 8 a partir de una disolución acuosa 50 mM de penicilina G en tampón fosfato (0.25 M). Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

### 6.2.4. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Shimadzu SCL-6B equipado con un detector VIS-UV, un inyector automático de muestras y una columna LiChrospher RP-18, cuyas especificaciones se recogen en la **Tabla 6.1**, utilizando resorcinol como estándar interno.

**Tabla 6.1** Características de la columna capilar.

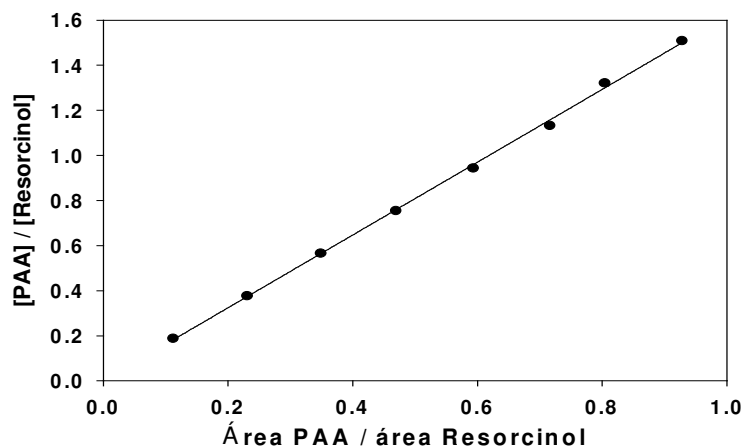
<i>LiChrospher RP-18</i>	
Longitud: 25 cm	Tamaño de partícula: 5 $\mu\text{m}$
Diámetro interno: 4 mm	Tamaño de poro: 10 nm

Las muestras se eluyeron isocráticamente con 80% (v/v) de tampón fosfato 20 mM a pH 6 y 20% (v/v) de acetonitrilo a un flujo de 0.8 ml/min, y se analizaron en un detector UV a 220 nm.

Se obtuvieron rectas de calibrado de cada uno de los compuestos representando la relación de concentración de cada compuesto y del estándar interno frente a la relación

## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos

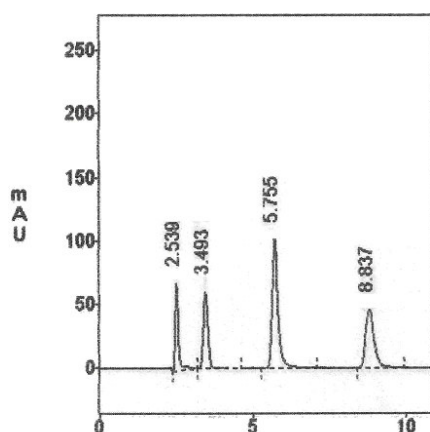
de áreas de los mismos. A título de ejemplo se muestra en la **Figura 6.3** la recta de calibrado de uno de los compuestos (PAA).



**Figura 4.3.** Recta de calibrado obtenida para el ácido fenilacético.

Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos y del valor del cociente entre el área de un determinado compuesto y el área del estándar interno, teniendo en cuenta la concentración del estándar interno y las diluciones efectuadas antes del análisis cuantitativo.

En la **Figura 6.4** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.



**Figura 6.4.** Cromatograma típico del análisis de las muestras de la reacción de hidrólisis de penicilina G.

## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: ácido 6-aminopenicilánico, 2.539 min.; ácido fenilacético, 3.493 min.; resorcinol (estándar interno), 5.755 min.; penicilina G, 8.837 min.

En la **Tabla 6.2** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.

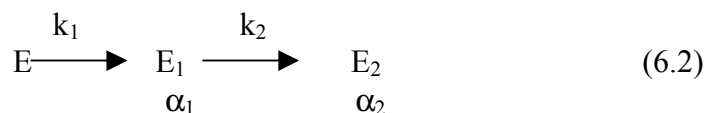
**Tabla 6.2.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: penicilina G, ácido 6-aminopenicilánico y ácido fenilacético.

Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
ÁCIDO 6-AMINOPENICILÁNICO	2.427	0.9973
ÁCIDO FENILACÉTICO	1.617	0.9989
PENICILINA G	0.795	0.9982

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los criterios clave para seleccionar un sistema enzima-líquido iónico es la estabilidad del catalizador en el medio de reacción. Por ello, se analizó la influencia de estos nuevos disolventes en la estabilidad enzimática incubando la enzima PGA en varios líquidos iónicos: [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] y [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] a 40 °C en ausencia y presencia de sustrato (PG).

La naturaleza multifásica de la molécula de proteína durante el proceso de desactivación sugiere que durante su transición conformacional pueden tener lugar sucesos internos complejos [25]. Por ello, para analizar la desactivación de PGA en líquidos iónicos se consideró el modelo de Henley y Sadana, que es un modelo de desactivación en serie consistente en dos etapas de primer orden con un precursor activo y un estado final de la enzima con posible actividad [26], tal y como se muestra a continuación:



## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos

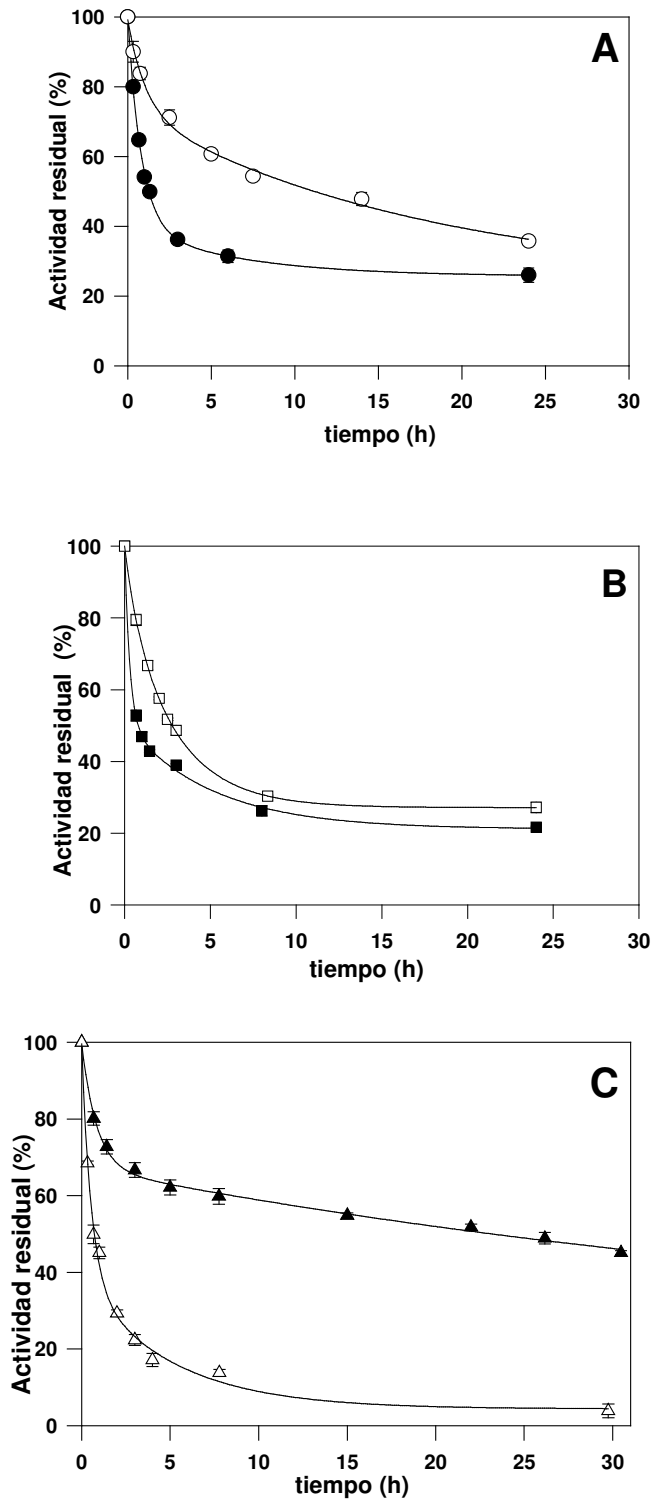
donde  $E$ ,  $E_1$  y  $E_2$  son estados homogéneos de la enzima que exhiben diferentes actividades específicas;  $k_1$  y  $k_2$  son constantes de velocidad de desactivación de primer orden ( $\text{min}^{-1}$ ), y  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son los cocientes de las actividades específicas  $E_1/E$  y  $E_2/E$ , respectivamente. La actividad residual,  $\alpha$ , viene dada por la integración de las ecuaciones de velocidad de desactivación de cada etapa y la sustitución en la expresión media ponderada (Ecuación 6.3.)

$$\alpha = \frac{E + \alpha_1 \cdot E_1 + \alpha_2 \cdot E_2}{E} = \alpha_2 + \left[ 1 + \frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1} \right] \cdot [\exp(-k_1 \cdot t)] - (\alpha_1 - \alpha_2) \cdot \left[ \frac{k_1}{k_2 - k_1} \right] \cdot [\exp(-k_2 \cdot t)] \quad (6.3)$$

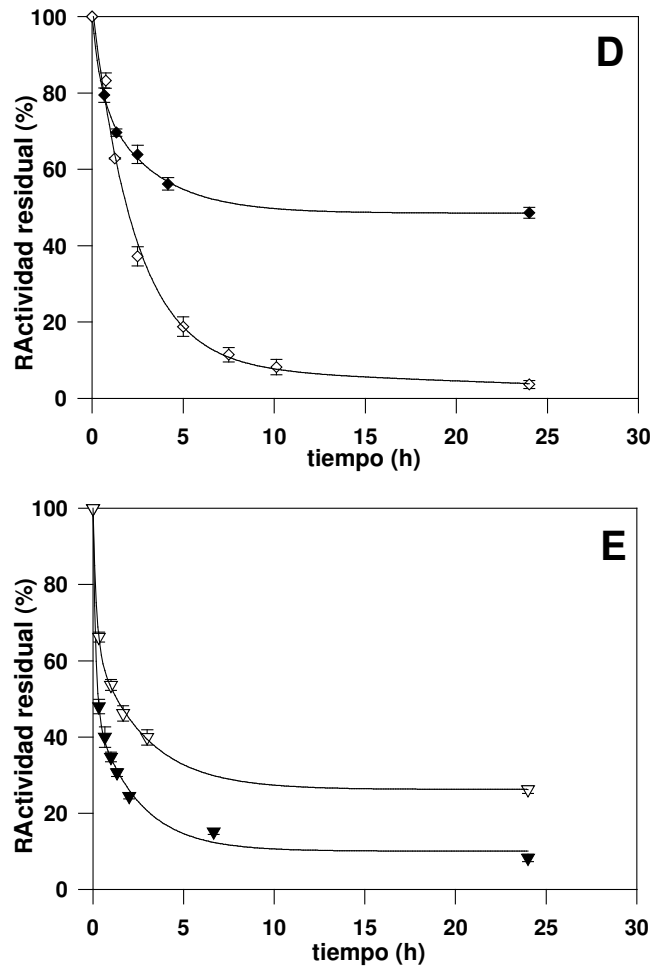
Se aplicaron otros modelos (p.e. el modelo lineal, exponencial y el lineal invertido) pero el grado de ajuste no fue muy satisfactorio. El modelo aplicado, de Henley y Sadana, ha sido también aplicado por otros autores [27] para modelar la desactivación de la enzima penicilina acilasa.

En la **Figura 6.5** se muestran los perfiles de desactivación de la enzima en cinco líquidos iónicos diferentes:  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ ;  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ;  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ ;  $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ , tanto en ausencia como en presencia de sustrato (PG), determinados a partir de los valores de actividad sintética mostrada por Penicilina G a distintos tiempos de incubación. Estos valores de actividad se obtuvieron de las pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G (Anexo 2, Tablas 12.4-12.14).

## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos



## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos



**Figura 6.5.** Perfiles de desactivación de penicilina G acilasa en líquidos iónicos en presencia (O, □, Δ, ◇, ▽) y ausencia (●, ■, ▲, ◆, ▼) de sustrato (PG) a 40 °C. (A) [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; (B) [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; (C) [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]; (D) [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]; (E) [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].

Las curvas representadas en la **Figura 6.5** son teóricas y se obtuvieron a partir de los datos experimentales (puntos) empleando el modelo de desactivación en serie descrito. La correlación obtenida entre los datos teóricos y experimentales fue adecuada ya que en todos los casos se obtuvieron coeficientes de correlación  $> 0.98$ . El perfil de desactivación de PGA en 2-propanol en idénticas condiciones mostró un comportamiento similar. En tolueno y diclorometano la desactivación de PGA fue prácticamente instantánea, por lo que el único disolvente orgánico en el que la enzima mostró una actividad apreciable en las condiciones de ensayo fue en 2-propanol. En la **Tabla 6.3** se recogen los parámetros de desactivación obtenidos en los líquidos iónicos y en 2-propanol.

## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos

**Tabla 6.3.** Parámetros cinéticos de la desactivación de PGA en diferentes medios a 40 °C obtenidos a partir de los datos experimentales empleando el modelo de desactivación en serie descrito.

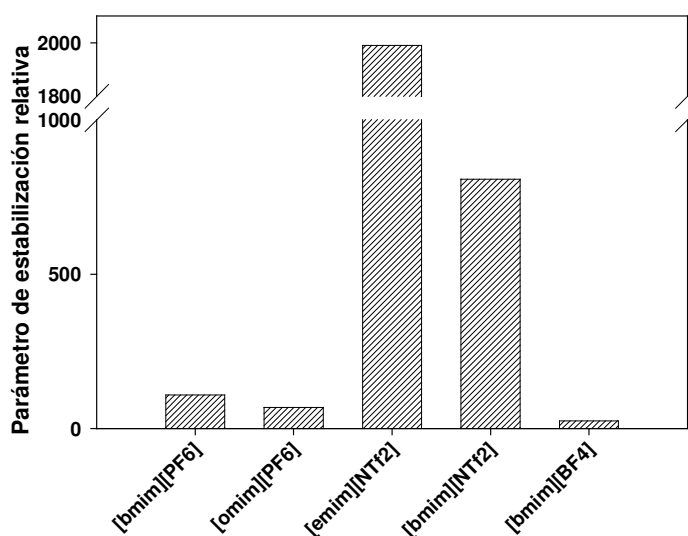
medio	$\alpha_1$	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2 \times 10^4$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
[emim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.66	0.0193	2.06	1392.3
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.59	0.0157	1.33	565.0
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0.34	0.0188	2.01	76.1
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0.40	0.0351	5.00	47.7
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	0.33	0.0643	12.94	17.5
2-propanol	0.11	1.1834	240.59	0.7

En todos los casos, la actividad específica del estado intermedio ( $E_1$ ) fue menor que la actividad específica del estado inicial,  $E$ , ( $\alpha_1 < 1$ ), mientras que para el estado final ( $E_2$ ) la actividad fue nula ( $\alpha_2 = 0$ ). Como puede apreciarse en la **Tabla 6.3**, los valores de las constantes de velocidad de desactivación  $k_1$  y  $k_2$  se vieron claramente reducidos en los líquidos iónicos. Además, los parámetros  $k_1$  y  $k_2$  fueron muy sensibles a las características de los líquidos iónicos, siendo considerablemente mayor en líquidos iónicos miscibles con agua. Los valores obtenidos para el  $t_{1/2}$ , definido éste como el tiempo al cual la enzima mantiene la mitad de su actividad inicial, se recogen también en la tabla. Éste es un parámetro que permite apreciar fácilmente el grado de estabilización de la enzima en los distintos medios. Los valores del parámetro  $t_{1/2}$  fueron notablemente mayores en líquidos iónicos que en 2-propanol.

Para comparar el efecto de los líquidos iónicos en la desactivación enzimática, se ha definido un parámetro de desactivación relativa como el cociente de entre el tiempo de vida media en un líquido iónico y en un disolvente orgánico, en este caso, 2-propanol. En la **Figura 6.6** se observa que el medio líquido iónico mejora en todos los casos la estabilidad de PGA, siendo el caso más notable el del líquido iónico [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], para el cual se obtuvo un tiempo de vida media aproximadamente 2000 veces superior al obtenido en 2-propanol.



## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos



**Figura 6.6.** Parámetro de desactivación relativa de PGA en varios líquidos iónicos definido como el cociente de entre el tiempo de vida media en un líquido iónico y en un disolvente orgánico, en este caso, 2-propanol, a 40°C.

El efecto más importante en la estabilidad de PGA se observó con la variación de la naturaleza del anión constituyente del líquido iónico. Así, en la **Tabla 6.4** se observa que los líquidos iónicos que contenían el catión [bmim<sup>+</sup>], los tiempos de vida media aumentaron según el siguiente orden: [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]. Teniendo en cuenta que la secuencia de hidrofobicidad para estos aniones es la siguiente: [BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] < [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] [28], el aumento de los tiempos de vida media coincide con el aumento de este parámetro. Este comportamiento podría ser explicado por el hecho de que el aumento de hidrofobicidad del medio permitiría la preservación de la cantidad de agua esencial alrededor de la proteína, reduciendo de este modo las interacciones directas entre la molécula de proteína y los iones constituyentes del líquido iónico. El bajo tiempo de vida media de PGA en [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], que es totalmente miscible con agua, podría ser atribuido a la interacción de este líquido iónico con la totalidad del agua indispensable para la adquisición y mantenimiento de la conformación catalítica de la enzima. Este disolvente podría retirar las moléculas de agua fuertemente unidas a la enzima, provocando una alteración o distorsión de la conformación catalítica y consecuentemente ocasionar la desactivación de la enzima [29].

La naturaleza del catión constituyente de los líquidos iónicos ejerce también un fuerte efecto en la estabilidad de PGA, observándose en la **Tabla 6.3** que la enzima es más estable en los líquidos iónicos que contienen cationes con longitud de cadena más corta. Este efecto es incluso más apreciable en los líquidos iónicos más hidrofóbicos, es decir,

## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos

aquellos basados en el anión  $[\text{NTf}_2^-]$ . Autores como Basso et al. [24] han observado también este comportamiento para un derivado enzimático inmovilizado de PGA (PGA-450).

La estabilidad de la enzima en líquidos iónicos en ausencia de sustrato podría considerarse como una estabilidad al almacenamiento de la enzima en estos medios a 40°C, la cual es diferente de la estabilidad en operación continua [30]. Para conocer la influencia directa del medio líquido iónico en estas condiciones sobre la enzima se ha analizado la estabilidad de PGA en presencia de sustrato a 40°C. Los perfiles de desactivación obtenidos, recogidos en la **Figura 6.7**, muestran un menor descenso de la actividad enzimática en presencia de sustrato para los líquidos iónicos basados en aniones hexafluorofosfato y tetrafluoroborato, mostrando tiempos de vida media notablemente superiores en estas condiciones (**Tabla 6.4**)

**Tabla 6.4.** Parámetros cinéticos de la desactivación de PGA en operación continua en diferentes medios en presencia de sustrato (PG) a 40 °C, obtenidos a partir de los datos experimentales empleando el modelo de desactivación en serie descrito.

medio	$\alpha_1$	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2 \times 10^4$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0.67	0.0121	4.51	669.9
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0.31	0.0078	91.70	165.7
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.07	0.0070	5.24	114.7
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	0.47	0.0435	4.13	79.5
[emim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.28	0.0258	0.16	42.5

Así por ejemplo, el tiempo de vida media de PGA en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] fue aprox. 9 veces superior en presencia de sustrato. Este comportamiento puede explicarse por las interacciones específicas de los sustratos con el centro activo de la enzima, que podrían prevenir la pérdida de la conformación activa de la enzima.

Contrariamente a lo que cabría esperar, PGA mostró menor estabilidad en líquidos iónicos basados en el anión bis{(trifluorometil)sulfonil}imida en presencia de sustrato que en ausencia del mismo. Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta que estos líquidos iónicos son los más hidrofóbicos entre los estudiados y, por tanto, permitirían una mayor cantidad de moléculas de agua libres en el medio que podrían actuar como posibles nucleófilos. Esto, unido a la alta estabilidad de PGA en estos líquidos iónicos en ausencia de sustrato, podría provocar la hidrólisis de PG en el medio de incubación dando lugar a los productos de hidrólisis (PAA y 6-APA), los cuales han sido reconocidos como inhibidores de la enzima PGA [31-32].

### 6.4. CONCLUSIONES

Se ha observado que la enzima penicilina G acilasa en estado libre muestra una mayor estabilidad en los líquidos iónicos ensayados que en los disolventes orgánicos ensayados con bajo contenido de agua. En este sentido, el tiempo de vida media obtenido en bis{(trifluorometil)sulfonil}imida de 1-etil-3-metilimidazolio ( $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ) fue de 23 h, aproximadamente 2000 veces superior al obtenido en 2-propanol.

Además, se observó que la presencia de sustrato mejora notablemente la estabilidad enzimática en los líquidos iónicos basados en aniones hexafluorofosfato y tetrafluoroborato.

Por tanto, las ventajas intrínsecas descritas para estos nuevos disolventes, junto al efecto de estabilización enzimática que producen sobre PGA, harían posible el desarrollo de nuevos procesos biocatalíticos para la producción de antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos y la resolución de compuestos racémicos, especialmente de aminas.

### 6.5. NOMENCLATURA

E	actividad específica del estado inicial de la enzima ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ )
$E_1$	actividad específica del estado intermedio de la enzima ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ )
$E_2$	actividad específica del estado final de la enzima ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ )
$k_1, k_2$	constantes de velocidad de desactivación ( $\text{min}^{-1}$ )
$\alpha_1$	cociente de las actividades específicas $E_1/E$
$\alpha_2$	cociente de las actividades específicas $E_2/E$
$\alpha$	actividad residual
$t_{1/2}$	tiempo de vida media (min)

## 6.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Illanes, S. Anjari, R. Arrieta, C. Aguirre, Optimization of yield in kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in organic media, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 97 (2002) 165-180.
- [2] P. Travascio, E. Zito, M. Portaccio, V. Grano, S. Di Martino, T. Bertolini, S. Rossi, D.G. Mita, Enzyme reaction engineering: Effect of methanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized penicillin G acylase under isothermal and non-isothermal conditions, *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 975-985.
- [3] A. Illanes, A. Fajardo, Kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin in the presence of organic cosolvents, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 11 (2001) 587-595.
- [4] A. Basso, L. De Martín, C. Ebert, L. Gardossi, P. Linda, V. Zlatev, Activity of covalently immobilised PGA in water miscible solvents at controlled  $a_w$ , *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 11 (2001) 851-855.
- [5] A. Basso, P. Braiuca, C. Ebert, L. Gardossi, P. Linda, F. Benedetti, GRID / Tetrahedral intermediate computational approach to the study of selectivity of penicillin G acylase in amide bond synthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 160 (2002) 85-92.
- [6] L.A. Blanchard, D. Hancu, E.J. Beckman, J.F. Brenneke, Green processing using ionic liquids and CO<sub>2</sub>, *Nature* 399 (1999) 28-29.
- [7] C. Carboni, P.J.L.M. Quaedflieg, Q.B. Broxterman, P. Linda, L. Gardossi, Quantitative enzymatic protection of D-amino acid methyl esters by exploiting "Relaxed" enantioselectivity of penicillin-G amidase in organic solvent, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 9649-9652.
- [8] D. Roche, K. Prasad, O. Repic, Enantioselective acylation of B-aminoesters using penicillin G acylase in organic solvents, *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 3665-3668.
- [9] M. Kosmulski, J. Gustafsson, J.B. Rosenholm, Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited, *Thermochim. Acta* 412 (2004) 47-53.
- [10] S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO<sub>2</sub> systems, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.

## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos

---

- [11] J.M. Pringle, J. Golding, K. Baranyai, C.M. Forsyth, G.B. Deacon, J.L. Scott, D.R. MacFarlane, The effect of anion fluorination in ionic liquids-Physical properties of a range of bis(methanesulfonyl)amide salts,. *New J. Chem.* 27 (2003) 1504-1510.
- [12] S.J. Nara, S.S. Mohile, J.R. Harjani, P.U. Naik, M.M. Salunkhe, Influence of ionic liquids on the rates and regioselectivity of lipase-mediated biotransformations on 3,4,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -glucal, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 28 (2004) 39-43.
- [13] M. Eckstein, M. Sesing, U. Kragl, P. Adlercreutz, At low water activity  $\alpha$ -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 867-872.
- [14] J.A. Berberich, J.L. Kaar, A.J. Russell, Use of salt hydrate pairs to control water activity for enzyme catalysis in ionic liquids, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1029-1032.
- [15] P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J.L. Iborra, Criteria to desing green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 661-669.
- [16] M. Noël, P. Lozano, M. Vaultier, J.L. Iborra, Kinetic resolution of *rac*-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 301-306.
- [17] M.-J. Kim, M.Y. Choi, J.K. Lee, Y. Ahn, Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: Significantly enhanced reactivity and regioselectivity, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 26 (2003) 115-118.
- [18] D. Dinelli, Fiber-entrapped enzymes, *Process. Biochem.* 7 (1972) 9-12.
- [19] L.R.B. Gonçalves, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, R.L.C. Giordano, A kinetic study of synthesis of amoxicillin using penicillin G acylase immobilized on agarose, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84 (2000) 931-946.
- [20] W. Marconi, F. Cecere, F. Morisi, G. Della Penna, B. Rappuoli, The hydrolysis of penicillin G to 6-amino penicillanic acid by entrapped penicillin acylase, *J. Antibiot.* 26 (1973) 228-232.
- [21] E. Andersson, B. Mattiasson, B. Hahn-Hagerdal, Enzymatic conversion in aqueous two-phase systems: Deacylation of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid with penicillin acylase, *Enzyme Microb. Technol.* 6 (1984) 301-306.

## 6. Estabilización de Penicilina G acilasa en estado libre en líquidos iónicos

---

- [22] L.C. Liao, C.S. Ho, W.T. Wu, Bioconversion with whole cell penicillin acylase in aqueous two-phase systems, *Process Biochem.* 34 (1999) 417-420.
- [23] P. Dhal, G.N. Babu, S. Sudhakaran, S.P. Borkar, Immobilization of penicillin acylase by covalent linkage on vinyl copolymers containing epoxy groups, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 6 (1985) 91-95.
- [24] A. Basso, S. Cantone, P. Linda, C. Ebert, Stability and activity of immobilised penicillin G amidase in ionic liquids at controlled  $a_w$ , *Green Chem.* 7 (2005) 671-676.
- [25] C.D. Lindsay, R.H. Pain, The folding and solution conformation of penicillin G acylase, *Eur. J. Biochem.* 192 (1990) 133-141.
- [26] A. Sadana, J.P. Henley, Single-step unimolecular non-firstorder enzyme deactivation kinetics, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 717-723.
- [27] A.M. Azevedo, L.P. Fonseca, D.M.F. Prazeres, Stability and stabilisation of penicillin acylase, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (1999) 1110-1116.
- [28] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [29] S.J. Nara, J.R. Harjani, M.M. Salunkhe, Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: A comparative study, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 2979-2982.
- [30] A. Illanes, C. Altamirano, M.E. Zuñiga, Thermal inactivation of immobilized penicillin acylase in the presence of substrate and products, *Biotechnol. Bioeng.* 50 (1996) 609-616.
- [31] A. Erarslan, A. Guray, Kinetic investigation of penicillin G acylase from a mutant strain of *Escherichia Coli* ATCC 11105 Immobilized on oxirane-acrylic beads, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 51 (1991) 181-195.
- [32] M.H.A. Janssen, L.M. van Langen, S.R.M. Pereira, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration, *Biotechnol. Bioeng.* 78 (2002) 425-432.





# 7

**Resolución racémica de  
*rac*-1-feniletanol mediante un proceso  
integrado de reacción/separación  
usando membranas líquidas  
soportadas basadas en líquidos  
iónicos**



**7. RESOLUCIÓN RACÉMICA DE RAC-1-FENILETANOL MEDIANTE UN PROCESO INTEGRADO DE REACCIÓN/SEPARACIÓN USANDO MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS**

**7.1. INTRODUCCIÓN**

La demanda de compuestos quirales por parte de la industria farmacéutica se ha incrementado drásticamente en la última década. La venta de fármacos basados en estos compuestos quirales representa un tercio de la demanda total de los mismos [1]. La importancia de los enantiómeros de una mezcla racémica radica en que cuando se administra como medicamento, muy a menudo, sólo uno de los enantiómeros es biológicamente activo mientras el otro es inactivo o presenta efectos secundarios colaterales, es tóxico, o actúa como antagonista [2,3]. Como consecuencia se han desarrollado numerosas técnicas de resolución racémica en las últimas dos décadas [4]. Entre estas metodologías cabe destacar por su importancia la resolución cinética catalizada por enzimas, que permite separar los isómeros de una mezcla racémica debido a la conversión preferencial de uno de éstos a un producto quiral. Así, la acilación de alcoholes quirales catalizada por lipasas ha demostrado ser una herramienta muy eficiente para la producción de enantiómeros ópticamente puros [5]. Sin embargo, la principal desventaja para su aplicación práctica radica en la necesidad de la inclusión de una etapa posterior de cromatografía para la separación del alcohol y el éster, lo que requiere el uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos. Una alternativa prometedora para superar esta desventaja es el uso de reactores enzimáticos de membrana [6-8]. La comunidad científica ha mostrado un gran interés por estos sistemas ya que son capaces de integrar la resolución cinética y la separación de los productos en una única operación de forma sencilla y versátil [9]. Es por ello que recientemente se han publicado trabajos [10, 11] sobre resoluciones de alcoholes quirales mediante procesos de transesterificación en reactores de membrana de diferentes configuraciones: membranas de fibra hueca [10], membranas poliméricas bifuncionales [11], etc., las cuales permiten la obtención de productos quirales de alta pureza.

Entre las posibles membranas que pueden ser utilizadas, el uso de membranas líquidas soportadas (SLMs), soportes porosos en cuyos poros se encuentra ocluido un líquido, tiene numerosas ventajas, tales como la mínima cantidad de disolvente que se necesita y el hecho de que los procesos de extracción y redisolución se combinan en una sola etapa [12]. Sin embargo, su aplicación industrial está todavía limitada, principalmente debido a la baja estabilidad de este tipo de membranas [13,14]. Las membranas líquidas soportadas basadas en líquidos orgánicos convencionales, se deterioran con el tiempo debido principalmente a la evaporación del líquido que la forma, a la disolución del mismo con las fases en contacto o el desplazamiento del disolvente de la estructura

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

porosa de la membrana bajo gradientes de presión (<10 kPa). A este respecto, los líquidos iónicos (ILs) como fase inmovilizada en una membrana líquida soportada son particularmente interesantes.

Los líquidos iónicos (ILs) se han revelado recientemente como una alternativa a los disolventes orgánicos desde un punto de vista medioambiental [15]. Estos son sales orgánicas que se presentan en estado líquido a temperatura ambiente o cercana esta y están compuestos generalmente por un catión orgánico (normalmente dialquilimidazolio y tetralquilamomio), y un anión inorgánico poliatómico (p.e. tetrafluoroborato, hexafluorofosfato) [16]. Los líquidos iónicos han mostrado un comportamiento satisfactorio como disolventes en una amplia variedad de procesos químicos (p.e. extracción, medios de reacción, catálisis química, etc.) [17-19]. Además, el uso de estos nuevos disolventes como fase líquida líquida en membranas líquidas soportadas ha permitido la estabilización éstas debido a la baja presión de vapor de los ILs, la posibilidad de minimizar la solubilidad de éstos en las fases circundantes mediante la selección adecuada del catión y del anión constituyentes [20,21], y a la gran fuerza capilar asociada con su alta viscosidad, la cual puede reducir el desplazamiento de los éstos de los microporos del soporte bajo condiciones de presión. A diferencia de los disolventes convencionalmente usados en SLMs, los ILs poseen otras propiedades únicas que los hacen interesantes en el contexto de las membranas líquidas soportadas. Por ejemplo, los líquidos iónicos presentan una alta estabilidad térmica [22], alta conductividad iónica [22] y no son inflamables. Además, disuelven una amplio número de compuestos inorgánicos y orgánicos [23,24] mientras son immiscibles con muchos disolventes orgánicos [25] e incluso con agua en algunos casos.

Recientemente, se ha comprobado que las SLMs basadas en líquidos iónicos pueden emplearse para el transporte selectivo de compuestos orgánicos tales como alcoholes, ésteres, ácidos, cetonas y aminas [20,21,26,27]. En el presente capítulo, por primera vez, se ha combinado la acción catalítica de la enzima lipasa con el uso de una membrana líquida soportada basada en líquidos iónicos, para llevar a cabo la separación selectiva de los racematos de *rac*-1-feniletanol. En este capítulo e ha analizado el comportamiento del biorreactor de membrana para la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol mediante transesterificación con ésteres vinílicos catalizada por la enzima comercial lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) (**Figura 7.1**). Más específicamente, se ha estudiado el efecto de varias variables del proceso que afectan a la eficiencia de la separación de la mezcla racémica tales como la naturaleza del líquido iónico soportado en la membrana, el contenido de agua del medio, la concentración del derivado enzimático en el compartimento de alimentación y la naturaleza del éster vinílico utilizado como dador de acilo.

## 7. Resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

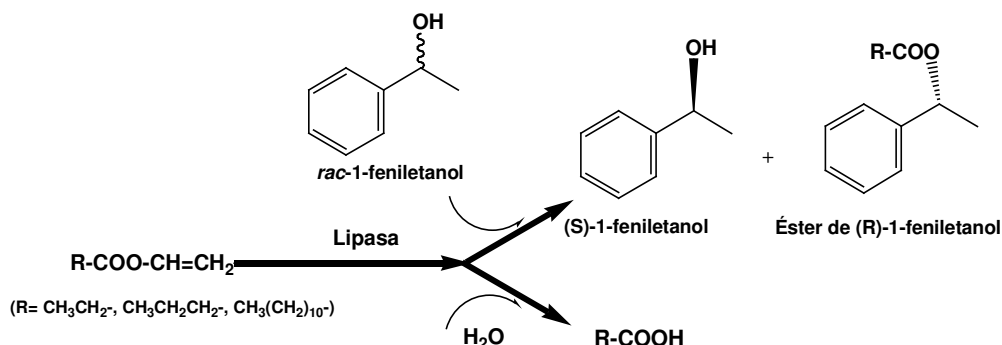


Figura 7.1. Esquema de reacción para la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol catalizada por CaLB.

## 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2.1. Enzima y materiales

Se utilizó como biocatalizador un preparado comercial de lipasa B de *Candida antarctica* (EC 3.1.1.3) suministrado por Novo España S.A. (Madrid, España). Este preparado, de denominación comercial Novozym 435<sup>®</sup>, consiste en un derivado inmovilizado de la lipasa B de *Candida antarctica* sobre una resina acrílica macroporosa.

Como membrana polimérica soporte se utilizó una membrana hidrofílica plana de poliamida (NYLON<sup>®</sup> HNWP 02500) de 25 mm de diámetro suministrada por la empresa Millipore Ibérica S.A. (Madrid, España). El tamaño medio de poro es de 0.45  $\mu\text{m}$  y el espesor de la membrana de 170  $\mu\text{m}$ .

Los líquidos iónicos hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio,  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  (pureza > 99%), hexafluorofosfato de 1-metil-3-octilimidazolio,  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  (pureza > 99%), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio,  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$  (pureza > 99%) y tetrafluoroborato de 1-metil-3-octilimidazolio,  $[\text{omim}^+][\text{BF}_4^-]$  (pureza > 99%) fueron suministrados por Solvent Innovation GmbH (Cologne, Alemania). El líquido iónico bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-butil-3-metilimidazolio,  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$  (pureza > 99%) fue suministrado por Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, España) y el bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-metil-3-octilimidazolio,  $[\text{omim}^+][\text{NTf}_2^-]$  (pureza > 99%) por Merck KgaA (Darmstadt, Alemania).

El compuesto racémico laurato de 1-feniletanol fue sintetizado tal y como se describe en el apartado 7.2.2. El resto de sustratos, disolventes y sustancias químicas fueron

## **7. Resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación**

suministrados por Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, España), y fueron de la mayor pureza disponible. Los disolventes y reactivos utilizados se deshidrataron con tamiz molecular de 3Å antes de ser utilizados.

Los gases necesarios para el análisis de las muestras por cromatografía de gases (hidrógeno, aire sintético y helio) fueron suministrados por Abelló-Linde S.A. (Barcelona, España).

### **7.2.2. Síntesis química de laurato de *rac*-feniletilo**

Sobre una disolución enfriada (0°C, baño de hielo) de *rac*-1-feniletanol (81.5 mmol) y piridina (97.2 mmol) en dietil eter seco (80 ml), se añadió gota a gota cloruro de laurilo (97.2 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con dietil eter y se lavó con una disolución acuosa 0.1 M de HCl, después con agua, posteriormente con agua saturada con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y por último de nuevo con agua. La disolución resultante en dietil eter se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Posteriormente se evaporó el disolvente a vacío y se purificó el producto mediante cromatografía en columna usando como fase fija gel de sílice y como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (22:1). El rendimiento de la reacción fue del 76%. El compuesto obtenido se analizó por <sup>1</sup>H NMR y <sup>13</sup>C NMR. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 0.90 (t, 3H), 1.28 (m, 16H), 1.55 (d, 3H), 1.64 (m, 2H), 2.39 (t, 2H), 5.91 (q, 1H), 7.29-7.37 (m, 5H). <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): 14.07, 22.21, 22.64, 24.92, 29.04, 29.21, 29.29, 29.41, 29.55, 31.87, 34.56, 71.93, 125.98, 127.71, 128.39, 141.80, 173.01.

### **7.2.3. Preparación de las membranas líquidas soportadas**

La inmovilización del líquido iónico se llevó a cabo haciendo uso de una célula de ultrafiltración Amicon<sup>TH</sup> de 10 mL. Para ello se colocó la membrana en el interior de ésta y se añadieron 3 mL de líquido iónico (**Figura 7.2**). La célula se cerró y se presurizó con nitrógeno gas a la presión de aprox. 1.5-2 bar para provocar que el líquido iónico fluyera a través de los poros de la membrana. Cuando se observó sólo una fina capa de líquido iónico sobre la membrana, el sistema se despresurizó y se repitió el mismo proceso dos veces más, reutilizando el líquido iónico, para asegurar que todos los poros estaban ocupados por líquido ya que los líquidos iónicos usados tienen una viscosidad elevada. Finalmente, se extrajo la membrana y se dejó gotear durante doce horas para eliminar el exceso de líquido iónico no inmovilizado presente en la superficie de la misma.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

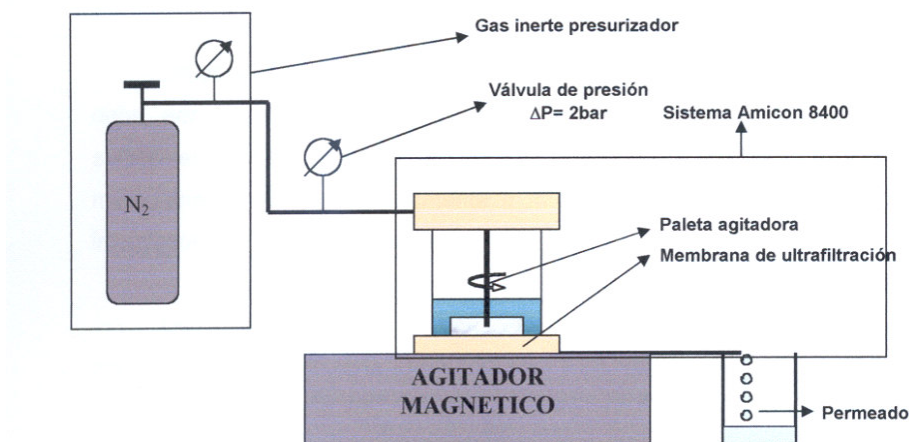


Figura 7.2. Esquema del equipo para el soporte a presión del líquido iónico en las membranas.

### 7.2.4. Dispositivo experimental

El dispositivo experimental empleado en los ensayos de separación y en los ensayos de reacción/separación consistió en una célula de difusión de vidrio con dos compartimentos independientes, de 30 mL cada uno, separados por la membrana líquida soportada. En la **Figura 7.3** se muestra una ilustración esquemática de la célula de difusión.

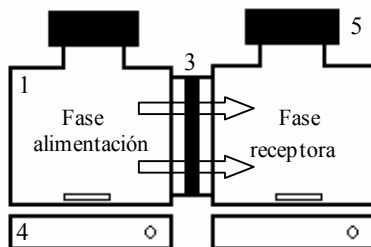


Figura 7.3. Ilustración esquemática de la célula de difusión usada en los ensayos: 1) fase alimentación que contiene los compuestos; 2) fase receptora que contiene n-hexano; 3) membrana líquida soportada; 4) agitador magnético; 5) septum.

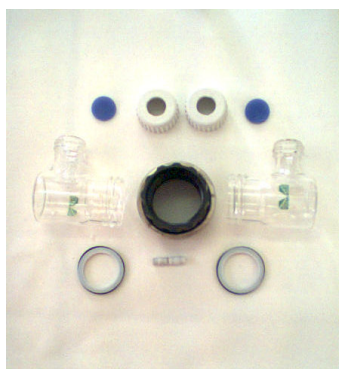
## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

Los compartimentos se unen entre sí a través de una tuerca, en cuyo interior se coloca la membrana, quedando sujeta entre dichos compartimentos mediante juntas, que impiden que haya fuga alguna o que pase disolución de un compartimento a otro. Además, estos compartimentos van provistos de tapones roscados con un orificio central en el que se coloca un septum de silicona/PTFE para llevar a cabo la toma de muestras sin abrir el sistema, evitando de este modo la evaporación de los compuestos y del n-hexano (**Figura 7.4**).



**Figura 7.4.** Distintas vistas de la célula de difusión utilizada en los ensayos de transporte.

A continuación se muestra la célula de difusión desmontada observándose las distintas piezas que la componen (**Figura 7.5**).



**Figura 7.5.** Piezas de la célula de difusión.

La temperatura se controló introduciendo la célula de difusión en un baño termostático de agua. El dispositivo experimental completo se muestra en la **Figura 7.6**.



## 7. Resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

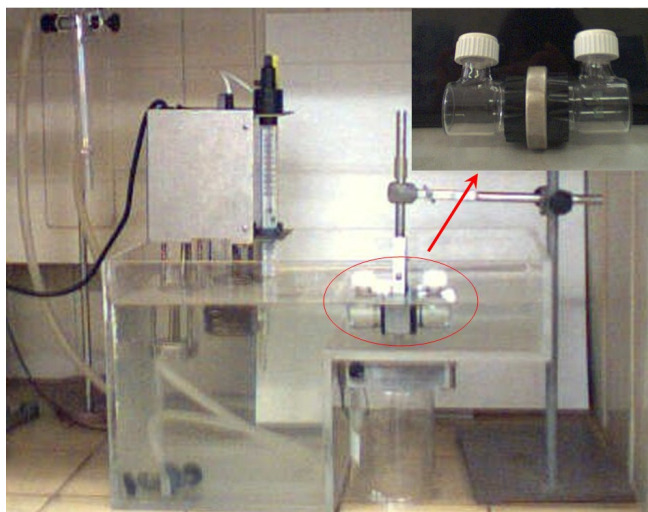


Figura 7.6. Dispositivo experimental.

### 7.2.5. Estudios de transporte

Se evaluó el transporte a 30 °C de todos los compuestos que intervienen en las resoluciones cinéticas en estudio, es decir, *rac*-1-feniletanol, propionato de vinilo, propionato de *rac*-1-feniletilo, ácido propiónico, butirato de vinilo, butirato de *rac*-1-feniletilo, ácido butírico, laurato de vinilo, laurato de *rac*-1-feniletilo y ácido láurico.

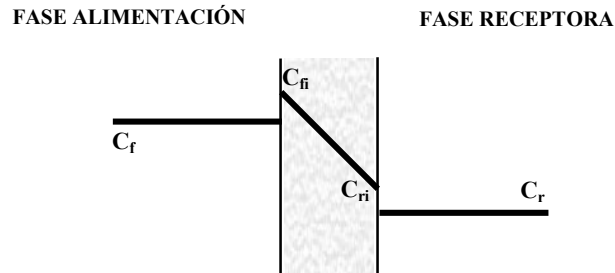
En cada uno de los ensayos, la concentración inicial de los compuestos en la fase alimentación fue de 100mM en n-hexano. En la fase receptora se colocó n-hexano puro en todos los casos. El ensayo de transporte comenzó con la adición de 30 mL de cada una de estas disoluciones en sus respectivos compartimentos. Ambos compartimentos se agitaron mecánicamente para evitar condiciones de polarización por concentración en las interfases de la membrana.

Periódicamente se tomaron muestras de 100  $\mu$ L de ambos compartimentos con una microjeringa durante 48 horas, para seguir la evolución del transporte de los compuestos. A los viales de las muestras se añadió una disolución en n-hexano de butirato de butilo (estándar interno) (100  $\mu$ L, 60 mM) y n-hexano (800  $\mu$ L) y 5  $\mu$ L de la disolución resultante se analizaron por cromatografía de gases, como se describe en el apartado 7.2.8.1.

El transporte de compuestos se analizó a través del parámetro de *permeabilidad*. La **Figura 7.7** muestra el perfil de concentración de un compuesto que es transportado

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

en sentido contrario a su gradiente de concentración. No se han considerado condiciones de polarización por concentración en las interfases de la membrana ya que ambos compartimentos fueron rigurosamente agitados.



**Figura 7.7.** Ilustración esquemática del perfil de concentración de un soluto en un proceso basado en membranas líquidas soportadas.

Bajo estas hipótesis, el proceso de transporte del soluto desde la fase alimentación hasta la fase receptora implica cinco etapas:

- 1.- Convección forzada desde el seno de la fase alimentación hasta la interfase alimentación-membrana.
- 2.- Reparto de los sustratos entre el n-hexano de la fase alimentación ( $C_f$ ) y el líquido iónico inmovilizado en la membrana orgánica ( $C_{fi}$ ).
- 3.- Difusión a través de la membrana líquida bajo la acción del gradiente de concentración hasta la interfase membrana-fase receptora.
- 4.- Reparto de los sustratos entre el líquido iónico inmovilizado en la membrana orgánica ( $C_{ri}$ ) y el hexano de la fase receptora ( $C_r$ ).
- 5.- Convección forzada desde la interfase membrana-fase receptora al seno de la fase receptora.

Considerando que no hay acumulación de los solutos en el interior de la membrana líquida, la ecuación que describe el proceso completo de permeación es la siguiente:

$$J = - \bar{P} (C_r - C_f) \quad (7.1)$$

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

donde  $J$  es el flujo másico de soluto,  $\bar{P}$  es la permeabilidad del soluto a través de la membrana y  $C_r$  y  $C_f$  son las concentraciones de soluto en la fase receptora y en la fase alimentación, respectivamente.

Dado que el flujo puede ser alternativamente expresado como el número de moles de soluto transportados por unidad de superficie de la membrana ( $A$ ) y por unidad de tiempo, la ecuación (7.1) puede reescribirse como:

$$\frac{dN_r}{dt} = -\bar{P} A (C_r - C_f) \quad (7.2)$$

donde  $N_r$  son los moles de soluto presentes en el compartimento receptor. Este término puede ser expresado en términos de la concentración de soluto como:

$$N_r = C_r \cdot V_r \quad (7.3)$$

donde  $V_r$  es el volumen de la fase receptora. Teniendo en cuenta que los volúmenes de las fases alimentación y receptora son iguales y se mantienen constantes a lo largo del ensayo ( $V_r = V_f = V$ ), la ecuación (7.2) puede ser expresada como:

$$\frac{dC_r}{dt} = -\frac{\bar{P} A (C_r - C_f)}{V} \quad (7.4)$$

Dado que el flujo de soluto es elevado, la concentración de soluto en la fase receptora ( $C_r$ ) no es despreciable frente a la concentración en la fase alimentación ( $C_f$ ). Entonces,  $(C_r - C_f)$  puede ser calculada usando la ecuación (7.5) donde  $C_0$  es la concentración inicial de soluto en la fase alimentación:

$$C_f = C_0 - C_r \quad \text{y} \quad (C_r - C_f) = 2C_r - C_0 \quad (7.5)$$

Combinando las ecuaciones (7.4) y (7.5) obtenemos la ecuación (7.6):

$$\frac{dC_r}{(2C_r - C_0)} = -\frac{\bar{P} A}{V} dt \quad (7.6)$$

La ecuación (7.6) puede ser analíticamente resuelta con la siguiente condición inicial:

$$t = 0, C_r = 0$$

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

y de contorno:

$$t = t, C_r = C_r$$

La integración de ambos términos de la ecuación (7.6) da lugar a la ecuación (7.7):

$$\ln \left[ \frac{(C_0 - 2C_r)}{C_0} \right] = \frac{-2 \bar{P} A}{V} t \quad (7.7)$$

que muestra que el  $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$  es una función lineal de  $t$ . El valor de la permeabilidad para un soluto dado se calcula mediante la ecuación (7.8), de la pendiente  $m$  de la representación de  $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$  frente a  $t$ :

$$\bar{P} = - \frac{mV}{2A} \quad (7.8)$$

Además, se determinó la *permeoselectividad media de la membrana* ( $r\bar{P}$ ) como un criterio numérico para comparar la capacidad de las diferentes SLMs para separar los compuestos de interés (Ecuación 7.9).

$$r\bar{P} = \frac{\sum_i^n rP_i}{n} \quad \text{con } rP_i > 1 \quad (7.9)$$

donde  $rP_i$  es la permeoselectividad que muestra la membrana hacia dos compuestos (i.e. rac-1-feniletanol y butirato de rac-1-feniletilo) y  $n$  es el número de parejas posibles entre los diferentes compuestos.  $rP_i$  puede ser expresado como el cociente de las permeabilidades individuales de dos compuestos:

$$rP_i = \frac{\bar{P}_A}{\bar{P}_B} \quad (7.10)$$

La permeoselectividad media de la membrana es un reflejo de la eficacia de la membrana en la separación de los compuestos de interés. Así, cuanto mayor sea el valor de  $r\bar{P}$  mayor será la selectividad de la membrana para separación de los compuestos. Valores de  $r\bar{P}$  cercanos a 1 significan que las membranas no son adecuadas para la separación de los compuestos de interés.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

### 7.2.6. Estudios de reacción

El medio de reacción en los todos los ensayos consistió en una mezcla estequiométrica de los sustratos y diferentes porcentajes de agua. En un vial de 22 mL se añadieron 1 mmol de éster vinílico, 1 mmol de *rac*-1-feniletanol y la correspondiente cantidad de agua y posteriormente se completó hasta un volumen total de 10 mL con n-hexano. El contenido en agua se controló mediante un valorador Karl Fischer, tal y como se describe en la sección 7.2.8.2. La reacción comenzó con la adición de 26.6 mg de Novozym 435 sobre la disolución de los sustratos y el vial de reacción se sumergió entonces en un baño termostataado a 30°C.

La mezcla de reacción permaneció agitada durante las 2 h de ensayo y a intervalos de tiempo regulares se tomaron muestras de 30 µL, las cuales se diluyeron con 470 µL de n-hexano, se agitaron y se enfriaron en un baño de hielo. Posteriormente, se añadieron 400 µL de la disolución anterior sobre 100 µL de una disolución 30 mM de estándar interno (butirato de butilo) en n-hexano y 5 µL de la disolución resultante se analizaron mediante cromatografía de gases tal y como se describe en la sección 7.2.8.1. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, mostrándose en la memoria los valores medios. La repetitividad de los ensayos, medida a través de la desviación estándar relativa fue < 3%. La eficiencia catalítica se midió mediante tres parámetros: la actividad sintética (U), definida como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de éster por minuto, la selectividad, como la relación entre la actividad sintética y la velocidad de consumo del dador de acilo (éster vinílico), la cual tiene en cuenta la reacción de hidrólisis competitiva del dador de acilo (ver **Figura 7.1**) y el exceso enantiomérico del producto de síntesis, determinado mediante la ecuación 7.11.

$$e.e(\%) = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \times 100 \quad (7.11)$$

donde  $C_R$  y  $C_S$  son las concentraciones de los enantiómeros (R) y (S), respectivamente.

### 7.2.7. Estudios de reacción/separación

Los estudios de reacción/separación se llevaron a cabo a 30°C usando el dispositivo experimental que se muestra en la Figura 7.6. La fase alimentación consistió en una disolución 100 mM de *rac*-1-feniletanol y 100 mM del éster vinílico correspondiente en n-hexano. La fase receptora fue n-hexano puro. Se colocó en la fase alimentación la cantidad correspondiente de enzima inmovilizada (Novozym 435) y se comenzó el experimento adicionando 30 ml de cada una de las disoluciones anteriormente citadas a sus respectivos compartimentos. Ambos compartimentos se agitaron mecánicamente y se siguió el proceso integrado de reacción/separación por cromatografía de gases,

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

tomando 100  $\mu\text{L}$  de cada compartimento a intervalos de tiempo regulares durante 120 h. A la muestra anterior se le añadieron 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 60 mM de butirato de butilo (estandar interno) y 800  $\mu\text{L}$  de n-hexano y 5  $\mu\text{L}$  de la disolución resultante se analizaron mediante cromatografía de gases tal y como se describe en la sección 7.2.8.1.

Para determinar la eficiencia del proceso integrado de reacción/separación en la separación de los dos enantiómeros, se calculó el factor de separación ( $\alpha_{S/R}$ ) mediante la expresión 7.12.

$$\alpha_{S/R} = \frac{\frac{C_{r,S}}{C_{f,S}}}{\frac{C_{r,R}}{C_{f,R}}} \quad (7.12)$$

siendo  $C_{r,S}$  y  $C_{r,R}$  las concentraciones en la fase receptora del enantiómero (S) y (R), respectivamente, y  $C_{f,S}$  y  $C_{f,R}$  las concentraciones del enantiómero (S) y (R) en la fase alimentación, respectivamente.

### 7.2.8. Métodos analíticos

#### 7.2.8.1. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras se llevó a cabo por cromatografía de gases en un cromatógrafo Agilent 6890 N equipado con un detector de ionización en llama (FID), un inyector automático de muestras y una columna capilar  $\beta$ DEX-120 de Supelco, cuyas especificaciones se recogen en la **Tabla 7.1**.

**Tabla 7.1.** Características de la columna capilar.

Columna Supelco™ 16612-03A-DEX 120	
Longitud: 30 m	Espesor de película: 250 $\mu\text{m}$
Diámetro nominal: 0.25 mm	Temperatura máxima: 230° C

En todos los casos, la temperatura en el inyector se fijó en 220 °C, se trabajó con presión constante de helio (gas portador) de 19.9 psi (1.9 mL /min flujo total) en la cabeza de la columna y con una relación de split de 30:1. En el detector, la temperatura fue de 300 °C y los caudales de gases en el mismo de 400 ml/min de aire sintético de

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

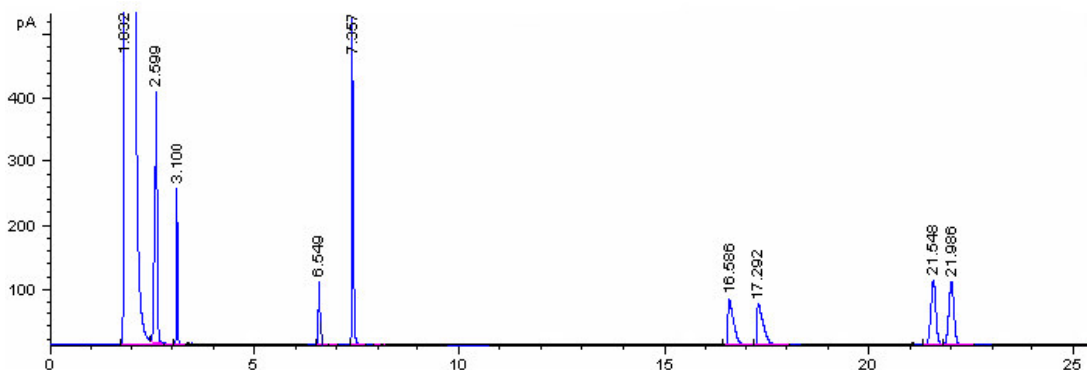
laboratorio, 30 ml/min de hidrógeno y 20 ml/min de helio. La temperatura de la columna se programó en todos los casos para conseguir la correcta separación de los picos de los distintos componentes de las muestras.

A continuación, se exponen los perfiles de temperatura, los tiempos de retención y las pendientes de las rectas de calibrado para cada uno de los sistemas estudiados.

Sistema de reacción 1 : *Propionato de vinilo, rac-1-feniletanol, propionato de rac-1-feniletilo y ácido propiónico.*

El perfil de temperatura es el siguiente: 60 °C, 2 min; 15 °C/min, 120 °C; 120 °C, 20 min.

En la **Figura 7.8** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema de reacción.



**Figura 7.8.** Cromatograma del sistema: propionato de vinilo, *rac*-1-feniletanol, propionato de *rac*-1-feniletilo y ácido propiónico.

Los tiempos de retención de los compuestos estudiados son los siguientes: n-hexano, 1-2.6 min; propionato de vinilo, 3.1 min; ácido propiónico 6.5 min; butirato de butilo (estándar interno), 7.4 min; (R)-1-feniletanol, 16.6 min; (S)-1-feniletanol, 17.3 min; propionato de (S)-1-feniletilo, 21.5 min; propionato de (R)-1-feniletilo, 21.9 min.

En la **Tabla 7.2** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

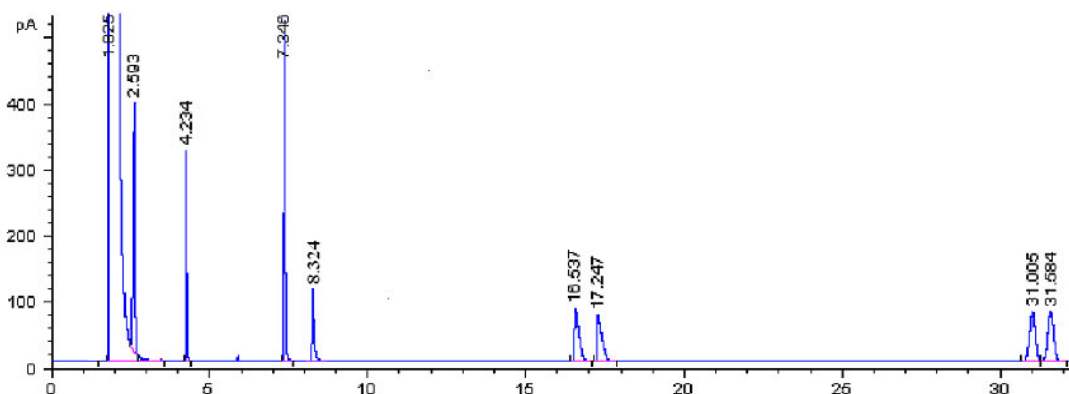
**Tabla 7.2.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: propionato de vinilo, (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, propionato de (S)-1-feniletilo, propionato de (R)-1-feniletilo y ácido propiónico.

Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
PROPIONATO DE VINILO	2.151	0.9937
(R)-1-FENILETANOL	0.938	0.9921
(S)-1-FENILETANOL	0.940	0.9984
PROPIONATO DE (S)-1-FENILETILO	0.726	0.9911
PROPIONATO DE (R)-1-FENILETILO	0.707	0.9907
ÁCIDO PROPIÓNICO	3.270	0.9974

Sistema de reacción 2: *Butirato de vinilo, rac-1-feniletanol, butirato de rac-1-feniletilo y ácido butírico.*

El perfil de temperatura es el siguiente: 60 °C, 2 min; 15 °C/min, 120 °C; 120 °C, 30 min.

En la **Figura 7.9** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.



**Figura 7.9.** Cromatograma del sistema: butirato de vinilo, rac-1-feniletanol, butirato de rac-1-feniletilo y ácido butírico.



## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

Los tiempos de retención de los compuestos estudiados son los siguientes: n-hexano, 1-2.6 min; butirato de vinilo, 4.2 min; butirato de butilo (estándar interno), 7.3 min; ácido butírico 6.5 min; (R)-1-feniletanol, 16.5 min; (S)-1-feniletanol, 17.2 min; butirato de (S)-1-feniletilo, 31.0 min; propionato de (R)-1-feniletilo, 31.6 min.

En la **Tabla 7.3** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.

**Tabla 7.3.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: butirato de vinilo, (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, butirato de (S)-1-feniletilo, butirato de (R)-1-feniletilo y ácido butírico.

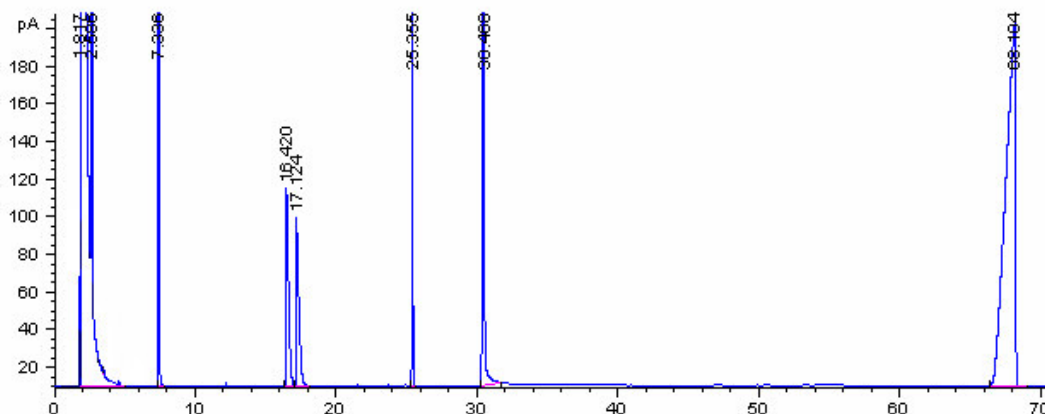
Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
BUTIRATO DE VINILO	1.860	0.9902
(R)-1-FENILETANOL	0.926	0.9926
(S)-1-FENILETANOL	0.925	0.9995
BUTIRATO DE (S)-1-FENILETILO	0.569	0.9901
BUTIRATO DE (R)-1-FENILETILO	0.569	0.9978
ÁCIDO BUTÍRICO	2.822	0.9952

Sistema de reacción 3: *Laurato de vinilo, rac-1-feniletanol, laurato de rac-1-feniletilo y ácido laúrico.*

El perfil de temperatura es el siguiente: 60 °C, 2 min; 15 °C/min, 120 °C; 120 °C, 13 min; 15 °C/min, 190 °C; 190 °C, 60 min.

En la **Figura 7.10** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación



**Figura 7.10.** Cromatograma del sistema: Laurato de vinilo, *rac*-1-feniletanol, Laurato de *rac*-1-feniletilo y ácido láurico.

Los tiempos de retención de los compuestos estudiados son los siguientes: n-hexano, 1.8-2.7 min; butirato de butilo (estándar interno), 7.3 min; (R)-1-feniletanol, 16.4 min; (S)-1-feniletanol, 17.1 min; Laurato de vinilo 25.3 min; ácido láurico 30.4 min; Laurato de *rac*-1-feniletilo, 68.1 min.

En la **Tabla 7.4.** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.

**Tabla 7.4.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: Laurato de vinilo, (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, Laurato de (*rac*)-1-feniletilo y ácido láurico.

Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
LAURATO DE VINILO	0.408	0.9977
(R)-1-FENILETANOL	0.926	0.9932
(S)-1-FENILETANOL	0.925	0.9964
LAURATO DE RAC-1-FENILETILO	0.361	0.9903
ÁCIDO LAÚRICO	0.629	0.9917

Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos.

### 7.2.8.2. Determinación del contenido en agua

El contenido en agua se midió con un aparato Karl Fisher coulombimétrico modelo Metrohm 831 KF. Para efectuar su determinación se valoró una muestra de peso conocido usando como reactivo Karl Fischer HYDRANAL-Coulomat AG (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Madrid, Spain).

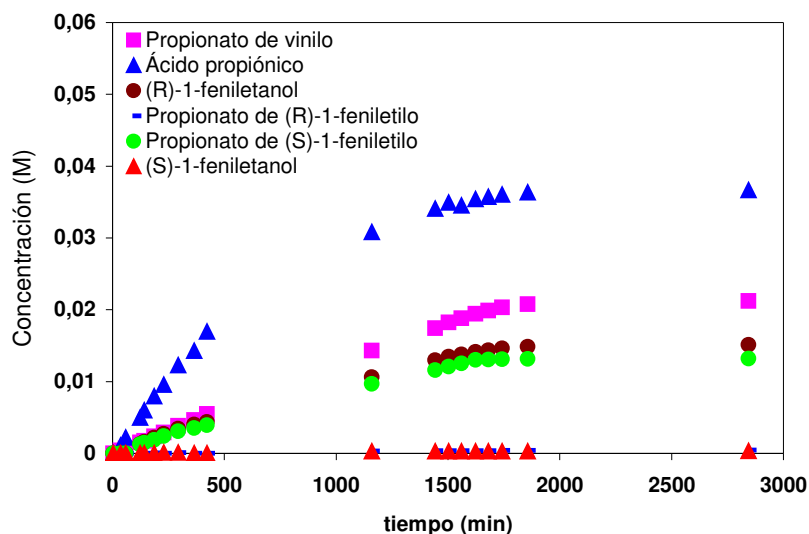
## 7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.3.1. Selección de la membrana líquida soportada

En primer lugar, se determinó la permeabilidad de los compuestos que intervienen en la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol mediante la reacción de transesterificación con con propionato de vinilo ((R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-1-feniletilo, propionato de (S)-1-feniletilo y ácido propiónico) a través de diferentes SLMs basadas en líquidos iónicos, con el fin de estudiar la influencia de la fase líquido iónico en el transporte de los solutos. En un trabajo previo [21] se comprobó que el carácter hidrofílico/hidrofóbico de los líquidos iónicos es un factor clave en la separación selectiva de los sustratos y productos de reacciones de transesterificación. En base a estos resultados se seleccionaron para el presente estudio líquidos iónicos con diferente carácter hidrofílico/hidrofóbico. Los líquidos iónicos usados estaban basados en dos cationes: (i) 1-butil-3-metilimidazolio ( $\text{bmim}^+$ ) y (ii) 1-metil-3-octilimidazolio ( $\text{omim}^+$ ) y en tres aniones nombrados como hexafluorofosfato ( $\text{PF}_6^-$ ), tetrafluoroborato ( $\text{BF}_4^-$ ) y bis{(trifluorometil)sulfonil} imida ( $\text{NTf}_2^-$ ).

Se siguió la evolución de las concentraciones experimentales de (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-1-feniletilo, propionato de (S)-1-feniletilo y ácido propiónico en la fase alimentación y receptora a lo largo de 48 h, utilizándose las concentraciones de la fase receptora para calcular las permeabilidades individuales de los compuestos ( $\bar{P}$ ). A título de ejemplo, en la **Figura 7.11** se muestra el perfil de concentraciones en el compartimento receptor cuando se utilizó la membrana de Nylon con  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$  soportado.

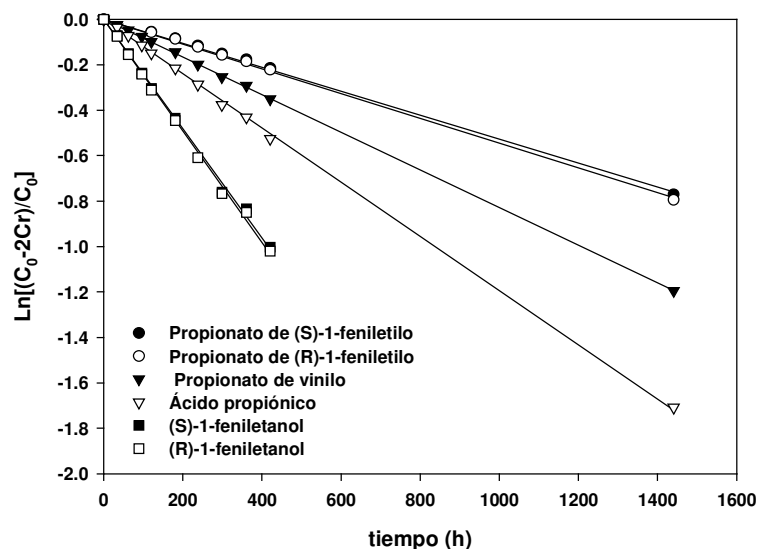
## 7. Resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación



**Figura 7.11.** Perfiles de concentración en la fase receptora de propionato de vinilo, *rac*-1-feniletanol, propionato de *rac*-1-feniletilo y ácido propiónico a través de la membrana de Nylon con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] soportado.

Los valores de permeabilidad se obtuvieron de las pendientes de las representaciones de  $\ln [(C_0 - 2 C_r) / C_0]$  para cada compuesto frente a  $t$  usando la ecuación 7.7. A título de ejemplo, en la **Figura 7.12** se muestran las representaciones gráficas usadas para el cálculo de las permeabilidades de los compuestos a través de la membrana de Nylon con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] inmovilizado. El resto de perfiles se encuentran recogidos en el Anexo 3.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación



**Figura 7.12.** Representación del  $\ln[(C_0 - 2C_r)/C_0]$  frente a  $t$  para el transporte de (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-1-feniletilo, propionato de (S)-1-feniletilo y ácido propiónico a través de la membrana de Nylon con  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  soportado.

Los valores de permeabilidad obtenidos para cada compuestos a través de las diferentes membranas líquidas soportadas se presentan en la **Tabla 7.5**. Como se puede observar, cuando se usó  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  y  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  como fase líquida soportada, los valores de permeabilidad obtenidos para los diferentes compuestos fueron menores los encontrados para el resto de líquidos iónicos. Además, no se encontraron diferencias de permeabilidad significativas entre (R)-1-feniletanol y (S)-1-feniletanol y entre propionato de (R)-1-feniletilo y propionato de (S)-1-feniletilo, en las diferentes membranas líquidas soportadas. Sin embargo, se encontraron notables diferencias de permeabilidad relacionadas con la naturaleza del grupo funcional de los compuestos estudiados, incrementándose la permeabilidad en el siguiente orden: éster < ácido < alcohol.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

**Tabla 7.5.** Permeabilidades de (R)-1-feniletanol y (S)-1-feniletanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-1-feniletilo, propionato de (S)-1-feniletilo y ácido propiónico a través de la membrana de Nylon con diferentes líquidos iónicos soportados.

SLM	Permeabilidad $\times 10^6$ (cm/s)					
	(R)-1-feniletanol	(S)-1-feniletanol	Propionato de vinilo	Propionato de (R)-1-feniletilo	Propionato de (S)-1-feniletilo	Ácido propiónico
Nylon con [bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	152.0	151.7	21.6	13.1	11.7	107.7
Nylon con [bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	43.1	42.5	12.7	6.6	6.3	23.2
Nylon con [bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	147.7	144.6	49.9	32.8	31.7	71.9
Nylon con [omim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	157.5	156.2	42.7	28.8	27.7	98.8
Nylon con [omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	59.4	59.2	38.6	17.1	15.8	34.3
Nylon con [omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	148.6	148.7	77.4	51.4	49.7	78.8

Condiciones: concentraciones iniciales de los solutos, 100 mM; temperatura, 30 °C; tiempo, 48 h.

Se determinaron además los valores de permeoselectividad media de las SLMs obtenidas, los cuales se recogen en la **Tabla 7.6**.

**Tabla 7.6.** Permeoselectividad media de las SLM estudiadas.

Membrana	rP
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	6.3
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	3.5
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	2.6
[omim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	3.1
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	2.2
[omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	1.9

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

Como se desprende de la tabla anterior, la SLM basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] fue la más adecuada para la separación selectiva de los compuestos de interés, ya que exhibió el mayor valor de permeoselectividad media.

Además, de la **Tabla 7.6** se puede derivar el siguiente orden de permeoselectividad media: [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] > [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]. Si se compara la secuencia anterior con el orden de hidrofiliidad de los líquidos iónicos estudiados, determinado en un trabajo anterior [28]: [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] > [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], se encuentra que la secuencia coincide exactamente con la anterior, por lo que se puede concluir que un incremento en el carácter hidrofílico de los líquidos iónicos implica un incremento en el valor de permeoselectividad media obtenido para la separación de los compuestos de interés.

Teniendo en cuenta que la SLM basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] fue la membrana líquida soportada más adecuada, se estudió el transporte a través de la misma de los compuestos que intervienen en la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol con butirato de vinilo y laurato de vinilo ((*R*)-1-feniletanol y (*S*)-1-feniletanol, butirato de vinilo, butirato de (*R*)-1-feniletilo y butirato de (*S*)-1-feniletilo, ácido butírico, laurato de vinilo, laurato de (*R*)-1-feniletilo y laurato de (*S*)-1-feniletilo y ácido láurico). Los valores de permeabilidad para cada compuesto y los de permeabilidad media obtenidos se recogen en la **Tabla 7.7**.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

**Tabla 7.7.** Valores de permeabilidad para el (R)-1-feniletanol y (S)-1-feniletanol, butirato de vinilo, butirato de (R)-1-feniletilo y butirato de (S)-1-feniletilo, ácido butírico, laurato de vinilo, laurato de (R)-1-feniletilo y laurato de (S)-1-feniletilo y ácido láurico a través de la SLM basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].

Compuesto	Permeabilidad × 10 <sup>6</sup> (cm/s)	$\bar{rP}$
<b>Sistema de reacción 2</b>		
(R)-1-feniletanol	134.18	10.98
(S)-1-feniletanol	133.24	
Butirato de vinilo	9.66	
butirato de (R)-1-feniletilo	4.41	
Butirato de (S)-1-feniletilo	4.43	
Ácido Butírico	51.35	
<b>Sistema de reacción 3</b>		
(R)-1-feniletanol	105.97	711.7
(S)-1-feniletanol	105.15	
Laurato de vinilo	0.09	
Laurato de (R)-1-feniletilo	0.06	
Laurato de (S)-1-feniletilo	0.06	
Ácido Láurico	0.09	

Tal y como puede observarse en la tabla anterior, los valores de permeoselectividad media aumentaron conforme lo hizo la longitud de la cadena alquílica del éster vinílico utilizado como dador de acilo en la resolución y, por lo tanto, conforme aumentó la longitud de la cadena alquílica de los posibles productos de reacción (p.e. butirato de (R)-1-feniletilo), lo cual se debe principalmente a las mayores diferencias en los valores permeabilidad entre el alcohol racémico y los ésteres alquílicos formados (p.e.  $\bar{P}_{(R)-1-feniletanol} = 105.97 \times 10^6(\text{cm/s})$  y  $\bar{P}_{\text{Laurato de (R)-1-feniletilo}} = 0.06 \times 10^6(\text{cm/s})$ ).

La membrana líquida soportada basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] fue la más adecuada entre todas las estudiadas para la separación selectiva de los compuestos objeto de estudio, por lo que los estudios posteriores se realizaron utilizando esta SLM.



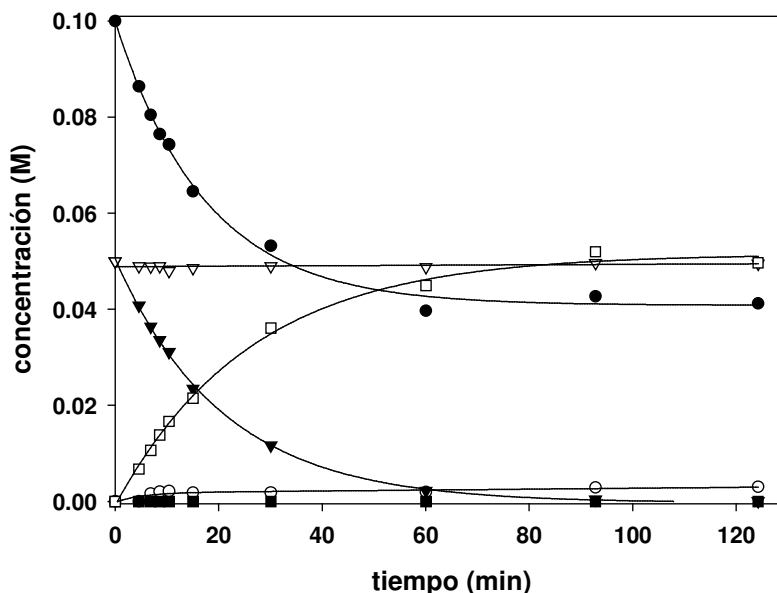
## 7. Resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

### 7.3.2. Resolución cinética de *rac*-1-feniletanol en n-hexano: efecto del éster vinílico y del contenido en agua

La resolución cinética de *rac*-1-feniletanol catalizada por la enzima inmovilizada lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) se estudió en n-hexano a 30 °C, usando tres dadores de acilo distintos (propionato de vinilo, butirato de vinilo y laurato de vinilo) y con diferentes contenidos de agua. Se utilizó n-hexano como medio de reacción ya que este fue el disolvente usado como fase alimentación y receptora en los ensayos de reacción/separación. Como cualquier proceso controlado cinéticamente por una serina hidrolasa (CaLB), el producto de transformación del éster vinílico depende de la distribución competitiva del intermedio acil-enzima rápidamente formado entre los diferentes nucleófilos presentes en el medio, tales como agua (producto de hidrólisis) o *rac*-1-feniletanol (producto de transesterificación) (ver **Figura 7.1**). La formación del producto de transesterificación puede ser potenciada mediante (i) el uso de dadores de acilo activados [29,30], tales como ésteres vinílicos, ya que el alcohol vinílico liberado en la degradación del éster vinílico tautomeriza a acetaldehído, el cual no puede actuar como sustrato para la enzima, (ii) medios con bajo contenido en agua y (iii) altas concentraciones de los compuestos nucleófilos de interés (p.e. *rac*-1-feniletanol). En este contexto, la eficiencia en la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol se puede medir mediante tres parámetros: la actividad sintética, la selectividad hacia el producto de síntesis y el exceso enantiomérico (e.e) del producto de reacción.

A título de ejemplo, en la **Figura 7.13** se muestra la evolución con el tiempo de la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol catalizada por la enzima inmovilizada CaLB en n-hexano con un contenido en agua de 50 ppm y a una temperatura de 30°C, usando propionato de vinilo como dador de acilo.

## 7. Resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

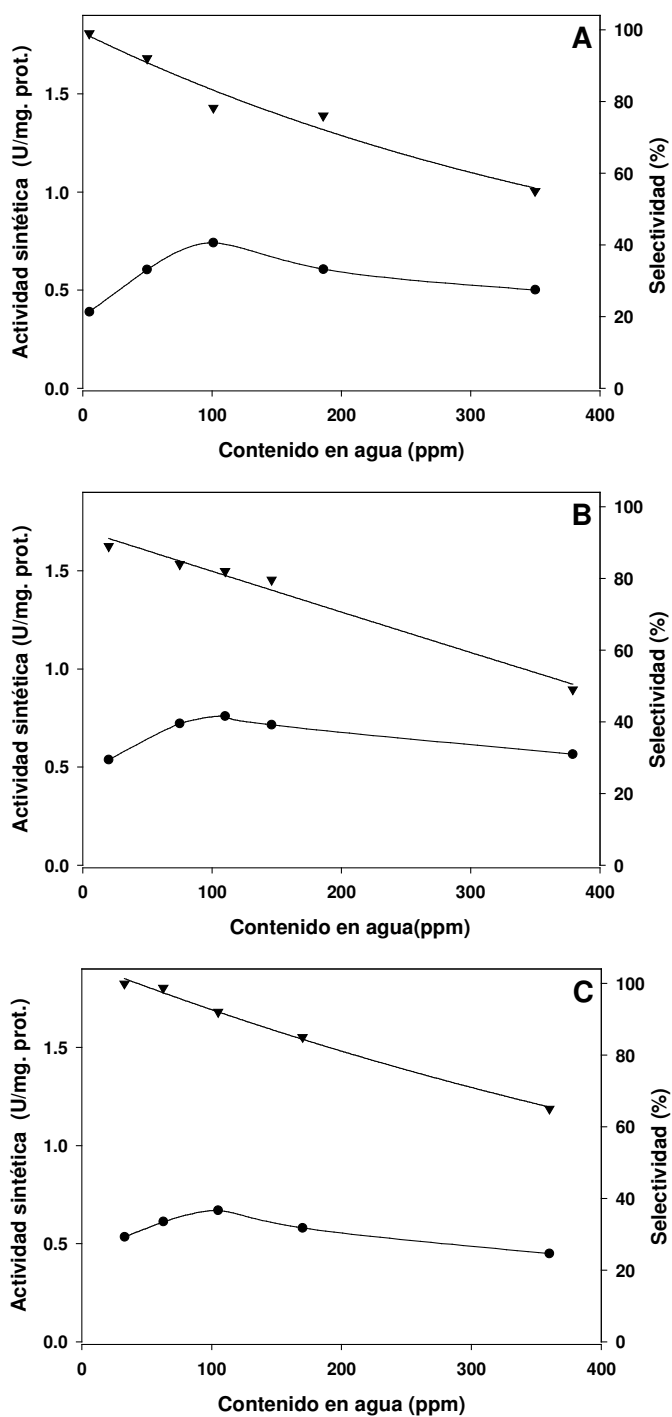


**Figura 7.13.** Evolución de la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol en n-hexano con un contenido en agua de 50 ppm y a una temperatura de 30°C, usando propionato de vinilo (●) como dador de acilo. (▼) (R)-1-feniletanol, (▽) (S)-1-feniletanol, (□) propionato de (R)-1-feniletilo, (■) propionato de (S)-1-feniletilo, (○) ácido propiónico.

Como se desprende de la gráfica anterior, el consumo del dador de acilo (propionato de vinilo) es seguido por un concomitante incremento de la concentración del producto de síntesis (propionato de (R)-1-feniletilo) y del producto de hidrólisis (ácido propiónico). Por otra parte, el consumo de *rac*-1-feniletanol coincide exactamente con la síntesis de propionato de (R)-1-feniletilo. No se detectó el isómero propionato de (S)-1-feniletilo, por lo que la reacción transcurrió con una gran enantioselectividad (e.e. > 99.99%).

La actividad sintética, selectividad y enantioselectividad de la enzima lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym 435) para la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol se determinó a 30°C, usando para ello diferentes dadores de acilo (propionato de vinilo, butirato de vinilo, laurato de vinilo) y variando el contenido en agua del medio de reacción (de 5 a 380 ppm). El control y optimización del contenido en agua se hizo necesario ya que es esencial una mínima cantidad de agua para el mantenimiento de la actividad de la mayoría de los biocatalizadores [30,31]. En el Anexo 4 se recogen las pendientes iniciales de los perfiles de concentración de los ésteres de (R)-1-feniletilo y de los ácidos carboxílicos utilizadas para el cálculo de los valores de actividad y selectividad. La **Figura 7.14** muestra la evolución con el contenido en agua de la actividad sintética y la selectividad exhibida por CaLB para la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol con ésteres vinílicos de diferente longitud de cadena.

## 7. Resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación



**Figura 7.14.** Actividad sintética (●) y selectividad (▼) mostrada por la enzima CaLB en función del contenido en agua, para la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol en *n*-hexano a 30°C, usando propionato de vinilo (A), butirato de vinilo (B) laurato de vinilo (C) como dadores de acilo.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

Como puede observarse, la actividad sintética mostrada por CaLB, para todos los ésteres vinílicos utilizados, presentó una distribución de campana de Gauss, encontrándose el máximo de actividad aprox. a 100 ppm de agua. Después de este máximo, la actividad sintética disminuyó conforme aumentó el contenido en agua. Por otra parte, respecto a los valores de selectividad cabe destacar que el incremento en el contenido en agua supuso una disminución en los valores de selectividad dentro del intervalo experimental, tal y como era de esperar ya que se ve más favorecido el proceso de hidrólisis. Además, no se encontraron diferencias importantes en cuanto actividad y selectividad entre los diferentes ésteres vinílicos usados. En relación a la enantioselectividad de la enzima es destacable que el producto de reacción propionato de (*S*)-1-feniletilo no se detectó en ningún caso en el medio de reacción, lo cual está totalmente de acuerdo con la *R*-enantioselectividad mostrada por las lipasas para esta clase de sustratos [32]. Se demuestra de este modo la excelente enantioselectividad CaLB para la resolución racémica estudiada.

En resumen, deberán emplearse distintas concentraciones en agua dependiendo de si se requiere una alta actividad o una alta selectividad.

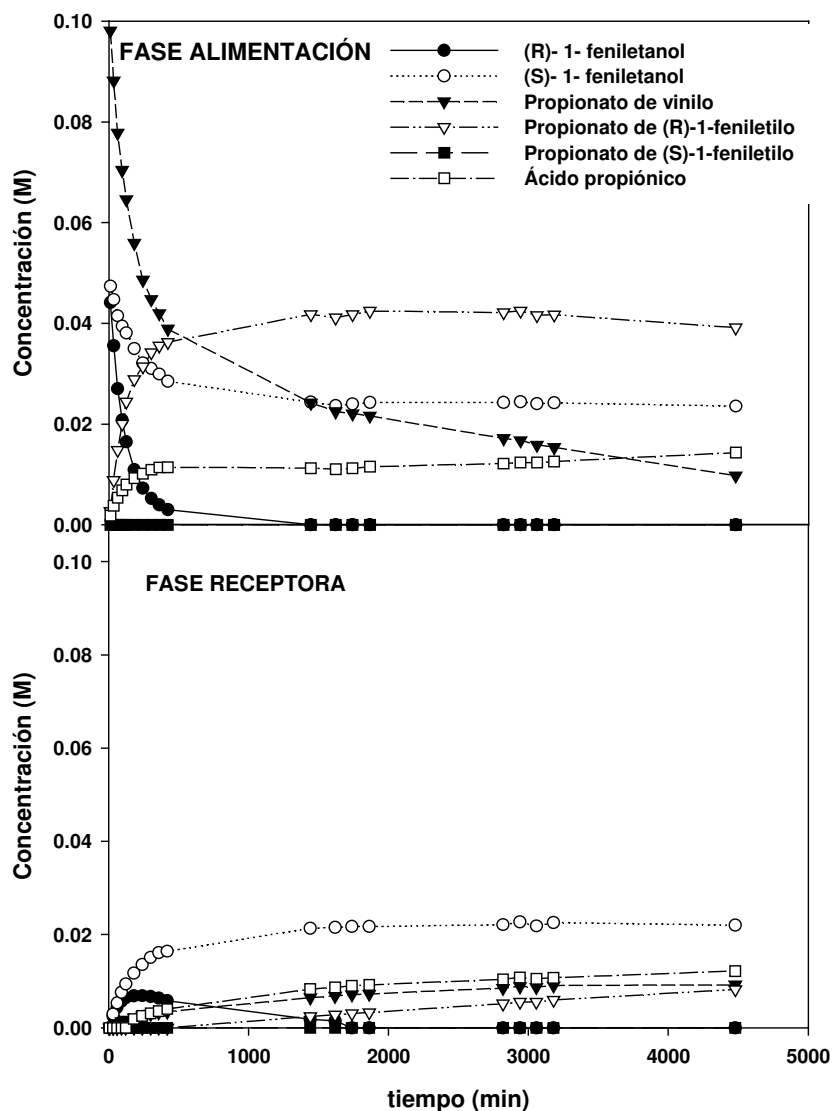
### 7.3.3. Proceso de reacción/separación para la resolución cinética de rac-1-feniletanol

#### **7.3.3.1. Efecto de la concentración de enzima**

Una vez seleccionada la SLM más adecuada para la separación de los compuestos que intervienen en la resolución racémica (Nylon con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]), esta membrana se utilizó en los procesos integrados de reacción/separación. El contenido de agua seleccionado como óptimo fue de 100 ppm, por lo que se añadió esta cantidad de agua en todos los ensayos de reacción/separación. A este contenido en agua, tal y como se ha comentado en el apartado anterior, la actividad sintética fue máxima mientras que la selectividad se mantenía en valores elevados.

En primer lugar, se analizó el efecto de la concentración enzimática en el compartimento de alimentación sobre la eficiencia del proceso integrado de reacción/separación. Para ello se añadieron diferentes cantidades de enzima inmovilizada en el compartimento alimentación (20, 40 y 80 mg). En la **Figura 7.15** se muestra la evolución con el tiempo de las concentraciones de los reactivos y productos en las fases alimentación y receptora cuando se añadieron 20 mg de enzima en el compartimento alimentación. Los perfiles de concentración en el compartimento alimentación y receptor cuando se añadieron 40 y 80 mg de enzima mostraron una tendencia similar (Anexo 5).

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación



**Figura 7.15.** Evolución de la concentración con el tiempo de (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-1-feniletilo, propionato de (S)-1-feniletilo, y ácido propiónico en la fase alimentación y en la receptora para el proceso de reacción/separación usando la membrana de Nylon con  $[bmim]^+[BF_4]^-$  soportado cuando se añadieron 20 mg de enzima en el compartimento alimentación (condiciones: concentración inicial de los sustratos, 100 mM; temperatura, 30 °C; tiempo, 120 h.).

Como se puede observar en la **Figura 7.15**, el isómero (S)-1-feniletanol no reaccionó en el compartimento alimentación con el propionato de vinilo y como consecuencia el producto de reacción propionato de (S)-1-feniletilo no se detectó, por lo que la

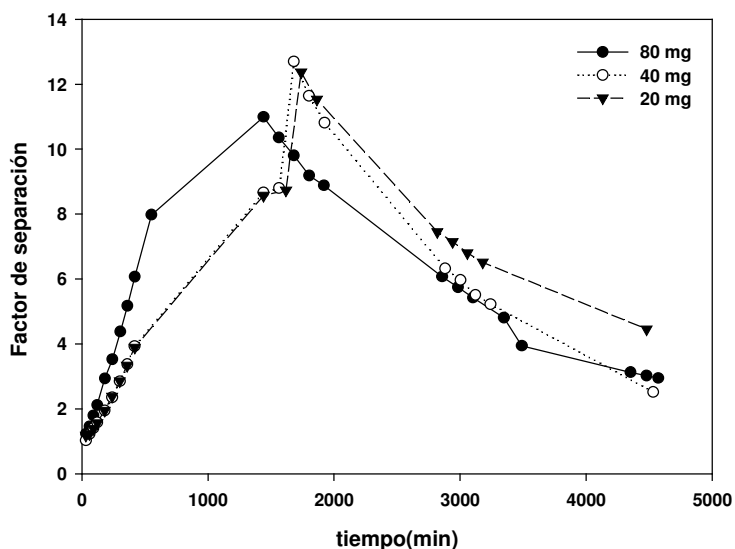
## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

enantioselectividad exhibida por la enzima en el proceso de reacción/separación fue muy alta ( $e.e_{\text{Producto}} > 99.9\%$ ). Por lo tanto, el (S)-1-feniletanol difundió a la fase receptora hasta alcanzar la concentración de equilibrio en ambas fases. Por el contrario, el (R)-1-feniletanol reaccionó con el éster vinílico en la fase alimentación formando el propionato de (R)-1-feniletilo. En una primera etapa del experimento, parte del isómero (R)-1-feniletanol, que todavía no había reaccionado, comenzó a difundir a la fase receptora. Sin embargo, cuando la concentración de este sustrato en la fase alimentación fue menor que en la fase receptora (ya que en la fase alimentación se consume continuamente), el (R)-1-feniletanol presente en la fase receptora retornó a la fase alimentación donde continuó reaccionando con el éster vinílico hasta consumirse totalmente.

Como también puede observarse en la **Figura 7.15**, la reacción competitiva hidrolítica del dador de acilo (éster vinílico) (ver **Figura 7.1**) también se dió en cierta extensión dado que se detectó el producto de hidrólisis en la fase alimentación y posteriormente en la fase receptora, lo cual llevó consigo una disminución en la selectividad de la reacción.

Con el fin de determinar el efecto de la concentración de enzima en el compartimento alimentación sobre la eficiencia del proceso de reacción/separación, se determinó la evolución del factor de separación ( $\alpha_{S/R}$ ) con el tiempo para las diferentes concentraciones de enzima (**Figura 7.16**). El factor de separación alcanzó un máximo a aprox. 1400-1700 min. y después fue decreciendo continuamente. La disminución del factor de separación es debido a que el (S)-1-feniletanol prácticamente alcanzó la concentración de equilibrio entre ambas fases a los 1400-1700 min., mientras que la concentración de propionato de (R)-1-feniletilo continuó aumentando en la fase receptora. Además, como puede observarse en la **Figura 7.16**, conforme aumentó la concentración de enzima, el máximo valor del factor de separación se desplazó a tiempos más cortos debido a que la velocidad de reacción fue mayor y por tanto el producto de reacción (propionato de (R)-1-feniletilo) empezó a difundir antes hacia la fase receptora.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación



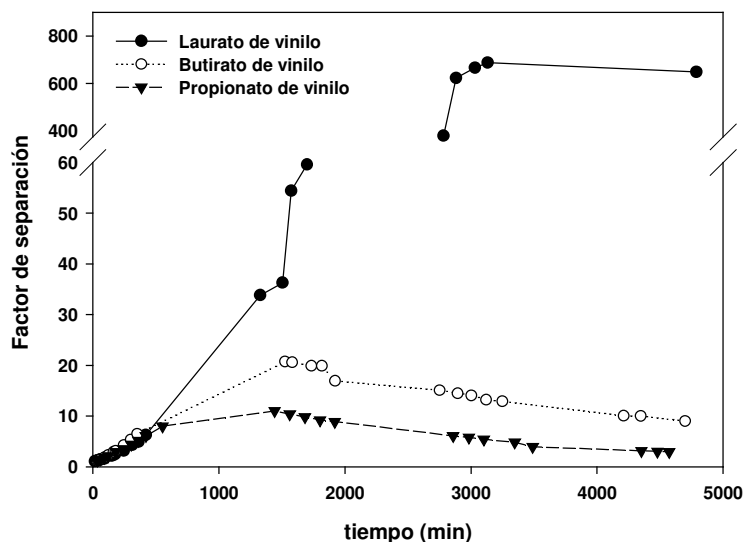
**Figura 7.16.** Evolución del factor de separación ( $\alpha_{S/R}$ ) con el tiempo para las diferentes concentraciones de enzima utilizadas en el compartimento alimentación.

La eficiencia del proceso de reacción/separación se analizó a partir de los valores obtenidos de los factores de separación a tiempos cortos. Como se puede observar en la **Figura 7.16**, al aumentar la concentración de enzima se observó un incremento en los factores de separación a tiempos cortos, dentro del intervalo experimental estudiado. Por lo tanto, la mayor eficiencia en el proceso de reacción/separación se alcanzó con 80 mg de enzima inmovilizada (80mg/ml), por ello los estudios posteriores se llevaron a cabo con esta cantidad de enzima.

### 7.3.3.2. Efecto de los ésteres vinílicos

Se estudió el efecto de la longitud de cadena alquílica de los ésteres vinílicos utilizados como dadores de acilo (propionato de vinilo, butirato de vinilo y laurato de vinilo) en la eficiencia del proceso integrado de reacción/separación a 30°C (perfiles de concentración recogidos en el Anexo 5). Para ello, se determinó la evolución con el tiempo del factor de separación ( $\alpha_{S/R}$ ) para los diferentes ésteres vinílicos (**Figura 7.17**).

## 7. Resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación



**Figura 7.17.** Evolución del factor de separación ( $\alpha_{S/R}$ ) con el tiempo para la resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante un proceso integrado de reacción/separación usando como dadores de acilo: laurato de vinilo, butirato de vinilo y propionato de vinilo.

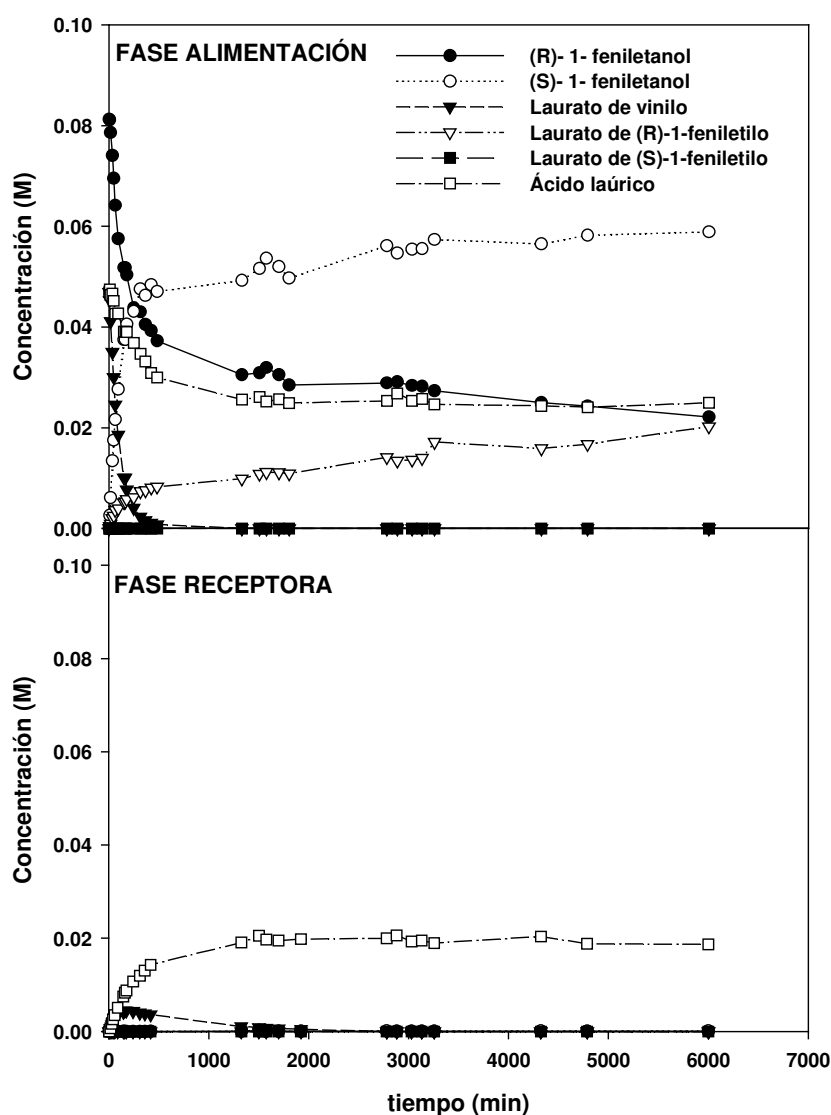
Como se puede observar en la **Figura 7.17**, conforme se aumentó la longitud de cadena del dador de acilo utilizado, aumentó el valor del factor de separación, aumentando por tanto la eficiencia del proceso de reacción/separación. La mayor eficiencia se consiguió cuando se utilizó como dador de acilo el laurato de vinilo, es decir, el éster vinílico de longitud de cadena más larga entre los estudiados. Esto puede ser explicado por el hecho de que el laurato de (R)-1-feniletilo formado en la fase alimentación presenta gran dificultad para pasar a través de la SLM desde la fase alimentación hasta la fase receptora, debido a la baja permeabilidad de este compuesto, tal y como se observó en los experimentos de transporte anteriormente discutidos. El factor de separación alcanzó un máximo para el propionato de vinilo y butirato de vinilo a aprox. 1400 y 1500 min, respectivamente. Cuando se utilizó laurato de vinilo como dador de acilo el factor de separación aumentó continuamente, manteniéndose en un valor constante después de 3100 min.

En la **Figura 7.18** se muestra la evolución en el tiempo de las concentraciones en la fases alimentación y receptora de los distintos compuestos que intervienen en la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol cuando se utilizó laurato de vinilo como dador de acilo. Como se puede observar en dicha figura, el laurato de (R)-1-feniletilo y el ácido láurico no se detectaron en la fase receptora durante el tiempo que duró el experimento, lo que puede explicarse por la baja permeabilidad de estos compuestos a



## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

través de la membrana líquida soportada empleada. La ausencia de laurato de (R)-1-feniletanol en la fase receptora explica el continuo incremento del factor de separación. Merece la pena destacar que, después de 24 h de operación, la fase receptora estuvo prácticamente constituida por (S)-1-feniletanol. Por lo tanto, tal y como se puede concluir de la Figura 4.8, el isómero (S)-1-feniletanol puede ser separado en la fase receptora del isómero (R)-1-feniletanol, el cual permanece en la fase alimentación en forma de éster (laurato de (R)-1-feniletanol).



**Figura 7.18.** Evolución con el tiempo de las concentraciones de (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, laurato de vinilo, propionato de (R)-1-feniletanol, propionato de (S)-1-feniletanol y ácido laúrico en las fases alimentación y receptora para el proceso de reacción/separación usando la membrana de Nylon con  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$  (Condiciones: concentraciones iniciales de los sustratos, 100 mM; cantidad de enzima, 80 mg; temperatura, 30 °C; tiempo, 120h).

### 7.4. CONCLUSIONES

La resolución racémica de *rac*-1-feniletanol mediante reacción de transesterificación con ésteres vinílicos catalizada por la enzima comercial lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym 435) se llevó a cabo satisfactoriamente en un reactor de membrana que contenía una SLM basada en líquidos iónicos. Este sistema integró la acción catalítica enantioselectiva de la enzima y la permeabilidad selectiva a través de la SLM de los distintos compuestos que intervienen en la reacción de transesterificación. Se analizaron varias variables del proceso de reacción/separación, tales como la naturaleza del líquido iónico inmovilizado, el contenido en agua del medio, la concentración de enzima en el compartimento alimentación y la naturaleza del éster vinílico utilizado como dador de acilo, con el fin de optimizar el proceso. Tras analizar la permeabilidad y permeoselectividad de seis SLMs basadas en ILs, la SLM basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] resultó ser la más adecuada para la separación selectiva de los compuestos que intervienen en la reacción de transesterificación. Además, se comprobó que el contenido en agua del medio es un parámetro clave para la actividad y selectividad mostrada por la enzima, siendo la cantidad óptima de agua de 100 ppm. Se analizó también el efecto de la concentración de enzima en la fase alimentación sobre la eficiencia del proceso, encontrándose que un incremento en la concentración de enzima implicaba un incremento en la eficiencia del proceso de reacción/separación. Respecto a la influencia de la naturaleza del éster vinílico utilizado en el proceso de reacción/separación es de destacar que la mayor eficiencia se consiguió con el éster vinílico de longitud de cadena alquílica mayor, laurato de vinilo. Con este éster, el (S)-feniletanol se separa casi completamente del (R)-feniletanol en la fase receptora tras 24 h de operación.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que el acoplamiento de lipasas con SLMs basadas en ILs proporciona una base prometedora para el desarrollo de metodologías respetuosas con el medio ambiente para la producción de compuestos enantioméricamente puros.

### **7.5. NOMENCLATURA**

$\bar{P}$	permeabilidad de la membrana ( $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ )
$C_f$	concentración de soluto en la fase alimentación ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_r$	concentración de soluto en la fase receptora ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$A$	area de la membrana ( $\text{cm}^2$ )
$t$	tiempo (min)
$V$	volumen de los compartimentos (mL)
$C_0$	concentración inicial de soluto en la fase alimentación ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$rP$	permeoselectividad de la membrana (adimensional)
$r\bar{P}$	permeoselectividad media de la membrana (adimensional)
e.e.	exceso enantiomérico (%)
$\alpha_{S/R}$	factor de separación (adimensional)
$C_{r,S}$	concentración del enantiómero (S) en la fase receptora ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_{r,R}$	concentración del enantiómero (R) en la fase receptora ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_{f,S}$	concentración del enantiómero (S) en la fase alimentación ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_{f,R}$	concentración del enantiómero (R) en la fase alimentación ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

### **7.6. BIBLIOGRAFÍA**

- [1] B. Schulze, M.G. Wubbolts, Biocatalysis for industrial production of fine chemicals, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 609-615.
- [2] E.J. Ariëns, Stereochemistry: A source of problems in medicinal chemistry, *Med. Res. Rev.* 6 (1986) 451-456.
- [3] I.W. Wainer, Drug stereochemistry, in: *Analytical Methods and Pharmacology*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 1993.
- [4] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, Separation of enantiomers: Needs, challenges, perspectives, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3-33.
- [5] U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlanskas, *Hydrolases in organic syntheses regio- and stereoselective biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [6] W.S. Long, A. Kamaruddin, S. Bathia, Chiral resolution of racemic ibuprofen in an enzymatic membrane reactor, *J. Memb. Sci.* 247 (2005) 185-200.
- [7] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Villora, A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B:Environmental* 67 (2006) 121-126.
- [8] E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto, Use of ionic liquids in a lipase-facilitated supported liquid membrane, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 805-808.
- [9] W.S. Long, S. Bathia, A. Kamaruddin, Modeling and simulation of enzymatic membrane reactor for chiral resolution of ibuprofen ester, *J. Memb. Sci.* 219 (2003) 69-88.
- [10] J. Ceynowa, M. Rauchfleisz, Resolution of racemic trans-2-methyl-1-cyclohexanol by lipase-catalysed transesterification in a membrane reactor, *J. Mol. Catal. B:Enzymatic* 15 (2001) 71-80.
- [11] I. Koter, J. Ceynowa, Kinetic resolution of chiral alcohols in bifunctional membrane exhibiting enzyme activity and enantioselective permeation, *J. Mol. Catal. B:Enzymatic* 24-25 (2003) 17-26.
- [12] X.J. Yang, A.G. Fane, K. Soldenhoff, Comparison of liquid membrane processes for metal separations: Permeability, stability and selectivity, *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (2003) 392-403.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

- [13] M. Teramoto, Sakaida, S.S. Fu, N. Ohnishi, H. Matsuyama, T. Fukui, K. Arai, Attempt for the stabilization of supported liquid membrane, *Sep. Purif. Technol.* 21 (2000) 137-142.
- [14] A.J.B. Kemperman, D. Bargeman, T. Boomgaard, H. Strathmann, Stability of supported liquid membranes: State of the art, *Sep. Sci. Technol.* 31 (1996) 2733-2762.
- [15] M.J. Earle, K.R. Seddon, Ionic liquids. Green solvents for the future, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1391-1398.
- [16] J.F. Brennecke, E.J. Maginn, Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [17] M. Freemantle, News horizons for ionic liquids, *Chem. Engin. News* 79 (2001) 21- 25.
- [18] A. Ruiz, A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, M.H.A. Janssen, R. Schoevaart, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, A cross-linked enzyme aggregate of *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1095-1099.
- [19] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, M. Rubio, D. Gómez, G. Villora, Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 190-195.
- [20] L.C. Branco, J.G. Grespo, C.A.M. Afonso, Studies on the selective transport of organic compounds by using ionic liquids as a novel supported liquid membranes, *Chem. Eur. J.* 8 (2002) 3865-3871.
- [21] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez, G. Villora, A novel application of supported liquid membranes based on ionic liquids to the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction, *J. Memb. Sci.* 293 (2007) 73-80.
- [22] P. Bonhôte, A.-P. Dias, N. Papageorgio, K. Kalayanasundaram, M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168-1178.
- [23] T. Welton, Room-temperature ionic liquids, solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2083.

## 7. Resolución racémica de rac-1-feniletanol mediante proceso integrado reacción/separación

- [24] L.A. Blanchard, J.F. Brenneke, Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287-292.
- [25] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatloski, A.E. Visser, R.D. Rogers, Room temperature ionic liquids as novel media for “clean” liquid-liquid extraction, *Chem. Commun.* 16 (1998) 1765-1766.
- [26] P. Scovazzo, A.E. Visser, J.H. Davis Jr., R.D. Rogers, C.A. Koval, D.L. DuBois, R.D. Noble, Supported ionic liquid membranes and facilitated ionic liquid membranes, in: R.D. Rogers, K. R. Seddon (Eds.), *Ionic Liquids: Industrial applications to Green Chemistry*, ACS Symposium Series 818, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 2002, p.68.
- [27] L.C. Branco, J.G. Crespo, C.A.M. Afonso, High selective transport of organic compounds by using supported liquid membranes based on ionic liquids, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 2771-2773.
- [28] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [29] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzymatic catalysis in ionic liquids: Lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* (2001) 425-426.
- [30] M. Noël, P. Lozano, M. Vaultier, J.L. Iborra, Kinetic resolution of rac-2- pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 301-306.
- [31] A.J. Messiano, E.J. Beckman, A.J. Russell, Supercritical biocatalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 623.
- [32] F. Cárdenas, M.S. De Castro, J.M. Sánchez-Montero, J.V. Sinisterra, M. Balmaceda, S.W. Elson, E. Alvarez, Novel microbial lipases: Catalytic activity in reactions in organic media, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 145-154.



# 8

**Resolución racémica de  
*rac*-2-pentanol mediante un  
bioreactor de membrana usando  
membranas líquidas soportadas  
basadas en líquidos iónicos**



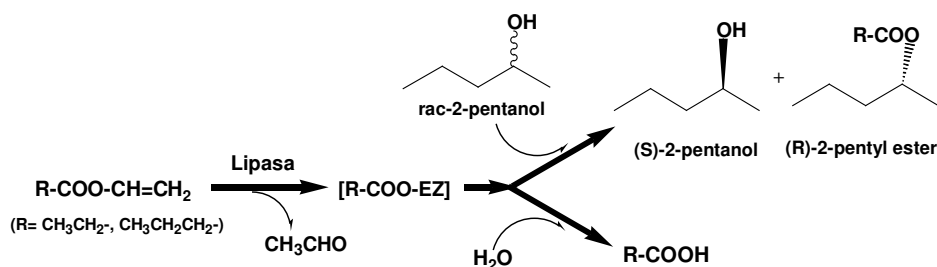


## 8. RESOLUCIÓN RACÉMICA DE *RAC*-2-PENTANOL MEDIANTE UN BIORREACTOR DE MEMBRANA USANDO MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS

### 8.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se mostró el enorme potencial del acoplamiento de la enantioselectividad de las lipasas con la permeabilidad selectiva a través de membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos para la producción de compuestos enantioméricamente puros, más concretamente, para la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol.

Por ello, en el presente capítulo se ha extendido el estudio a la resolución racémica de *rac*-2-pentanol. El interés de esta resolución radica en que el enantiómero *S*-2-pentanol es un intermedio quiral en la síntesis de varios fármacos anti-Alzheimer ya que inhibe la liberación y/o síntesis [1] del péptido  $\beta$ -amiloide. Se ha analizado el comportamiento del biorreactor de membrana, que emplea una membrana líquida soportada basada en líquidos iónicos, para la resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante la reacción de transesterificación con un éster vinílico catalizada por la lipasa B *Candida antarctica* inmovilizada (CaLB) (**Figura 8.1**). Más específicamente se ha estudiado el efecto sobre la eficiencia de la separación de la mezcla racémica de varias variables del proceso tales como la naturaleza del líquido iónico soportado en la membrana, la de los ésteres vinílicos utilizados como dadores de acilo y la del contenido en agua del medio.



**Figura 8.1.** Esquema de reacción para la resolución cinética de *rac*-2-pentanol catalizada por CaLB.

## 8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.2.1. Enzima y materiales

Se utilizó como biocatalizador un preparado comercial de lipasa B de *Candida antarctica* (EC 3.1.1.3) suministrado por Novo España S.A. (Madrid, España). Este preparado, de denominación comercial Novozym 435<sup>®</sup>, consiste en un derivado inmovilizado de la lipasa B de *Candida antarctica* sobre una resina acrílica macroporosa.

Como membrana polimérica soporte se utilizó una membrana hidrofílica plana de poliamida (NYLON<sup>®</sup> HNWP 02500) de 25 mm de diámetro suministrada por la empresa Millipore Ibérica S.A. (Madrid, España). El tamaño medio de poro es de 0.45  $\mu\text{m}$  y el espesor de la membrana de 170  $\mu\text{m}$ .

Los líquidos iónicos hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] (pureza > 99%), hexafluorofosfato de 1-metil-3-octilimidazolio, [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] (pureza > 99%), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] (pureza > 99%) y tetrafluoroborato de 1-metil-3-octilimidazolio, [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] (pureza > 99%) fueron suministrados por Solvent Innovation GmbH (Cologne, Alemania). El líquido iónico bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-butil-3-metilimidazolio, [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (pureza > 99%) fue suministrado por Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, España) y el bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida de 1-metil-3-octilimidazolio, [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (pureza > 99%) por Merck KgaA (Darmstadt, Alemania).

El compuesto racémico propionato de 2-pentilo fue sintetizado tal y como se describe en la sección 8.2.2. El resto de sustratos, disolventes y sustancias químicas fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, España), y fueron de la mayor pureza disponible. Los disolventes y reactivos utilizados se deshidrataron con tamiz molecular de 3Å antes de ser utilizados.

Los gases necesarios para el análisis de las muestras por cromatografía de gases (hidrógeno, aire sintético y helio) fueron suministrados por Abelló-Linde S.A. (Barcelona, España).

### 8.2.2. Síntesis química del propionato de *rac*-2-pentilo

Sobre una mezcla de *rac*-2-pentanol (90.96 mmol) y ácido propiónico (118.24 mmol) se añadió ácido sulfúrico concentrado (500  $\mu\text{L}$ ) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó y se calentó a reflujo durante 24 h. Pasado este tiempo, se diluyó con dietil eter y se lavó en primer lugar con agua destilada, posteriormente con una disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en agua y finalmente con agua destilada de nuevo. La disolución en dietil

## **8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana**

---

eter se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y finalmente el dietil eter se evaporó a vacío. El rendimiento de la reacción fue del 87%. El compuesto obtenido se analizó por <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 0.85 (t, 3H), 1.07 (t, 3H), 1.15 (d, 3H), 1.28 (m, 2H), 1.35 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 2.24 (q, 2H), 4.85 (m, 1H). <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 9.19, 13.78, 18.56, 19.88, 27.82, 38.03, 70.40, 174.03.

### **8.2.3. Preparación de las membranas líquidas soportadas**

La inmovilización del líquido iónico se llevó a cabo haciendo uso de una célula de ultrafiltración Amicon<sup>TH</sup> de 10 mL, describiéndose en detalle el procedimiento de preparación en el apartado 7.2.3.

### **8.2.4. Dispositivo experimental**

El dispositivo experimental usado en los ensayos de separación y en los ensayos de reacción/separación consistió en una célula de difusión de vidrio con dos compartimentos independientes, de 30 mL cada uno, separados por la membrana líquida soportada. Los detalles del dispositivo experimental se encuentran recogidos en el apartado 7.2.4

### **8.2.5. Estudios de transporte**

Se evaluó el transporte a 30 °C de todos los compuestos que intervienen en las resoluciones cinéticas en estudio, es decir, *rac*-2-pentanol, propionato de vinilo, propionato de *rac*-2-pentilo, ácido propiónico, butirato de vinilo, butirato de *rac*-2-pentilo y ácido butírico.

En cada uno de los ensayos, la concentración inicial de los compuestos en la fase alimentación fue de 100mM en n-hexano. En la fase receptora se colocó n-hexano puro en todos los casos. El ensayo de transporte comenzó con la adición de 30 mL de cada una de estas disoluciones en sus respectivos compartimentos. Ambos compartimentos se agitaron mecánicamente para evitar condiciones de polarización por concentración en las interfases de la membrana.

Periódicamente se tomaron muestras de 100 μL de ambos compartimentos con una microjeringa durante 48 horas, para seguir la evolución del transporte de los compuestos. A los viales de las muestras se añadió una disolución en n-hexano de propionato de etilo (estándar interno) (100 μL, 60 mM) y n-hexano (800 μL) y 5 μL de la disolución resultante se analizaron por cromatografía de gases, tal y como se describe en el apartado 8.2.8.1.

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

El transporte de los compuestos se analizó a través del parámetro permeabilidad ( $\bar{P}$ ), el cual se calculó mediante la ecuación (8.1), de la pendiente de la representación gráfica de  $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$  frente a  $t$  (deducción en el apartado 7.2.5).

$$\ln \left[ \frac{(C_0 - 2C_r)}{C_0} \right] = \frac{-2 \bar{P} A}{V} t \quad (8.1)$$

siendo  $C_0$  la concentración inicial de soluto en la fase alimentación ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $C_r$  es la concentración de soluto en la fase receptora ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $A$  es el área de la membrana ( $\text{cm}^2$ ) y  $V$  es el volumen de los compartimentos (mL).

Además, se determinó la *permeoselectividad media de la membrana* ( $r\bar{P}$ ) como un criterio numérico para comparar la capacidad de las diferentes SLMs para separar los compuestos de interés (Ecuación 8.2).

$$r\bar{P} = \frac{\sum_i^n rP_i}{n} \quad \text{con } rP_i > 1 \quad (8.2)$$

donde  $rP_i$  es la permeoselectividad que muestra la membrana hacia dos compuestos (p.e. *rac*-2-pentanol y propionato de *rac*-2-pentilo) y  $n$  es el número de parejas posibles entre los diferentes compuestos.  $rP_i$  puede ser expresado como el cociente de las permeabilidades individuales de dos compuestos:

$$rP_i = \frac{\bar{P}_A}{\bar{P}_B} \quad (8.3)$$

La permeoselectividad media de la membrana es un reflejo de la eficacia de la membrana en la separación de los compuestos de interés. Así, cuanto mayor sea el valor de  $r\bar{P}$  mayor será la selectividad de la membrana para separación de los compuestos. Valores de  $r\bar{P}$  cercanos a 1 significan que las membranas no son adecuadas para la separación de los compuestos de interés.

### 8.2.6. Estudios de reacción

En los todos los ensayos, el medio de reacción consistió en una mezcla estequiométrica de los sustratos y diferentes porcentajes de agua. En un vial de 22 mL se añadió 1 mmol de éster vinílico, 1 mmol de *rac*-2-pentanol y la correspondiente cantidad de agua y posteriormente se completó hasta un volumen total de 10 ml con n-hexano. El contenido en agua se controló mediante un valorador Karl Fischer, tal y como se describe en la sección 8.2.8.2. La reacción comenzó con la adición de 26.6 mg de Novozym 435 sobre la disolución de los sustratos y el vial de reacción se sumergió entonces en un baño termostataado a 30°C.

La mezcla de reacción permaneció agitada durante las 2 h de ensayo y a intervalos de tiempo regulares se tomaron muestras de 30 µL las cuales se diluyeron con 470 µL de n-hexano, se agitaron y enfriaron en un baño de hielo. Posteriormente, 400 µL de la disolución anterior se añadieron sobre 100 µL de una disolución 30 mM de estándar interno (propionato de etilo) en n-hexano y 5 µL de la disolución resultante se analizaron mediante cromatografía de gases tal y como se describe en el apartado 8.2.8.1. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, mostrándose en la memoria los valores medios. La repetitividad de los ensayos, medida a través de la desviación estándar relativa fue < 3%. La eficiencia catalítica se midió mediante tres parámetros: la actividad sintética (U), definida como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de éster por minuto, la selectividad, como la relación entre la actividad sintética y la velocidad de consumo del dador de acilo, la cual tiene en cuenta la reacción de hidrólisis competitiva del dador de acilo (ver **Figura 8.1**) y el exceso enantiomérico del producto de síntesis, determinado mediante la ecuación 8.4.

$$e.e(\%) = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \times 100 \quad (8.4)$$

donde  $C_R$  y  $C_S$  son las concentraciones de los enantiómeros (R) y (S), respectivamente.

### 8.2.7. Estudios de reacción/separación

Los estudios de reacción/separación se llevaron a cabo a 30°C usando el dispositivo experimental que se muestra en la **Figura 7.6**. La fase alimentación consistió en una disolución 100 mM de *rac*-2-pentanol y 100 mM del éster vinílico correspondiente en n-hexano. La fase receptora fue n-hexano puro. Se colocó en la fase alimentación 80 mg de CaLB inmovilizada (Novozym 435), y se comenzó el experimento adicionando 30 ml de cada una de las disoluciones anteriormente citadas a sus respectivos compartimentos.

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

Ambos compartimentos se agitaron mecánicamente y se siguió el proceso integrado de reacción/separación por cromatografía de gases, tomando 100  $\mu\text{L}$  de cada compartimento a intervalos de tiempo regulares durante 120 h. A la muestra anterior se le añadió 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 60 mM de propionato de etilo (estándar interno) y 800  $\mu\text{L}$  de *n*-hexano y 5  $\mu\text{L}$  de la disolución resultante se analizaron mediante cromatografía de gases tal y como se describe en la sección 8.2.8.1.

Para determinar la eficiencia del proceso integrado de reacción/separación en la separación de los dos enantiómeros, se calculó el factor de separación ( $\alpha_{S/R}$ ) mediante la expresión 8.5.

$$\alpha_{S/R} = \frac{\frac{C_{r,S}}{C_{f,S}}}{\frac{C_{r,R}}{C_{f,R}}} \quad (8.5)$$

siendo  $C_{r,S}$  y  $C_{r,R}$  las concentraciones en la fase receptora del enantiómero (S) y (R), respectivamente, y  $C_{f,S}$  y  $C_{f,R}$  las concentraciones del enantiómero (S) y (R) en la fase alimentación, respectivamente.

### 8.2.8. Métodos analíticos

#### 8.2.8.1. Análisis por cromatografía de gases

El análisis de las muestras se llevó a cabo por cromatografía de gases en un cromatógrafo Agilent 6890 N equipado con un detector de ionización en llama (FID), un inyector automático de muestras y una columna capilar  $\beta$  DEX-120 (30m  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25 $\mu\text{m}$ ) de Supelco, utilizando propionato de etilo como estándar interno.

En todos los casos, la temperatura en el inyector se fijó en 220  $^{\circ}\text{C}$ , se trabajó con presión constante de helio (gas portador) de 10 psi (velocidad lineal de 21 cm/s) en la cabeza de la columna y con una relación de split de 70:1. En el detector, la temperatura fue de 300  $^{\circ}\text{C}$  y los caudales de gases en el mismo de 400 ml/min de aire sintético de laboratorio, 30 ml/min de hidrógeno y 20 ml/min de helio. La temperatura de la columna se programó en todos los casos para conseguir la correcta separación de los picos de los distintos componentes de las muestras.

Se obtuvieron rectas de calibrado de cada uno de los compuestos representando la relación de concentración de cada compuesto y del estándar interno frente a la relación de áreas de los mismos.

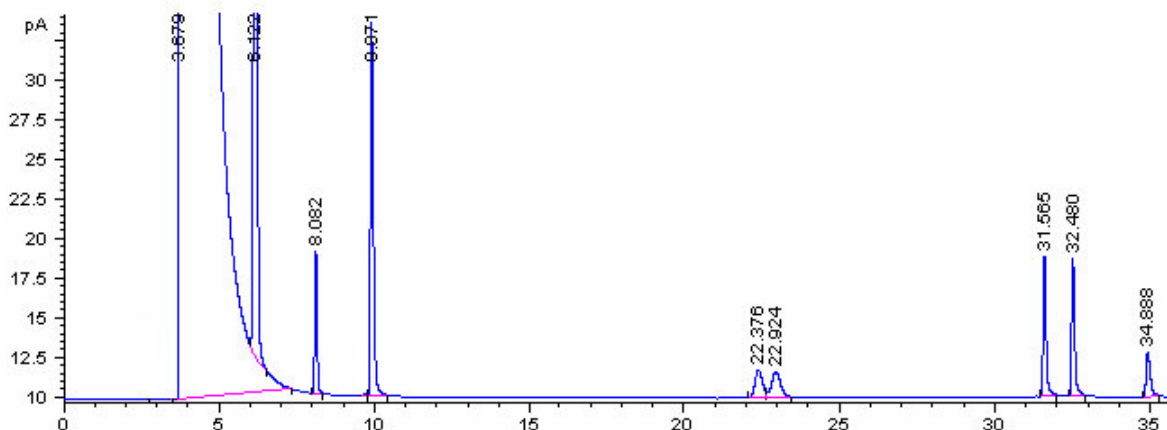
## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

A continuación se exponen los perfiles de temperatura, los tiempos de retención y las pendientes de las rectas de calibrado para cada uno de los sistemas estudiados.

Sistema de reacción 1: Propionato de vinilo, *rac*-2-pentanol, propionato de *rac*-2-pentilo y ácido propiónico.

El perfil de temperatura es el siguiente: 50 °C, 25 min; 15 °C/min, 90 °C; 90 °C, 11 min.

En la **Figura 8.2** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema de reacción.



**Figura 8.2.** Cromatograma del sistema: propionato de vinilo, *rac*-2-pentanol, propionato de *rac*-2-pentilo y ácido propiónico.

Los tiempos de retención de los compuestos estudiados son los siguientes: n-hexano, 3.7-6.1 min; propionato de vinilo, 8.1 min; propionato de etilo (estándar interno), 9.9 min; (R)-2-pentanol, 22.4 min; (S)-2-pentanol, 22.9 min; propionato de (S)-2-pentilo, 31.6 min; propionato de (R)-2-pentilo, 32.5 min y ácido propiónico, 34.9 min.

En la **Tabla 8.1** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.



## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

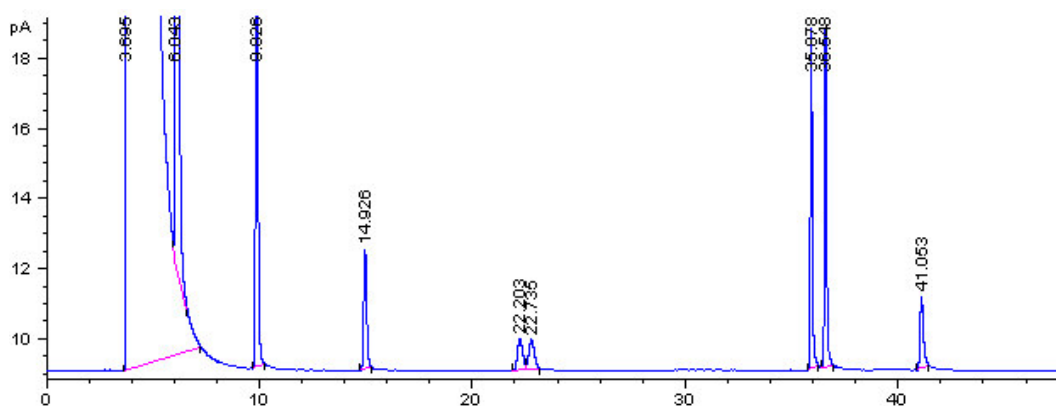
**Tabla 8.1.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: propionato de vinilo, (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, propionato de (S)-2-pentilo, propionato de (R)-2-pentilo y ácido propiónico.

Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
PROPIONATO DE VINILO	1.108	0.9921
(R)-2-PENTANOL	0.895	0.9970
(S)-2-PENTANOL	0.835	0.9939
PROPIONATO DE (S)-2-PENTILO	0.456	0.9907
PROPIONATO DE (R)-2-PENTILO	0.466	0.9903
ÁCIDO PROPIÓNICO	1.761	0.9911

Sistema de reacción 2 : *Butirato de vinilo, rac-2-pentanol, butirato de rac-2-pentilo y ácido butírico.*

El perfil de temperatura es el siguiente: 50 °C, 25 min; 10 °C/min, 100 °C; 100 °C, 15 min.

En la **Figura 8.3** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema de reacción.



**Figura 8.3.** Cromatograma del sistema: butirato de vinilo, *rac*-2-pentanol, butirato de *rac*-2-pentilo y ácido butírico.

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

Los tiempos de retención de los compuestos estudiados son los siguientes: n-hexano, 3.7-6.0 min; propionato de etilo (estándar interno), 9.8 min; butirato de vinilo, 14.9 min; (R)-2-pentanol, 22.2 min; (S)-2-pentanol, 22.7 min; butirato de (S)-2-pentilo, 35.1 min; butirato de (R)-2-pentilo, 36.5 min y ácido butírico, 41.1 min.

En la **Tabla 8.2** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.

**Tabla 8.2.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: butirato de vinilo, (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, butirato de (S)-2-pentilo, butirato de (R)-2-pentilo y ácido butírico.

Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
BUTIRATO DE VINILO	0.699	0.9947
(R)-2-PENTANOL	0.895	0.9970
(S)-2-PENTANOL	0.835	0.9939
BUTIRATO DE (S)-2-PENILO	0.300	0.9903
BUTIRATO DE (R)-2-PENILO	0.302	0.9910
ÁCIDO BUTÍRICO	0.930	0.9933

### 8.2.8.2. Determinación del contenido en agua

El contenido en agua se midió con un equipo Karl Fisher coulombimétrico modelo Metrohm 831 KF. Para ello una muestra de peso conocido se valoró usando como reactivo Karl Fischer HYDRANAL-Coulomat AG (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Madrid, Spain).

## 8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

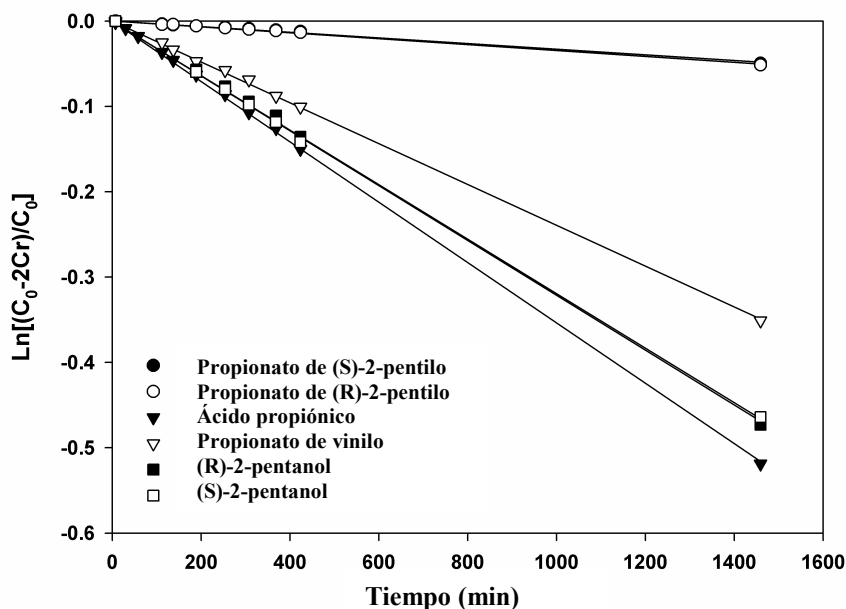
### 8.3.1. Selección de la membrana líquida soportada

En primer lugar, se analizó la permeabilidad de los compuestos que intervinieron en la resolución cinética de *rac*-2-pentanol mediante transesterificación con propionato de vinilo ((R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-2-pentilo, propionato de (S)-2-pentilo y ácido propiónico) a través de diferentes membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos, con el fin de estudiar la

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

influencia de la fase líquido iónico en el transporte de los solutos. En un trabajo previo [2] se demostró que el carácter hidrofílico/hidrofóbico de los líquidos iónicos es un factor clave que determina la capacidad de los mismos para la separación selectiva de los sustratos y productos de reacciones de transesterificación mediante membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos. Por ello para el presente estudio se han seleccionado líquidos iónicos de diferente carácter hidrofílico/hidrofóbico. Estos líquidos iónicos están basados en dos cationes: (i) 1-butil-3-metilimidazolio ( $\text{bmim}^+$ ) y (ii) 1-metil-3-octilimidazolio ( $\text{omim}^+$ ) y en tres aniones: (i) hexafluorofosfato ( $\text{PF}_6^-$ ), (ii) tetrafluoroborato ( $\text{BF}_4^-$ ) y (iii) bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida ( $\text{NTf}_2^-$ ).

Se siguió la evolución de las concentraciones experimentales de (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-2-pentilo, propionato de (S)-2-pentilo y ácido propiónico en la fase alimentación y receptora a lo largo de 48 horas, utilizándose las concentraciones de la fase receptora para calcular las permeabilidades individuales de los compuestos ( $\bar{P}$ ). Los valores de permeabilidad se obtuvieron de las pendientes de las representaciones de  $\ln[(C_0 - 2C_r)/C_0]$  para cada compuesto frente a  $t$  usando la ecuación 8.1. A título de ejemplo, en la **Figura 8.4** se muestran las representaciones gráficas usadas para el cálculo de las permeabilidades de los compuestos a través de la membrana de Nylon con  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  soportado. El resto de perfiles se encuentran recogidos en el Anexo 3.



**Figura 8.4.** Representación del  $\ln[(C_0 - 2C_r)/C_0]$  frente a  $t$  para el transporte de (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-2-pentilo, propionato de (S)-2-pentilo, y ácido propiónico a través de la membrana de Nylon con  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  soportado (condiciones: concentraciones iniciales de los solutos, 100 mM; temperatura, 30 °C; tiempo, 48 h.).

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

Los valores de permeabilidad de cada compuesto a través de las distintas membranas líquidas soportadas se presentan en la **Tabla 8.3**.

**Tabla 8.3.** Efecto del líquido iónico soportado en el transporte de (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-2-pentilo, propionato de (S)-2-pentilo y ácido propiónico.

SLM	Permeabilidad $\times 10^6$ (cm/s)					
	(R)-2-pentanol	(S)-2-pentanol	Propionato de vinilo	Propionato de (R)-2-pentilo	Propionato de (S)-2-pentilo	Ácido propiónico
Nylon con [bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	26.28	26.35	15.50	0.46	0.48	46.61
Nylon con [omim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	50.37	49.95	30.50	2.19	1.96	50.43
Nylon con [bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	25.80	26.20	20.99	0.63	0.57	40.98
Nylon con [omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	18.70	18.77	21.28	2.07	1.98	14.50
Nylon con [bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	48.46	48.37	46.05	6.02	5.92	44.55
Nylon con [omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	84.6	83.2	71.95	26.01	26.33	51.69

Condiciones: concentraciones iniciales de soluto, 100 mM; temperatura, 30 °C; tiempo, 48 h.

La influencia del líquido iónico en los valores de permeabilidad se puede apreciar comparando los valores de permeabilidad de una misma molécula a través de membranas basadas en diferentes líquidos iónicos. Como se puede observar en la **Tabla 8.3**, los valores de permeabilidad obtenidos para la SLM basada en el líquido iónico [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] fueron mayores que los obtenidos cuando se inmovilizó [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], lo cual significa que un incremento en la longitud de la cadena alquílica del catión del líquido iónico implica un incremento de los valores de permeabilidad de los compuestos. La misma conclusión se obtiene cuando se comparan las parejas [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]/[bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]/[bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], excepto para el caso de (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol y ácido propiónico, en los cuales los valores de permeabilidad fueron mayores en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] que en [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. Además, no se encontraron diferencias de permeabilidad importantes entre (R)-2-pentanol y (S)-2-pentanol y entre propionato de (R)-2-pentilo y propionato de (S)-2-pentilo en los distintos ILs utilizados como fase soportada en SLMs.

Se determinaron también los valores de permeoselectividad media de las SLMs obtenidas, los cuales se recogen en la **Tabla 8.4**.

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

**Tabla 8.4.** Permeoselectividad media de las distintas SLMs utilizadas.

Líquido iónico	$\bar{rP}$
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	32.5
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	25.2
[omim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	11.3
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	5.1
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	4.4
[omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	2.0

Como se puede observar en la tabla anterior, la membrana líquida soportada más efectiva para la separación de los compuestos orgánicos de interés fue la basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], la cual mostró el valor de permeoselectividad media más alto (32.5). Además, puede observarse cómo los valores de permeoselectividad media se incrementan para un catión dado en el siguiente orden: [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] < [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], y para un anión dado en el siguiente: [omim<sup>+</sup>] < [bmim<sup>+</sup>], lo cual está perfectamente de acuerdo con el incremento en la hidrofobicidad de los líquidos iónicos [2].

Dado que la membrana líquida soportada basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] fue la más adecuada, se estudió la permeabilidad a través de la misma de los compuestos que intervienen en la resolución cinética de *rac*-2-pentanol mediante transesterificación con butirato de vinilo ((R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, butirato de vinilo, butirato de (R)-2-pentilo, butirato de (S)-2-pentilo, y ácido butírico). Los valores de permeabilidad para cada compuesto y la permeabilidad media obtenida se recogen en la **Tabla 8.5**.

**Tabla 8.5.** Valores de permeabilidad para el (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, butirato de vinilo, butirato de (R)-2-pentilo, butirato de (S)-2-pentilo y ácido butírico a través de la SLM basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] y permeoselectividad media de la SLM.

SLM	$\bar{rP}$	Permeabilidad $\times 10^6$ (cm/s)					
		(R)-2-pentanol	(S)-2-pentanol	Butirato de vinilo	Butirato de (R)-2-pentilo propionate	Butirato de (S)-2-pentilo	Ácido butírico
Nylon con [bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	34.0	28.70	27.52	7.08	0.32	0.31	27.13

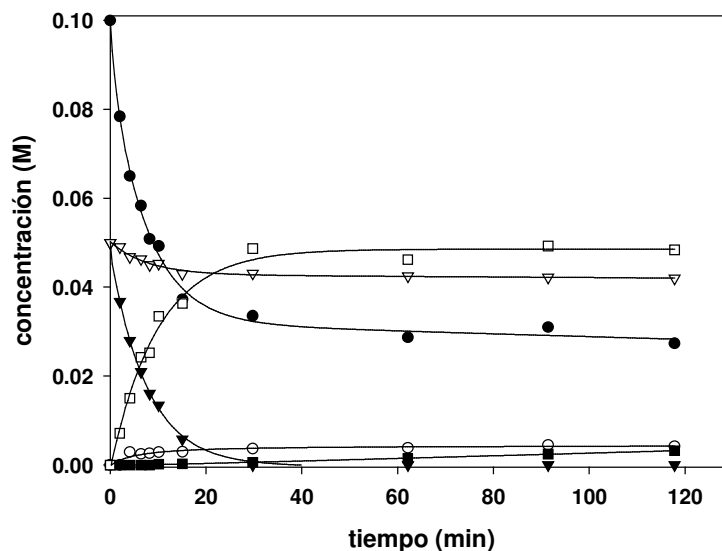
Condiciones: concentraciones iniciales de los solutos, 100 mM; temperatura, 30 °C; tiempo, 48 h.

Como se puede observar en la tabla anterior, la permeoselectividad media de la SLM basada en [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] para los compuestos que integran este sistema de reacción fue mayor que la obtenida para la misma membrana cuando el sistema de reacción estudiado fue: (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-2-pentilo, propionato de (S)-2-pentilo y ácido propiónico (**Tabla 8.4**).

### **8.3.2. Resolución cinética de *rac*-2-pentanol en n-hexano: efecto del éster vinílico y del contenido en agua**

Se estudió la resolución de *rac*-2-pentanol catalizada por la enzima lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) inmovilizada usando dos dadores de acilo (propionato de vinilo y butirato de vinilo) en n-hexano a 30 °C y con diferentes contenidos en agua. Se utilizó n-hexano como medio de reacción ya que es el disolvente utilizado como fase alimentación y receptora en los ensayos de reacción/separación. Tal y como se comentó en el apartado 7.3.2, el mecanismo de reacción depende de los aceptores nucleófilos presentes en el medio de reacción. De esta forma el intermedio acil-enzima rápidamente formado podrá reaccionar bien con el agua presente en el medio de reacción, dando lugar al producto de hidrólisis, o bien con otro reactivo nucleófilo, tal como el *rac*-2-pentanol rindiendo el producto de síntesis (transesterificación) (ver **Figura 8.1**). El camino de síntesis, puede ser potenciado mediante el uso de (i) dadores de acilo activados tales como ésteres vinílicos [3,4], (ii) concentraciones muy bajas de agua en el medio y (iii) alta concentración del compuesto nucleófilo de interés (p.e. 2-pentanol). En este contexto, la eficiencia de la resolución cinética de *rac*-2-pentanol se puede medir mediante tres parámetros: (i) la actividad sintética, (ii) la selectividad hacia la reacción de síntesis y (iii) el exceso enantiomérico (e.e) del producto de síntesis (e.e). En la **Figura 8.5** se muestra la evolución con el tiempo de las concentraciones de los distintos sustratos y productos implicados en la resolución cinética de *rac*-2-pentanol catalizada por la enzima inmovilizada CaLB en n-hexano, con un contenido en agua de 107 ppm y a 30°C, usando como dador de acilo propionato de vinilo.

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana



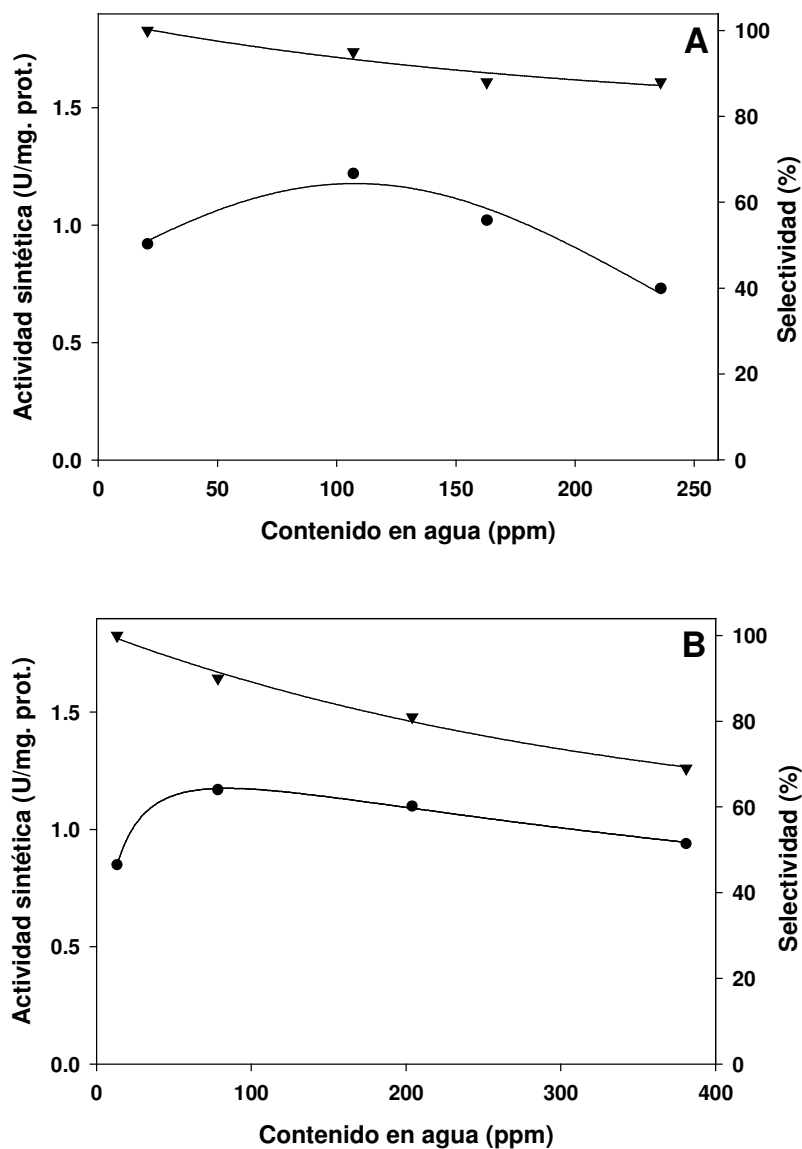
**Figura 8.5.** Evolución con el tiempo de los compuestos que intervienen en la resolución cinética de *rac*-2-pentanol catalizada por CaLB en *n*-hexano a 30°C y un contenido en agua de 107 ppm utilizando propionato de vinilo (●) como dador de acilo. (▼) (*R*)-2-Pentanol, (▽) (*S*)-2-pentanol, (□) propionato de (*R*)-2-pentilo, (■) propionato de (*S*)-2-pentilo, (○) ácido propiónico.

Como puede observarse de la figura anterior, al mismo tiempo que el propionato de vinilo (dador de acilo) se consume, van apareciendo los dos posibles productos de reacción, propionato de *rac*-2-pentilo (producto de síntesis) y ácido propiónico (producto de hidrólisis). También puede observarse cómo la enzima utilizada mostró una mayor preferencia hacia la producción de propionato de (*R*)-2-pentilo, lo cual está en concordancia con la *R*-enantioselectividad mostrada por las lipasas [5]. La síntesis no fue totalmente enantioselectiva hacia la formación del propionato de (*R*)-2-pentilo en estas condiciones de reacción, aunque sólo se sintetizó una pequeña cantidad de propionato de (*S*)-2-pentilo.

En el presente estudio se determinó la actividad sintética, la selectividad y la enantioselectividad de la enzima lípasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym 435) en la resolución cinética de *rac*-2-pentanol a 30 °C y a diferentes concentraciones de agua utilizando como dadores de acilo el propionato de vinilo y el butirato de vinilo. En el Anexo 6 se recogen las pendientes iniciales de los perfiles de concentración de los ésteres de (*R*)-2-pentilo y de los ácidos carboxílicos utilizadas para el cálculo de los valores de actividad y selectividad. Teniendo en cuenta que es necesaria una pequeña cantidad de agua para el mantenimiento de la actividad catalítica de la mayoría de los catalizadores, se hizo necesario el control y la optimización del contenido en agua del medio [4,6]. La **Figura 8.6** representa la evolución con el

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

contenido en agua de la actividad sintética y la selectividad exhibida por la enzima CaLB para la resolución cinética de *rac*-2-pentanol con propionato de vinilo y butirato de vinilo.



**Figura 8.6.** Actividad sintética (●) y selectividad (▼) exhibida por la enzima CaLB en función del contenido en agua para la resolución cinética de *rac*-2-pentanol en n-hexano a 30°C, utilizando como dadores de acilo propionato de vinilo (A) y butirato de vinilo (B).

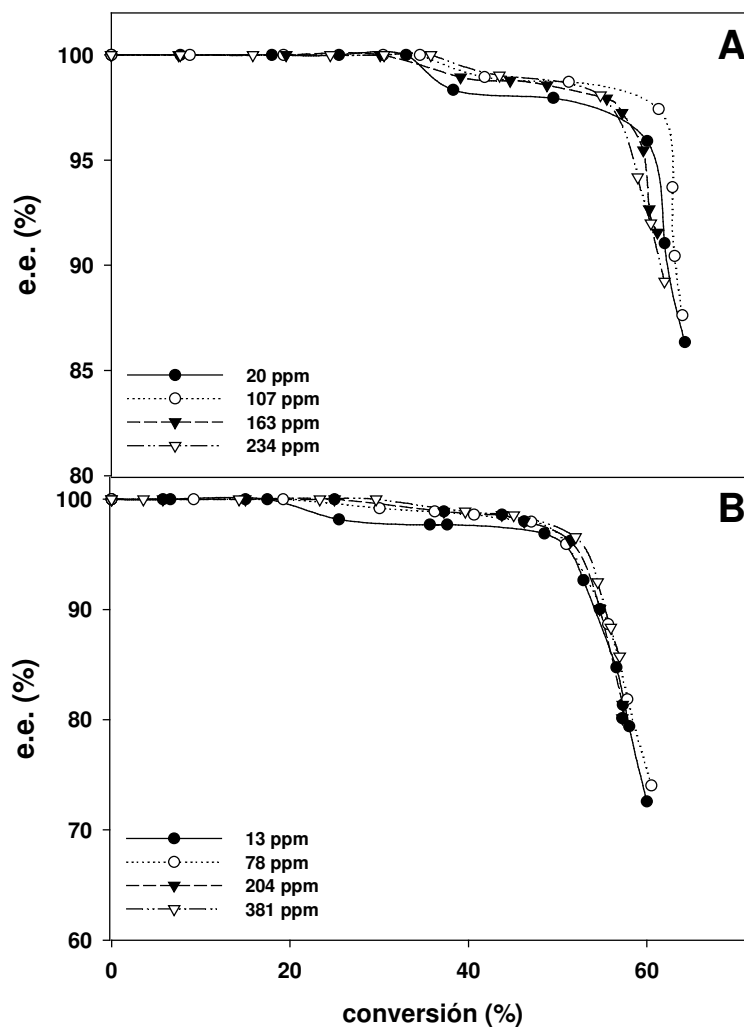
Como se puede observar en dicha figura, para los dos ésteres vinílicos estudiados la actividad sintética mostrada por la enzima CaLB siguió una curva de Gauss, con un máximo situado aprox. a 100 ppm de contenido en agua, después del cual la actividad sintética disminuyó al incrementar el contenido en agua. Con respecto a la selectividad



## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

de la reacción, el incremento en el contenido en agua dentro del intervalo experimental estudiado, tal y como era de esperar, supuso una disminución de la selectividad hacia el producto de síntesis, aumentando, por lo tanto, la concentración del producto de hidrólisis. Del análisis de las gráficas se desprende que la actividad mostrada por CaLB fue ligeramente mayor cuando se utilizó butirato de vinilo como dador de acilo que cuando se usó propionato de vinilo, sin embargo la selectividad alcanzada cuando se utilizó el primero fue menor que la obtenida con propionato de vinilo.

En la **Figura 8.7** se representa el perfil del exceso enantiomérico exhibido por la enzima CaLB en función de la conversión de *rac*-2-pentanol en n-hexano a 30 °C y a diferentes contenidos en agua, usando propionato de vinilo y butirato de vinilo como dadores de acilo.



**Figura 8.7.** Perfiles del exceso enantiomérico exhibido por CaLB frente a la conversión de *rac*-2-pentanol en la resolución cinética de *rac*-2-pentanol en n-hexano a 30°C, para diferentes contenidos en agua, usando propionato de vinilo (A) y butirato de vinilo (B) como dadores de acilo.

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

---

Como se puede derivar de la **Figura 8.7**, para los dos ésteres vinílicos empleados, la enantioselectividad mostrada por la enzima CaLB inmovilizada fue prácticamente independiente del contenido de agua utilizado. A este respecto, Martins *et al.* [7] describieron el efecto de varios disolventes orgánicos sobre la cinética de la lipasa porcina pancreática (PPL) en la resolución cinética de *rac*-glicidol mediante esterificación con ácido butírico, concluyendo que la enantioselectividad de la enzima no dependía del contenido en agua del medio. Como también se puede observar en la figura, el exceso enantiomérico de CaLB en la resolución cinética de *rac*-2-pentanol alcanzó valores próximos a 100% a bajas conversiones del sustrato *rac*-2-pentanol. El exceso enantiomérico disminuyó ligeramente a las conversiones de 30% y 20%, para el propionato de vinilo y butirato de vinilo respectivamente. Cuando la conversión fue del 50%, el exceso enantiomérico exhibido por CaLB fue de  $98.5 \pm 0.5\%$  para el propionato de vinilo y de  $98 \pm 0.5\%$  para butirato de vinilo. Como también se desprende de la **Figura 8.7**, cuando se consumió todo el (S)-2-pentanol, a una conversión total aprox. de 55 %, el exceso enantiomérico comenzó a descender rápidamente. Comparando el comportamiento de la enzima para los dos dadores de acilo utilizados, se alcanzaron mayores enantioselectividades cuando se utilizó como dador de acilo el propionato de vinilo, aunque las diferencias entre los dos ésteres vinílicos no fueron muy significativas.

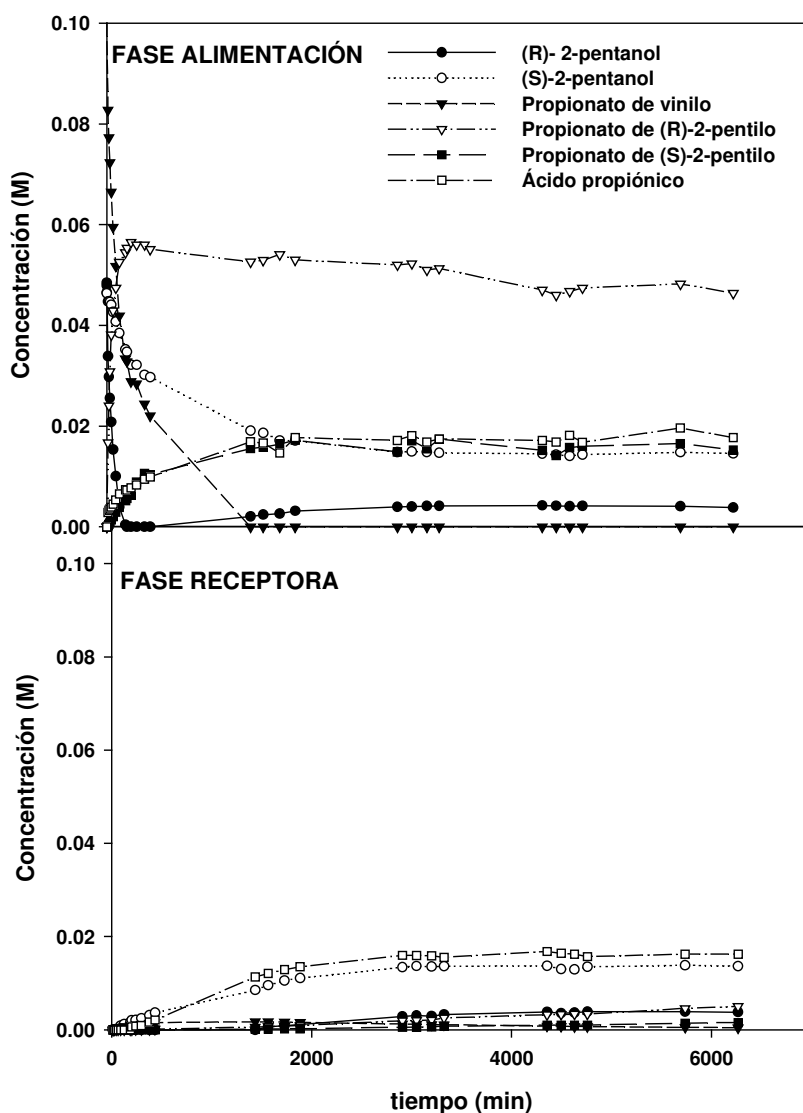
En resumen, deberán emplearse distintas concentraciones en agua dependiendo de si se requiere una alta actividad o una alta selectividad en una reacción específica. En estudios posteriores de reacción/separación, se utilizó un contenido en agua del medio de 100 ppm ya que con esta cantidad de agua se consigue la máxima actividad y la selectividad se mantiene en valores altos, entre un 91-95% dependiendo del éster vinílico utilizado.

### 8.3.3. Proceso de reacción/separación para la resolución racémica *rac*-2-pentanol

Una vez seleccionada la membrana líquida soportada más adecuada para la separación de los compuestos de interés (Nylon con  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ ) y la cantidad óptima de agua en el medio (100 ppm), se llevó a cabo el proceso integrado de reacción/separación.

En la **Figura 8.8** se representa la evolución en el tiempo de la concentración de los compuestos que intervienen en el proceso de reacción/separación en las fases alimentación y receptora, cuando se utilizó propionato de vinilo como dador de acilo.

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana



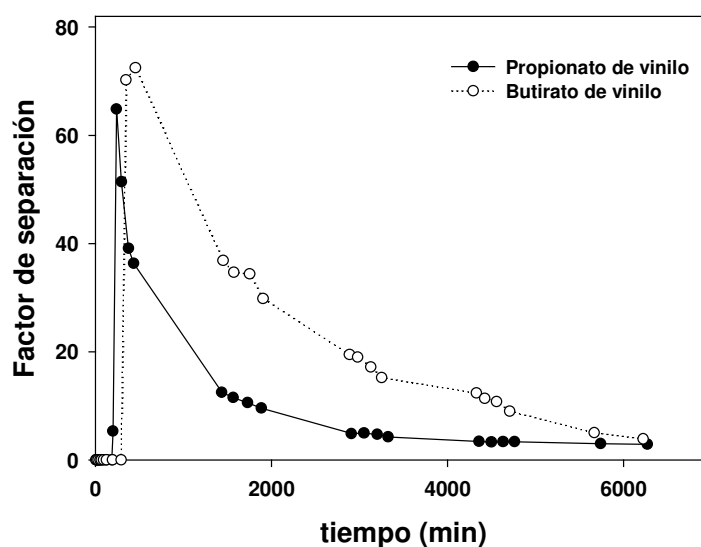
**Figura 8.8.** Evolución con el tiempo de las concentraciones de (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, propionato de vinilo, propionato de (S)-2-pentilo, propionato de (R)-2-pentilo y ácido propiónico en las fases alimentación y receptora para el proceso de reacción/separación, usando la membrana de Nylon con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] soportado. (condiciones: concentración inicial de los sustratos, 100 mM; cantidad de enzima, 80 mg; temperatura, 30 °C; tiempo, 120 h.).

Como se desprende de la **Figura 8.8**, aprox. a 200 min el isómero (R)-2-pentanol se consumió totalmente en el compartimento alimentación, mediante reacción con propionato de vinilo, dando lugar a propionato de (R)-2-pentilo. A ese tiempo, sólo el 30% del (S)-2-pentanol ha reaccionado, como lo demuestra la alta enantioselectividad de

## 8. Resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un biorreactor de membrana

la enzima hacia el isómero R. El isómero (S)-2-pentanol, que no había reaccionado, difundió a la fase receptora hasta que se alcanzó su concentración de equilibrio en ambas fases. Por el contrario, el propionato de (R)-2-pentilo y el propionato de (S)-2-pentilo formados en la fase alimentación tuvieron dificultad para pasar desde esta fase hasta la fase receptora debido a la baja permeabilidad de estos compuestos a través de la SLM, tal y como se comprobó en el apartado 8.3.1. Como se puede observar en la **Figura 8.8**, también ocurrió la reacción de hidrólisis del propionato de vinilo (ver **Figura 8.1**), ya que el ácido propiónico se detectó en la fase alimentación y tiempo después en la fase receptora, lo cual supuso una disminución de la selectividad del proceso. Por lo tanto, de la observación de la **Figura 8.8**, puede concluirse que el isómero (S)-2-pentanol puede separarse en la fase receptora del isómero (R)-2-pentanol, el cual permanece en la fase alimentación como propionato de (R)-2-pentilo.

Con el fin de determinar el efecto del dador de acilo utilizado en la eficiencia del proceso de reacción/separación, se determinó la evolución del factor de separación ( $\alpha_{S/R}$ ) con el tiempo para los dos dadores de acilo utilizados (propionato de vinilo y butirato de vinilo) (**Figura 8.9**). Los perfiles de concentración para perfiles de concentración cuando se utilizó butirato de vinilo como dador de acilo se recogen en el Anexo 7).



**Figura 8.9.** Evolución del factor de separación ( $\alpha_{S/R}$ ) con el tiempo para la resolución racémica de *rac*-2-pentanol mediante un proceso integrado de reacción/separación usando como dadores de acilo propionato de vinilo y butirato de vinilo.

Como se puede observar de la **Figura 8.9**, se alcanzaron valores elevados del factor de separación para los dos ésteres vinílicos estudiados. Cuando se utilizó propionato de vinilo como dador de acilo, el factor de separación alcanzó un valor máximo (65) a 240 min, después del cual empezó a disminuir continuamente, ya que el propionato de (R)-2-pentilo empezó a difundir a la fase receptora. En el caso del butirato de vinilo, se alcanzó un mayor valor máximo del factor de separación (72), pero a tiempos más largos. Merece la pena comentar que el factor de separación disminuyó más lentamente después del máximo cuando se usó butirato de vinilo que cuando se utilizó propionato de vinilo. Este hecho puede explicarse por la menor permeabilidad del butirato de (R)-2-pentilo que del propionato de (R)-2-pentilo a través de la membrana líquida soportada, tal y como fue comprobado en los ensayos de transporte (apartado 8.3.1).

### 8.4. CONCLUSIONES

La resolución cinética de *rac*-2-pentanol mediante transesterificación con ésteres vinílicos catalizada por la enzima lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym 435), se llevó a cabo satisfactoriamente en un biorreactor de membrana que contenía una membrana líquida soportada basada en líquidos iónicos. Con el fin de optimizar el proceso integrado de reacción/separación se analizó la influencia en el proceso de varias variables tales como la naturaleza del líquido iónico soportado, el contenido en agua del medio de reacción y la naturaleza de los ésteres vinílicos utilizados como dadores de acilo. Después de ensayar seis líquidos iónicos diferentes como fase líquida soportada en una membrana orgánica de Nylon, la SLM basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] mostró el comportamiento más adecuado para la separación selectiva de los compuestos que intervienen en la resolución cinética de *rac*-2-pentanol. Además, se encontró que el contenido de agua de medio era un parametro clave que determina la actividad sintética y la selectividad del proceso, siendo el contenido de agua óptimo de 100 ppm. Finalmente, el proceso integrado de reacción/separación para la resolución racémica de *rac*-2-pentanol se llevó a cabo en las condiciones óptimas determinadas, usando como dadores de acilo propionato de vinilo y butirato de vinilo. Los resultados demostraron de nuevo que se logra una mayor eficiencia en el proceso con el éster vinílico de longitud de cadena alquílica mayor, es decir, con butirato de vinilo.

### 8.5. NOMENCLATURA

$\bar{P}$	permeabilidad de la membrana ( $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ )
$C_f$	concentración de solutos en la fase alimentación ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_r$	concentración de solutos en la fase receptora ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$A$	area de la membrana ( $\text{cm}^2$ )
$t$	tiempo (min)
$V$	volumen de los compartimentos (mL)
$C_0$	concentración inicial de los solutos en la fase alimentación ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$rP$	permeoselectividad de la membrana (adimensional)
$r\bar{P}$	permeoselectividad media de la membrana (adimensional)
e.e.	exceso enantiomérico (%)
$\alpha_{S/R}$	factor de separación (adimensional)
$C_{r,S}$	concentración del enantiómero (S) en la fase receptora ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_{r,R}$	concentración del enantiómero (R) en la fase receptora ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_{f,S}$	concentración del enantiómero (S) en la fase alimentación ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_{f,R}$	concentración del enantiómero (R) en la fase alimentación ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

## 8.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.E. Audia, T.C. Britton, J.J. Droste, B.K. Folmer, G.W. Huffman, V. John, L.H. Latimer, T.E. Mabry, J.S. Nissen, W.J. Porter, J.K. Reel, E.D. Thorsett, J.S. Tung, J. Wu, C.N. Eid, W.L. Scott, Patent WO 98/22494, 1998.
- [2] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, M. Rubio, D. Gómez, G. Villora, On the importance of the nature of the ionic liquids in the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction through supported ionic liquid membranes, *J. Memb. Sci.*, 307 (2008) 233-238.
- [3] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzymatic catalysis in ionic liquids: Lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* (2001) 425-426.
- [4] M. Noël, P. Lozano, M. Vaultier, J.L. Iborra, Kinetic resolution of *rac*-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 301-306.
- [5] F. Cárdenas, M.S. De Castro, J.M. Sánchez-Montero, J.V. Sinisterra, M. Balmaceda, S.W. Elson, E. Alvarez, Novel microbial lipases: Catalytic activity in reactions in organic media, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 145-154.
- [6] A.J. Messiano, E.J. Beckman, A.J. Russell, Supercritical biocatalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 623.
- [7] J.F. Martins, T. Corrêa de Sampaio, I. Borges de Carvalho, S. Barreiros, Lipase catalyzed esterification of glycidol in nonaqueous solvents: Solvent effects on enzymatic activity, *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994) 119-124.

# 9

**Nuevo reactor enzimático de membrana con  
recirculación para la síntesis de ésteres en  
sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de  
carbono supercrítico**





**9. NUEVO REACTOR ENZIMÁTICO DE MEMBRANA CON RECIRCULACIÓN PARA LA SÍNTESIS DE ESTERES EN SISTEMAS BIFÁSICOS LÍQUIDO IÓNICO/DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

**9.1. INTRODUCCIÓN**

El uso de disolventes orgánicos volátiles (VOS) en procesos químicos tiene un impacto negativo sobre el medioambiente y la salud, por lo que resulta necesario desarrollar medios de reacción más respetuosos con el medioambiente [1-3]. Los fluidos supercríticos (SCFs) y los líquidos iónicos (ILs) se han revelado recientemente como alternativas interesantes a los disolventes orgánicos convencionales desde el punto de vista medioambiental [4].

Entre los fluidos supercríticos, el dióxido de carbono supercrítico ( $scCO_2$ ) es especialmente ventajoso ya que es barato, no es tóxico ni inflamable y tiene una temperatura crítica cercana a la temperatura ambiente (31.1 °C) y una presión crítica moderada [5-6]. Respecto a su uso en biocatálisis, hay muchos ejemplos en la literatura que demuestran la viabilidad del  $scCO_2$  como medio de reacción en catálisis enzimática [5-7]. El  $scCO_2$  puede ser además reutilizado y los productos de reacción se pueden separar fácilmente ya que la solubilidad de los mismos en el medio  $scCO_2$  es función de las condiciones de presión y temperatura del  $scCO_2$ , por lo que su capacidad como disolvente puede ser modulada. Todas estas propiedades hacen muy atractivo al  $scCO_2$  para ser utilizado como “*disolvente verde de diseño*”. Por el contrario, el  $scCO_2$  ha mostrado un efecto adverso sobre la actividad enzimática, ya que puede bajar el pH del microambiente de la enzima, modificar covalentemente los grupos amino libres de la superficie de la proteína para formar carbamatos y además puede desactivar la enzima durante los ciclos de presurización/depresurización, por lo tanto, deben desarrollarse nuevas estrategias para la estabilización enzimática en este medio [7-8].

Los líquidos iónicos han demostrado ser buenos disolventes para su empleo en procesos químicos [9] y bioquímicos [10] donde han mostrado una capacidad excepcional para estabilizar enzimas durante operaciones continuas [11]. La ventaja más importante de los líquidos iónicos es su presión de vapor prácticamente nula, lo que los hace disolventes medioambientalmente benignos comparados con los disolventes orgánicos convencionales. Además poseen una alta estabilidad química y térmica lo que le permite ser utilizados a altas temperaturas [12].

Estudios recientes han mostrado la posibilidad de llevar a cabo procesos biocatalíticos que combinan ILs y  $scCO_2$  [13,14]. El éxito de estos sistemas bifásicos está basado en la alta solubilidad del  $scCO_2$  en la fase IL, mientras que el IL es insoluble en la fase  $scCO_2$ . El  $scCO_2$  puede de esta forma, llevar a cabo la extracción de compuestos orgánicos de

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

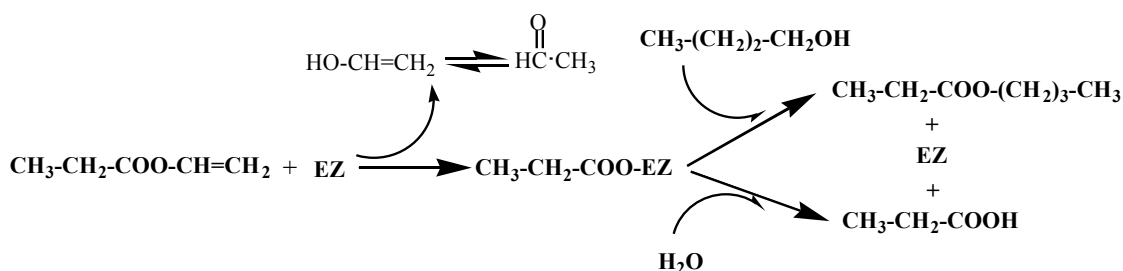
---

los líquidos iónicos sin contaminación del extracto por la fase líquido iónico [15,16]. Además, los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub> han demostrado tener efectos estabilizantes frente a la desactivación enzimática, incluso bajo condiciones extremadamente severas [17].

El uso de reactores de membrana constituye un intento de integrar la conversión catalítica, la separación y/o concentración del producto de reacción y la recuperación del catalizador en una sola etapa. Un número importante de reactores de membrana enzimáticos usan lipasas como biocatalizadores. El hecho de que las lipasas sean activadas por las interfases, probablemente hacen de ellas los catalizadores perfectos para su uso en reactores de membrana, los cuales promueven el contacto interfacial entre la enzima y los sustratos [18]. La lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) es una enzima muy interesante debido a su potencial aplicación en muchos procesos industriales, tales como la síntesis de numerosos ésteres. Esta enzima también ha mostrado un alto nivel de actividad, estabilidad y estereoselectividad en medios no convencionales, tales como medios orgánicos, en dióxido de carbono supercrítico y en líquidos iónicos [7,19,20].

En este capítulo se presenta, por primera vez, un proceso sintético biocatalítico que combina fluidos supercríticos, líquidos iónicos y tecnología de membranas. Como reacción modelo se seleccionó la síntesis de propionato de butilo a partir de propionato de vinilo y 1-butanol catalizada por CaLB (**Figura 9.1**). En primer lugar, se midió la actividad sintética de la enzima CaLB, covalentemente unida a una membrana tubular de  $\alpha$ -alúmina en medio scCO<sub>2</sub>, en un reactor de flujo tangencial. De acuerdo con las velocidades iniciales obtenidas para distintas concentraciones de los sustratos, se propuso un modelo cinético basado en el mecanismo Ping Pong Bi-Bi con inhibición competitiva por el sustrato alcohol. Posteriormente la enzima inmovilizada se recubrió con cuatro líquidos iónicos: (i) hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]), (ii) hexafluorofosfato de 1-butil-2,3-dimetilimidazolio ([bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]), (iii) hexafluorofosfato de 1-metil-3-octilimidazolio ([omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]) y (iv) bis{(trifluorometil)sulfonil}imida de 1-butil-3-metilimidazolio ([bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]), para estudiar la influencia de estos medios en la actividad y selectividad de la enzima CaLB inmovilizada. Por último, con el fin de entender mejor el comportamiento de la enzima y los fenómenos de transferencia en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>, se llevó a cabo también la reacción de síntesis de propionato de butilo en medios líquidos iónico y en sistemas bifásicos líquido iónico/hexano y se determinaron los coeficientes de reparto líquido iónico/hexano de los compuestos implicados en la reacción de transesterificación.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres



**Figura 9.1.** Esquema de reacción de la síntesis de propionato de butilo a partir de propionato de vinilo y 1-butanol catalizada por CaLB.

## 9.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.2.1. Enzima y materiales

Se utilizó como biocatalizador un preparado comercial de lipasa B de *Candida antarctica* (EC 3.1.1.3) suministrado por Novo España S.A. (Madrid, España). Este preparado, de denominación comercial Novozym 525F, consiste en una disolución acuosa de la enzima libre. Antes de su uso, la disolución de enzima se purificó, tal y como se describe en el apartado 9.2.2.

Las membranas tubulares de  $\alpha$ -alúmina microporosas (150 mm de longitud, 7 mm diámetro interno, 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, 15 g de peso, 33  $\text{cm}^2$  de superficie efectiva) fueron suministradas por Exekia (Bazet, Francia).

Los líquidos iónicos [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] fueron suministrados por Solvent Innovation GmbH (Cologne, Alemania) (pureza >99%). [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (pureza >99%) fue suministrado por Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, España). El contenido en agua de los líquidos iónicos se determinó mediante una valoración Karl Fischer y fue el siguiente: [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], 450 ppm; [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], 474.5 ppm; [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], 483 ppm; y [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], 416.3 ppm.

El resto de sustratos, disolventes y sustancias químicas fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, España) y fueron de la mayor pureza disponible.

Los gases necesarios para el análisis de las muestras por cromatografía de gases (hidrógeno, aire sintético y nitrógeno) fueron suministrados por Abelló-Linde S.A. (Barcelona, España).

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

### 9.2.2. Purificación del preparado enzimático

La disolución de enzima libre fue ultrafiltrada con el fin de eliminar todos los aditivos de bajo peso molecular. Para ello 25 mL de Novozym 525F se diluyeron en 225 mL de tampón fosfato 20 mM a pH 7, concentrándose posteriormente 10 veces mediante ultrafiltración a 4°C en un sistema Minitan (Figura 9.2) equipado con membranas de polisulfona (5000 Da. de límite de exclusión). Este proceso de filtración se repitió tres veces generando una disolución de CaLB de 8.5 mg proteína/mL, determinado mediante el método de Lowry [8], consiguiéndose un grado de purificación de 1.4 veces respecto a la disolución inicial.

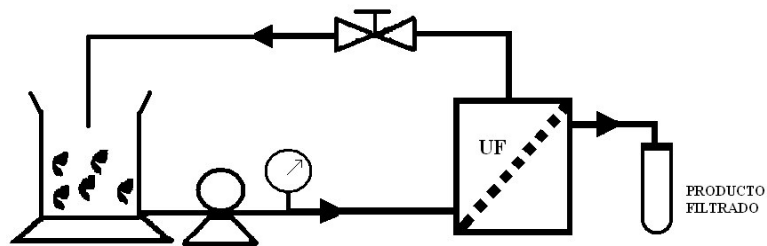


Figura 9.2. Sistema Minitan™ de ultrafiltración por membranas.

### 9.2.3. Preparación de las membranas con enzima inmovilizada

Para la preparación de las membranas se emplea el equipo de filtración tangencial a escala piloto presentado en la Figura 9.3.

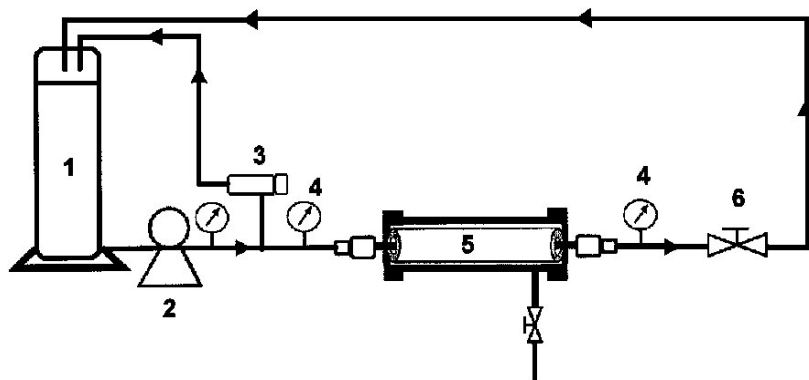


Figura 9.3. Esquema del sistema piloto de filtración tangencial para la obtención de membranas. (1) Depósito de almacenamiento del fluido; (2) bomba de impulsión; (3) válvula de seguridad; (4) manómetros; (5) carcasa de alojamiento de la membrana; (6) válvula de regulación de presión.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

Este dispositivo fue construido con materiales de acero inoxidable y equipado con una carcasa de acoplamiento de membranas cilíndricas, bomba de membrana (Wanner, USA) y sistemas de control. La bomba Wanner está conectada a un convertidor de frecuencias que permite regular la velocidad del fluido del circuito. El equipo posee además tres manómetros de aguja que permiten controlar la presión en todo momento, y una válvula de asiento que permite regular la pérdida de carga en el circuito y, por tanto, el flujo de permeado a través de la membrana. En el equipo, la alimentación procedente de un depósito termostatado se impulsa a través de la sección interna de la membrana cilíndrica, que se sitúa dentro de una carcasa de morfología también cilíndrica, permitiendo un contacto de tipo tangencial entre el fluido y la membrana.

Antes de inmovilizar la enzima sobre la membrana, ésta debe de estar limpia, y para ello debe seguirse un protocolo que siempre precede a la inmovilización, y que consta de las siguientes etapas:

- (i) Lavado con agua destilada a 60°C durante 5 minutos.
- (ii) Lavado con una disolución al 2% (p/p) de NaOH a 60°C durante 30 min.
- (iii) Lavado con una disolución al 2% (p/p) de NaOH a 60°C durante 30 min. y a 2 bares de presión.
- (iv) Lavado con agua destilada a 60°C y 2 bares hasta pH neutro.
- (v) Circulación a través del sistema de una disolución que contenga un 1% (p/p) de ácido nítrico durante 15 min. a 60 °C.
- (vi) Circulación a través del sistema de una disolución al 2% (p/p) de ácido nítrico a 60°C y 2 bares de presión durante 20 min.
- (vii) Lavado con agua destilada a 60°C y 2 bares hasta pH neutro.
- (viii) Circulación a través del sistema de agua destilada a la misma temperatura y presión durante 20 min.
- (ix) Secado de la membrana en estufa a 70°C.

A continuación se detalla el protocolo de inmovilización de la enzima en la membrana [21], el cual se puede resumir en las tres etapas siguientes: generación de un depósito de polímero hidrosoluble (gelatina-polietilenimina) sobre la membrana cerámica, activación de los grupos amino libres mediante un agente de entrecruzamiento (glutaraldehído) y, por último, fijación de la enzima:

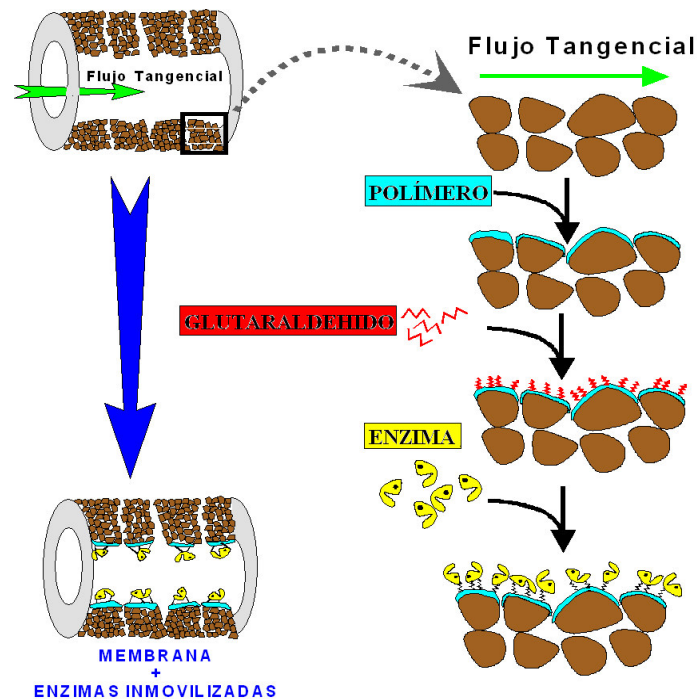
**a) Hidratación de la membrana**, pasando agua destilada durante 30 min. a 2 bares y a temperatura ambiente.

**b) Generación de un depósito de polímero hidrosoluble**, recirculando una disolución que se obtiene de la mezcla de las dos disoluciones que se citan a continuación en tampón  $\text{CO}_3\text{H}/\text{CO}_3^{2-}$ , 0.1M y de pH= 9.2. Una de estas disoluciones se prepara con 20 g de gelatina en 1L de tampón, calentando a 50°C para facilitar la disolución. Esta disolución debe ser preparada 15 horas antes de

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

su utilización. La otra disolución se prepara a partir de 40 g de polietilenimina en 1L de tampón carbonato. La mezcla de las dos disoluciones se hace pasar por la membrana durante 30 minutos a una presión de 2 bares y a temperatura ambiente. Tras esta operación, se extrae la membrana de la carcasa del equipo de filtrado y se lava repetidas veces con tampón  $\text{CO}_3\text{H}/\text{CO}_3^{2-}$  de  $\text{pH}= 9.2$ . Finalmente, se limpia el equipo recirculando una disolución de  $\text{NaOH}$  al 2% a  $60^\circ\text{C}$ , y posteriormente con agua destilada.

**c) Acoplamiento covalente de las moléculas de enzima.** Se generan en primer lugar los grupos funcionales llenando el volumen interno de la membrana, previamente sellado en sus extremos con parafilm<sup>®</sup>, con una disolución de glutaraldehído al 12.5% en tampón  $\text{CO}_3\text{H}/\text{CO}_3^{2-}$ , 0.1M a  $\text{pH}= 9.2$ , manteniéndola en contacto con la membrana durante una hora en un agitador de rodillos. Posteriormente, se vacía el contenido y se lava la membrana con disolución de tampón fosfato 0.1 M a  $\text{pH}= 7.8$ . La fijación de la enzima se realiza finalmente mediante el llenado de la membrana con disolución de enzima en tampón fosfato 0.1M a un  $\text{pH}= 7.8$  (sellando sus extremos con parafilm<sup>®</sup>) y manteniendo la membrana durante toda la noche en la nevera para asegurar una buena inmovilización. Terminado este periodo de acoplamiento enzimático se retira la disolución enzimática del interior de la membrana y se almacena a  $4^\circ\text{C}$  en presencia de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (condiciones anhidras). La **Figura 9.4** muestra un esquema de todo el proceso.

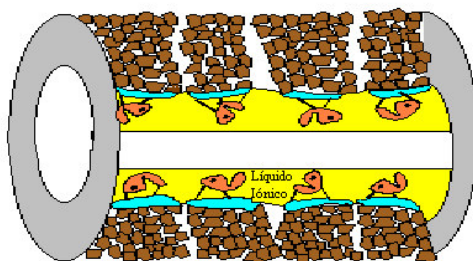


**Figura 9.4.** Esquema del proceso de generación de membranas con enzima inmovilizada.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

### 9.2.4. Preparación de membranas enzimáticas recubiertas con líquidos iónicos

Las membranas enzimáticas anteriormente preparadas se recubrieron con 4 líquidos iónicos:  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{bdmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ . Para ello se colocaron 2 mL de líquido iónico en el interior de las membranas con enzima inmovilizada y se agitó durante 30 min. en un agitador de rodillos, de manera que el líquido iónico se adsorbió sobre la superficie activa de la membrana en una capa muy fina. Después de este proceso, la membrana se colocó verticalmente para eliminar el exceso de líquido iónico. La membrana enzimática recubierta con el líquido iónico (**Figura 9.5**) se almacenó a 4 °C en presencia de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .



**Figura 9.5.** Sistema líquido iónico/enzima inmovilizada en membrana.

### 9.2.5. Ensayos de actividad enzimática en líquidos iónicos y en n-hexano

Sobre 477.1  $\mu\text{L}$  de IL o n-hexano, se añadieron 8.3  $\mu\text{l}$  (75  $\mu\text{mol}$ ) de propionato de vinilo y 4.6  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{mol}$ ) de 1-butanol en un vial de 1.5 mL de volumen total. La reacción comenzó adicionando en el vial 10  $\mu\text{l}$  de disolución de lipasa B de *Candida antarctica* (8.5 mg de lipasa B de *Candida antarctica*/mL en tampón fosfato 20 mM a pH 7) y el vial de reacción se sumergió entonces en un baño termostatado a 50°C.

La mezcla de reacción permanece agitada durante las 2 h de ensayo y a intervalos de tiempo regulares se toman muestras de 15  $\mu\text{L}$  del medio de reacción, se suspenden en 485  $\mu\text{L}$  de n-hexano y se enfrían en un baño de hielo. El sistema bifásico formado (cuando se utilizan líquidos iónicos como medio de reacción) se agita en un vortex durante 30 s para conseguir la extracción de los sustratos y productos disueltos en el líquido iónico y se centrifuga durante otros 30 s a 12.000 rpm, con el fin de separar adecuadamente el sistema bifásico. Seguidamente, se toman 400  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 75 mM de hexanoato de etilo (estándar interno) en n-hexano. 5  $\mu\text{L}$  de la disolución resultante se analizan mediante cromatografía de gases según se describe en el apartado 9.2.9. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y en la memoria se recogen los valores medios. La repetitividad de los

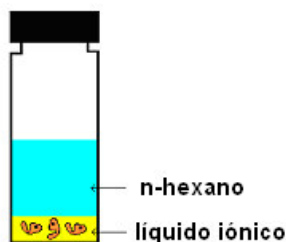


## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

ensayos, medida a través de la desviación estándar fue  $< 3\%$ . La eficiencia catalítica se midió mediante dos parámetros: la actividad sintética (U), definida como la cantidad de enzima que produce  $1 \mu\text{mol}$  de éster por minuto y la selectividad, como la relación entre la actividad sintética y la velocidad de consumo del dador de acilo, la cual tiene en cuenta la reacción de hidrólisis competitiva del dador de acilo (propionato de vinilo)(ver **Figura 9.1**).

### 9.2.6. Ensayos de actividad enzimática en sistemas bifásicos líquido iónico/hexano

Este tipo de reacciones se llevaron a cabo en viales de 1.5 mL de volumen total. La reacción comienza con la adición de  $10 \mu\text{L}$  de preparado enzimático ( $8.5 \text{ mg}$  de lipasa B *Candida antarctica*/mL en tampón fosfato  $20 \text{ mM}$  pH 7) suspendido en  $100 \mu\text{L}$  de líquido iónico ( $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{dbmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{TfN}_2^-]$ ) sobre  $390 \mu\text{L}$  de una disolución en n-hexano que contiene  $8.3 \mu\text{L}$  ( $75 \mu\text{mol}$ ) de propionato de vinilo y  $4.6 \mu\text{L}$  ( $50 \mu\text{mol}$ ) de 1-butanol, quedando finalmente el sistema reaccionante como se muestra en el **Figura 9.6**. El vial de reacción se sumergió entonces en un baño termostataado a  $50^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción permaneció agitada durante las 2 h de ensayo y a intervalos de tiempo regulares se tomaron alícuotas de  $15 \mu\text{L}$  de la fase hexano que se diluyeron en  $485 \mu\text{L}$  de n-hexano. Posteriormente, se tomaron  $400 \mu\text{L}$  a los que se adicionaron  $100 \mu\text{L}$  de una disolución  $75 \text{ mM}$  de hexanoato de etilo (estándar interno) en n-hexano y  $5 \mu\text{L}$  de la disolución resultante se analizaron mediante cromatografía de gases como se describe en el apartado 9.2.9. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y en la memoria se recogen los valores medios. La repetitividad de los ensayos, medida a través de la desviación estándar fue  $< 3\%$ .



**Figura 9.6.** Sistema de reacción bifásico líquido iónico/hexano.

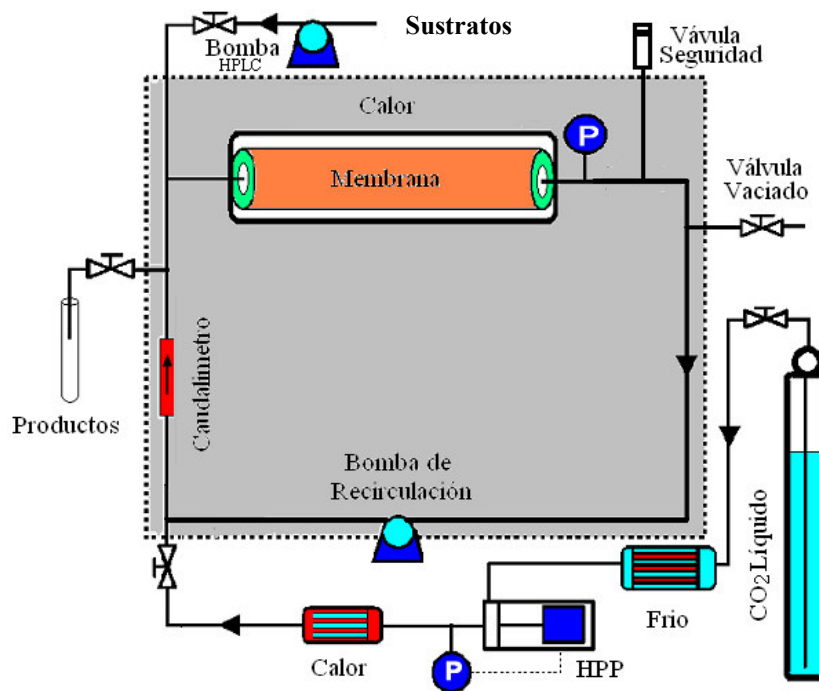
La eficiencia catalítica se midió mediante dos parámetros: la actividad sintética (U), definida como la cantidad de enzima que produce  $1 \mu\text{mol}$  de éster por minuto, la selectividad, como la relación entre la actividad sintética y la velocidad de consumo del dador de acilo, la cual tiene en cuenta la reacción de hidrólisis competitiva.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

### 9.2.7. Ensayos de actividad enzimática en dióxido de carbono supercrítico y en sistemas bifásicos líquido iónico/ dióxido de carbono supercrítico

#### 9.2.7.1. Dispositivo experimental

La síntesis de propionato de butilo catalizada por la enzima CaLB inmovilizada en la membrana tubular de  $\alpha$ -alúmina se llevó a cabo en un reactor con recirculación a 50 °C y 80 bar. El reactor de recirculación supercrítico consiste en un circuito tubular que posee una carcasa donde se aloja la membrana con la enzima inmovilizada y por el que circula el  $scCO_2$  junto con la mezcla reaccionante y, en su caso, los productos de reacción. El dispositivo experimental responde al esquema que se muestra en la **Figura 9.7**.



**Figura 9.7.** Dispositivo experimental del reactor enzimático de membrana con recirculación en  $scCO_2$ .

Las subunidades de las que se compone el equipo son las que se relacionan a continuación:

- **Reactor:** El cuerpo del reactor utilizado está compuesto por una carcasa (cerrada herméticamente mediante juntas de nitrilo) y por tubos construidos en acero inoxidable. Está equipado con válvulas y medidores de presión y caudalímetro

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

másico (Ceran Sensor, TC503). El volumen interno del conjunto es de 178 mL. Todo ello se coloca en un armario a temperatura controlada.

- **Grupo frío:** HETO, de Heto Lab Equipment (Alemania). Se utiliza para enfriar el CO<sub>2</sub> procedente de la botella del gas de alimentación, con el fin de poder bombearlo en estado líquido. Funcionando al máximo, puede enfriar hasta proporcionar una temperatura de -30°C.
- **Bomba de alta presión:** Dosapro, Milton Roy. Bomba de émbolo utilizada para el suministro de CO<sub>2</sub> líquido a alta presión hacia el interior reactor.
- **Bomba de alimentación del reactor:** modelo Shimadzu LC 10 (Japón). Bomba para HPLC, capaz de proporcionar altas presiones con pequeños caudales (pueden variar de 0 a 9.9 mL/min). La presión máxima es de 400 bar y dispone de un sistema de desconexión cuando la presión a la salida es superior a un determinado valor de consigna. Se utilizó para introducir la alimentación al reactor.
- **Bomba de recirculación del reactor.** Bomba magnética de Micropump, suministrada por Axflow.
- **Intercambiador de calor.** Construido en acero inoxidable por la Unidad Técnica de la Universidad de Murcia. El intercambiador se encuentra alimentado por un fluido caliente procedente de un baño calefactor.
- **Restrictor termostatado.** Utilizado para la toma de muestras. El restrictor es un tubo de acero con una sección muy pequeña (1/16''), de manera que produzca una gran pérdida de carga y permita extraer de un modo controlado las muestras gaseosas que se encuentran en el reactor a presiones elevadas. Dispone de una parte en forma de serpentín que está sumergida en un baño termostatado a una temperatura de 50°C. El motivo es evitar obstrucciones de la conducción ocasionados por la formación de cristales de los compuestos por congelación.
- **Válvula de seguridad.** Como sistema de seguridad, el reactor dispone de una válvula calibrada para apertura a presión superior a 120 bares, presión inferior a la de diseño del equipo.

Para su funcionamiento general, el equipo dispone de un sistema de alimentación que consta de una botella de CO<sub>2</sub> industrial con una sonda, que permite extraer de su interior el CO<sub>2</sub> en estado líquido. Una vez que el CO<sub>2</sub> sale de la botella se le hace pasar a través de un grupo frío, cuya misión es mantenerlo en estado líquido para alimentar la bomba de alta presión que lo introduce en el sistema de reacción. A continuación de su paso a través de la bomba, el CO<sub>2</sub> en estado líquido se precalienta en el intercambiador de calor antes de introducirlo en el reactor.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

---

La alimentación de los sustratos se realiza mediante una bomba de HPLC con la que se introducen en el reactor una vez que éste ya se encuentra presurizado y termostatado en las condiciones de trabajo.

La salida del reactor está compuesta por una válvula de esfera y otra de aguja de acero inoxidable y un restrictor termostatado para la toma de muestras.

### 9.2.7.2. Ensayos de actividad enzimática

En primer lugar se termostató el armario en el que se aloja el reactor. El siguiente paso consistió en colocar la membrana enzimática (con o sin líquido iónico) en la carcasa del circuito de reacción asegurando la estanqueidad mediante juntas de nitrilo. A continuación, el CO<sub>2</sub> se introdujo al sistema procedente de la botella de alimentación, aumentando la presión y la temperatura hasta alcanzar las condiciones deseadas, para lo que se siguieron varias etapas. En primer lugar, se presurizó el reactor directamente con la botella de alimentación de CO<sub>2</sub>, que proporciona una presión aproximada de 55 bares, manteniendo las válvulas de salida abiertas durante un tiempo suficiente para evacuar el aire del interior del reactor, cerrándolas a continuación. Una vez alcanzada la temperatura final (50°C) se dejó que el sistema se estabilizase en esas condiciones. Posteriormente, con ayuda del grupo frío y de la bomba de alta presión, se introdujo en el reactor la cantidad suficiente de CO<sub>2</sub> hasta llegar a la presión de trabajo (80 bar).

Una vez estabilizado el sistema en las condiciones de operación requeridas se introdujo en el interior del sistema de reacción la disolución de los reactantes que consistió en una disolución en n-hexano (10 ml, 5% v/v sobre el volumen total) que contenía 166 µL (1.5 mM) de propionato de vinilo y 92 µL (1mM) de 1-butanol. Para ello se colocó el sustrato en una probeta y se empleó una bomba de HPLC a un flujo constante de 5 ml/min. Se introdujo el conducto de succión de la bomba en la probeta y se cebó la bomba a través de la válvula de purga. Posteriormente, se puso en marcha la bomba durante un tiempo hasta que el sustrato llenó todo su circuito y llegó al final de la conducción de alimentación. Cuando se tuvieron la bomba y el conducto llenos de sustrato se conectó la conducción al reactor, se abrió la válvula de entrada y se comenzó a bombear al interior el volumen deseado. Una vez realizada esta operación, se cerró la válvula de entrada y la disolución se impulsó junto con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico por todo el sistema mediante la bomba de recirculación (**Figura 9.7**).

Las muestras se toman a intervalos regulares de 15 minutos, procediendo del siguiente modo: el sistema cuenta con dos válvulas de toma de muestra; la primera de ellas es una válvula todo o nada, y sólo permite comenzar o terminar de tomar muestra, mientras que la segunda, situada a continuación de ésta, es de regulación (es una válvula de aguja) y permite controlar la velocidad de flujo con que la muestra está siendo tomada, a fin de evitar un burbujeo excesivo. En primer lugar, se estableció un flujo de gas que se mantuvo constante para todas las muestras del ensayo. Una vez fijado el caudal, las

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

muestras se tomaron haciendo burbujear el gas de salida durante 1 minuto en 4 mL de n-hexano, donde se retienen los productos arrastrados en el gas. Transcurrido este tiempo se volvió a cerrar la válvula todo o nada de salida y se mantuvo el restrictor burbujear en n-hexano durante otros 2 minutos. 900  $\mu\text{L}$  de la muestra tomada del reactor se mezclaron con 100  $\mu\text{L}$  de una disolución 150 mM de hexanoato de etilo (estándar interno) en n-hexano y 5  $\mu\text{L}$  de la disolución resultante se analizaron mediante GC como se describe en el apartado 9.2.9.

La eficiencia catalítica se midió mediante dos parámetros: la actividad sintética (U), definida como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de éster (producto de síntesis) por minuto, la selectividad, como la relación entre la actividad sintética y la velocidad de consumo del dador de acilo (éster vinílico), la cual tiene en cuenta la reacción de hidrólisis competitiva del dador de acilo. En estos ensayos de actividad, se utilizaron concentraciones porcentuales en lugar de cuantitativas, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. En primer lugar, se refiere el área de cada pico,  $a_i$ , respecto a la del estándar interno,  $a_{SI}$ . De este modo, para cada analito,  $i$ , se obtiene un área adimensional,  $A_i$ , de valor constante e independiente de la cantidad de muestra inyectada para hacer el análisis:

$$A_i = a_i / a_{SI} \quad (9.2)$$

Multiplicando las áreas adimensionales por el factor de respuesta de cada compuesto (pendiente de la recta de calibrado) se obtendrán las concentraciones normalizadas de cada componente.

$$[PV_n] = f_1 \cdot a_{PV} / a_{SI} \quad (9.3)$$

$$[BuOH_n] = f_2 \cdot a_{BuOH} / a_{SI} \quad (9.4)$$

$$[BB_n] = f_3 \cdot a_{PB} / a_{SI} \quad (9.5)$$

$$[BuA_n] = f_4 \cdot a_{AP} / a_{SI} \quad (9.6)$$

Siendo  $f_1$ ,  $f_2$ ,  $f_3$  y  $f_4$  los factores de respuesta del propionato de vinilo, 1-butanol, propionato de butilo y ácido propiónico, respectivamente.

Con el fin de obtener las concentraciones porcentuales de cada reactivo, se realizan dos balances de materia referidos a los sustratos de la reacción (1-butanol y propionato de vinilo). En cada uno de ellos, la cantidad total del grupo funcional presente en el sistema será igual a la suma de las cantidades de todos los reactivos y productos que los contengan. De acuerdo con esto, en el primero, la concentración total de 1-butanol en el

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

medio ( $[BuOH_t]$ ) será igual a la suma de las concentraciones de 1-butanol ( $[BuOH_n]$ ) y propionato butilo  $[PB_n]$  que hay en el sistema en cada momento, respectivamente:

$$[ BuOH_t ] = [ BuOH_n ] + [ PB_n ] \quad (9.7)$$

y en el segundo balance, la concentración total de propionato ( $[PV_t]$ ) presente en el medio, será igual a la suma de las concentraciones de propionato de vinilo ( $[PV_n]$ ), ácido propiónico ( $[AP_n]$ ) y propionato de butilo ( $[PB_n]$ ):

$$[ PV_t ] = [ PV_n ] + [ AP_n ] + [ PB_n ] \quad (9.8)$$

Los balances de materia permiten referir a ellos cada uno de los componentes implicados. Así, para el primer balance, la concentración en tanto por ciento respecto a la cantidad total de cada uno de los componentes (%cBuOH y %cPB) quedaría como sigue:

$$\%cBuOH = 100 \cdot ([BuOH_n]/[BuOH_t]) \quad (9.9)$$

$$\%cPB = 100 \cdot ([PB_n]/[BuOH_t]) \quad (9.10)$$

El mismo tratamiento se puede aplicar para el segundo balance, donde se obtienen las concentraciones de propionato de vinilo (%cPV), propionato de butilo (%cPB), y ácido propiónico (%cAP) como tanto por ciento de la cantidad inicial de propionato de vinilo introducida:

$$\%cPV = 100 \cdot ([PV_n]/[PV_t]) \quad (9.11)$$

$$\%cPB = 100 \cdot ([PB_n]/[PV_t]) \quad (9.12)$$

$$\%cAP = 100 \cdot ([AP_n]/[PV_t]) \quad (9.13)$$

Conociendo todos estos porcentajes y las concentraciones iniciales de cada sustancia que se introduce al reactor, se pueden determinar las concentraciones de cada especie en cada momento, pudiendo obtener los perfiles de reacción a lo largo del tiempo.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

La expresión que permite calcular la actividad a partir de la pendiente del tramo lineal del perfil de reacción es la siguiente:

$$\text{Actividad} = \frac{m \cdot [C_0] \cdot V_T}{100} = U \quad (9.14)$$

donde  $m$  es la pendiente del tramo inicial del perfil de producción de propionato de butilo con el tiempo, en %c/minuto, obtenido a partir del balance de materia;  $[C_0]$  es la concentración inicial de los sustratos en  $\mu\text{mol/mL}$ ; y  $V_T$  es el volumen total del sistema, 178 mL. Puesto que se está empleando una membrana con enzima inmovilizada sobre una cierta superficie, esta actividad será expresada en  $U/\text{cm}^2$ , con lo que la expresión anterior se transforma en:

$$\text{Actividad} / \text{cm}^2 = U / \text{cm}^2 \quad (9.15)$$

donde  $A$  es el área ó la superficie interna de la membrana, expresada en  $\text{cm}^2$ .

La selectividad se calcula a través de la siguiente expresión:

$$\text{Selectividad (\%)} = \frac{\%PB}{\%PB + \%AP} \cdot 100 \quad (9.16)$$

El denominador debe coincidir con el porcentaje de sustrato que se ha consumido en la reacción. Empleando las pendientes iniciales del perfil de reacción de cada sustancia, la expresión anterior se puede transformar en la siguiente:

$$\text{Selectividad(\%)} = \frac{m_{PB}}{m_{PB} + m_{AP}} \cdot 100 \quad (9.17)$$

estando todas las pendientes expresadas en %c/min.

### 6.2.8. Determinación experimental de los coeficientes de reparto de los sustratos y productos de reacción entre los líquidos iónicos y n-hexano

Se determinó el coeficiente de reparto de los compuestos implicados en la reacción modelo propuesta entre los líquidos iónicos y n-hexano mediante el método “*flash-shake*”. Se empleó el n-hexano como disolvente de referencia debido a que su capacidad como disolvente es similar a la del scCO<sub>2</sub> en condiciones suaves de operación. Para ello en un vial de 2 mL se colocaron 750 µL de líquido iónico previamente equilibrado con la fase n-hexano y otros 750 µL de la disolución de compuestos en n-hexano. Una vez cerrados los viales, se agitaron vigorosamente en un vortex y se introdujeron en un baño termostataado a 50° C, a la misma temperatura que los ensayos llevados a cabo en el reactor supercrítico. A los 5 minutos, se tomó muestra de la fase hexano. Se volvió a tomar otra muestra a los 20 minutos para verificar que se había alcanzado el equilibrio de reparto entre el líquido iónico y n-hexano. La composición de la fase orgánica se determinó antes y después de la agitación, calculándose los coeficientes de reparto a través de la ecuación 9.18:

$$K_{AB} = \left( \frac{[A]_{H(i)} - [A]_{H(f)}}{[A]_{H(f)}} \right) \frac{V_H}{V_{IL}} \quad (9.18)$$

donde  $[A]_{H(i)}$  y  $[A]_{H(f)}$  son las concentraciones del analito en la fase hexano antes y después de la extracción respectivamente, siendo  $V_H$  y  $V_{IL}$  los volúmenes de la fase hexano y líquido iónico, respectivamente.

### 9.2.9. Análisis cromatográfico

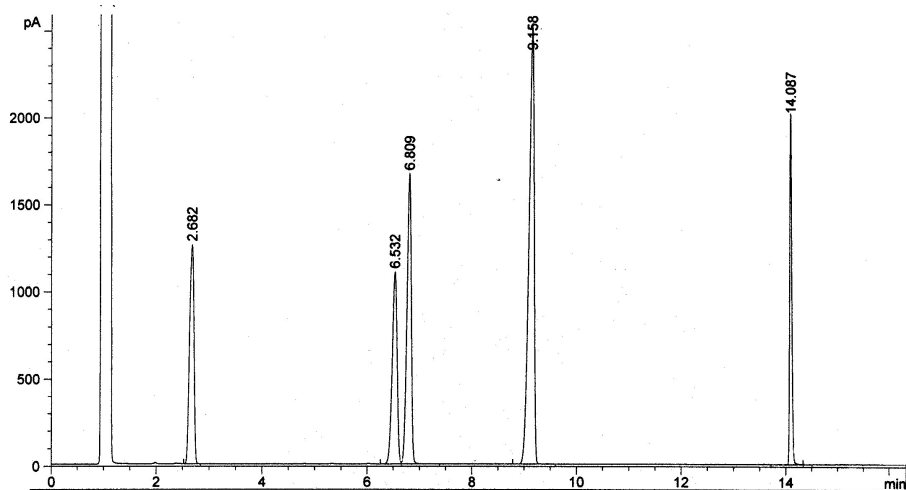
El análisis de las muestras se llevó a cabo por cromatografía de gases en un cromatógrafo Agilent 6890 N equipado con un detector de ionización en llama (FID), un inyector automático de muestras y una columna capilar capilar Nukol<sup>TM</sup> (15m × 0.53mm × 0.5µm) de Supelco, utilizando hexanoato de etilo como estándar interno.

El gas portador utilizado fue nitrógeno y se suministró a la columna a una presión constante de 1.5 psi en la cabeza de la columna (39.9 mL/min, de flujo total) y una relación de split fue de 7.9/1. La temperatura en el inyector se fijó en 190 °C y la temperatura del detector fue de 220 °C siendo los caudales en el mismo de de 400 ml/min de aire sintético de laboratorio, 30 ml/min de hidrógeno y 20 ml/min de nitrógeno. La temperatura de la columna se programó para conseguir la correcta separación de los picos de los distintos componentes de las muestras. El programa de temperatura fue: 40 °C, 3 min; 5 °C/min, 70 °C; 15 °C/min, 180 °C.



## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

En la **Figura 9.8** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema de reacción.



**Figura 9.8.** Cromatograma del sistema: propionato de vinilo, 1-butanol, propionato de butilo y ácido propiónico.

Los tiempos de retención de los compuestos estudiados son los siguientes: n-hexano, 1.1; propionato de vinilo, 2.7 min.; propionato de butilo, 6.5 min; 1-butanol, 6.8 min; hexanoato de etilo (estándar interno), 9.2 min y ácido propiónico, 14.1 min.

Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos, las cuales se muestran en la **Tabla 9.1**.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

**Tabla 9.1.** Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: propionato de vinilo, 1-butanol, butirato de propilo y ácido propiónico.

Compuesto	m = pendiente	r <sup>2</sup>
PROPIONATO DE VINILO	1.437	0.9999
1-BUTANOL	1.335	0.9999
BUTIRATO DE PROPILO	0.829	0.9999
ÁCIDO PROPIÓNICO	1.877	0.9997

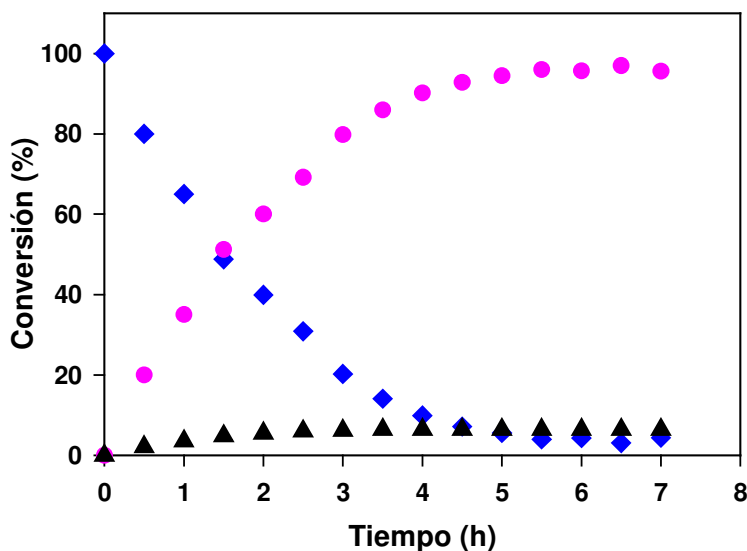
### 9.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 9.3.1. Síntesis de propionato de butilo catalizada por membranas enzimáticas en dióxido de carbono supercrítico

Se analizó el comportamiento catalítico de la enzima CaLB inmovilizada sobre una membrana de  $\alpha$ -alúmina para la síntesis de propionato de butilo a partir de propionato de vinilo y 1-butanol a 50°C y 80 bar en scCO<sub>2</sub>.

La **Figura 9.9** muestra el perfil de reacción para la síntesis de propionato de butilo catalizada por la membrana enzimática a 50 °C y 80 bar en scCO<sub>2</sub>.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres



**Figura 9.9.** Perfil de reacción para la síntesis de propionato de butilo (●) y ácido propiónico (▲) a partir de propionato de vinilo (150 mM) (no dibujada) y 1-butanol (◆) (75 mM) mediante membranas enzimáticas con CaLB inmovilizada en scCO<sub>2</sub> (50 °C, 80 bar).

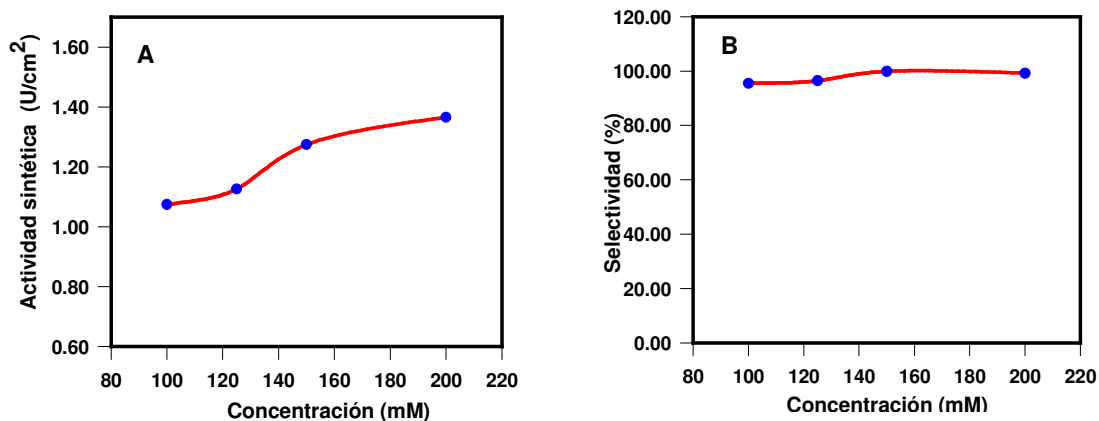
Como se desprende de la gráfica anterior el consumo de 1-butanol es seguido por un incremento en la concentración del producto del síntesis (propionato de butilo) y del producto de hidrólisis (ácido propiónico). La reacción procedió con un alto grado de eficiencia, consiguiendo una selectividad del 93.3% y una actividad sintética de 1.82 U/cm<sup>2</sup>.

### 9.3.2. Modelo cinético para la síntesis de propionato de butilo catalizada por membranas enzimáticas en dióxido de carbono supercrítico

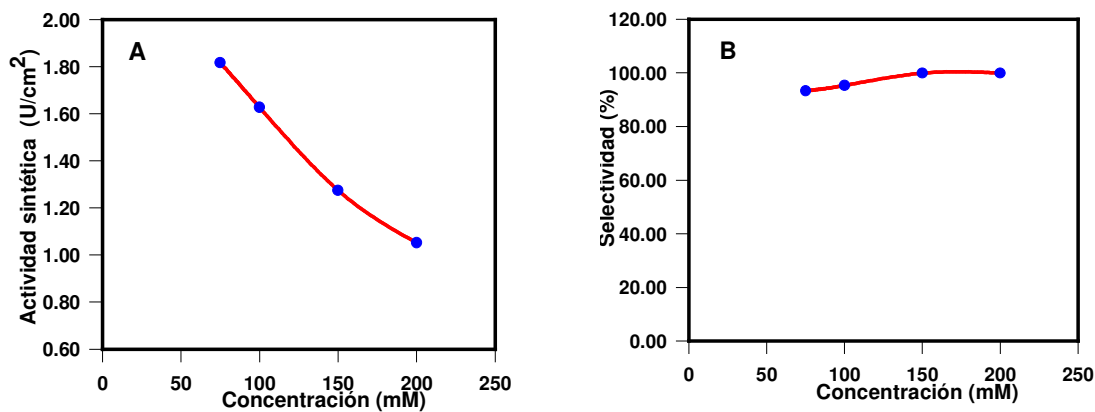
El efecto de las concentraciones de propionato de vinilo y 1-butanol en la actividad enzimática y en la selectividad de la reacción de transesterificación de propionato de vinilo a propionato de butilo en scCO<sub>2</sub> fue estudiada, con el fin de proponer una ecuación de velocidad y establecer las condiciones iniciales de reacción en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>. Así, las concentraciones del sustrato alcohol se variaron dentro de un intervalo de 75-200 mM, siendo el intervalo estudiado para el propionato de vinilo de 100-200 mM.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

La **Figura 9.10** muestra la variación de la actividad y selectividad con la variación equimolecular de los reactivos, mientras que la **Figura 9.11** muestra la variación de la actividad y selectividad al variar la concentración del sustrato alcohol manteniendo constante la concentración de propionato de vinilo.



**Figura 9.10.** Actividad (A) y selectividad (B) de las membranas enzimáticas en medio  $scCO_2$  a diferentes concentraciones equimolares de propionato de vinilo y 1-butanol.

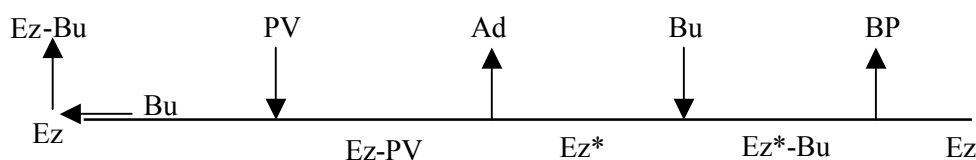


**Figura 9.11.** Actividad (A) y selectividad (B) de la membranas enzimáticas en medio  $scCO_2$  a diferentes concentraciones de 1-butanol manteniendo constante la concentración de propionato de vinilo a 150mM.

Los valores de las pendientes obtenidas de los perfiles de concentración para cada ensayo se encuentran recogidos en el Anexo 8.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

Como se puede observar en la **Figura 9.10** conforme se incrementó la concentración equimolecular de los sustratos se produjo un leve incremento en la velocidad inicial de reacción. Los valores de selectividad también aumentaron conforme lo hicieron las concentraciones equimolares de los reactivos hasta llegar a la concentración de 200 mM, para la cual disminuyó ligeramente. El efecto del sustrato 1-butanol en la velocidad inicial y en la selectividad se estudió mediante la variación de la concentración del mismo, manteniendo constante la concentración de propionato de vinilo. En este estudio se observó una fuerte inhibición de la reacción por el sustrato alcohol ya que la velocidad inicial de reacción disminuyó de forma importante y continua al pasar de 75 mM a 200 mM (**Figura 9.11**). La inhibición por este tipo de sustrato ha sido descrita en las reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por lipasas. Así, algunos autores han demostrado, tanto en medios orgánicos convencionales [22] como en no convencionales (p.e.  $\text{scCO}_2$ ) [23], que la cinética de este tipo de reacciones siguen un mecanismo Bi-Bi Ping-Pong con inhibición competitiva por el sustrato alcohol. Según este mecanismo, la lipasa puede reaccionar con 1-butanol generando un complejo terminal lipasa-1-butanol ó con propionato de vinilo para rendir el complejo lipasa-propionato de vinilo. Este último complejo se descompone a alcohol vinílico (que se transforma en acetaldehído) y a un complejo acil-lipasa ( $\text{Ez}^*$ ) que interaccionará con el 1-butanol para formar otro complejo binario ( $\text{Ez}^*\text{-Bu}$ ) que dará finalmente lugar al butirato de propilo, regenerando la enzima en su estado inicial tal y como se muestra en la **Figura 9.12**.



**Figura 9.12.** Mecanismo Bi Bi Ping-Pong con inhibición competitiva por 1-butanol, donde Ez es la enzima libre, Ez-PV es el complejo enzima-propionato de vinilo,  $\text{Ez}^*$  el complejo acil-enzima, Ad acetaldehído, Bu 1-butanol,  $\text{Ez}^*\text{-Bu}$  complejo binario de acil-enzima y 1-butanol, BP propionato de butilo y Ez-Bu complejo enzima-1-butanol.

En el caso objeto de este estudio, la selectividad aumentó conforme lo hizo la concentración de 1-butanol desde un 93.3% (relación 1-butanol:propionato de vinilo de 75:150) hasta un 99.9% (relación 1-butanol:propionato de vinilo de 150:150 y 200:150). Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que la mayor concentración de este sustrato en el medio de reacción permite que su unión al complejo acil-enzima ( $\text{Ez}^*$ ) se produzca más rápidamente aumentando la selectividad de la reacción. Sin embargo, también facilita su unión al centro activo de la enzima formando el complejo

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

terminal Ez-Bu, con lo que se reduce el número de centros activos libres para la unión del sustrato propionato de vinilo, que dará lugar al producto de reacción y por tanto disminuye la actividad sintética. Así, a la vista de los resultados obtenidos se seleccionó para los posteriores ensayos una concentración de 150 mM para propionato de vinilo y 100 mM para 1-butanol, con el fin de alcanzar una situación de compromiso entre la selectividad y la actividad de la reacción.

En base a las velocidades iniciales obtenidas para cada pareja de concentraciones de los sustratos de reacción se propuso una ecuación de velocidad. Dado que el dispositivo experimental considerado es un reactor enzimático de membrana con recirculación, si la velocidad de recirculación es suficientemente alta como para que la conversión por paso sea baja, el sistema puede ser considerado como un reactor tanque discontinuo, el cual se podría representar mediante la ecuación de continuidad (9.19) corrigiendo el tiempo a

través de la siguiente relación  $\frac{S}{V_{total}}$ :

$$\left( \frac{S}{V_{total}} \times dt \right) = \frac{dCa}{(-ra)} \quad (9.19)$$

donde  $S$  es la superficie interna de la membrana ( $\text{cm}^2$ ),  $V_{total}$  el volumen interno del reactor (mL),  $t$  el tiempo de reacción (min),  $Ca$  la concentración de producto en el interior del reactor (mol / L) y  $ra$  la velocidad de reacción ( $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ )

La velocidad inicial de reacción referida a la superficie efectiva de la membrana, se obtiene de la variación inicial de la concentración con el tiempo, tal y como se expresa en la ecuación 9.20.

$$V_0 = \left( \frac{V_{total}}{S} \right) \times \left( \frac{dCa}{dt} \right)_0 \quad (9.20)$$

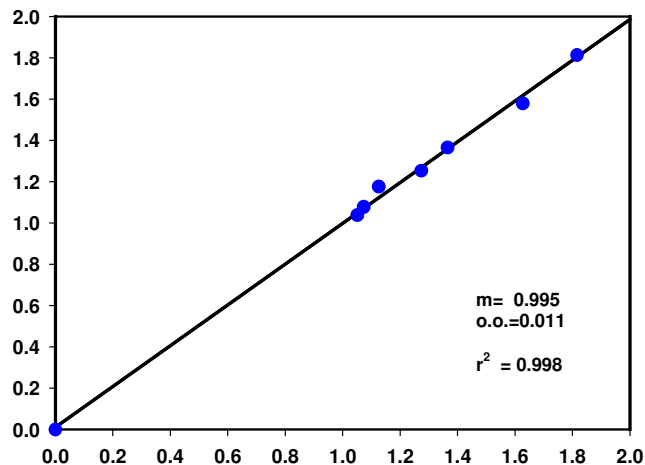
Como se ha mencionado en el apartado anterior, se espera que esta reacción siga un mecanismo Bi-Bi Ping Pong con inhibición competitiva del sustrato alcohol. Así, la ecuación cinética para este mecanismo se utilizó para ajustar los datos experimentales, determinando de este modo los parámetros cinéticos mediante la siguiente expresión 9.21.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

$$V_0 = V_{\max} \cdot \frac{[PV]_0 \cdot [Bu]_0}{[Bu]_0 \cdot \left( K_{mPV} \cdot \left( \frac{[Bu]_0}{K_I} + 1 \right) \right) + (K_{mBU} + [Bu]_0) \cdot [PV]_0} \quad (9.21)$$

donde  $V_0$  y  $V_{\max}$  son las velocidades inicial y máxima respectivamente,  $[PV]_0$  y  $[Bu]_0$  son las concentraciones iniciales del propionato de vinilo y de 1-butanol,  $K_{mPV}$  y  $K_{mBU}$  las constantes de Michaelis para el propionato de vinilo y el 1-butanol y  $K_I$  es la constante de inhibición de 1-butanol.

Los parámetros implicados en la ecuación de velocidad fueron estimados mediante mínimos cuadrados utilizando la aplicación Solver de Microsoft Excel. Los valores para los parámetros cinéticos obtenidos son los siguientes:  $V_{\max} = 0.851 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $K_{mPV} = 0.9985 \text{ M}$ ;  $K_{mBU} = 0.0102 \text{ M}$ ;  $K_I = 0.0776 \text{ M}$  y la media de la suma del cuadrado de los errores =  $5.77 \times 10^{-6}$ . Es conveniente destacar que los parámetros obtenidos deben ser considerados como aparentes, ya que en el modelo no se han considerado las limitaciones difusionales internas y/o externas. En la **Figura 9.13** se representan los valores de velocidad inicial experimentales y calculados, usando los parámetros antes mencionados. Como se puede observar se obtiene una línea recta de pendiente 0.995, ordenada en el origen = 0.011 y con un coeficiente de regresión al cuadrado de 0.998, mostrando, por tanto, que los datos experimentales se ajustan en gran medida a los valores calculados mediante el modelo.

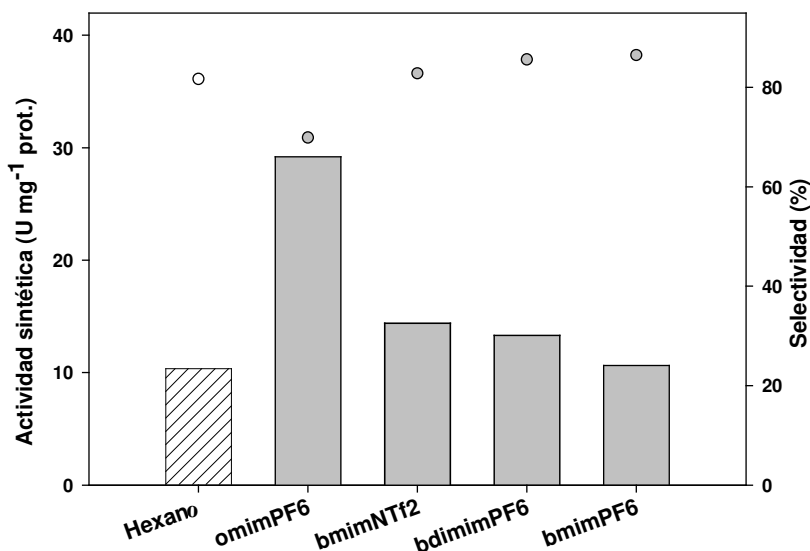


**Figura 9.13.** Comparación de los datos experimentales y calculados para el modelo cinético propuesto ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ).

**9.3.3. Síntesis de propionato de butilo en líquidos iónicos catalizada por lipasa B de *Candida antarctica***

Las reacciones catalizadas por enzimas están ampliamente influenciadas por el medio de reacción. Por ello se estudió efecto de los líquidos iónicos [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bdmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] sobre la actividad y selectividad de la enzima lipasa B de *Candida antarctica* libre (CaLB), para la síntesis de propionato de butilo mediante reacción de transesterificación de propionato de vinilo con 1-butanol a 50°C y con un contenido en agua del 2% (v/v). La reacción de transesterificación también se realizó en n-hexano, un disolvente orgánico convencional para la síntesis enzimática de ésteres en medios anhidros [24] en las mismas condiciones de operación, con el fin de comparar la eficiencia en los diferentes medios de reacción objeto de estudio.

La **Figura 9.14** muestra la actividad sintética y la selectividad exhibida por la enzima CaLB para la síntesis de propionato de butilo en medios líquido iónico y en n-hexano. Los valores de las pendientes obtenidas para cada ensayo se encuentran recogidos en el Anexo 9.



**Figura 9.14.** Actividad sintética (barras) y selectividad (puntos) exhibida por la enzima lipasa B de *Candida antarctica* libre para la síntesis de propionato de butilo en n-hexano y en cuatro líquidos iónicos ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bdmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]). Las condiciones de reacción fueron T = 50°C, propionato de vinilo 150 mM y 1-butanol 100 mM.



## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

Tal y como se desprende de la **Figura 9.14**, la actividad enzimática y la selectividad en los líquidos iónicos ensayados, resultó ser más alta que la obtenida en n-hexano, demostrando la viabilidad de éstos nuevos disolventes como medios de reacción. La secuencia obtenida de actividad enzimática fue la siguiente:  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-] > [\text{bdmim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ . En general, para los líquidos iónicos basados en el mismo anión, la hidrofobicidad de los mismos se incrementa con el aumento de la longitud de la cadena alquílica del catión [25]. De acuerdo con los resultados mostrados en la **Figura 9.14**, considerando los líquidos iónicos basados en el mismo anión, la actividad sintética aumentó gradualmente al aumentar la hidrofobicidad de los líquidos iónicos, lo cual puede ser explicado por el hecho de que un incremento en la hidrofobicidad del medio permite el mantenimiento de la capa de agua necesaria alrededor de la enzima, reduciendo así la interacción directa entre los iones del líquido iónico y la enzima [26]. La actividad enzimática en  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$  como medio de reacción fue mayor que en  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ . Los resultados de otros autores indican esta misma tendencia, siendo también la enzima lipasa más activa en  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$  respecto a  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  [24, 27].

Por otra parte las diferencias en la selectividad entre los diferentes líquidos iónicos ensayados (**Figura 9.14**) puede ser atribuida a su habilidad específica para reducir la actividad del agua ( $A_w$ ) en el microambiente de la enzima. En este sentido, un incremento en la hidrofobicidad en los líquidos iónicos supone un incremento en las moléculas libres de agua, las cuales pueden actuar como aceptores nucleófilos en las reacciones de transesterificación, disminuyendo la selectividad. Así, el aumento de hidrofobicidad asociado al incremento de la longitud de cadena para un mismo anión, está de acuerdo con la disminución de la selectividad. Del mismo modo, si se comparan dos líquidos iónicos de igual catión pero de distinto anión, por ejemplo,  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ , la mayor hidrofobicidad del que contiene el anión bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida implica una menor selectividad con respecto a aquel que contiene el anión hexafluorofosfato, más hidrofílico. Así, para el n-hexano, que es el compuesto más hidrófobo de todos, la selectividad que cabría esperar sería la menor, y en efecto, así sucede.

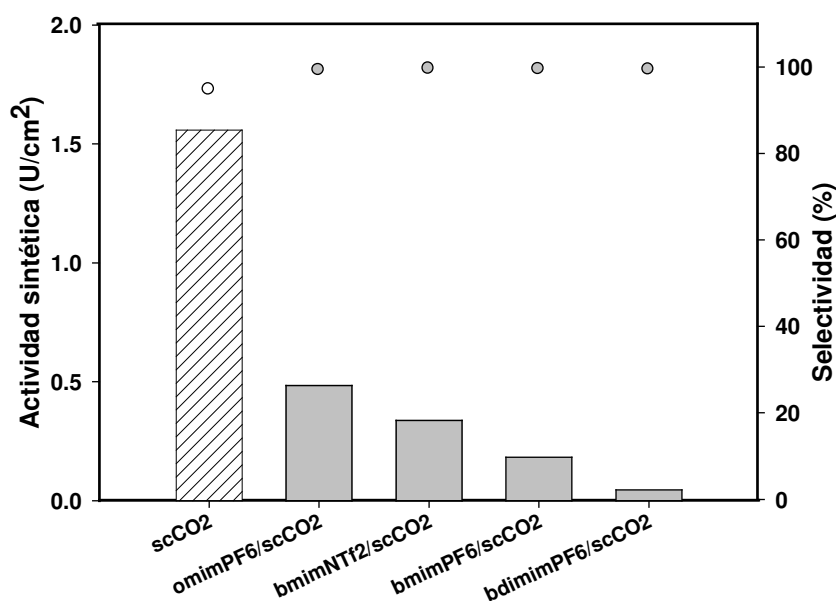
### 6.3.4. Síntesis de propionato de butilo catalizada por membranas enzimáticas en sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico

Se estudió la actividad y selectividad de la enzima CaLB inmovilizada sobre membranas cerámicas en la síntesis de propionato de butilo a partir de propionato de vinilo y 1-butanol en sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>. Se utilizaron 4 líquidos iónicos:  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{bdmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$  para proveer a la enzima de un microambiente adecuado mientras que el scCO<sub>2</sub> (50°C y 80 bar) se empleó como fase extractante. La concentración inicial de sustratos fue 150 mM de propionato de vinilo y 100mM de 1-butanol. Los valores de las pendientes obtenidas

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

para la reacción de transesterificación en medio  $\text{scCO}_2$  y en los sistemas bifásicos IL/ $\text{scCO}_2$  se encuentran recogidos en el Anexo 10 .

La **Figura 9.15** muestra la actividad sintética y selectividad de la enzima CaLB inmovilizada sobre membranas cerámicas en medio  $\text{scCO}_2$  y en cuatro sistemas bifásicos IL/ $\text{scCO}_2$ .



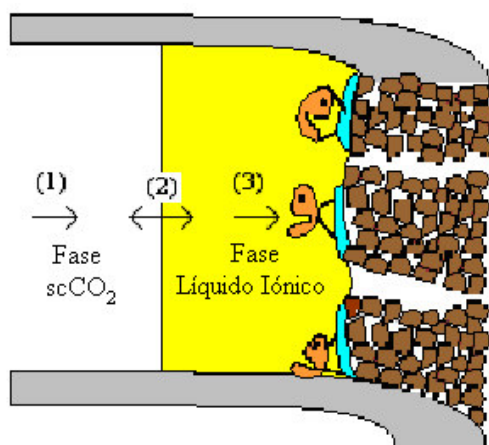
**Figura 9.15.** Actividad enzimática (barras) y selectividad (puntos) de la enzima CaLB inmovilizada en medio  $\text{scCO}_2$  y en cuatro sistemas bifásicos IL/ $\text{scCO}_2$  (IL =  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{bdimim}^+][\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ). Las condiciones de reacción fueron  $T = 50^\circ\text{C}$ ,  $P = 80$  bar, propionato de vinilo 150 mM y 1-butanol 100 mM.

Como se puede observar de la **Figura 9.15**, la actividad sintética de la lipasa inmovilizada en los sistemas bifásicos IL/ $\text{scCO}_2$  fue más baja que en  $\text{scCO}_2$ . Mori et al. (2005) [28] observaron resultados similares en sistemas bifásicos IL/hexano. Estos autores prepararon membranas con enzima inmovilizada en líquidos iónicos, observando que las membranas preparadas por simple adsorción de CaLB sobre la superficie de la membrana eran más activas que las membranas preparadas con líquidos iónicos.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

El orden de actividad sintética exhibida por la lipasa B de *Candida antarctica* en los sistemas bifásicos estudiados es el siguiente (**Figura 9.15**):  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-] > [\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bdmim}^+][\text{PF}_6^-]$ . Ésta es prácticamente la misma secuencia observada en las reacciones homogéneas en líquidos iónicos analizadas en el apartado 9.3.3 ( $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-] > [\text{bdmim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ), con la excepción de que el orden entre  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  y  $[\text{bdmim}^+][\text{PF}_6^-]$  es el contrario al obtenido en ese caso. Este cambio de orden en la secuencia puede ser explicado en base a los fenómenos de transferencia de materia en el transporte de los sustratos desde la fase  $\text{scCO}_2$  hasta el líquido iónico donde está presente la enzima.

El mecanismo de transporte de los sustratos hacia el centro catalítico, tal y como se muestra en la **Figura 9.16**, supone tres pasos consecutivos: la difusión de los sustratos a través de la capa de difusión, desde la fase  $\text{scCO}_2$  hasta la interfase IL/ $\text{scCO}_2$  (etapa 1); el reparto de los sustratos entre el  $\text{scCO}_2$  y la fase IL (etapa 2), y el proceso de difusión dentro de la fase IL hacia la enzima inmovilizada (etapa 3).



**Figura 9.16.** Mecanismo de transferencia de soluto desde la fase  $\text{scCO}_2$  hasta la enzima inmovilizada a través de la fase líquido iónico.

Para el análisis de la etapa 2 se recurrió a la determinación y estudio de los coeficientes de reparto de los sustratos y productos de la reacción de transesterificación entre *n*-hexano y IL (**Tabla 9.2**) a 50°C. Se utilizó *n*-hexano como disolvente de referencia ya que su capacidad como disolvente es comparable a la de  $\text{scCO}_2$  en condiciones suaves de operación.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

**Tabla 9.2.** Valores de los coeficientes de reparto IL/hexano para 1-butanol, propionato de vinilo, propionato de butilo y ácido propiónico en cuatro ILs: [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

	[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	[bdimim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]
Propionato de vinilo	1.10	1.15	0.71	0.22
1-Butanol	5.21	3.63	2.46	0.68
Propionato de butilo	0.51	0.49	0.15	0.03
Ácido propiónico	6.77	2.43	2.66	1.31

Para el correcto análisis de los resultados obtenidos, es importante considerar que los compuestos con un alto coeficiente de reparto IL/hexano (K) se ven más fuertemente absorbidos en la fase IL. Como se desprende de la **Tabla 9.2**, los valores de K de los sustratos de la reacción para los diferentes líquidos iónicos siguen el orden: [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] > [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. Esta secuencia podría explicar el cambio en el orden de actividad enzimática entre [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] en sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub> respecto al encontrado en líquidos iónicos utilizados como medios homogéneos ([omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] > [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]), ya que los mayores valores para K en [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] indican una mayor absorción de los sustratos en este líquido iónico y, por lo tanto, un contacto más fácil entre los sustratos y el centro activo de la enzima. Además, los valores de K muestran que los sustratos de reacción son más fuertemente absorbidos en [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] que en [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. Este hecho podría explicar la menor diferencia en los valores de actividad enzimática entre [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] y [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] en los sistemas bifásicos (**Figura 9.15**) comparados con aquellos observados en medios homogéneos (**Figura 9.14**).

Todo lo anteriormente expuesto demuestra la importancia del reparto de los compuestos entre el IL y n-hexano en los valores de actividad enzimática observada. La pérdida de actividad en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub> podría ser atribuida a las limitaciones de transferencia de materia a través de la capa de líquido iónico que rodea al biocatalizador más que a fenómenos de desactivación enzimática. De hecho, se ha señalado el efecto protector de los ILs frente a otros medios no acuosos [11] y scCO<sub>2</sub> en condiciones extremas [17]. Por todo ello, se puede concluir que la actividad exhibida por la enzima CaLB inmovilizada en un sistema bifásico IL/scCO<sub>2</sub> depende de dos factores: la especificidad de las interacciones entre la enzima y el líquido iónico y los fenómenos de transferencia de materia entre el scCO<sub>2</sub> y los ILs. Por lo tanto, la adecuada selección del líquido iónico podría mejorar de forma importante la actividad enzimática y los fenómenos de transferencia de materia permitiendo un mejor diseño de los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

La selectividad se determinó también con el fin de cuantificar la eficiencia catalítica de la enzima en el sistema bifásico IL/scCO<sub>2</sub>. A este respecto se observó un incremento en la selectividad de estos medios (>99.5 %) con respecto al medio scCO<sub>2</sub> (95%). Estos resultados pueden ser explicados teniendo en cuenta que los ILs, tienen la capacidad de reducir la actividad de agua en el microambiente de la enzima, la cual puede actuar como nucleófilo, compitiendo con el sustrato alcohol y dando lugar al producto de hidrólisis.

Por lo tanto, los líquidos iónicos proporcionan un microambiente adecuado para la enzima, permitiendo un alta selectividad, mientras que el uso de dióxido de carbono supercrítico como segunda fase en el sistema bifásico permite la recuperación de los productos, sin contaminación del extracto por la fase líquido iónico.

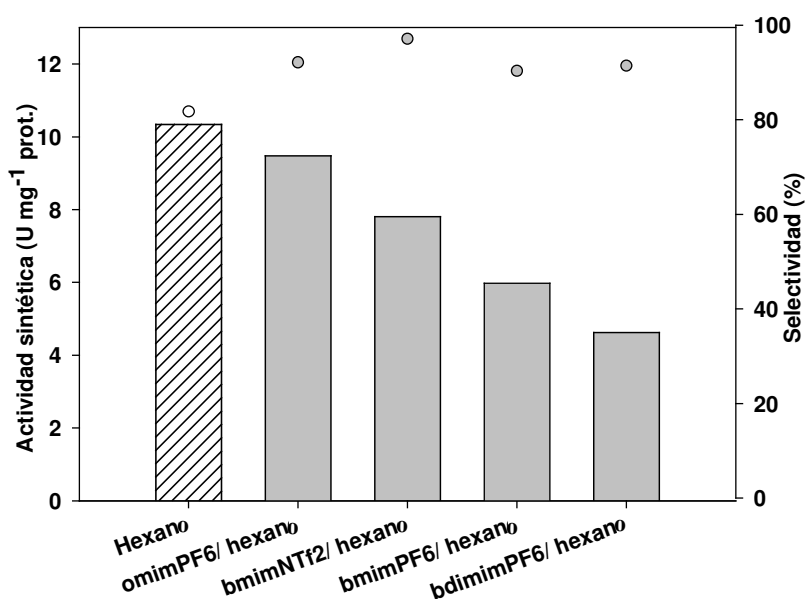
### **6.3.5. Síntesis de propionato de butilo catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* libre en sistemas bifásicos líquido iónico/hexano**

En esta serie de experimentos se estudió la actividad y la selectividad exhibida por CaLB libre en la síntesis de propionato de butilo a partir de propionato de vinilo (150 mM) y 1-butanol (100 mM) en sistemas bifásicos IL/hexano a 50 °C, con el fin de obtener una mejor comprensión de los resultados observados en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>. Los líquidos iónicos utilizados en este estudio son los mismos que se utilizaron en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>: [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bdmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub>]. En los sistemas IL/hexano, se suspende la enzima en la fase líquido iónico, mientras que el n-hexano actúa como fuente de sustratos y receptor de productos. Al igual que en la determinación de los coeficientes de reparto, se ha utilizado n-hexano como disolvente de referencia debido a que su capacidad como disolvente es comparable a la del scCO<sub>2</sub> en condiciones suaves de operación.

Los valores de las pendientes obtenidas para la reacción de transesterificación en los sistemas bifásicos IL/hexano se encuentran recogidos en el Anexo 11.

En la **Figura 9.17** se muestra la actividad sintética y la selectividad exhibida por la enzima CaLB libre en n-hexano y en diferentes sistemas bifásicos IL/hexano.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres



**Figura 9.17.** Actividad sintética (barras) y selectividad (puntos) de CaLB libre en medio scCO<sub>2</sub> y en cuatro sistemas bifásicos IL/hexano: [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] y [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. Las condiciones de reacción fueron T=50°C, propionato de vinilo 150 mM y 1-butanol 100 mM.

Tal y como se desprende de la **Figura 9.17**, la actividad sintética exhibida por CaLB libre en los sistemas bifásicos IL/hexano fue menor que cuando se utilizó n-hexano como medio homogéneo de reacción. En este sentido, se reproduce el comportamiento observado en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub> con respecto al sistema homogéneo scCO<sub>2</sub> (**Figura 9.15**). Tal y como se puso de manifiesto en el apartado 9.3.3, las reacciones de transesterificación catalizadas por CaLB en medios homogéneos están más favorecidas en los líquidos iónicos que en n-hexano, por lo que la reducción de actividad en los sistemas bifásicos IL/hexano respecto al sistema homogéneo en n-hexano puede ser explicado, tal y como se comentó para los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>, por limitaciones para la transferencia de materia entre fases, relacionada ésta con los coeficientes de reparto IL/hexano. Merece la pena destacar que la secuencia de actividad sintética en los sistemas bifásicos IL/hexano ([omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][Tf<sub>2</sub>N<sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]) fue la misma que en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>.

Así, los resultados encontrados en los sistemas bifásicos IL/hexano ratifican los obtenidos en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>, por lo que de nuevo se confirma la importancia de considerar el efecto del líquido iónico sobre la actividad enzimática y los fenómenos de transferencia de materia en el diseño de sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

---

En los sistemas bifásicos IL/hexano, la selectividad de la reacción fue mayor que cuando se utilizó n-hexano como medio de reacción (**Figura 9.17**). Así, mientras la selectividad de la enzima en hexano fue del 81.7 %, ésta resultó ser del 90.2 % para el sistema bifásico IL/hexano que presentó menor selectividad ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]/hexano). El mismo comportamiento mostró la enzima inmovilizada en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub> comparado con el medio homogéneo scCO<sub>2</sub>. En este sentido, se puede concluir que cuando la enzima ejerce su acción catalítica en un líquido iónico, que reduce la actividad de agua en el microambiente de la enzima, se incrementa los valores de selectividad alcanzada.

### 9.4. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo de forma satisfactoria la síntesis de propionato de butilo a partir de propionato de vinilo y 1-butanol en sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub> a 50°C y 80 bar catalizada por la enzima CaLB inmovilizada sobre una membrana de  $\alpha$ -alúmina microporosa. Cuando la reacción se realizó en sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>, la selectividad de los procesos se incrementó (>99.5%) en relación a la obtenida en dióxido de carbono supercrítico, aunque la actividad sintética fue menor.

Además, se ha realizado la síntesis de propionato de butilo también en medios IL y en sistemas bifásicos IL/hexano y se han estudiado los fenómenos de transferencia de materia a través de los coeficientes de reparto IL/hexano, con el fin de mejorar el conocimiento sobre los procesos biocatalíticos en sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>. Estos estudios mostraron que la eficiencia catalítica de estos sistemas depende de las interacciones entre la enzima y el líquido iónico, y de los fenómenos de transferencia de materia entre las fases inmiscibles IL y scCO<sub>2</sub>. Por lo tanto, la pérdida de actividad enzimática, observada en los sistemas bifásicos IL/scCO<sub>2</sub>, puede ser debida a las limitaciones en los fenómenos de transferencia de materia a través de la capa de IL que rodea al biocatalizador.

Además, los valores de actividad enzimática en medio scCO<sub>2</sub> se ajustaron a un modelo basado en el mecanismo Ping Pong Bi-Bi con inhibición competitiva por el sustrato alcohol.

Este trabajo demuestra el gran potencial que tiene la combinación de ILs, scCO<sub>2</sub> y la tecnología de membranas para llevar a cabo procesos sintéticos catalizados por enzimas en condiciones anhidras que sean respetuosos con el medio ambiente. En estos sistemas, el IL proporciona un microambiente adecuado para la enzima, permitiendo una alta selectividad, mientras que el uso de dióxido de carbono supercrítico como segunda fase en sistemas bifásicos, hace posible la fácil recuperación de los productos sin contaminación del extracto por el IL.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

---

### 9.5. NOMENCLATURA

$[A]_{H(i)}$  concentraciones del analito en la fase hexano antes del proceso de extracción ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$[A]_{H(f)}$  concentraciones del analito en la fase hexano después del proceso de extracción ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$V_H$  volumen de la fase hexano utilizado en el proceso de extracción (mL)

$V_{IL}$  volumen de la fase IL utilizado en el proceso de extracción (mL)

$S$  superficie interna de la membrana ( $\text{cm}^2$ )

$V_{total}$  volumen interno del reactor (mL)

$t$  tiempo de reacción (min)

$Ca$  concentración del producto en el reactor ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$ra$  velocidad de reacción ( $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ )

$V_0$  velocidad inicial de reacción ( $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ )

$V_{max}$  velocidad máxima de reacción ( $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ )

$[PV]_0$  concentración inicial de propionato de vinilo ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$[BuOH]_0$  concentración inicial de 1-butanol ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$K_{mPV}$  constante de Michaelis para el propionato de vinilo ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$K_{mBU}$  constante de Michaelis para el 1-butanol ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$K_I$  constante de inhibición para el 1-butanol ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )



## 9.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.M. Klibanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature* 409 (2001) 241-246.
- [2] P. Halling, Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 178 -206.
- [3] M. Freemantle, Cleaning up hydrogenations, *Chem. Eng. News* 79 (2001) 21-25.
- [4] S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO<sub>2</sub> systems, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.
- [5] T. Dumont, D. Barth, C. Corbier, G. Branlant, M. Perrut, Optimization of enzyme environment, *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992) 329-333.
- [6] S. Srivastava, G. Madras, J. Modak, Esterification of myristic acid in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluid.* 27 (2003) 55-64.
- [7] P. Lozano, G. Villora, D. Gómez, A.B. Gayo, J.A. Sánchez-Conesa, M. Rubio, J.L. Iborra, Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluid.* 29 (2004) 121-128.
- [8] B. Al-Duri, R. Goddard, J. Bosley, Characterisation of a novel support for biocatalysis in supercritical carbon dioxide, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11 (2001) 825-834.
- [9] J.D. Holbrey, K.R. Seddon, Ionic liquids, *Clean Prod. Proc.* 1 (1999) 223-236.
- [10] F. van Rantwijk, R. Madeira Lau, R.A. Sheldon, Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 131-138.
- [11] P. Lozano, T. De Diego, D. Carré, M. Vaultier, J.L. Iborra, Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis, *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 1529-1533.
- [12] R.A. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

---

- [13] M.T. Reetz, W. Wiesenhöfer, G. Franciò, W. Leitner, Biocatalysis in ionic liquids: Batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase, *Chem. Commun.* 9 (2002) 992-993.
- [14] P. Lozano, T. de Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J.L. Iborra, Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 661-669.
- [15] L.A. Blanchard, Z. Gu, J.F. Brennecke, High-pressure phase behavior of ionic liquid/CO<sub>2</sub> systems, *J. Phys. Chem. B.* 105 (2001) 2437-2444.
- [16] L.A. Blanchard, J.F. Brennecke, Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287-292.
- [17] P. Lozano, T. de Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra, Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150 °C, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 380-382.
- [18] D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, Enzymatic membrane bioreactors and their applications, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 738-750.
- [19] A.R. Toral, A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, M.H.A. Janssen, R. Schoevaart, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1095-1099.
- [20] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F.A. Martínez, M. Rubio, G. Villora, The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of *Candida antarctica* lipase B in ester synthesis, *Biocatal. Biotrans.* 25 (2007) 151-156.
- [21] P. Lozano, A.B. Pérez-Marín, T. de Diego, D. Gómez, D. Paolucci-Jeanjean, M.P. Belleville, G.M. Rios, J.L. Iborra, Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: Preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media, *J. Membr. Sci.* 201 (2002) 55-64.
- [22] A.V. Paiva, D.V. Rossum, F.X. Malcasa, Kinetics of lipase-mediated synthesis of butyl butyrate in n-hexane, *Biocatal. Biotransform.* 20 (2002) 43-51.
- [23] R. Goddard, J. Bosley, B. Al-Duri, Esterification of oleic acid and ethanol in plug flow (packed bed) reactor under supercritical conditions Investigation of kinetics, *J. Supercrit. Fluid.* 18 (2000) 121-130.

## 9. Nuevo reactor enzimático de membrana con recirculación para la síntesis de ésteres

- [24] M. Persson, U.T. Bornscheuer, Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 22 (2003) 21-27.
- [25] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7(2005) 83-90.
- [26] Y. Yuan, S. Bai, Y. Sun, Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of ( $\pm$ )-menthol in ionic liquids and organic solvents, *Food Chem.* 97 (2006) 324-330.
- [27] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzyme catalysis in ionic liquids: Lipase catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* 5 (2001) 425-426.
- [28] M. Mori, R. Gomez Garcia, M.P. Belleville, D. Paolucci-Jeanjean, J. Sanchez, P. Lozano, M. Vaultier, G. Rios, A new way to conduct enzymatic synthesis in an active membrane using ionic liquids as catalyst support, *Catal. Today* 104 (2005) 313-317.

# 10

## Conclusiones



### 10. CONCLUSIONES GENERALES

Los líquidos iónicos, el dióxido de carbono supercrítico y la tecnología de membranas han sido utilizados satisfactoriamente para el desarrollo de nuevos bioprocesos respetuosos con el medioambiente.

- Con relación al empleo de los *líquidos iónicos* como medios de reacción en procesos biocatalíticos cabe destacar los siguientes logros:

1. Todos los tratamientos aplicados a los líquidos iónicos tales como la equilibración con soluciones acuosas de  $\text{NaHCO}_3$  o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , y la adición de una cantidad catalítica de una base orgánica no reactiva, tal como la trietilamina, a la mezcla de reacción, han resultado adecuados para aumentar la eficiencia catalítica de la lipasa B de *Candida antarctica* en reacciones de transesterificación.
2. Se ha obtenido un nuevo derivado enzimático de la lipasa B de *Candida antarctica* mediante adsorción y entrecruzamiento covalente de la enzima sobre un soporte de polipropileno (CALB-PP) que mantiene su actividad catalítica en líquidos iónicos que desactivan la enzima libre, permitiendo catalizar de forma satisfactoria la acilación de *rac*-1-feniletanol y de *rac*-1-feniletilamina en  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$  y  $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$  con altas enantioselectividades.
3. Los líquidos iónicos han mostrado ser medios de reacción adecuados para la enzima Penicilina G acilasa. Esta enzima ha exhibido una estabilidad más alta en los líquidos iónicos estudiados que en disolventes orgánicos convencionales como 2-propanol. Además, se ha observado un aumento en la estabilidad de esta enzima en presencia de los sustratos de reacción para los líquidos iónicos basados en aniones tetrafluoroborato y hexafluoroborato.

- Considerando la utilización de los *líquidos iónicos* como fase líquida en *membranas líquidas soportadas*, se ha comprobado que dichas membranas muestran un comportamiento adecuado para su empleo en procesos integrados de reacción/separación, específicamente en la resolución racémica de *rac*-1-feniletanol y *rac*-2-pentanol catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica*. Se ha conseguido separar en la fase receptora el isómero (S)-alcohol del isómero (R)- alcohol, el cual permaneció en la fase alimentación en forma de éster. Del análisis de las variables del proceso se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La membrana líquida soportada basada en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] ha resultado ser la más adecuada para la separación selectiva de los compuestos que intervienen en las resoluciones cinéticas.
2. Se ha observado un aumento en la eficiencia del proceso con el incremento de la concentración de la enzima, dentro del intervalo experimental estudiado.
3. Se ha comprobado que el contenido en agua es un parámetro clave que determina la eficiencia del proceso.
4. La mayor eficiencia en el proceso integrado de reacción/separación se ha logrado utilizando como dador de acilo, en las reacciones de transesterificación, el éster vinílico de mayor longitud de cadena.

- Se ha desarrollado un nuevo bioproceso basado en la combinación de **líquidos iónicos**, **dióxido de carbono supercrítico** y **tecnología de membranas** para la síntesis de ésteres alquílicos.

1. La inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) en una membrana sintética microporosa de  $\alpha$ -alúmina ha permitido la obtención de una membrana activa capaz de catalizar satisfactoriamente la síntesis de propionato de butilo a partir de propionato de vinilo y 1-butanol en sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico a 50 °C y 80 bar. En estos sistemas la selectividad del proceso fue mayor que la obtenida con dióxido de carbono supercrítico como medio de reacción. Por lo tanto, los líquidos iónicos actúan en los sistemas bifásicos proporcionando un microambiente adecuado para la actividad catalítica de la enzima mientras el uso de dióxido de carbono supercrítico como segunda fase hace posible la fácil recuperación de los productos sin contaminación del extracto por el líquido iónico.
2. Se ha comprobado que la eficiencia catalítica de lipasa B de *Candida antarctica* en los sistemas bifásicos líquido iónico/ dióxido de carbono supercrítico depende de la especificidad de las interacciones establecidas entre los líquidos iónicos y la enzima y de los fenómenos de transferencia de materia entre las fases inmiscibles, líquido iónico y fluido supercrítico.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis auguran un enorme potencial para la aplicación de los líquidos iónicos, los fluidos supercríticos y la tecnología de membranas a procesos de reacción y/o separación industriales en el campo de la química fina y farmacéutica, con importantes beneficios medioambientales y socioeconómicos.



## **11. Perspectivas futuras**

---

**11**

**Perspectivas futuras**



### 11. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados presentados en esta Tesis no sólo contribuyen a la sustitución de los disolventes orgánicos convencionales sino a otro tema de interés dentro de la *Química verde*: la “*intensificación de procesos*”. El presente trabajo sienta las bases del diseño de nuevos métodos intensificados de producción de compuestos enantioméricamente puros, o enriquecidos en uno de los enantiómeros, usando reactores de membrana basados en líquidos iónicos en los cuales se integra la acción catalítica del biocatalizador y la separación o concentración de los productos en una única operación.

Dado que es posible diseñar líquidos iónicos para cada aplicación concreta, es de esperar que los bioprocesos basados en el uso de líquidos iónicos, dióxido de carbono supercrítico y tecnología de membranas desarrollados en la presente Tesis sean aplicables a un importante número de procesos industriales, especialmente en química fina y farmacéutica. Por todo ello, sería recomendable extender las investigaciones realizadas en la presente Tesis a otros productos de interés industrial.

Como etapa previa a la aplicación industrial de los líquidos iónicos sería necesario ampliar el conocimiento de aspectos relacionados con su posible impacto medioambiental (estabilidad en el tiempo, toxicidad, biodegradabilidad, etc.). Sería además interesante desarrollar modelos capaces de predecir las propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos en función del catión y del anión constituyentes. Esto haría posible seleccionar el líquido iónico más adecuado para cada aplicación evitando gran parte del costoso trabajo experimental de laboratorio.

La combinación de líquidos iónicos, el dióxido de carbono supercrítico y la tecnología de membrana en procesos químicos conllevaría importantes beneficios económicos y medioambientales en comparación con los procesos convencionales. La reducción del consumo de disolventes orgánicos y de catalizadores (mediante inmovilización en membranas) permitiría disminuir los costes de materias primas y reducir la cantidad de residuos generados. Además, los costes de energía asociados a la presurización del dióxido de carbono para generar los sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico serían más bajos que los asociados a la evaporación de disolventes en los procesos convencionales. Por todo ello, desde el punto de vista económico y medioambiental sería deseable la rápida implementación de estos nuevos procesos. Sin embargo, es de esperar que sólo sean implantadas industrialmente aquellas tecnologías que ofrezcan grandes ventajas frente a las convencionalmente utilizadas, debido fundamentalmente a los largos ciclos de vida de las actuales plantas de producción y al alto riesgo que se percibe en el proceso de innovación.



# 12

**Anexos**



**ANEXO 1. PENDIENTES INICIALES DE LOS PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE BUTIRATO DE BUTILO Y ÁCIDO BUTÍRICO EN LA SÍNTESIS DE BUTIRATO DE BUTILO CATALIZADA POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* EN LÍQUIDOS IÓNICOS A 30 °C**

**Tabla 12.1.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones de butirato de butilo y ácido butírico en la síntesis de butirato de butilo en líquidos iónicos a 30 °C y 2% (v/v) de contenido en agua.

Medio	m <sub>éster</sub> (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	m <sub>ácido</sub> (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>antes de purificar</sub>	2.383	0.245
[hmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>antes de purificar</sub>	0.014	0
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>antes de purificar</sub>	0	0
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>después de purificar</sub>	2.840	0.290
[hmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>después de purificar</sub>	9.792	1.616
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>después de purificar</sub>	19.732	3.070
[emim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	2.020	0.332
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	6.005	1.573
[hmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	8.736	1.829
[omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	12.370	2.542
n-hexano	1.293	0.424



**Tabla 12.2.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones de butirato de butilo y ácido butírico en la síntesis de butirato de butilo en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] sometido a diferentes tratamientos a 30 °C y 2% (v/v) de contenido en agua.

Medio	m <sub>éster</sub> (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	m <sub>ácido</sub> (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>NaHCO<sub>3</sub></sub>	11.407	1.500
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></sub>	23.301	2.431
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>Et<sub>3</sub>N</sub>	24.620	0.664

**Tabla 12.3.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones de butirato de butilo y ácido butírico en la síntesis de butirato de butilo en líquidos iónicos a 30 °C y 2% (v/v) de contenido en agua tras la adición de una cantidad catalítica de trietilamina.

Medio	m <sub>éster</sub> (mol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	m <sub>ácido</sub> (mol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
[hmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>Et<sub>3</sub>N</sub>	32.256	2.402
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ] <sub>Et<sub>3</sub>N</sub>	35.373	3.467
[emim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] <sub>Et<sub>3</sub>N</sub>	24.506	1.403
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] <sub>Et<sub>3</sub>N</sub>	30.757	1.125
[hmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] <sub>Et<sub>3</sub>N</sub>	23.537	2.098
[omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] <sub>Et<sub>3</sub>N</sub>	33.941	4.920

**ANEXO 2. PENDIENTES INICIALES DE LOS PERFILES DE CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO FENILACÉTICO EN LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE PENICILINA G CATALIZADA POR PENICILINA G ACILASA DE *ESCHERICHIA COLI* EN LÍQUIDOS IÓNICOS A 40 °C**

**A) SIN SUSTRATO**

**Tabla 12.4.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

Tiempo de incubación (min)	m <sub>PAA</sub> (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
20	0.995
40	0.805
60	0.674
80	0.621
180	0.450
360	0.391
1440	0.326

**Tabla 12.5.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

Tiempo de incubación (min)	$m_{PAA}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
40	0.970
80	0.816
120	0.703
150	0.632
180	0.594
500	0.370
1440	0.332

**Tabla 12.6.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].

Tiempo de incubación (min)	$m_{PAA}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
41	0.988
85	0.897
180	0.822
300	0.766
465	0.738
900	0.683
1320	0.638
1570	0.603
1828	0.562

**Tabla 12.7.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].

Tiempo de incubación (min)	$m_{PAA}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
40	0.956
80	0.858
150	0.796
250	0.700
1440	0.562

**Tabla 12.8.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].

Tiempo de incubación (min)	$m_{PAA}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
20	0.598
40	0.498
60	0.433
80	0.382
120	0.301
400	0.199
1440	0.103

**Tabla 12.9.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en 2-propanol.

Tiempo de incubación (min)	$m_{\text{PAA}}$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
0	1.244
1	0.467
2	0.252
5	0.118
10	0.112
15	0.099

## B) CON SUSTRATO

**Tabla 12.10.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] en presencia de sustrato.

Tiempo de incubación (min)	$m_{PAA}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
20	1.099
45	1.023
150	0.869
300	0.741
450	0.663
840	0.584
1440	0.437

**Tabla 12.11.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] en presencia de sustrato.

Tiempo de incubación (min)	$m_{PAA}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
40	0.970
80	0.816
120	0.703
150	0.632
180	0.594
500	0.370
1440	0.332

**Tabla 12.12.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] en presencia de sustrato.

Tiempo de incubación (min)	$m_{PAA}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
20	0.836
40	0.610
60	0.551
120	0.358
180	0.274
240	0.210
467	0.169
1785	0.048

**Tabla 12.13.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] en presencia de sustrato.

Tiempo de incubación (min)	$m_{PAA}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
45	1.017
75	0.769
150	0.455
300	0.230
450	0.140
607	0.100
1440	0.045

**Tabla 12.14.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración del ácido fenilacético (PAA) en la reacción de hidrólisis de penicilina G a 40 °C, a distintos tiempos de incubación en el líquido iónico [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] en presencia de sustrato.

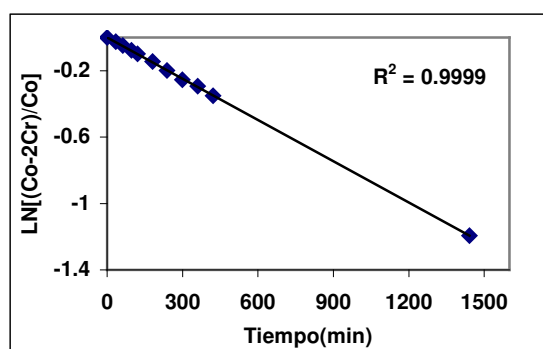
Tiempo de incubación (min)	$m_{PAA}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
0	1.244
20	0.808
60	0.655
100	0.564
180	0.488
1440	0.320



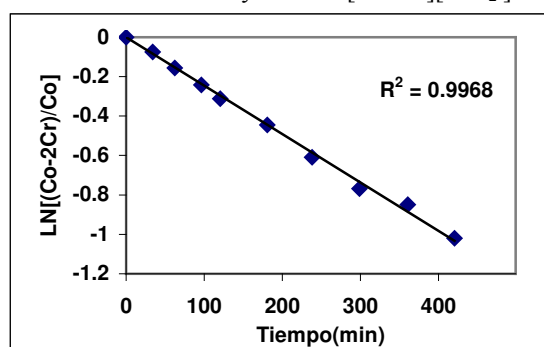


**ANEXO 3. REPRESENTACIÓN DE LA LINEALIZACIÓN DE LA 1ª LEY DE FICK PARA EL CÁLCULO DE LAS PERMEABILIDADES DE LOS COMPUESTOS A TRAVÉS DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS**

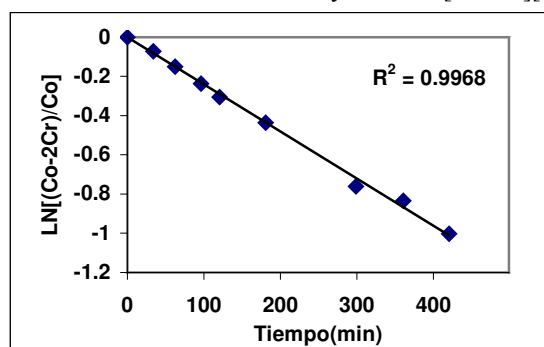
**A) SISTEMA RAC-1-FENILETANOL**



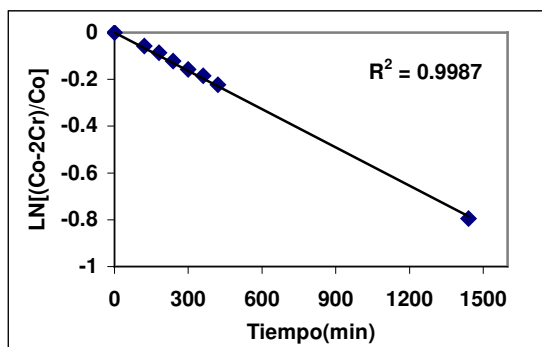
**Figura 11.1.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



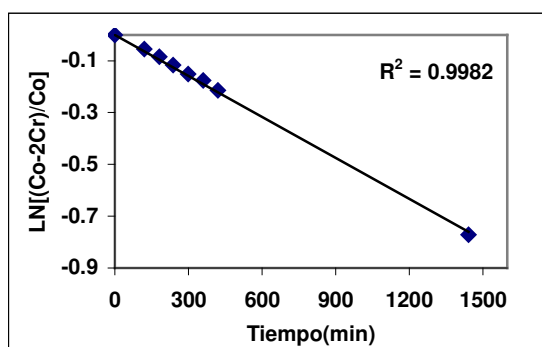
**Figura 12.2.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



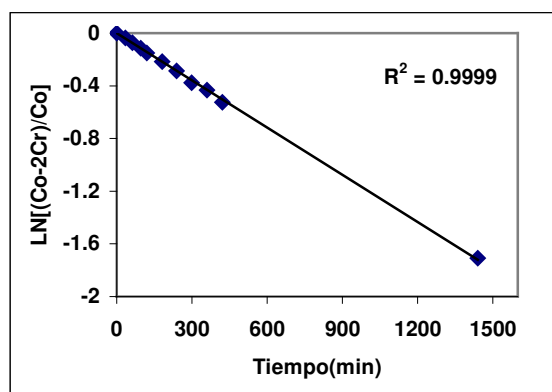
**Figura 12.3.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



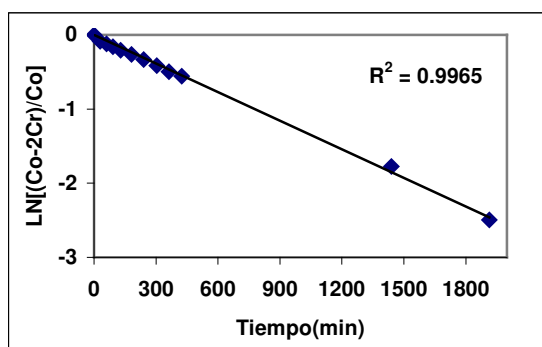
**Figura 12.4.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



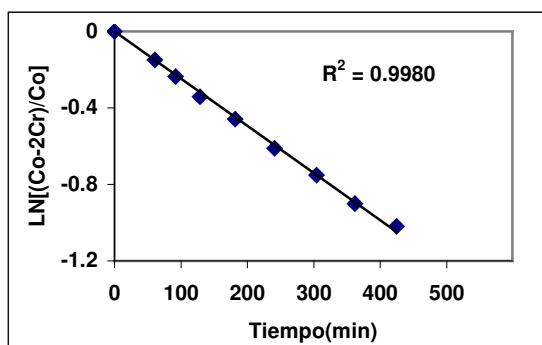
**Figura 12.5.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



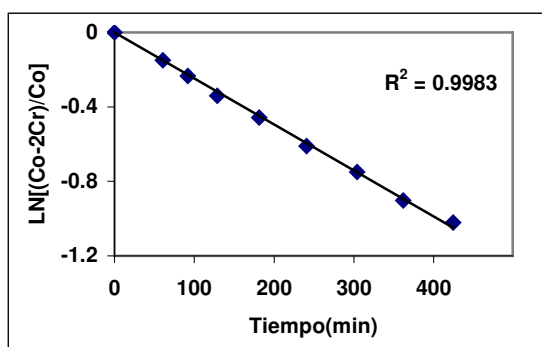
**Figura 12.6.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



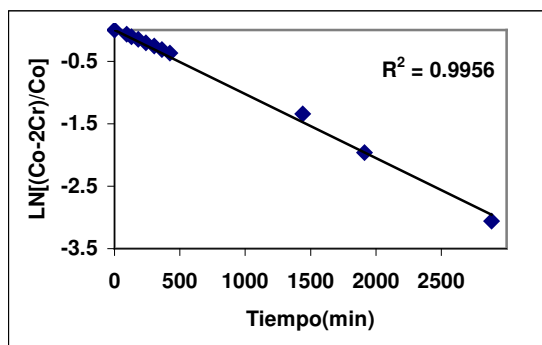
**Figura 12.7.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



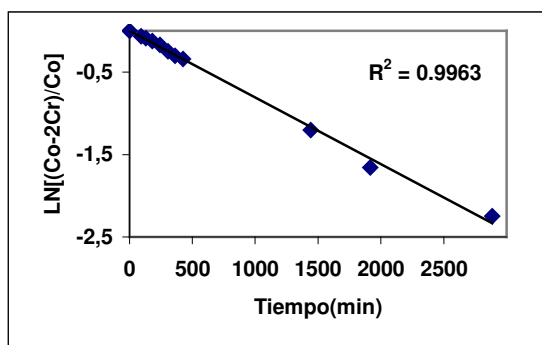
**Figura 12.8.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



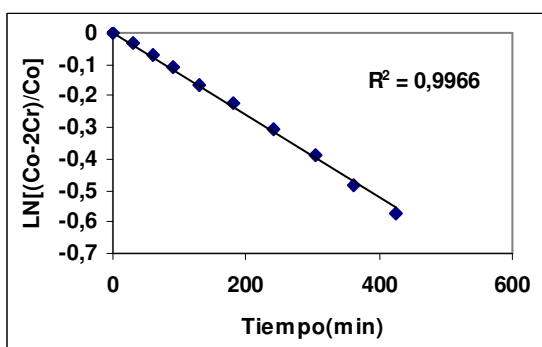
**Figura 12.9.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.10.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.11.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.12.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].

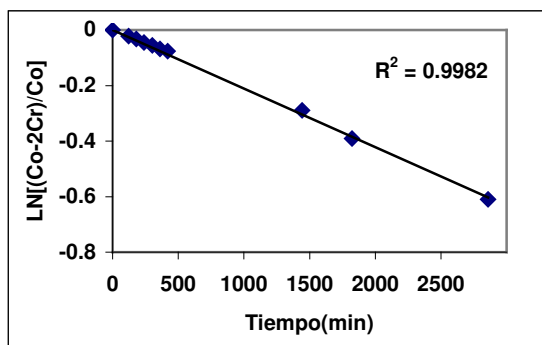


Figura 12.13. Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

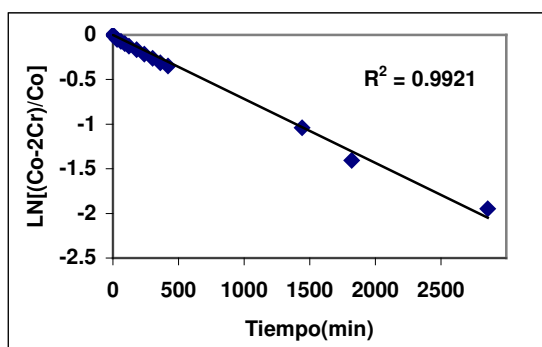


Figura 12.14. Cálculo de la permeabilidad para (R)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

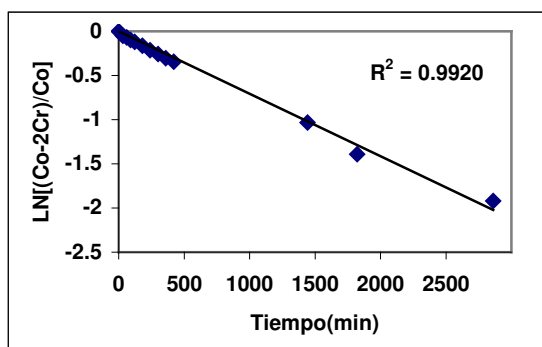
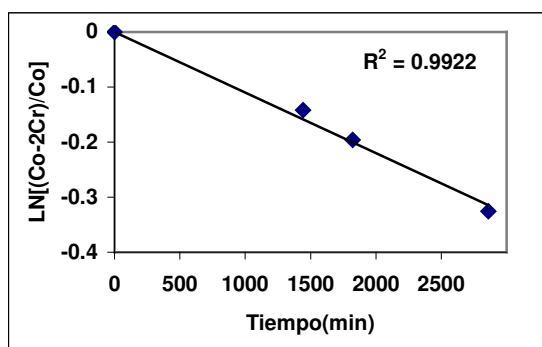
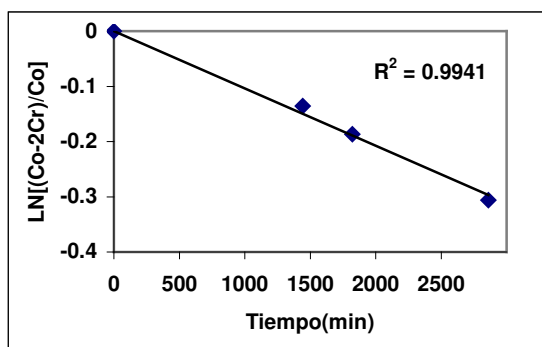


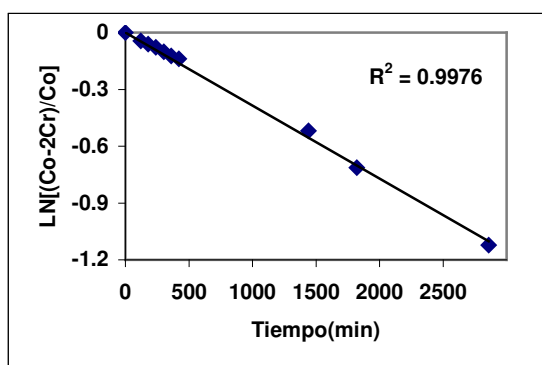
Figura 12.15. Cálculo de la permeabilidad para (S)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



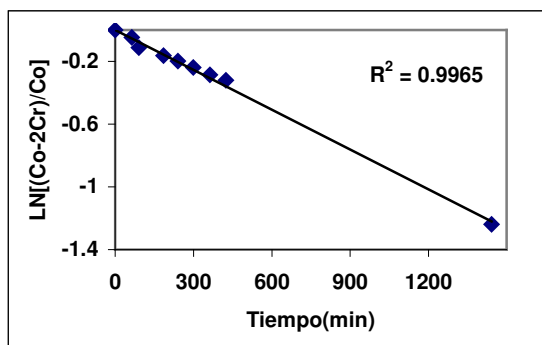
**Figura 12.16.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



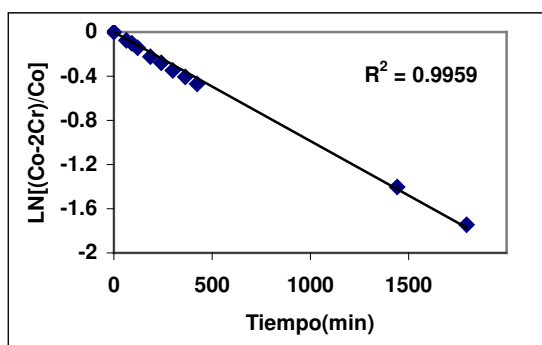
**Figura 12.17.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



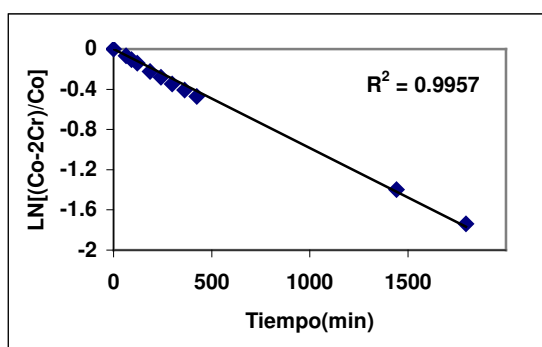
**Figura 12.18.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.19.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

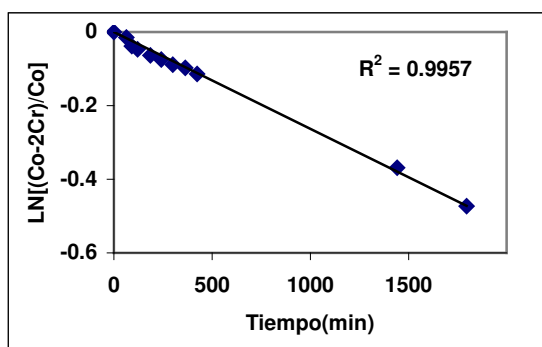


**Figura 12.20.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

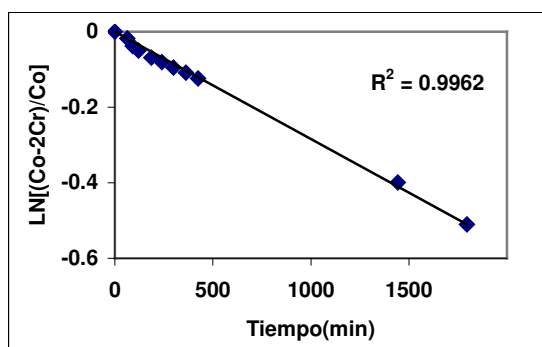


**Figura 12.21.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

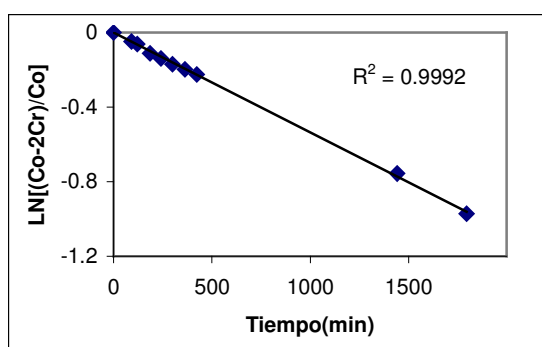




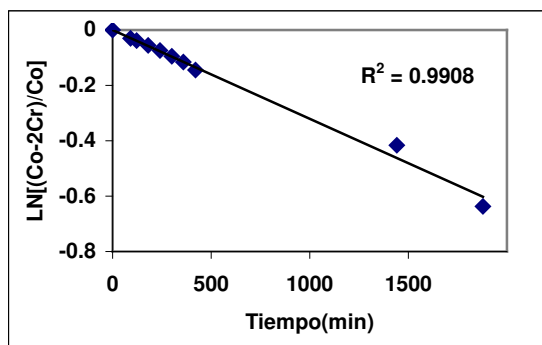
**Figura 12.22.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



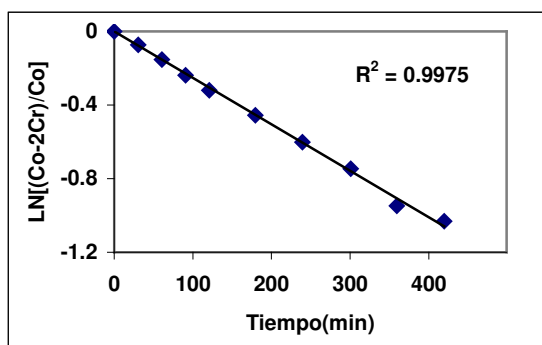
**Figura 12.23.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



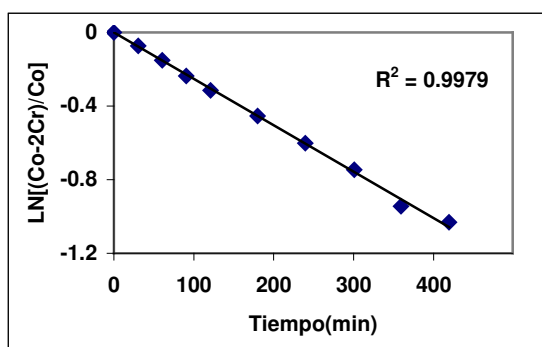
**Figura 12.24.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



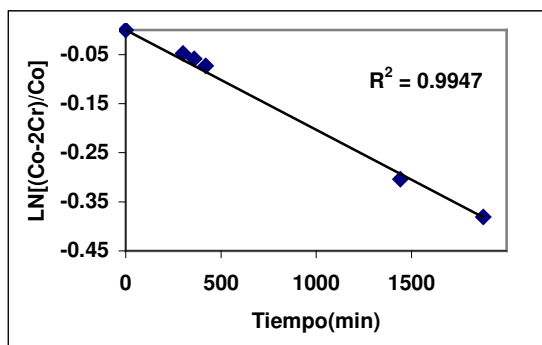
**Figura 12.25.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



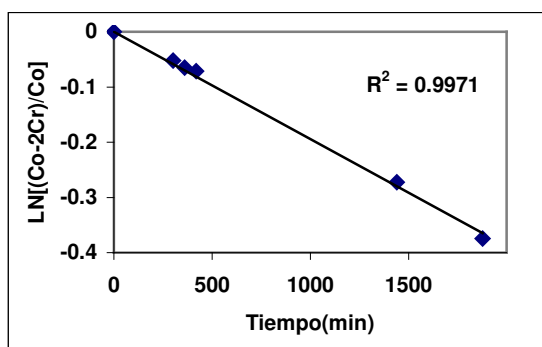
**Figura 12.26.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



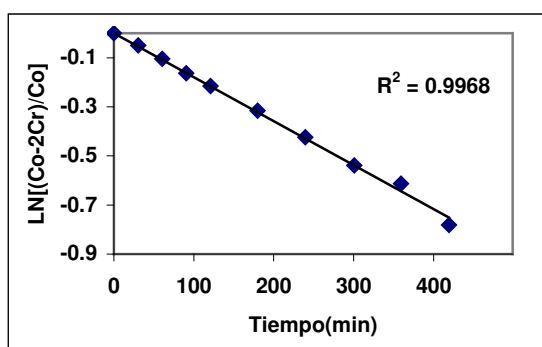
**Figura 12.27.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



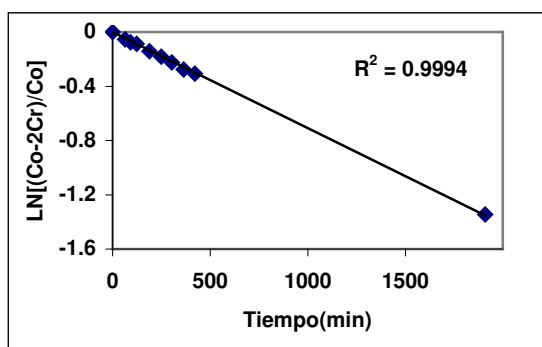
**Figura 12.28.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



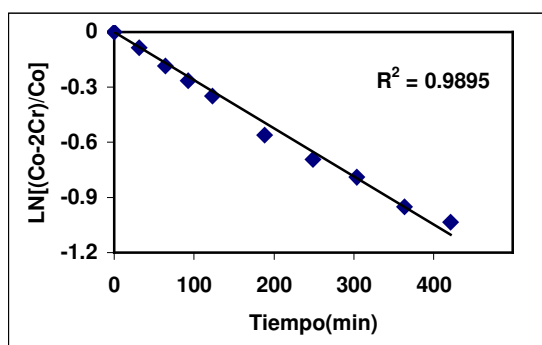
**Figura 12.29.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



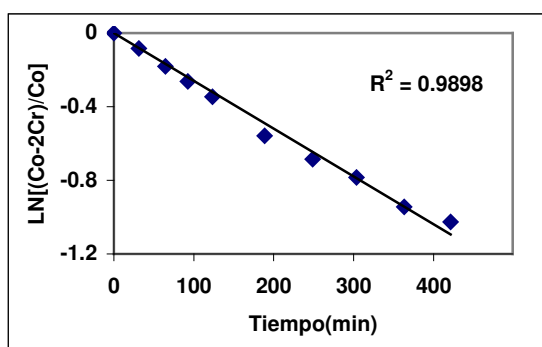
**Figura 12.30.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



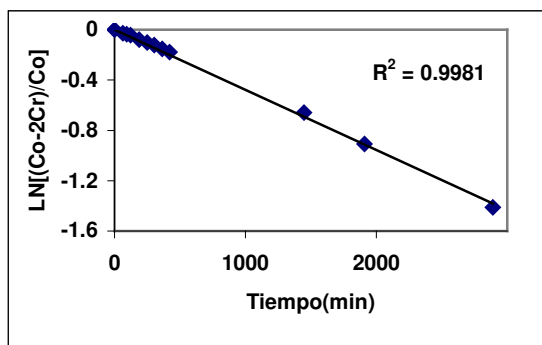
**Figura 12.31.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



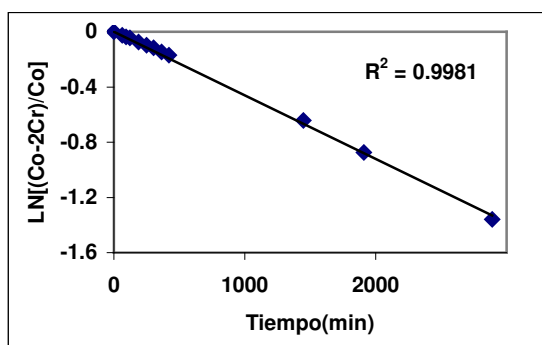
**Figura 12.32.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



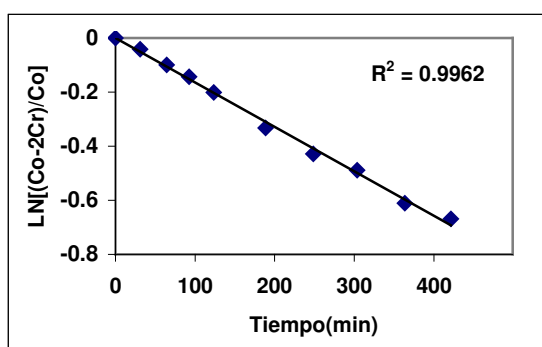
**Figura 12.33.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



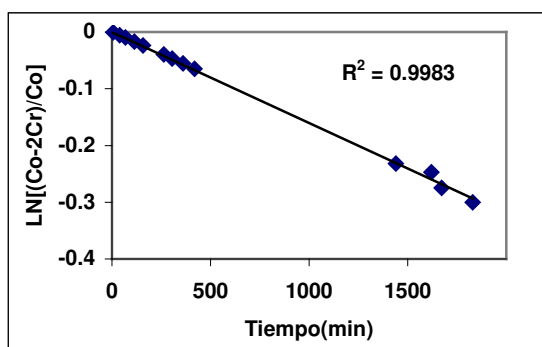
**Figura 12.34.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



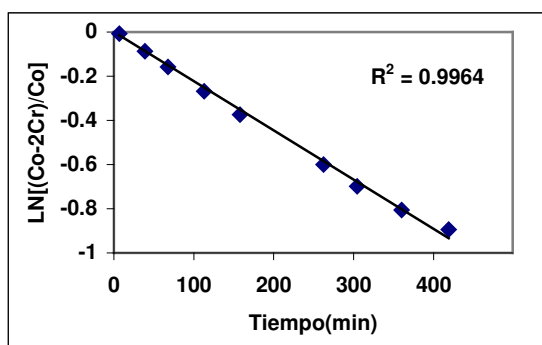
**Figura 12.35.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



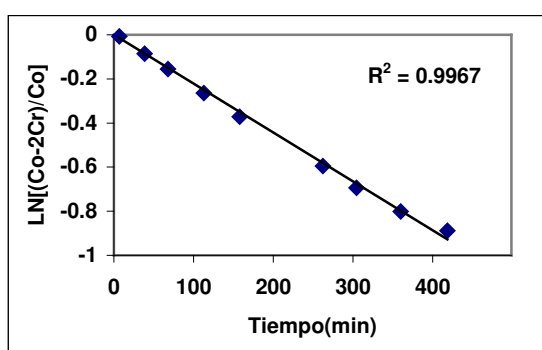
**Figura 12.36.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



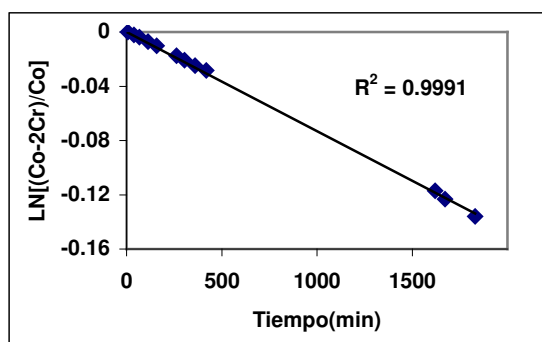
**Figura 12.37.** Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



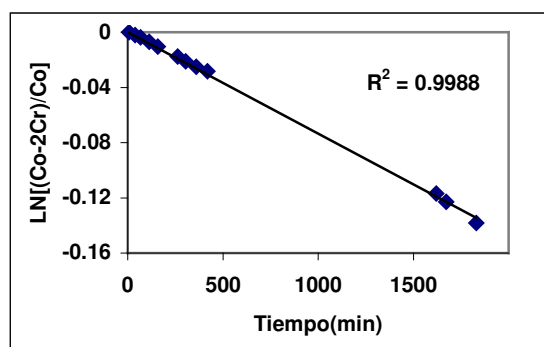
**Figura 12.38.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], para su resolución racémica con butirato de vinilo.



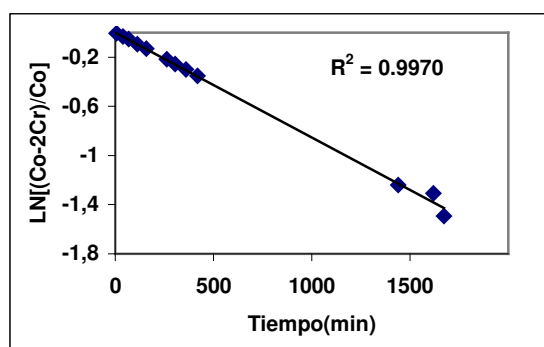
**Figura 12.39.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] para su resolución racémica con butirato de vinilo.



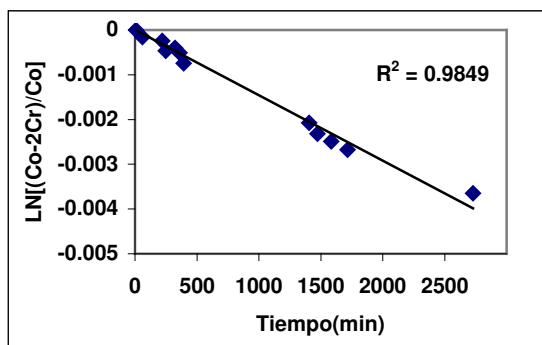
**Figura 12.40.** Cálculo de la permeabilidad para butirato de (R)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[bmim^+][BF_4^-]$ .



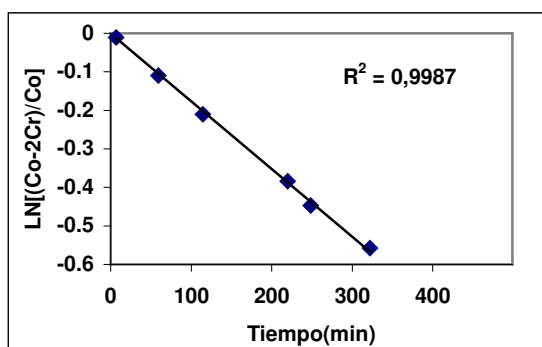
**Figura 12.41.** Cálculo de la permeabilidad para butirato de (S)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[bmim^+][BF_4^-]$ .



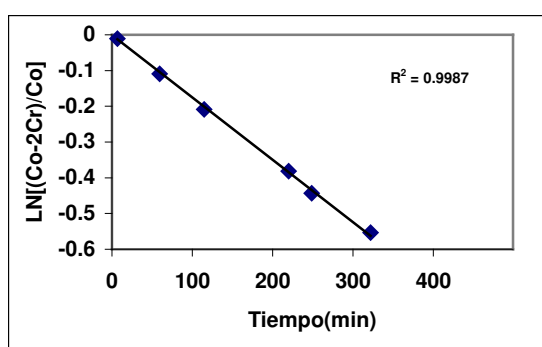
**Figura 12.42.** Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[bmim^+][BF_4^-]$ .



**Figura 12.43.** Cálculo de la permeabilidad para laurato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].

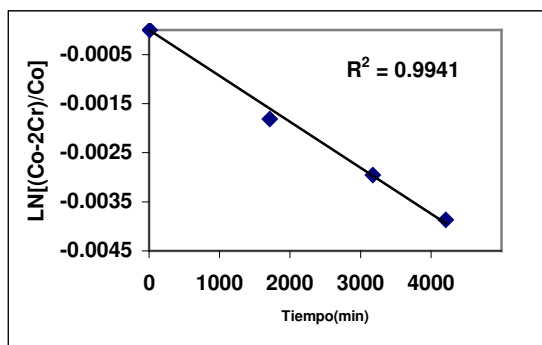


**Figura 12.44.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], para su resolución racémica con laurato de vinilo.

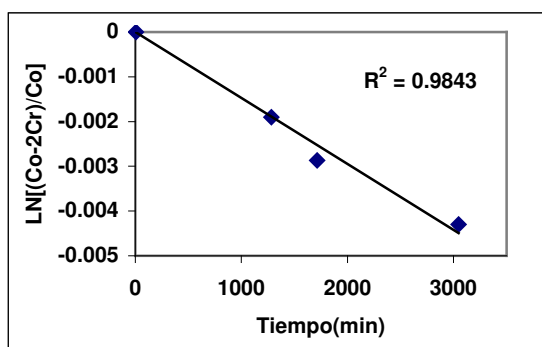


**Figura 12.45.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-1-feniletanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], para su resolución racémica con laurato de vinilo.





**Figura 12.46.** Cálculo de la permeabilidad para laurato de *rac*-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.47.** Cálculo de la permeabilidad para ácido láurico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].

## B) SISTEMA RAC-2-PENTANOL

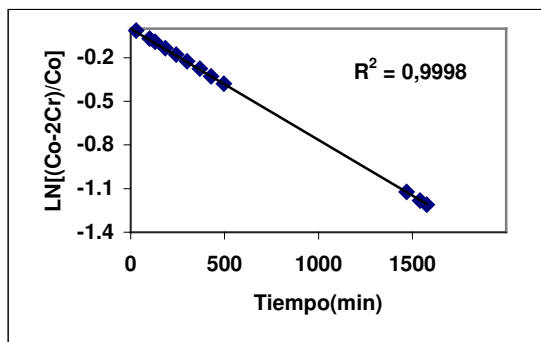


Figura 12.48. Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].

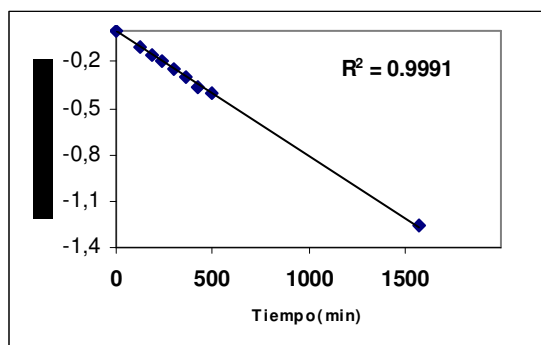


Figura 12.49. Cálculo de la permeabilidad para (R)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].

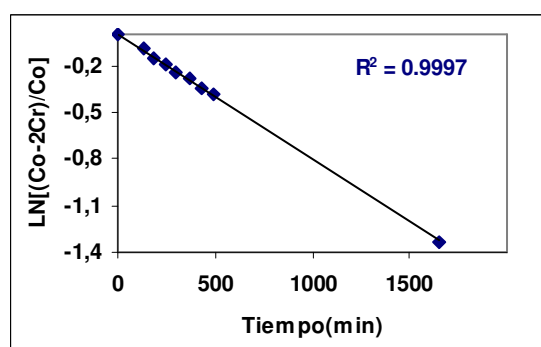
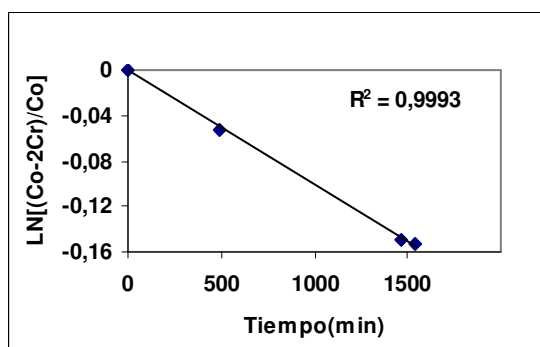
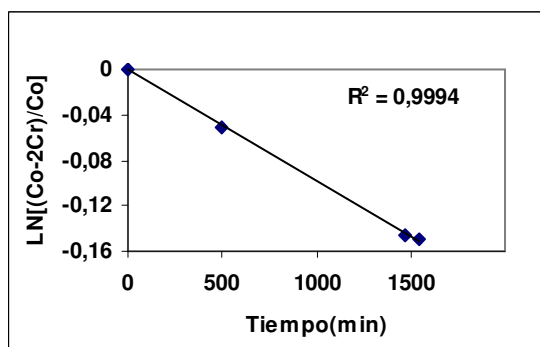


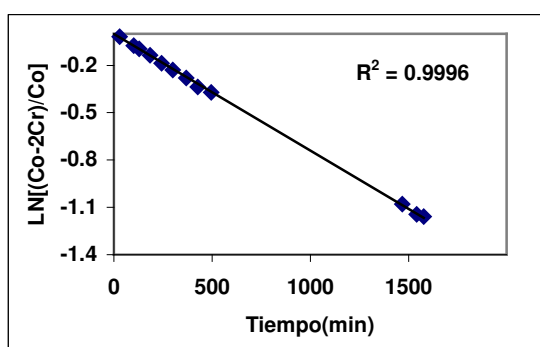
Figura 12.50. Cálculo de la permeabilidad para (S)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.51.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.52.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.53.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].

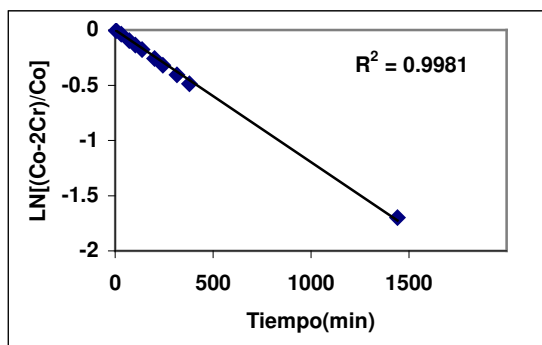


Figura 12.54. Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].

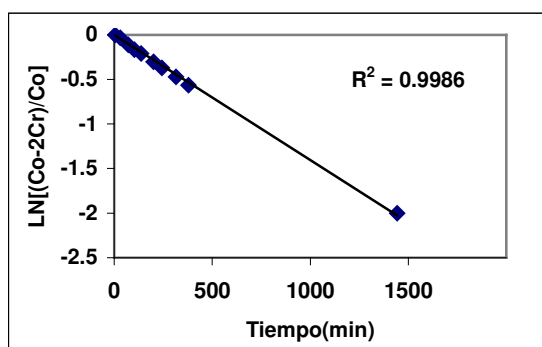


Figura 12.55. Cálculo de la permeabilidad para (R)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].

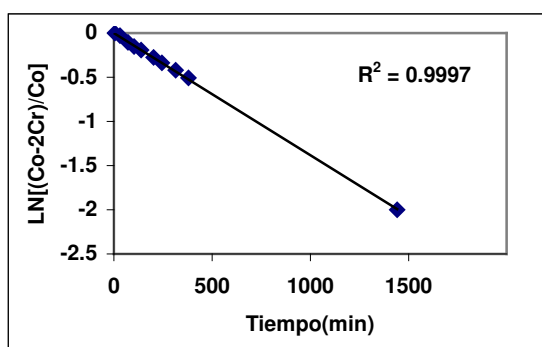
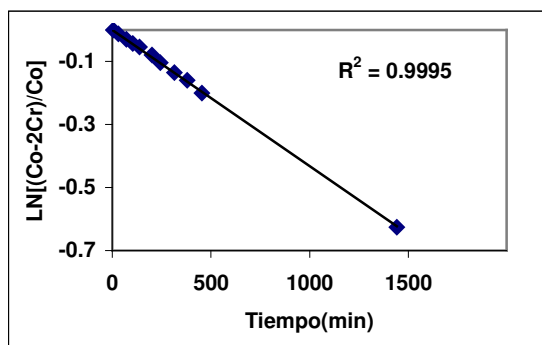
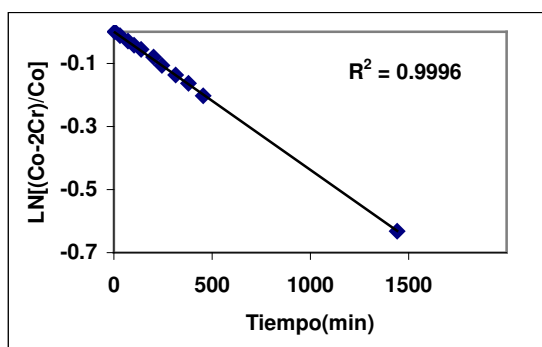


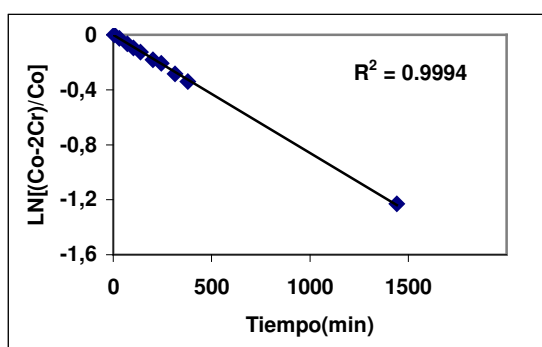
Figura 12.56. Cálculo de la permeabilidad para (S)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



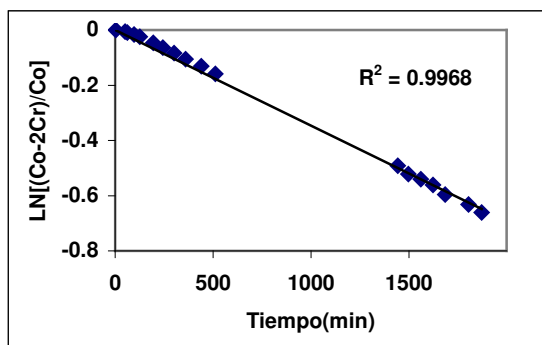
**Figura 12.57.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



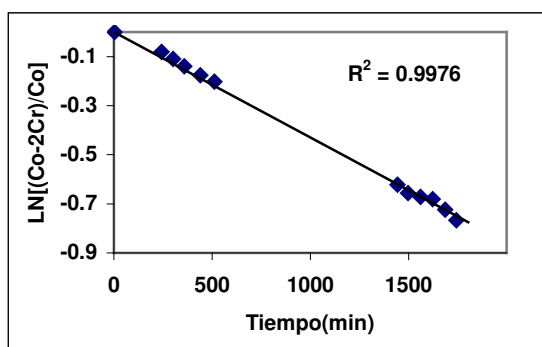
**Figura 12.58.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



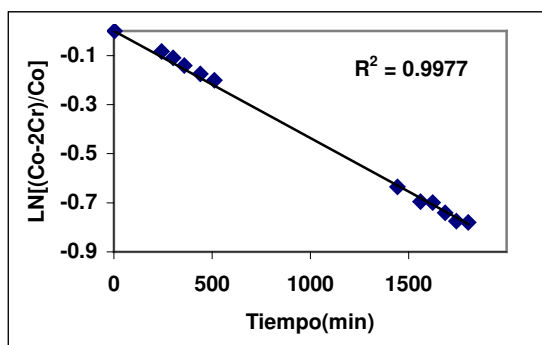
**Figura 12.59.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>].



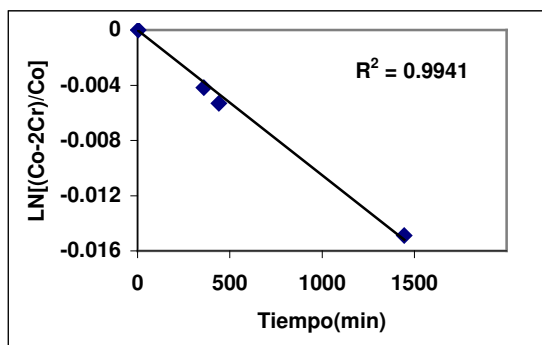
**Figura 12.60.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



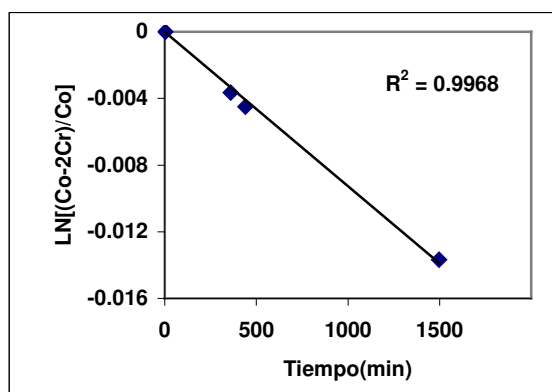
**Figura 12.61.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



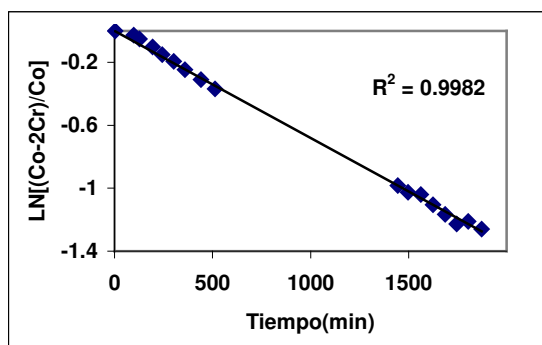
**Figura 12.62.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



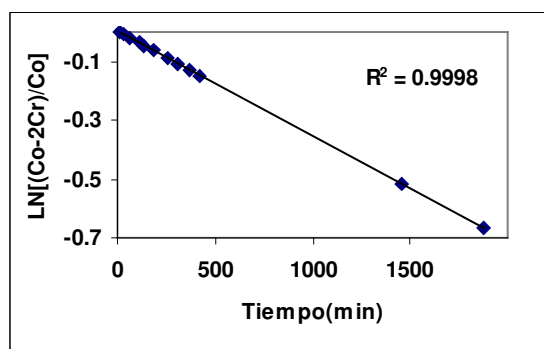
**Figura 12.63.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



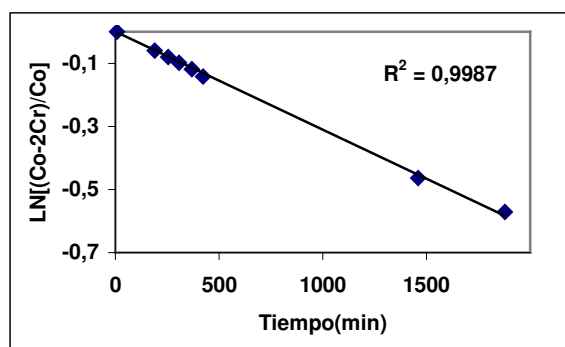
**Figura 12.64.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-1-feniletanilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



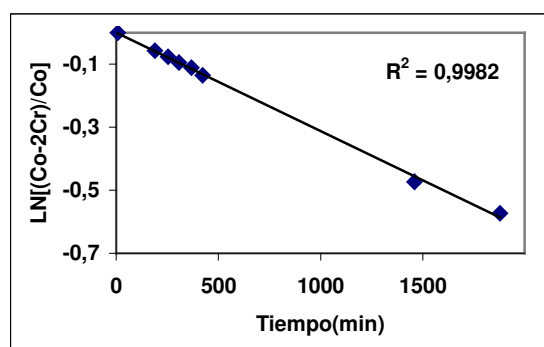
**Figura 12.65.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.66.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ .

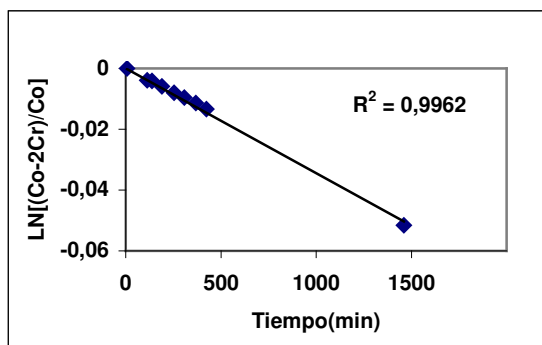


**Figura 12.67.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ .

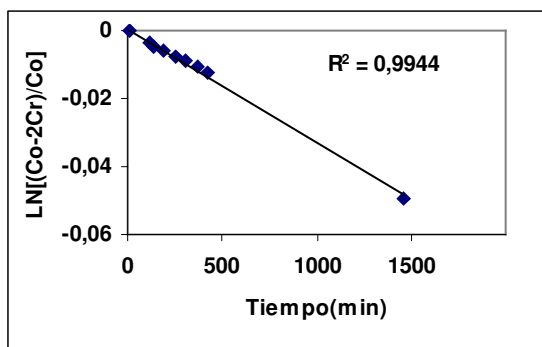


**Figura 12.68.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ .

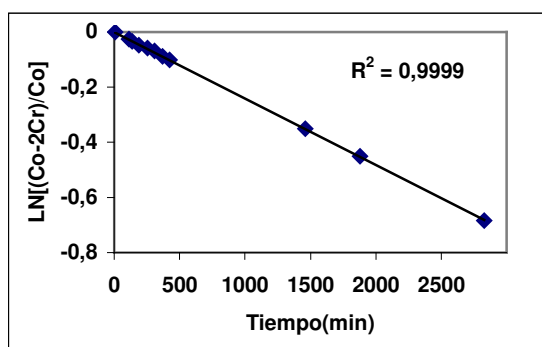




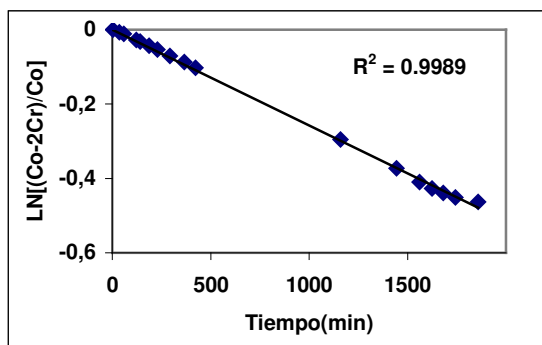
**Figura 12.69.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[omim^+][PF_6^-]$ .



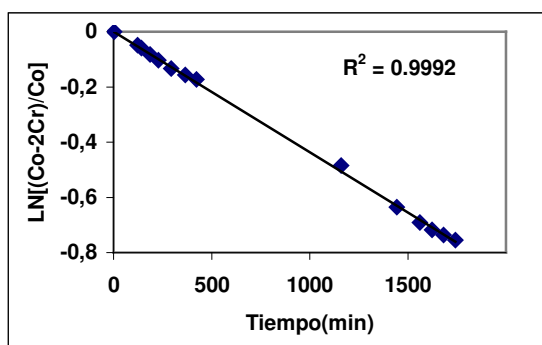
**Figura 12.70.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[omim^+][PF_6^-]$ .



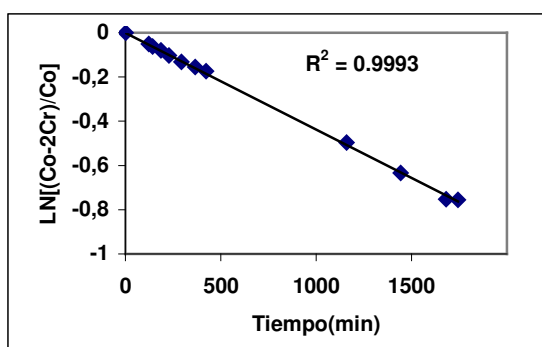
**Figura 12.71.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[omim^+][PF_6^-]$ .



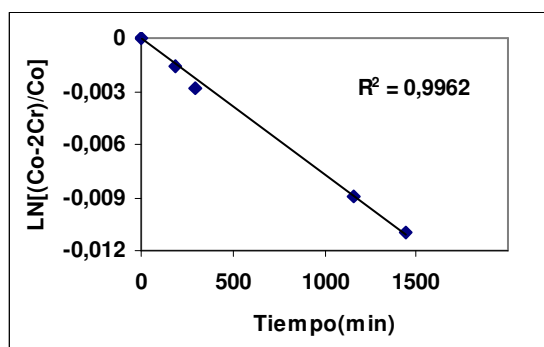
**Figura 12.72.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



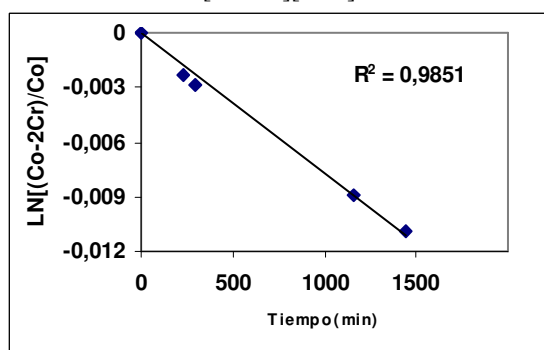
**Figura 12.73.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



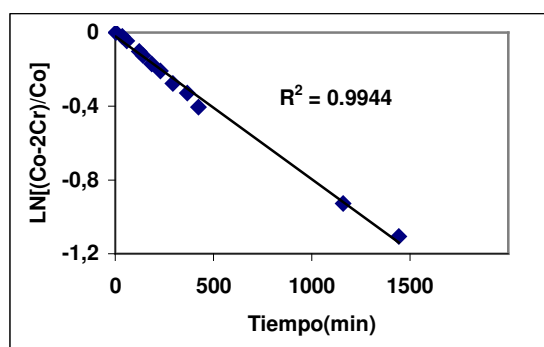
**Figura 12.74.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



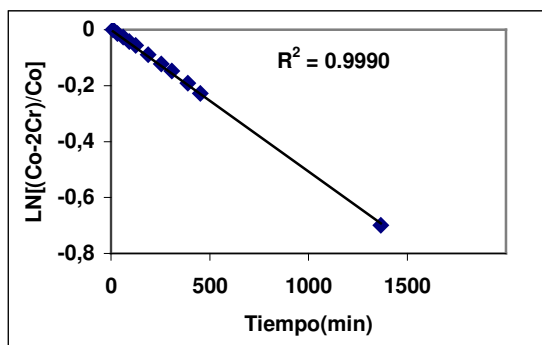
**Figura 12.75.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ .



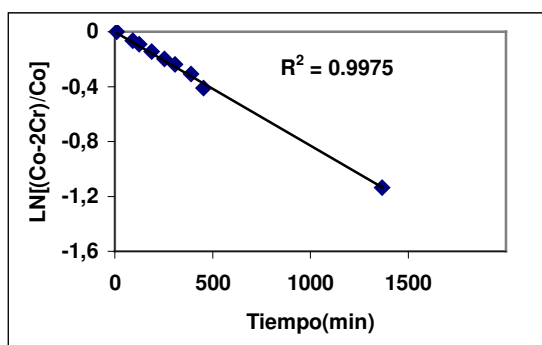
**Figura 12.76.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-1-feniletilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ .



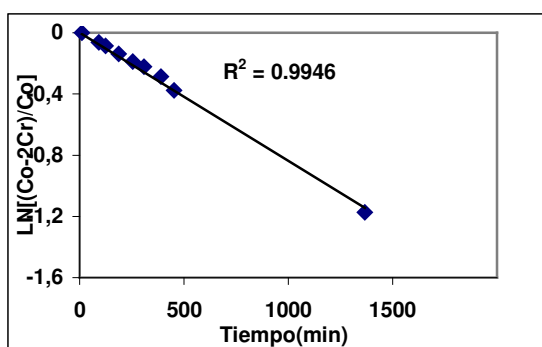
**Figura 12.77.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ .



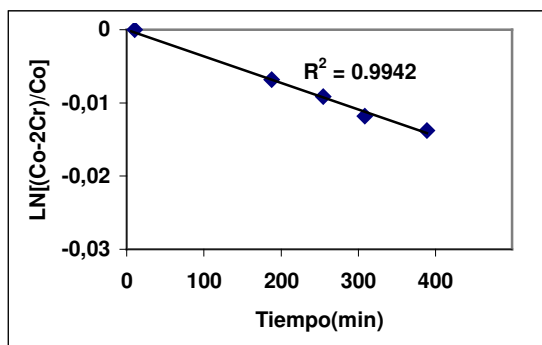
**Figura 12.78.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



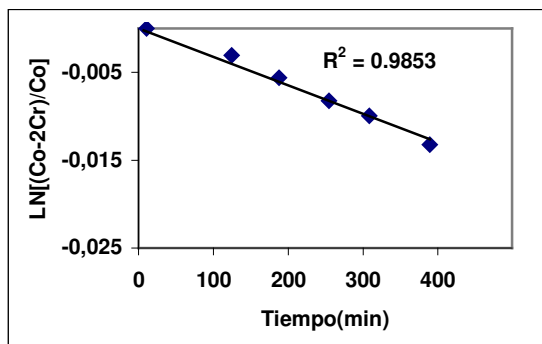
**Figura 12.79.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



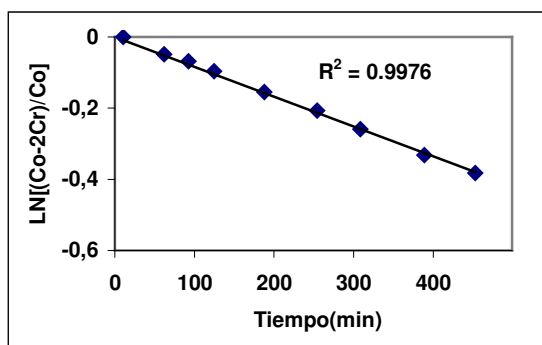
**Figura 12.80.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



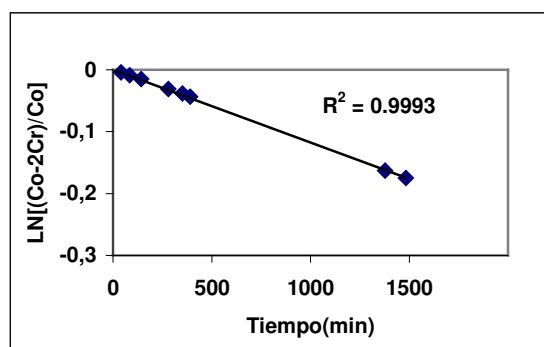
**Figura 12.81.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (R)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



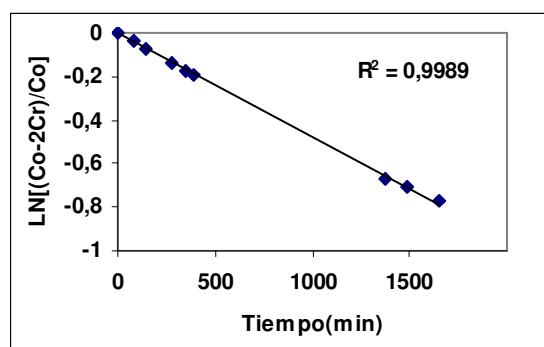
**Figura 12.82.** Cálculo de la permeabilidad para propionato de (S)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



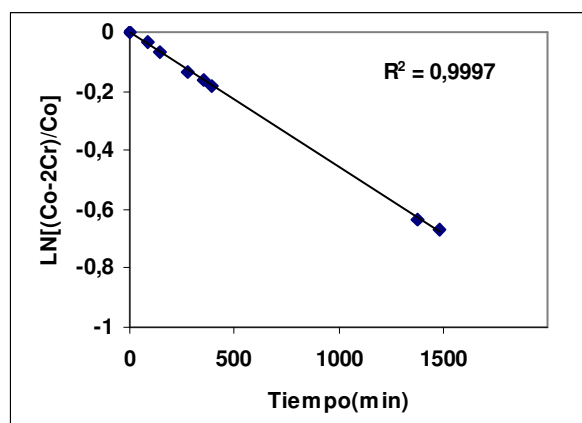
**Figura 12.83.** Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



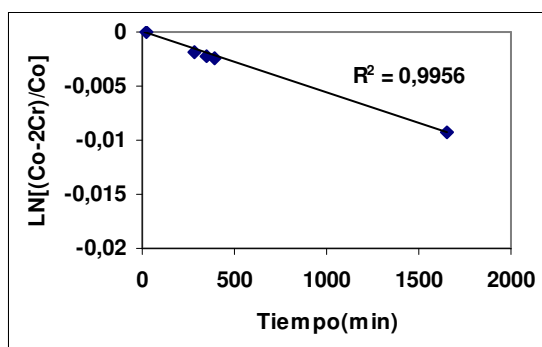
**Figura 12.84.** Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



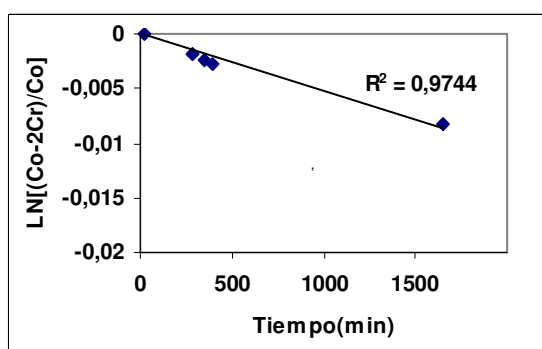
**Figura 12.85.** Cálculo de la permeabilidad para (R)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], para su resolución racémica con butirato de vinilo.



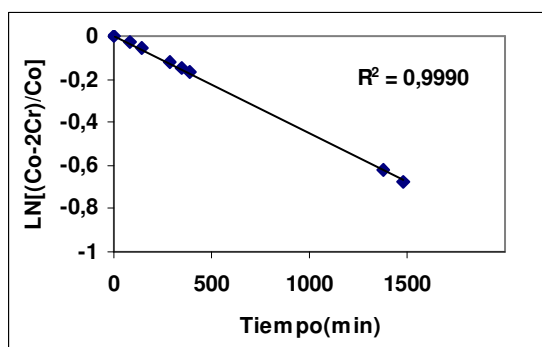
**Figura 12.86.** Cálculo de la permeabilidad para (S)-2-pentanol en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] para su resolución racémica con butirato de vinilo.



**Figura 12.87.** Cálculo de la permeabilidad para butirato de (R)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.88.** Cálculo de la permeabilidad para butirato de (S)-2-pentilo en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].



**Figura 12.89.** Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Nylon<sup>®</sup> con [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].

**ANEXO 4. PENDIENTES INICIALES DE LOS PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE ÉSTERES DE (R)-1-FENILETILO Y DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE RAC-1-FENILETANOL CATALIZADA POR LIPASA B DE CANDIDA ANTARCTICA EN N-HEXANO A 30 °C**

**Tabla 12.15.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración de ésteres de (R)-1-feniletilo y de ácidos carboxílicos en la resolución cinética de *rac*-1-feniletanol con distintos ésteres vinílicos catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* en n-hexano a 30 °C y a diferentes contenidos en agua.

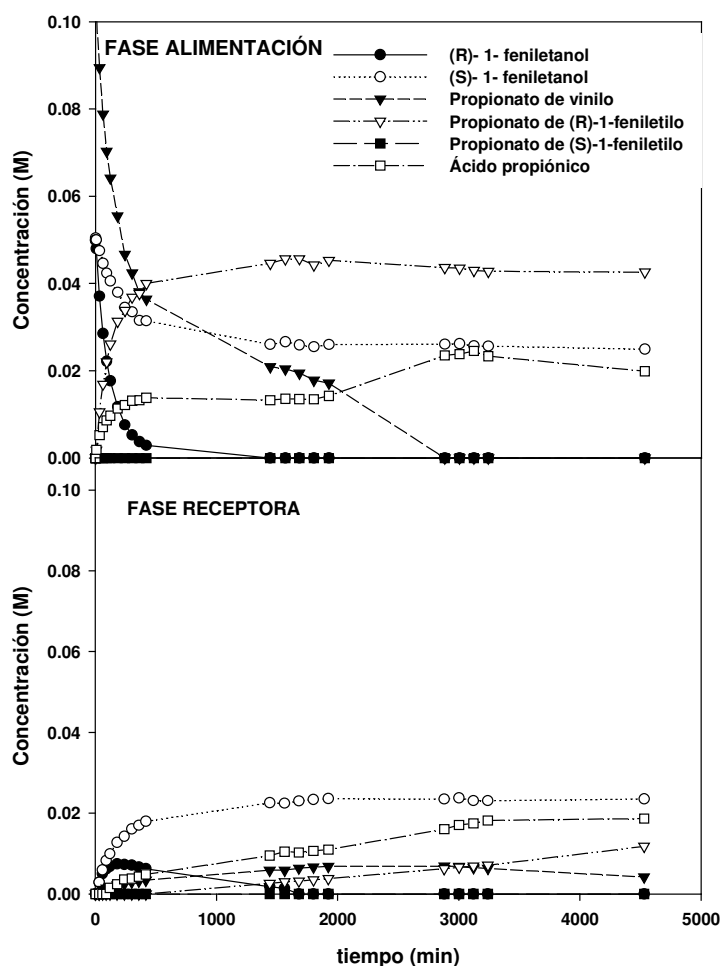
Éster vinílico	Contenido en agua (ppm)	$m_{\text{éster}}$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$m_{\text{ácido}}$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
Propionato de vinilo	5	1.034	0.010
Propionato de vinilo	50	1.610	0.140
Propionato de vinilo	101	1.974	0.550
Propionato de vinilo	186	1.615	0.510
Propionato de vinilo	350	1.333	1.091
Butirato de vinilo	20	1.428	0.177
Butirato de vinilo	75	1.920	0.358
Butirato de vinilo	110	2.021	0.444
Butirato de vinilo	146	1.901	0.487
Butirato de vinilo	379	1.505	1.572
Laurato de vinilo	33	1.423	0.001
Laurato de vinilo	62.8	1.628	0.021
Laurato de vinilo	105	1.782	0.155
Laurato de vinilo	170	1.543	0.272
Laurato de vinilo	360	1.197	0.645



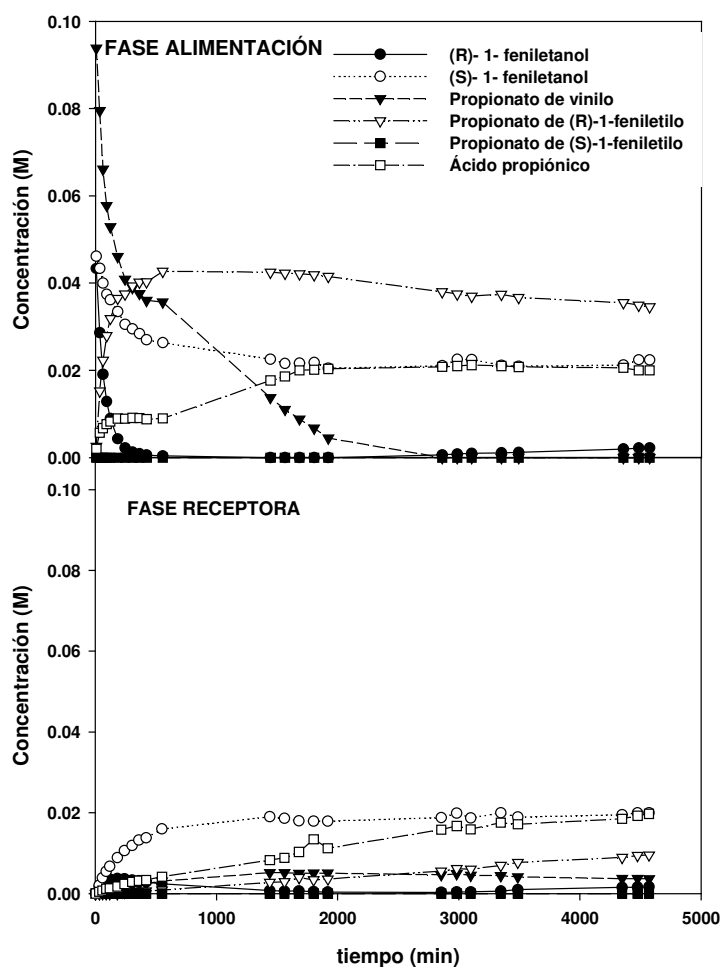


**ANEXO 5. PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE LOS SUSTRATOS Y PRODUCTOS IMPLICADOS EN LAS RESOLUCIÓN CINÉTICA DE *RAC*-1-FENILETANOL CATALIZADAS POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* EN EL PROCESO INTEGRADO DE REACCIÓN/SEPARACIÓN**

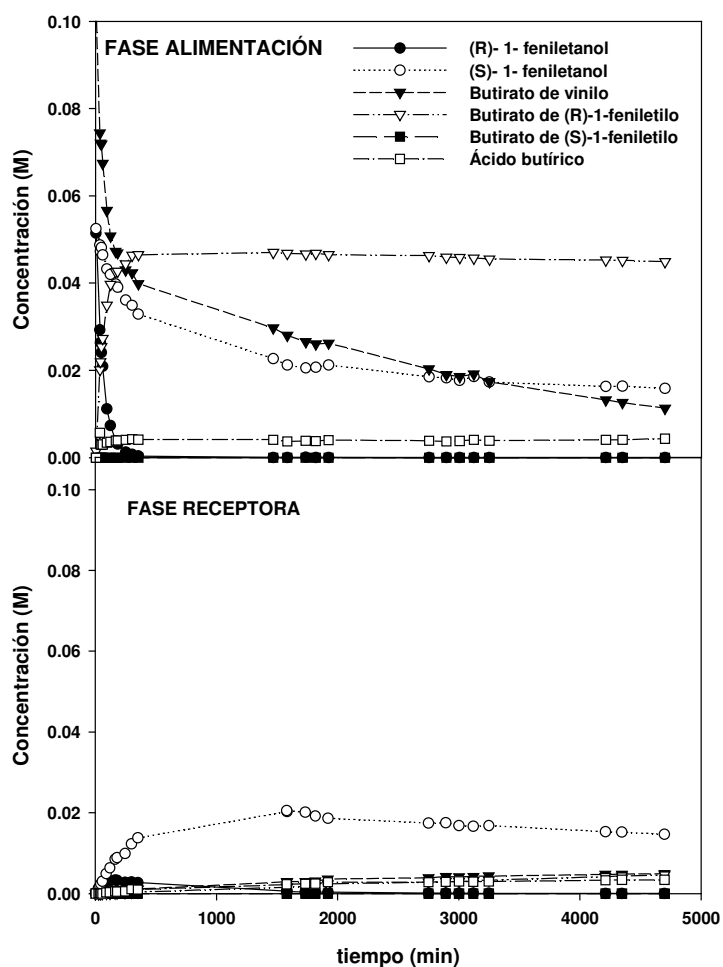
**Figura 12.90.** Evolución de la concentración con el tiempo de (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-1-feniletilo, propionato de (S)-1-feniletilo, y ácido propiónico en la fase alimentación y receptora para el proceso de reacción/separación usando la membrana de Nylon con  $[bmim^+][BF_4^-]$  soportado cuando se añadieron 40 mg de enzima en el compartimiento alimentación (condiciones: concentración inicial de los sustratos, 100 mM; temperatura, 30 °C; tiempo, 120 h.).



**Figura 12.91.** Evolución de la concentración con el tiempo de (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, propionato de vinilo, propionato de (R)-1-feniletilo, propionato de (S)-1-feniletilo, y ácido propiónico en la fase alimentación y receptora para el proceso de reacción/separación usando la membrana de Nylon con  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$  soportado cuando se añadieron 80 mg de enzima en el compartimiento alimentación (condiciones: concentración inicial de los sustratos, 100 mM; temperatura, 30 °C; tiempo, 120 h.).



**Figura 12.92.** Evolución de la concentración con el tiempo de (R)-1-feniletanol, (S)-1-feniletanol, butirato de vinilo, butirato de (R)-1-feniletilo, butirato de (S)-1-feniletilo, y ácido butírico en la fase alimentación y receptora para el proceso de reacción/separación usando la membrana de Nylon con  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$  soportado cuando se añadieron 80 mg de enzima en el compartimiento alimentación (condiciones: concentración inicial de los sustratos, 100 mM; temperatura, 30 °C; tiempo, 120 h.).





**ANEXO 6. PENDIENTES INICIALES DE LOS PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE ÉSTERES DE (R)-2-PENTILO Y DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DE RAC-2-PENTANOL CATALIZADA POR LIPASA B DE CANDIDA ANTARCTICA EN N-HEXANO A 30 °C**

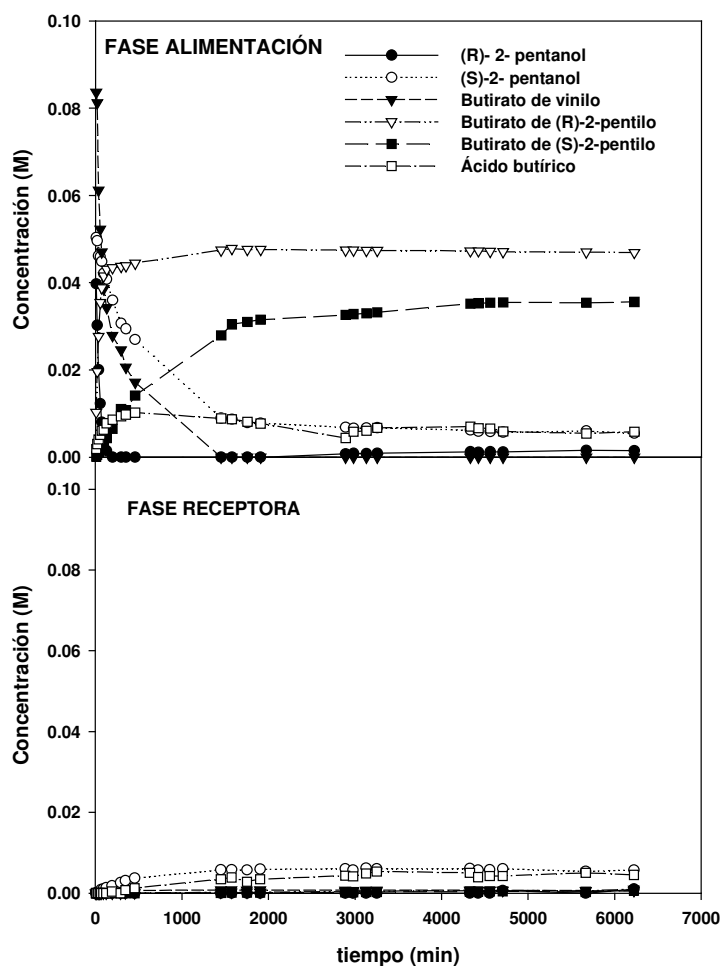
**Tabla 12.16.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentración de ésteres de (R)-2-pentilo y de ácidos carboxílicos en la resolución cinética de *rac*-2-pentanol con distintos ésteres vinílicos catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* en n-hexano a 30 °C y a diferentes contenidos en agua.

Éster vinílico	Contenido en agua (ppm)	$m_{\text{éster}}$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$m_{\text{ácido}}$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
Propionato de vinilo	20	2.454	0
Propionato de vinilo	107	3.242	0.160
Propionato de vinilo	163	2.715	0.370
Propionato de vinilo	234	1.950	0.250
Butirato de vinilo	13	2.258	0
Butirato de vinilo	78	3.108	0.328
Butirato de vinilo	204	2.603	0.611
Butirato de vinilo	381	2.508	1.119



**ANEXO 7. PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE LOS SUSTRATOS Y PRODUCTOS IMPLICADOS EN LAS RESOLUCIÓN CINÉTICA DE *RAC*-2-PENTANOL CATALIZADAS POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* EN EL PROCESO INTEGRADO DE REACCIÓN/SEPARACIÓN**

**Figura 12.93.** Evolución con el tiempo de las concentraciones de (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, butirato de vinilo, butirato de (S)-pentilo, butirato de (R)-2-pentilo y ácido butírico en la fase alimentación y receptora para el proceso de reacción/separación usando la membrana de Nylon con  $[bmim^+][BF_4^-]$  soportado. (condiciones: concentración inicial de los sustratos, 100 mM; cantidad de enzima, 80 mg; temperatura, 30 °C; tiempo, 120 h.).







**ANEXO 8. PENDIENTES INICIALES DE LOS PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE PROPIONATO DE BUTILO Y ÁCIDO PROPIÓNICO EN LA SÍNTESIS DE PROPIONATO DE BUTILO CATALIZADA POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* EN DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A 80 BAR Y 50 °C**

**Tabla 12.17.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones propionato de butilo y ácido propiónico en la síntesis de propionato de butilo en dióxido de carbono supercrítico a 80 bar y 50 °C obtenidas a partir del balance de materia referido a propionato de vinilo.

$C_{PV}$ (mM)	$C_{BuOH}$ (mM)	$m_{éster}^*$ (% $C_{PB}$ · min <sup>-1</sup> )	$m_{ácido}^*$ (% $C_{AP}$ · min <sup>-1</sup> )
100	100	0.1991	0.0094
125	125	0.1670	0.0062
150	75	0.2245	0.0161
150	100	0.2011	0.0099
150	150	0.1575	0.0001
150	200	0.1300	0.0001
200	200	0.1266	0.0010

\*Concentración expresada en % de concentración respecto a la concentración inicial de propionato de vinilo.



**ANEXO 9. PENDIENTES INICIALES DE LOS PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE PROPIONATO DE BUTILO Y ÁCIDO PROPIÓNICO EN LA SÍNTESIS DE PROPIONATO DE BUTILO CATALIZADA POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* EN LÍQUIDOS IÓNICOS A 50 °C**

**Tabla 12.18.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones propionato de butilo y ácido propiónico en la síntesis de propionato de butilo en líquidos iónicos a 50 °C.

Medio	$m_{\text{éster}}$ (mmol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	$m_{\text{ácido}}$ (mol · L <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	1.806	0.282
[bdmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	2.256	0.378
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	4.962	2.136
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	2.452	0.509
n-hexano	1.758	0.394



**ANEXO 10. PENDIENTES INICIALES DE LOS PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE PROPIONATO DE BUTILO Y ÁCIDO PROPIÓNICO EN LA SÍNTESIS DE PROPIONATO DE BUTILO CATALIZADA POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* EN SISTEMAS BIFÁSICOS LÍQUIDO IÓNICO/DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A 80 BAR Y 50 °C**

**Tabla 12.19.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones propionato de butilo y ácido propiónico en la síntesis de propionato de butilo en sistemas bifásicos líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico a 80 bar y 50 °C obtenidas a partir del balance de materia referido a propionato de vinilo.

Medio	$m_{\text{éster}}^*$ (%C <sub>PB</sub> · min <sup>-1</sup> )	$m_{\text{ácido}}^*$ (%C <sub>AP</sub> · min <sup>-1</sup> )
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]/ scCO <sub>2</sub>	0.02247	0.00007
[bdmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]/ scCO <sub>2</sub>	0.00562	0.00002
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]/ scCO <sub>2</sub>	0.05992	0.00030
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]/ scCO <sub>2</sub>	0.04174	0.00008

\* Concentración expresada en % respecto a la concentración inicial de propionato de vinilo.



**ANEXO 11. PENDIENTES INICIALES DE LOS PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE PROPIONATO DE BUTILO Y ÁCIDO PROPIÓNICO EN LA SÍNTESIS DE PROPIONATO DE BUTILO CATALIZADA POR LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* EN SISTEMAS BIFÁSICOS LÍQUIDO IÓNICO/HEXANO A 50 °C**

**Tabla 12.20.** Pendientes iniciales de los perfiles de concentraciones de propionato de butilo y ácido propiónico en la síntesis de propionato de butilo en sistemas bifásicos líquido iónico/hexano a 50 °C.

Medio	$m_{\text{éster}}$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$m_{\text{ácido}}$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]/hexano	1.015	0.109
[bdmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]/hexano	0.786	0.074
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]/hexano	1.610	0.138
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]/hexano	1.327	0.040





# 13

**Resumen en inglés de la Tesis Doctoral**





**UNIVERSITY OF MURCIA**

**FACULTY OF CHEMISTRY**  
**DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING**

*Development of new biotechnology  
processes based on the use of  
ionic liquids, supercritical fluids and  
membrane technology*

**FRANCISCO JOSÉ HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**

**MURCIA 2008**



## **SUMMARY**

Green chemistry is a chemical philosophy encouraging “*the design, development and implementation of chemical processes and products to reduce or eliminate substances hazardous to human health and the environment*” as published by Anastas and Warner in *Green Chemistry Theory and Practice* in 1998 . This definition has been expanded into the “12 Principles of Green Chemistry” which set forth standards against which new products and processes should be measured. The principles cover such concepts as:

4. the design of processes to maximize the amount of raw material that ends up in the product;
5. the use of safe, environment-benign substances, including solvents, whenever possible;
6. the design of energy-efficient processes; the best form of waste disposal is not to create it in the first place.

The motivation behind such programmes is to alleviate some of the problems facing our society, in this case pollution, toxic waste, bioaccumulation, and a reliance on non-renewable resources. Furthermore, the chemical industry is under considerable pressure to drastically reduce the huge amounts of chemical wastes produced and the energy it consumes. It is up to scientists and engineers to increase the resource-efficiency of chemical processes, minimize solvent losses and to integrate, whenever possible, several unit operations into one process (process intensification) in such a way that it has minimal impact on the environment, and to make it sustainable enough not to rely on limited resources. One research area of great interest is the replacement of the traditional volatile organic compounds used in reaction and separation processes for new alternative solvents, such as ionic liquids and supercritical fluids.

Ionic liquids, which are salts with melting points close to room temperature, are emerging as potentially green solvents for chemical processes because they combine good and tunable solubility properties with negligible vapor pressures and high thermal and (electro-) chemical stabilities. They can be used as reaction media, where they enhance reaction rates and selectivities. Moreover, the combination of ionic liquids and supercritical carbon dioxide is advantageous because products can be separated from ionic liquids by extraction with supercritical carbon dioxide without detectable ionic liquid contamination due to the negligible solubility of ionic liquids in carbon dioxide. Ionic liquids can also be used as separation media in supported liquid membranes with the aim of separating the final product, which is often the most expensive and wasteful step in chemical processes.

The main objective of this thesis is to develop new bioprocesses based on ionic liquids, carbon dioxide and membrane technology as combined reaction and separation media in order to improve the efficiency of the processes and minimize waste generation and energy consumption.

A wide range of ionic liquids (ILs) based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cation in combination with hexafluorophosphate and bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide anions were tested as reaction media for lipase catalyzed transesterification in low water conditions (**Chapter 1**). With the aim of improving the activity and/or selectivity of the lipase, various treatments were applied to ionic liquid media such as equilibration with aqueous solutions of salts, NaHCO<sub>3</sub> or Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, or the addition of triethylamine. All treatments were found to enhance the synthetic activity of the enzyme, *Candida antarctica* Lipase B (CaLB), the best results being achieved with the addition of triethylamine.

Since water-miscible ionic liquids have been shown to denature the free enzyme, the immobilisation of CaLB as a crosslinked enzyme aggregate (CLEA), was carried out with the aim of rendering enzymes tolerant to these denaturing ionic liquids (**Chapter 2**). This immobilized biocatalyst mediated the acylation of 1-phenylethanol and 1-phenylethylamine with high enantioselectivity in water-miscible ionic liquids, such as [bmim<sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] and [bmim][dca].

The suitability of using ionic liquids as reaction media was also tested with another enzyme, Penicillin G acylase (PGA; EC 3.5.1.11), which is the key enzyme used in the industrial production of  $\beta$ -lactam penicillin antibiotics (**Chapter 3**). Different ionic liquids based on dialkylimidazolium cations associated with perfluorinated and bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide anions, were used to investigate the scope and limitations of these new solvents as media for penicillin G acylase-catalyzed reactions. It was shown that native penicillin G acylase exhibited higher stability in the assayed ILs than in common organic solvents.

Often the most expensive and wasteful step in a given process is the separation of the final product. The most commonly used methods are crystallization, fractional distillation and solvent extraction. Most of these methods are technically demanding, involve considerable energy cost and/or result in large amounts of waste solvents. Membrane-based separation processes have been recognized as a promising alternative since they do not require high energy consumption for their operation and because they can be conducted under moderate operating conditions and with sequential operation. Among membrane-based separation processes, the use of supported liquid membranes (SLMs), porous supports whose pores are filled with a liquid, has numerous advantages such as the minimal amount of solvent needed and the fact that the processes of extraction and stripping are combined into one single stage. Nevertheless, their industrial application is still limited, mainly due to concerns about SLM stability and

long-term performance. One promising alternative is to use ionic liquids as supported liquid phase. Due to their non-measurable vapour pressure, combined with the greater capillary force associated with their relatively high viscosity, which could reduce displacement of the liquids from the micron pores under pressure, and the possibility of minimizing their solubility in the surrounding phases by adequate selection of the cation and anion, it is possible to obtain very stable and environmentally friendly supported liquid membranes using ionic liquids as supported liquid phase. In **Chapter 4**, a membrane bioreactor containing a supported liquid membrane based on ionic liquids was successfully applied to the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol which is used as chiral building block and synthetic intermediate in fine-chemical and pharmaceutical, catalyzed by a commercial immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). This system integrated the enantioselective catalytic action of the enzyme and the selective permeability of the compounds through the SLM. Variables affecting the performance of the above bioreactor were investigated in order to optimize the integrated reaction/separation process. After 24 h of operation, the (*S*)-1-phenylethanol was separated from the (*R*)-1-phenylethanol with a very high purity. This new technology was also applied to the resolution of *rac*-2-pentanol (**Chapter 5**). The *S*-2-pentanol is a chiral intermediate in the synthesis of several potential anti-Alzheimer's drugs that inhibit  $\beta$ -amyloid peptide release and/or its synthesis. The kinetic resolution of *rac*-2-pentanol by transesterification with vinyl esters catalyzed by a commercial immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozyme) was also successfully carried out in the membrane bioreactor with supported liquid membrane based on ionic liquids. In conclusion, new methodologies for the practical production of enantiomerically pure or enriched compounds have been developed.

The exciting potential of IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems to carry out synthetic biocatalytic green processes in anhydrous conditions has been demonstrated. While ILs provide an adequate microenvironment for the enzyme, the use of supercritical carbon dioxide as a second phase in biphasic systems facilitates recovery of the products without any cross-contamination of the extract with the ILs. The use of supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) as a second phase is especially advantageous because it is cheap, non-toxic, non-inflammable, has a near ambient critical temperature (31.3 °C) and a moderate critical pressure (72.9 bar). In the **Chapter 6**, a synthetic biocatalytic process combining scCO<sub>2</sub>, ILs and membrane technology was investigated. In the IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems, the immobilized enzyme (free *Candida antarctica* lipase B) showed an increase in the selectivity of the process compared with supercritical carbon dioxide assayed in the absence of IL. Further studies were conducted in order to understand the behaviour of the enzyme and the mass-transfer phenomena in IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems. These studies showed that the efficiency of the IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems were dependent on both the specificity of the enzyme–IL interactions and the mass-transfer phenomena between IL and scCO<sub>2</sub> immiscible phases.



Finally, in *Chapter 7* final conclusions and an outlook on the future potential of ionic liquids, supercritical carbon dioxide and supported liquid membrane technology are presented.

---

## TABLE OF CONTENTS

<b>1. ENHANCEMENT OF ACTIVITY AND SELECTIVITY IN LIPASE-CATALYZED TRANSESTERIFICATION IN IONIC LIQUIDS BY THE USE OF ADDITIVES .....</b>	<b>1</b>
1.1. Introduction.....	3
1.2. Materials and Methods.....	4
1.3. Results and Discussion.....	6
1.4. Conclusions.....	12
1.5. References.....	13
<b>2. A CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATE OF <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> LIPASE B IS ACTIVE IN DENATURING IONIC LIQUIDS.....</b>	<b>15</b>
2.1. Introduction.....	17
2.2. Materials and Methods.....	17
2.3. Results and Discussion.....	20
2.4. Conclusions.....	22
2.5. References.....	23
<b>3. STABILIZATION OF NATIVE PENICILLIN G ACYLASE BY IONIC LIQUIDS.....</b>	<b>25</b>
3.1. Introduction.....	27
3.2. Materials and Methods.....	28
3.3. Results and Discussion.....	30
3.4. Conclusions.....	36
3.5. Nomenclature.....	36
3.6. References.....	37

---

<b>4. INTEGRATED REACTION/SEPARATION PROCESSES FOR THE KINETIC RESOLUTION OF <i>RAC</i>-1-PHENYLETHANOL USING SUPPORTED LIQUID MEMBRANES BASED ON IONIC LIQUIDS.....</b>	<b>41</b>
4.1. Introduction.....	43
4.2. Materials and Methods.....	44
4.3. Results and Discussion.....	49
4.4. Conclusions.....	62
4.5. Nomenclature.....	62
4.6. References.....	63
<b>5. ON THE DEVELOPMENT OF A NEW INTEGRATED MEMBRANE PROCESS WITH IONIC LIQUIDS FOR THE KINETIC RESOLUTION OF <i>RAC</i>-2-PENTANOL.....</b>	<b>65</b>
5.1. Introduction.....	67
5.2. Materials and Methods.....	68
5.3. Results and Discussion.....	73
5.4. Conclusions.....	85
5.5. Nomenclature.....	86
5.6. References.....	87
<b>6. A NEW RECIRCULATING ENZYMATIC MEMBRANE REACTOR FOR ESTER SYNTHESIS IN IONIC LIQUID/SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE BIPHASIC SYSTEMS.....</b>	<b>89</b>
6.1. Introduction.....	91
6.2. Materials and Methods.....	92
6.3. Results and Discussion.....	96
6.4. Conclusions.....	106
6.5. Nomenclature.....	107
6.6. References.....	108

<b>7. CONCLUSIONS AND OUTLOOK.....</b>	<b>111</b>
7.1. Conclusions.....	113
7.2. Outlook.....	115



# 1

## **Enhancement of activity and selectivity in lipase-catalyzed transesterification in ionic liquids by the use of additives**

### **BACKGROUND:**

Seven ionic liquids (ILs) based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cation in combination with hexafluorophosphate and bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide anions were tested as reaction media for lipase-catalyzed transesterification in low water conditions. With the aim to improve the activity and/or selectivity of the lipase, various treatments were applied to ionic liquid media such as equilibration with aqueous solutions of salts,  $\text{NaHCO}_3$  or  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , or the addition of a catalytic amount of a non-reactive organic base to the reaction mixture, triethylamine.

### **RESULTS:**

The treated ionic liquids showed to be excellent media for lipase-catalyzed ester synthesis by transesterification compared with conventional organic solvents, such as n-hexane. All the treatments were found to enhance the synthetic activity of the enzyme, the best results being achieved with the addition of triethylamine. The addition of a catalytic amount of this base to the ILs resulted in a significant increase in both the synthetic activity and selectivity values. For instance, the synthetic activity in  $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$  was enhanced more than 12 times and the selectivity increased from 86% to 95% when triethylamine was used.

### **CONCLUSION:**

These treatments could be easy-to-use approaches to improve the efficiency of enzymatic reactions in ionic liquids when the reaction proceeds not so smoothly.



## 1. ENHANCEMENT OF ACTIVITY AND SELECTIVITY IN LIPASE-CATALYZED TRANSESTERIFICATION IN IONIC LIQUIDS BY THE USE OF ADDITIVES

### 1.1. INTRODUCTION

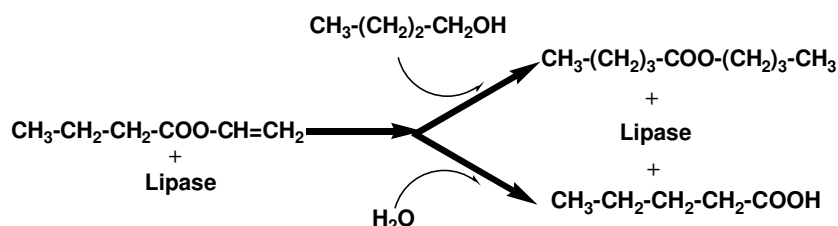
The use of biocatalysts in non-aqueous environments has received growing attention during the last two decades due to the advantages they offer, such as the possibility of carrying out processes which are thermodynamically unfavourable in water (e.g. transesterification), increasing the solubility of organic substrates, and facilitating enzyme and product recovery in fine chemistry [1]. Among these non-conventional media, room temperature ionic liquids (ILs) have recently appeared as interesting, clean alternatives to classical organic solvents [2-4]. This is mainly due to their almost negligible vapour pressure, their thermal stability [5] and their widely tunable properties with regard to polarity, hydrophobicity and solvent miscibility behavior by means of appropriate modification of the cation and anion [6].

ILs of the 1-alkyl-3-methylimidazolium and 1-alkyl-pyridinium families, in combination with anions such as tetrafluoroborate, hexafluorophosphate and bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide have been shown to be suitable media for lipase-catalyzed transesterification, enhancing the synthetic activity and (enantio)selectivity with respect to conventional organic solvents such as tert-butyl alcohol [7,8], dioxane [9], toluene [10], and n-hexane [11]. The early results were not always consistent, possibly due to impurities resulting from the preparation of the ionic liquid. Hence, a purification step is strongly recommended [10, 12].

Different methods have been reported to enhance the synthetic activity and (enantio)selectivity of lipase-catalyzed reactions. Among these methods, treatment of the reaction mixture with an additive has been shown to be a very convenient way of improving the outcome of the reaction because of its practical simplicity [13]. Some authors have used bases such as triethylamine as additive to improve the efficiency of lipase from *Candida antarctica* in organic solvents [14-15]. The aim of the present work was to study the ability of free CaLB to catalyze the synthesis of butyl butyrate, commonly used in the flavor industry, by transesterification from vinyl butyrate and 1-butanol (see **Scheme 1.1**), as reaction model, in seven water-immiscible ILs as well as in a common water-immiscible organic solvent, n-hexane. In all cases a modification of the purification treatment suggested by Park and Kazlauskas [10] was applied.



## 1. Enhancement of CaLB activity and selectivity in ionic liquids by the use of additives



**Scheme 1.1.** Stoichiometric scheme of kinetically controlled synthesis of butyl butyrate from vinyl butyrate and 1-butanol catalyzed by CaLB.

After purification of ionic liquids, in order to improve the use of these the ionic liquid as reaction media, different treatments were carried out on  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  medium, such as equilibration with aqueous solutions of salts,  $\text{NaHCO}_3$  or  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , or adding a catalytic amount of an organic base, triethylamine, to the reaction mixture. The assayed method that most improved the activity and selectivity of CaLB was chosen to extend the study to the range of the IL media mentioned above.

## 1.2. EXPERIMENTAL

### 1.2.1. Enzyme and chemicals

A commercial lipase (EC 3.1.1.3) preparation were used as catalyst: free *Candida antarctica* lipase B (Lipozyme CaLB L), which was a gift from Novo España S.A. (Madrid, Spain). Prior to use, the enzyme solution was 4-fold diluted in phosphate buffer 20 mM at pH 7. Seven water-immiscible ionic liquids were used (see **Figure 1.1**): (i) 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ( $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ), (ii) 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ( $[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ), (iii) 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ( $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ ), (iv) 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ( $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ), (v) 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ( $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ), (vi) 1-hexyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ( $[\text{hmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ), and (vii) 1-octyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ( $[\text{omim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ).  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$  and  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  were purchased from Solvent Innovation (Cologne, Germany) (purity > 98%) The ionic liquids  $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$  (purity >99%) and  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$  (purity >98%) were purchased from Strem Chemical Inc. (Bischheim, France) and Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain), respectively and  $[\text{hmim}^+][\text{NTf}_2^-]$  (purity >99%) and  $[\text{omim}^+][\text{NTf}_2^-]$  (purity >99%) from Merck KgaA (Darmstadt, Germany). All ionic liquids were used after purification by a modification of the method suggested by Park and Kazlauskas [10]. Substrates, solvents and other

## 1. Enhancement of CaLB activity and selectivity in ionic liquids by the use of additives

chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain), and were of the highest purity available.

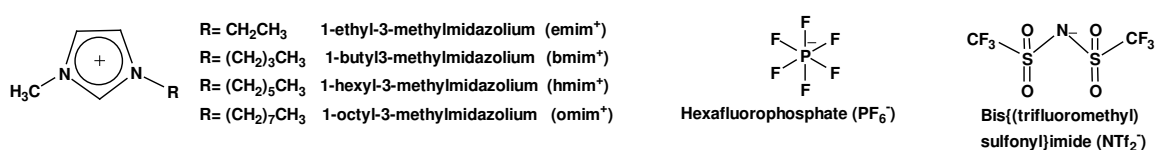


Figure 1.1. Ions involved in the assayed ionic liquids.

### 1.2.2. Developed method for ionic liquid purification

A modification of the purification method suggested by Park and Kazlauskas [10] was applied to the ionic liquid prior to use them as reaction media. The ionic liquids were diluted with methylene chloride prior to the washing step in order to decrease the high viscosity of some ionic liquids, which makes efficient washing difficult. They were washed firstly with 250 mM aqueous sodium carbonate and then with milli-Q water until they reached the pH of the milli-Q water (about pH 5.5), thus ensuring the complete remove of the sodium carbonate. Finally, the ionic liquids were dried under anhydrous phosphorous pentoxide in vacuo followed by evaporation of the methylene chloride under vacuum.

### 1.2.3. Equilibration of ionic liquids with aqueous solutions of salts

One of the treatments applied for improving the efficiency of enzymatic reactions in ionic liquids consisted on the equilibration of the IL with 250 mM aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> or Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. In both cases, the ionic liquid were diluted with methylene chloride and then washed with the NaHCO<sub>3</sub> or Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution, washing afterward with milli-Q water until neutral pH. The ionic liquid was then dried under anhydrous phosphorous pentoxide in vacuo followed by evaporation of the methylene chloride under vacuum.

## 1. Enhancement of CaLB activity and selectivity in ionic liquids by the use of additives

### 1.2.4. General procedure for lipase-catalyzed transesterification reaction in room temperature ionic liquids

To 457  $\mu\text{l}$  of each ionic liquid ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]), [hmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [hmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], or n-hexane, 19.2  $\mu\text{l}$  (150  $\mu\text{mol}$ ) vinyl butyrate and 13.8  $\mu\text{l}$  (150  $\mu\text{mol}$ ) 1-butanol were added into a screw-capped vial of 1.5 ml total volume. For reactions carried out in the presence of triethylamine, 0.4% (v/v) of this compound was added to the reaction medium before adding the substrates. The reaction was started by adding 10  $\mu\text{l}$  (8.5 mg *Candida antarctica* lipase B ml<sup>-1</sup> in 20 mM phosphate buffer at pH 7) and run for 2 h at 30°C. At different times, 15  $\mu\text{l}$  aliquots were extracted and suspended in 485  $\mu\text{l}$  n-hexane. The biphasic mixture was strongly shaken for 2 min to extract all the substrates and products into the n-hexane phase. Then, 400  $\mu\text{l}$  of the n-hexane extract were added to 100  $\mu\text{l}$  30 mM ethyl hexanoate (internal standard) solution in n-hexane and 5  $\mu\text{l}$  of the resulting solution was analyzed by GC. All the experiments were carried out in duplicate and the mean values are reported. The repeatability of the assay, as measured by the relative standard deviation was 3% or less.

The efficiency of the catalytic action was measured by two parameters: the synthetic activity, defined as the amount of enzyme that produces 1  $\mu\text{mol}$  of butyl butyrate per minute, and the selectivity as the ratio between this parameter and the acyl-donor consumption rate, which takes into account the competitive hydrolytic reaction of the acyl-donor.

### 1.2.5. Gas chromatographic analysis

GC analysis was performed with a Agilent 6890 N instrument equipped with FID detector and a Nukol<sup>TM</sup> capillary column (15m  $\times$  0.53mm  $\times$  0.5 $\mu\text{m}$ , Supelco), using butyl acetate as internal standard. The chromatographic conditions were as follows: carrier gas (N<sub>2</sub>) at 1.89 psi (51 ml/min total flow); temperature program: 40 °C, 1 min; 15 °C/min, 95 °C; 35 °C/min, 160°C; 2 min, 160 °C; split ratio: 7.9/1; detector: 220 °C. Retention times of the peaks were as follows: vinyl butyrate, 2.6 min; butyl acetate 3.0 min; 1-butanol, 3.7 min; butyl butyrate, 4.4 min and butyric acid 7.3 min. Substrate and product concentrations were calculated from calibration curves using stock solutions of pure compounds.

### 1.2.6. <sup>19</sup>F-NMR analysis

The <sup>19</sup>F-NMR spectra were recorded in acetonitrile-d solution in 5mm tubes at room temperature on a Varian Unity 300 spectrometer at 300 MHz, with CFCl<sub>3</sub> as internal standard.

### 1.3. RESULTS AND DISCUSSIONS

#### 1.3.1. Purification of ionic liquids

The ionic liquids described above were used for the transesterification of vinyl butyrate and 1-butanol. Unfortunately, lipase-catalyzed reactions in some of these unpurified ionic liquids were either slow or did not occur. We suspected that the ionic liquids might contain hydrogen fluoride due to their hydrolytic decomposition. The presence of these impurities may have deleterious effects on biocatalytic reactions for which the ionic liquid may be used as reaction medium. In this sense, it has been shown that the decrease in pH of the enzyme microenvironment has a direct adverse effect on enzyme activity. We have checked the presence of hydrogen fluoride in these ionic liquids by  $^{19}\text{F}$ -NMR analysis (acetonitrile- $d_3$ , 300 MHz). It was observed that ionic liquids that contain the hexafluorophosphate ion are prone to hydrolytic decomposition, giving rise to hydrogen fluoride, as could be seen in their  $^{19}\text{F}$ -NMR which showed a singlet at  $\delta = -150$  ppm. The ionic liquids based on the anion bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide resulted to be much more stable against hydrolysis not showing hydrogen fluoride impurities.

With the purpose of removing the traces of hydrogen fluoride, a modification of the purification method suggested by Park and Kazlauskas [10] was applied as described in the section 2.2. The purification method developed yields ionic liquids that worked reliably in the lipase-catalyzed transesterification of 1-butanol with vinyl butyrate. As can be seen in **Table 1.1**, a great increase in the synthetic activity of the free enzyme over that obtained by using the commercial ILs assayed without further purification was achieved. With the commercial  $[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$  and  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ , CaLB showed little or no activity, while after the purification treatment the synthetic activity increased up to 57.61 U  $\text{mg}^{-1}$  prot. in  $[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$  and 116.10 U  $\text{mg}^{-1}$  prot. in  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ .

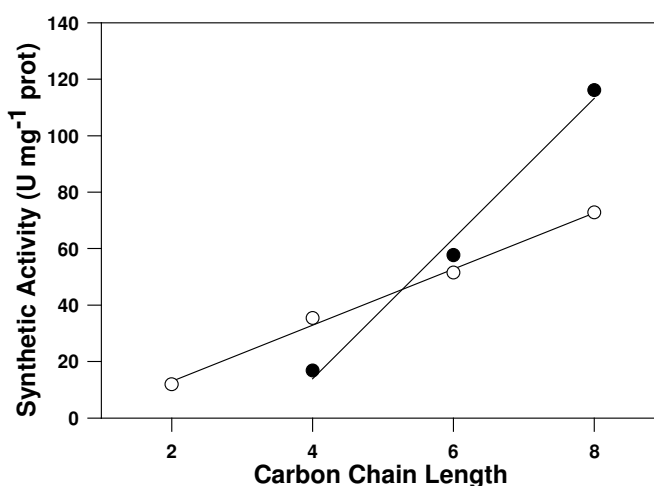
**Table 1.1.** Synthetic activity exhibited by CaLB for butyl butyrate synthesis in ILs based on the  $[\text{PF}_6^-]$  anion with and without purification treatment at 30 °C.

	Synthetic Activity in ILs without purification (U $\text{mg}^{-1}$ prot.)	Synthetic Activity in ILs after purification (U $\text{mg}^{-1}$ prot.)
$[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$	14.02	16.74
$[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$	0.08	57.61
$[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$	0	116.10

## 1. Enhancement of CaLB activity and selectivity in ionic liquids by the use of additives

### 1.3.2. Lipase-catalyzed transesterification in room temperature ionic liquids

The transesterification of vinyl butyrate and 1-butanol was carried out in the purified ionic liquids. **Figure 1.2** shows the synthetic activity exhibited by *Candida antarctica* lipase B in the different ionic liquids at 2% (v/v) water content and 30°C. The water content was controlled by Karl-Fischer-titration. The ILs chosen for this study were based on different anions and cations in order to determine the effect of the composition of the IL on the enzymatic efficiency. Enzyme reactions were also carried out in n-hexane, a classical organic solvent for lipase-catalyzed ester synthesis in non-aqueous environments [11], to compare the efficiency of ionic liquids for use as reaction media. It was observed that enzyme activity and selectivity in all the assayed ILs were much higher than that obtained in n-hexane (Synthetic activity = 7.605 U mg<sup>-1</sup> prot.; Selectivity = 75.3 %), demonstrating the greater suitability of these neoteric solvents for the proposed reaction.



**Figure 1.2.** Effect of the carbon chain length of the alkyl side chain of the cation in purified ILs based on [PF<sub>6</sub>]<sup>-</sup> (●) and [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (○) on the synthetic activity of CaLB in butyl butyrate synthesis at 30 °C.

Two properties of the solvent, cation hydrophobicity and anion nucleophilicity, were considered for analyzing the behaviour of CaLB for lipase-catalyzed reactions in ILs because they can influence the active conformation of the enzyme. A systematic study of ILs has been carried out using ionic liquid based on the same anion, [PF<sub>6</sub>]<sup>-</sup> or [NTf<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, and changing only the chain length of the alkyl substituent in the imidazolium ring of the cation. As can be observed in **Figure 1.2**, the synthetic activity was gradually enhanced by the increase in the alkyl chain length of the cation for the same anion. The increase in the alkyl chain length of the cation have been correlated by Ropel et al. (2005) with the

## 1. Enhancement of CaLB activity and selectivity in ionic liquids by the use of additives

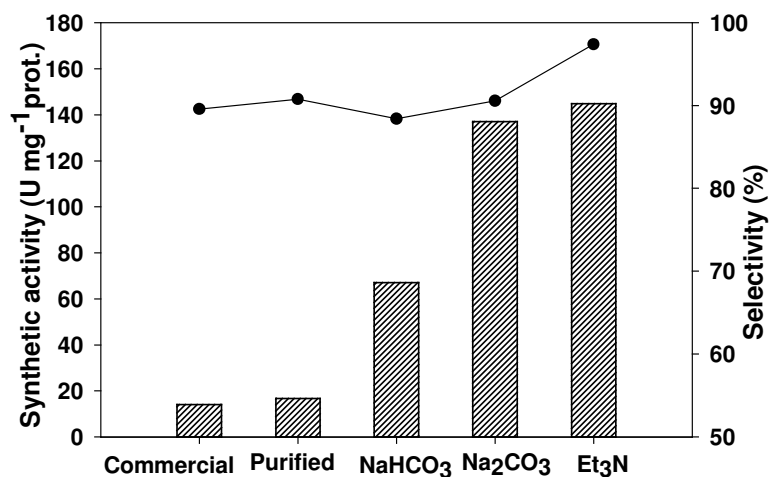
increase on the ILs hydrophobicity, measured by the octanol-water partition coefficients ( $K_{OW}$ ) [16]. Therefore, the observed increase in the synthetic activity of CaLB when increase the alkyl chain length of the cation for the same anion could be explained by the fact that the increase in the hydrophobicity of the medium involves a better preservation of the essential water layer, reducing the direct protein-ion interactions [17]. It has also be observed that [hmim<sup>+</sup>] and [omim<sup>+</sup>] cations combined with [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] anion provided better reaction rates than those based on the same cation and [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (**Figure 1.2**). We suggest that the nucleophilicity of the ILs might explain this tendency. Muldoon et al. [18] determined the hydrogen bond acceptor ability, or nucleophilicity of a range of ILs, based on the measurement of the wave length for the lowest energy d-d absorption band at solvation of the square planar salt [Cu(acac)(tmen)][X] (acac=acetylacetonate, tmen=N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, X=[BPh<sub>4</sub>]). These authors concluded that the nucleophilicity of the ILs is entirely anion-dependent and established the following nucleophilicity order: [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]. Therefore, the decrease in the nucleophilicity of the ILs might be involved in the increased reaction rates in ILs based on [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] compared with those based on [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], which could be explained by the higher tendency of the most nucleophilic anion to change the enzyme's conformation by interacting with the positively charged sites in the enzyme structure [19-20]. However, contrary to what might be expected from this tendency, the reaction rate in [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] was greater than in [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. Several others authors have also reported that lipases are more active in [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] than in [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] [11,21].

On the other hand, the differences in selectivity between the assayed ILs (data included in **Figure 1.5**) could be attributed to their specific abilities to reduce water activity ( $A_w$ ) in the enzyme microenvironment. In this sense, an increase in the hydrophobicity of the IL generally involves an increase in free water molecules, which can act as nucleophile acceptors in the transesterification reaction and so produce a loss in selectivity.

### 1.3.3. Effect of different treatments on the transesterification activity and selectivity of CaLB in [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]

Initially, the ionic liquid [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] was employed as reaction medium to test different treatments with the aim of improving the efficiency of *Candida antarctica* lipase B. **Figure 1.3** shows the effect of the different treatments on the synthetic activity and selectivity of CaLB at 2% (v/v) water content and 30°C.

## 1. Enhancement of CaLB activity and selectivity in ionic liquids by the use of additives



**Figure 1.3.** Effect of different treatments of the [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] medium on both the synthetic activity (bars) and selectivity (●) of CaLB for butyl butyrate synthesis at 30 °C.

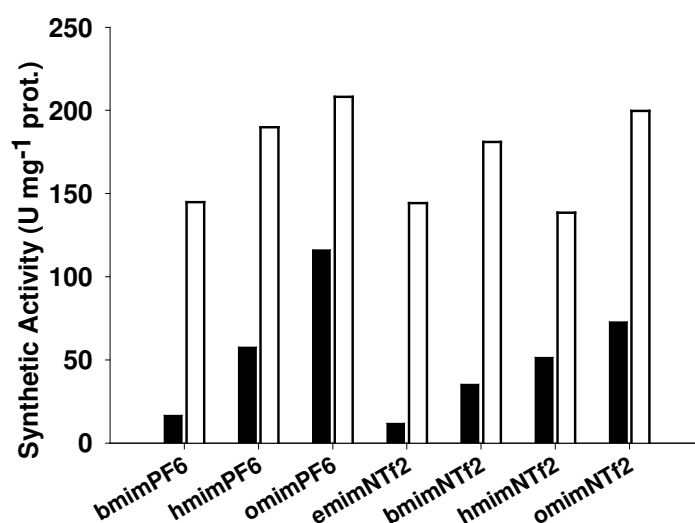
One of these treatments consisted on the equilibration of the IL with 250 mM aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> or Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, as described in section 2.3. The synthetic activity displayed by the CaLB in [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] equilibrated with NaHCO<sub>3</sub> was four times that the obtained for the same reaction in this medium purified as described above. The results were even better when the equilibration was carried out with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, when the synthetic activity was eight times greater. These findings suggest that the reaction rate improved because the NaHCO<sub>3</sub> and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> washes may add small amounts of buffer to the ionic liquid. The better results obtained with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> could be due to the most basic character of this salt. The selectivity was not affected appreciably in either case.

An alternative avenue for improving the activity and/or selectivity of CaLB in these media is to use additives. Interestingly, certain non-reactive organic bases have been shown to be highly beneficial, since the overall catalytic activity and (enantio)selectivity of enzymes in non-conventional media improves drastically [22]. When the effect of a catalytic amount of triethylamine (0.4% v/v) in the reaction medium was studied, there was a significant enhancement in activity compared with the same reaction in the absence of additives. This effect is explained by the fact that triethylamine may act as neutralizing agent, removing the traces of carboxylic acids generated by undesired hydrolysis side reactions of the ester, thereby protecting the enzyme from deactivation. Furthermore, the selectivity parameter of the reaction was strikingly higher in the presence of the catalytic amount of triethylamine.

## 1. Enhancement of CaLB activity and selectivity in ionic liquids by the use of additives

### 1.3.4. Effect of the addition of a catalytic amount of triethylamine on the transesterification activity and selectivity of CaLB in ILs

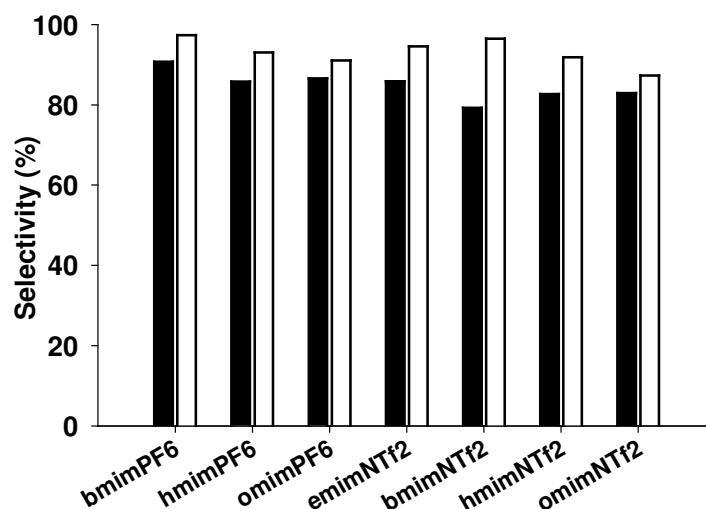
In view of the results obtained for the [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] medium, the addition of a catalytic amount of triethylamine was chosen to extend the study to others purified ILs: [hmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [hmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] and [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]. **Figure 1.4** and **Figure 1.5** show a comparison between the synthetic activity and the selectivity of the reactions, respectively, carried out in ionic liquids with and without triethylamine.



**Figure 1.4.** Synthetic activity exhibited by CaLB for butyl butyrate synthesis in purified ILs in presence (white bars) and absence (black bars) of triethylamine at 30 °C.



## 1. Enhancement of CaLB activity and selectivity in ionic liquids by the use of additives



**Figure 1.5.** Selectivity exhibited by CaLB for butyl butyrate synthesis in purified ILs in presence (white bars) and absence (black bars) of triethylamine at 30 °C.

A significant increase in the catalytic activity and selectivity values of the lipase was observed in the presence of the catalytic amount of triethylamine in all the assayed ILs, the biggest increase being observed in  $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$ , when it was more than 12 times greater. In this case the selectivity also showed a significantly increase, from 86% to 95%. In general, the activity and selectivity values for the assayed ILs followed the same tendencies as in the absence of additives. The synthetic activity increased with the increase of the alkyl chain length of the cation for the same anion ( $[\text{PF}_6^-]$  or  $[\text{NTf}_2^-]$ ). Furthermore, higher activity values were obtained when IL based on the  $[\text{PF}_6^-]$  anion was used for the same cation.

### 1.4. CONCLUSIONS

ILs based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cation in combination with hexafluorophosphate and bis(trifluoromethylsulfonyl)imide anions are shown to be excellent media for lipase-catalyzed ester synthesis by transesterification in low water conditions, compared with conventional organic solvents, such as n-hexane. The effect of different treatments of the reaction medium on both the synthetic activity and selectivity of the enzyme were studied systematically, using CaLB as biocatalyst and  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  as solvent, being the synthetic activity enhanced in all cases. The addition of a catalytic amount of this non-reactive base, triethylamine, gave the best results for  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  medium, increasing also the selectivity value. This additive was used to extend the study to others ILs, and a significant increase in both the synthetic activity and selectivity was achieved in all cases. These results point out the exciting potential of using catalytic amounts of a non-reactive organic base, such as triethylamine, in enzymatic reactions in ILs, which could reduce the reaction times and make the enzymatic processes more efficient.

### 1.5. REFERENCES

- [1] A.M. Klibanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature* 409 (2001) 241-246.
- [2] S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO<sub>2</sub> systems, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.
- [3] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Villora, A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B:Environmental* 67 (2006) 121-126.
- [4] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, M. Rubio, D. Gómez, G. Villora, Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 190-195.
- [5] M. Kosmulski, J. Gustafsson, J.B. Rosenholm, Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited, *Thermochim. Acta* 412 (2004) 47-53.
- [6] J.M. Pringle, J. Golding, K. Baranyai, C.M. Forsyth, G.B. Deacon, J.L. Scott, D.R. MacFarlane, The effect of anion fluorination in ionic liquids-Physical properties of a range of bis(methanesulfonyl)amide salts, *New J. Chem.* 27 (2003) 1504-1510.
- [7] R.M. Lau, F. van Rantwijk, K.R. Seddon, R.A. Sheldon, Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Org. Lett.* 2 (2000) 4189-4191.
- [8] A. Ruiz, A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, M.H.A. Janssen, R. Schoevaart, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, A cross-linked enzyme aggregate of *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1095-1099.
- [9] S.J. Nara, J.R. Harjani, M.M. Salunkhe, Lipase-catalyzed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 2979-2982.
- [10] S. Park, R.J. Kazlauskas, Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8395-8401.
- [11] M. Persson, U.T. Bornscheuer, Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 22 (2003) 21-27.

## 1. Enhancement of CaLB activity and selectivity in ionic liquids by the use of additives

---

- [12] K.R. Seddon, A. Stark, M.J. Torres, Influence of chloride, water, and organicsolvents on the physical properties of ionic liquids, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 2275-2287.
- [13] F. Thiel, Enhancement of selectivity and reactivity of lipases by additives, *Tetrahedron* 56 (2000) 2905-2919.
- [14] M. Quiros, M-C. Parker, N.J. Turner, Tuning lipase enantioselectivity in organic media using solid-state buffers, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 5074-5079.
- [15] E. García-Urdiales, F. Rebolledo, V. Gotor, Kinetic resolution of (+/-)-1-phenylbutan-1-ol by means of CaLB-catalyzed aminolyses: A study on the role of the amine in the alcohol resolution, *Adv. Synth. Catal.* 343 (2001) 646-654.
- [16] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [17] Y.Yuan, S. Bai, Y. Sun, Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of ( $\pm$ )-menthol in ionic liquids and organic solvents, *Food Chem.* 97 (2006) 324-330.
- [18] M.J. Muldoon, C.M. Gordon, I.R. Dunkin, Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes, *J. Chem. Soc., Perkin. Trans.* 2 (2001) 433-435.
- [19] T. De Diego, P. Lozano, S. Gmough, M. Vaultier, JL. Iborra , Understanding structure-stability relationship of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *Biomacromol.* 6 (2005) 1457-1464.
- [20] R.M. Lau, M.J. Sorgedraeger, G. Carrea, F. van Rantwijk, Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: Effects on structure and activity, *Green Chem.* 6 (2004) 483-487.
- [21] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzyme catalysis in ionic liquids II: Lipase catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* 5 (2001) 425-426.
- [22] L. Zheng, S. Zhang, Y. Xiaoqi, L. Zhao, G. Gao, X. Yang, H. Duan, S. Cao, Enhancement of the enantioselectivity in lipase-catalyzed resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine by additives, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 38 (2005) 17-23.

# 2

## **A cross-linked enzyme aggregate of *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids**

*Candida antarctica* lipase B, aggregated and cross-linked on a polypropylene carrier maintained its activity when dispersed in ionic liquids, such as [bmim<sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], that denatured the free enzyme. Enantioselective acylation (kinetic resolution) of 1-phenylethanol and 1-phenylethylamine in such ionic liquids was demonstrated.



## **2. A CROSS-LINKED *CANDIDA ANTARCTICA* LIPASE B IS ACTIVE IN DENATURING IONIC LIQUIDS**

### **2.1. INTRODUCTION**

Ionic liquids are, to an increasing degree, being accepted as reaction solvents, including biocatalytic transformations [1,2]. Much attention has been focused on *Candida antarctica* lipase B (CaLB) [3], a very stable enzyme that readily tolerates anhydrous organic solvents and is catalytically active in weakly coordinating ionic liquids, such as 1-butyl-3-methylimidazolium (bmim)hexafluorophosphate or bis(triflic)imide [4-6]. Evidence that free or carrier adsorbed suspensions of CaLB, as well as some other hydrolases, in such ionic liquids are more thermally and operationally stable than those suspended in common organic solvents had been accumulating for some years [1,7] and recently has been supported by fluorescence and CD spectroscopy [8]. Ionic liquids that contain strongly coordinating anions, such as [bmim] nitrate or acetate, interacted sufficiently strongly with CaLB to dissolve the enzyme but also caused its deactivation [9,10]. It would seem, with few exceptions [10,11], that enzyme solubility and activity in ionic liquids are mutually exclusive.

Strongly coordinating ionic liquids, such as [bmim<sup>+</sup>][dca<sup>-</sup>] are potentially useful solvents [12,13] and biocatalyst engineering is one way to render these compatible with enzymatic reactions. Some of us have recently shown that immobilisation as a cross-linked enzyme aggregate (CLEA) is a straightforward approach to stable and highly active biocatalysts [14-16]. We now report that cross-linked derivatives of CaLB stay active in ionic liquids that deactivate the free or carrier-adsorbed enzyme.

### **2.2. MATERIALS AND METHODS**

#### **2.2.1. Materials**

*Candida antarctica* lipase B (Novozyme 525F) was obtained from Novozymes (Bagsværd, Denmark). N-methylimidazole, 1-butanol, 1-chlorobutane, ethyl butanoate, methyl 2-methoxyacetate, vinyl acetate and Dowex 1X8-200 anion-exchange resin were from Acros Organics. 1,2-Dimethoxybenzene, 1-phenylethanol and 1-phenylethylamine were purchased from Aldrich. Accurel EP 100 (microporous polypropylene) was obtained from Membrana GmbH (Wuppertal, Germany). Zeolite KA (powder) was obtained from Aldrich and activated at 400 °C prior to use. HPLC grade tert-butyl methyl ether (TBME) and tert-butyl alcohol were from Acros Organics and Riedel-de Haën and were dried over activated zeolite NaA (Aldrich) before use.

## 2. A cross-linked enzyme aggregate of CaLB is active in denaturing ionic liquids

### 2.2.2. Analysis and equipment

Chiral GC was performed on a Hewlett-Packard 5890A or a Shimadzu 2010 instrument equipped with a FID detector and a Varian Inc. 25 m x 0.32 mm Chirasil-Dex CB column. Resolution of 1-phenylethanol: isothermal at 110 °C; retention times: (S)-1-phenylethyl acetate 5.3 min, 1,2-dimethoxybenzene (internal standard) 5.7 min, (R)-1-phenylethyl acetate 6.4 min, (R)-1-phenylethanol 9.7 min, (S)-1-phenylethanol 10.7 min. Resolution of 1-phenylethylamine: 40 min at 75 °C, then 10 °C/min to 120 °C, 40 min at 120 °C, 10 °C/min to 180 °C; retention times: (R)-1-phenylethylamine 35.3 min, (S)-1-phenylethylamine 37.1 min, 1,2,3-trimethoxybenzene (internal standard) 40.0 min, (R)-1-phenylethylamide 54.6 min and (S)-1-phenylethylamide 56.4 min.

The amount of Cl<sup>-</sup> in the ionic liquids was determined by a silver chromate test. An aqueous solution of potassium chromate (5 g/L, 27 mM, indicator) was added to the sample and a silver nitrate solution (0.24 g/L, 1.4 mM) was added dropwise. The endpoint was reached when a red persistent precipitate of silver chromate was observed; the detection limit is approx. 10 ppm Cl<sup>-</sup>.

### 2.2.3. Cross-linking of CaLB [17]

CaLB-PP. At room temperature Novozyme 525F (10 mL) was added to Accurel EP100 (1 g) which had been washed with 2-propanol and water in advance. The suspension was stirred at room temperature for 2 h; then 2-propanol (30 mL) was added at once. After stirring for 5 min, glutaraldehyde solution (25%, 1.5 mL, final concentration 100 mM) was added and stirring was continued for 2 h at room temperature. The supernatant was decanted, the immobilised lipase was thrice washed with water, transferred to a 150 mm metal sieve and subsequently dried with acetone and diethylether. Yield: 1.3 g (protein contents 41%), activity 36 kU/g.

### 2.2.4. Synthesis of ionic liquids

*1-Butyl-3-methylimidazolium chloride* [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>]: 1-methylimidazole (98 g, 1.19 mol) was reacted with 1-chlorobutane (131.00 g, 1.42 mol) at 80 °C under a nitrogen atmosphere for 5 days. The excess of 1-chlorobutane was removed by rotary evaporation yielding a slightly yellow viscous ionic liquid (208.6 g, 100%); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 0.96 (t, 3H), 1.38 (q, 2H), 1.94 (m, 2H), 4.16 (s, 3H), 4.39 (t, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 10.52 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 13.47, 19.38, 32.15, 36.68, 49.72, 122.43, 123.91, 136.93.

*1-Butyl-3-methylimidazolium dicyanamide* [bmim<sup>+</sup>][dca<sup>-</sup>]: [bmim<sup>+</sup>][Cl<sup>-</sup>] (100.9 g, 0.58 mol) was dissolved in acetone (100 mL) and sodium dicyanamide (53.6 g, 0.6 mol) was added. The mixture was stirred for 20 h at room temperature, then kept at -20 °C for 1 day and filtered. The filtrate was evaporated by rotary evaporation yielding a slightly

## 2. A cross-linked enzyme aggregate of CaLB is active in denaturing ionic liquids

yellow ionic liquid (109.2 g, 92%).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.99 (t, 3H), 1.41 (m, 2H), 1.92 (m, 2H), 4.03 (s, 3H), 4.26 (t, 2H), 7.50 (m, 2H), 9.17 (s, 1H). The product contained 1440 ppm chloride according to ion chromatographic analysis. Purification by column chromatography over active alumina reduced the chloride level to 660 ppm.

*1-Butyl-3-methylimidazolium nitrate* [ $\text{bmim}^+$ ][ $\text{NO}_3^-$ ]: a column was packed with 250 g of Dowex 1X8-200 anion-exchange resin and flushed thoroughly with a 1 M sodium nitrate solution (0.5 L), then with Milli-Q water. [ $\text{bmim}^+$ ][ $\text{Cl}^-$ ] (17.5 g, 0.1 mol) was dissolved in Milli-Q water (200 mL) and the resulting solution was slowly run over the column and eluted with Milli-Q water (1 L). The eluate was collected and concentrated under reduced pressure. The residue was dried extensively under vacuum over phosphorous pentoxide. [ $\text{bmim}^+$ ][ $\text{NO}_3^-$ ] was obtained in near-quantitative yield as a colourless liquid that contained < 10 ppm  $\text{Cl}^-$  according to the silver chromate test.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.94 (t, 3H), 1.36 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 4.01 (s, 3H), 4.25 (t, 2H), 7.52 (m, 2H), 9.78 (s, 1H).

*1-Butyl-3-methylimidazolium acetate* [ $\text{bmim}^+$ ][ $\text{OAc}^-$ ] was prepared by ion exchange as described above in near-quantitative yield. The product contained < 10 ppm  $\text{Cl}^-$  according to the silver chromate test.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.95 (t, 3H), 1.36 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.94 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 4.29 (t, 2H), 7.45 (m, 3H).

*1-Butyl-3-methylimidazolium lactate* [ $\text{bmim}^+$ ][ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2^-$ ] was prepared by ion exchange as described above in near-quantitative yield. The product contained < 10 ppm  $\text{Cl}^-$  according to the silver chromate test.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  0.95 (t, 3H), 1.40 (m, 5H), 1.87 (m, 2H), 4.98 (m, 1H), 4.05 (s, 3H), 4.28 (m, 2H), 4.72 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 10.56 (s, 1H).

### 2.2.5. Enzymatic reactions

Blank reactions without biocatalyst were carried out in all cases to ensure that there was no background reaction.

*1-Phenylethanol* (18.3 mg, 0.15 mmol), vinyl acetate (25.8 mg = 27.7  $\mu\text{L}$ , 0.3 mmol) and 1,2-dimethoxybenzene (8  $\mu\text{L}$ , internal standard) were dissolved in the reaction medium (1.45 mL) in a 2 mL screw-capped vial. Activated zeolite KA (75 mg) and CaLB-PP CLEA (11.6 mg, 40.5 U, unless indicated otherwise) were added and the mixture was shaken at 40 °C in an oil bath. At regular time intervals, 15  $\mu\text{L}$  aliquots were withdrawn and added to 0.6 mL TBME. The biphasic mixture was vortexed during 1 min and centrifuged at 12000  $\text{min}^{-1}$ . 5  $\mu\text{L}$  samples of the supernatant were analyzed by GC.



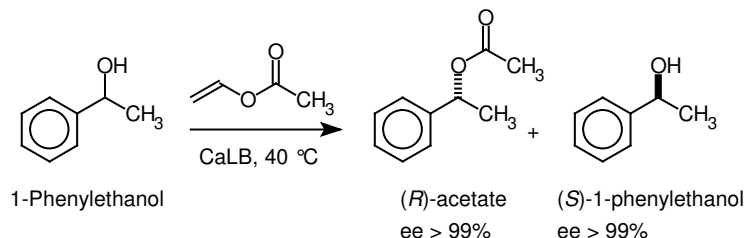
## 2. A cross-linked enzyme aggregate of CaLB is active in denaturing ionic liquids

1-Phenylethylamine (10  $\mu\text{L}$ , 77.5  $\mu\text{mol}$ ), methyl methoxyacetate (15  $\mu\text{L}$ , 0.151 mmol), 1,2,3-trimethoxybenzene (12.9 mg, internal standard) were dissolved in 1.475 ml reaction medium. Activated zeolite KA (75 mg) and CaLB-PP CLEA (81 U) were added and the mixture was shaken at 40  $^{\circ}\text{C}$  in an oil bath. At regular time intervals, 15  $\mu\text{L}$  aliquots were withdrawn and added to 0.6 mL TBME. The biphasic mixture was vortexed during 1 min and centrifuged at 12000  $\text{min}^{-1}$ . To a 5  $\mu\text{L}$  sample of the supernatant 3 drops of trifluoroacetic anhydride were added, the resulting mixture was heated at 40  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min and ethanol (3 drops) was added. The mixture was concentrated *in vacuo*, diluted with n-hexane and analysed by GC.

### 2.3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 2.3.1. Resolution of *rac*-1-phenylethanol

The CLEA-PP biocatalyst was applied to the enantioselective acylation of 1-phenylethanol with vinyl acetate (see **Figure 2.1**), which is a well-known test case for alcohol resolution. When conducted in *tert*-butyl alcohol, the reaction was fast (initial rate 260  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (g protein) $^{-1}$ ) and highly enantioselective, with enantiomeric ratio  $E > 500$ .

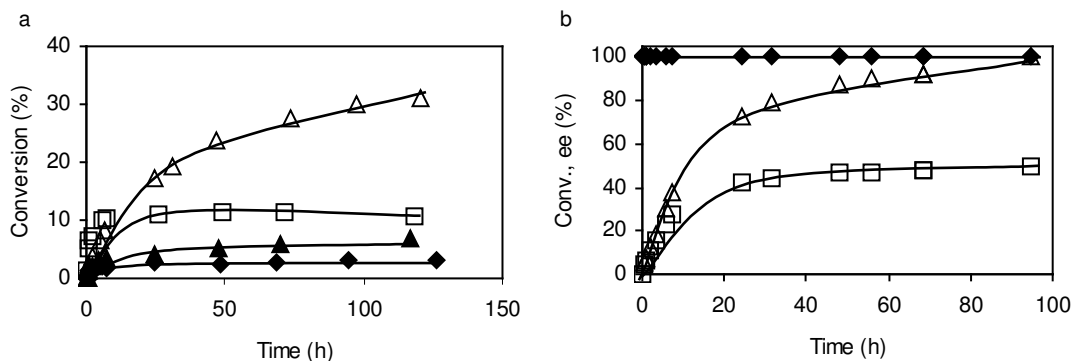


**Figure 2.1.** Kinetic resolution of 1-phenylethanol.

The kinetic resolution of 1-phenylethanol has been performed successfully in the weakly coordinating ionic liquids [bmim] hexafluorophosphate and bis(triflic)imide with a rate and enantioselectivity that were comparable with or better than those in conventional solvents [5,18]. In our range of strongly coordinating ionic liquids the reaction was quite slow, in contrast, and a sustained reaction could only be accomplished in [bmim $^{+}$ ][NO $_3^{-}$ ]. The reaction was initially faster in [bmim $^{+}$ ][acetate $^{-}$ ] (47  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (g protein) $^{-1}$ ), but in this latter medium, as well as in [bmim $^{+}$ ][dca $^{-}$ ] and [bmim $^{+}$ ][lactate $^{-}$ ], the reaction came to a standstill after only 3-11% conversion (See **Figure 2.2a**). The initial rate in [bmim $^{+}$ ][NO $_3^{-}$ ] was only 24  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (g protein) $^{-1}$  and the enzyme concentration had to be increased to obtain 50% conversion within a

## 2. A cross-linked enzyme aggregate of CaLB is active in denaturing ionic liquids

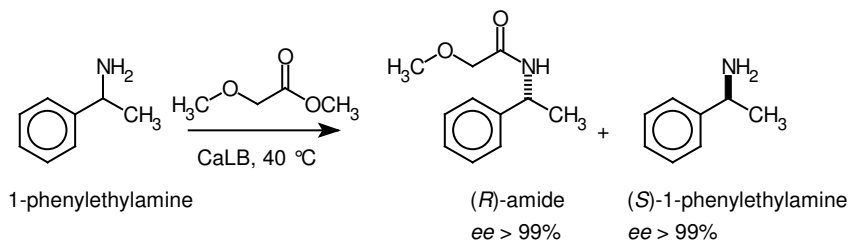
reasonable time. It is worth noting that the enantioselectivity remained near-quantitative (Figure 2.2b).



**Figure 2.2.** Kinetic resolution of 1-phenylethanol (0.1 M); a: time-course in [bmim<sup>+</sup>][lactate<sup>-</sup>] (◆), [dicyanamide<sup>-</sup>] (▲), [acetate<sup>-</sup>] (□) and [nitrate<sup>-</sup>] (Δ) in the presence of CaLB-PP (27 U/mL); b: in [bmim<sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>], progress (□) and e.e. of the alcohol (Δ) and the ester (◆) with 68 U/mL of CaLB-PP.

### 3.3.2. Resolution of *rac*-1-phenylethylamine

The enantioselective acylation of chiral amines, such as 1-phenylethylamine (Figure 2.3), has rapidly expanded from a laboratory experiment [19] into a multi-kT/a industrial process [20]. The resolution of this particular amine has been accomplished under a wide variety of conditions, including ionic liquid medium [6]. We selected methyl 2-methoxyacetate as the acyl donor on account of its superior reaction rate [21,22]. Non-enzymatic acylation did not take place at the concentrations used.

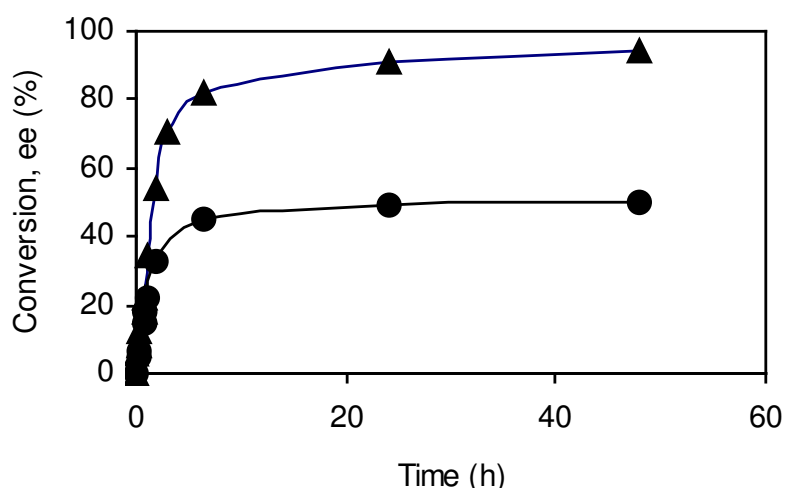


**Figure 2.3.** Kinetic resolution of 1-phenylethylamine.

## 2. A cross-linked enzyme aggregate of CaLB is active in denaturing ionic liquids

CaLB-PP proved to be an efficient biocatalyst for the enantioselective acylation of 1-phenylethylamine. The initial rate in *tert*-butyl methyl ether (TBME) was  $1.45 \text{ mmol min}^{-1} (\text{g protein})^{-1}$  and 50 % conversion was accomplished within 24 h at a protein/reactant ratio of approx. 0.12 g/g. The enantiomeric purity of the unconverted amine (95%) corresponds with  $E = 140$ . In *tert*-butyl alcohol the reaction was more than ten times slower and the enzyme load had to be increased four-fold, but the enantioselectivity was maintained (data not shown).

The resolution of 1-phenylethylamine was likewise performed in the same series of ionic liquids as above. In  $[\text{bmim}^+][\text{acetate}^-]$  and lactate the reaction became stagnant at only 15% conversion as observed before. Complete (50%) conversion was obtained in  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$  and  $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$  at the same enzyme loading that had been used with *tert*-butylalcohol. The best reaction rate was observed in  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ ; the reaction was much slower initially than in *tert*-butyl alcohol ( $30 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g protein})^{-1}$ ), but was sustained better and complete conversion was obtained in a shorter reaction time (see **Figure 2.4**). The enantiomeric purity of the unconverted amine (94%) corresponds with  $E = 95$ .



**Figure 2.4.** Resolution of 1-phenylethylamine (52 mM) in  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$  catalysed by CaLB-PP (54 U/mL); conversion (●), ee of 1-phenylethylamine (▲).

## 2.4. CONCLUSIONS

*Candida antarctica* lipase B, adsorbed and cross-linked on a polypropylene carrier, mediated the acylation of 1-phenylethanol and 1-phenylethylamine with high enantioselectivity, in conventional organic solvents as well as in  $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ . In short, cross-linking is a promising approach to render enzymes tolerant to denaturing ionic liquids.

## 2.5. REFERENCES

- [1] F. Van Rantwijk, R. Madeira Lau, R.A. Sheldon, Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 131-138.
- [2] Z. Yang, W. Pan, Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis, *Enzyme Microb. Technol.* 37 (2005) 19-28.
- [3] O. Kirk, M.W. Christensen, Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin, *Org. Proc. Res. Dev.* 6 (2002) 446-451.
- [4] R. Madeira Lau, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, R.A. Sheldon, Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Org. Lett.* 2 (2000) 4189-4191.
- [5] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* (2001) 425-426.
- [6] R. Irimescu, K. Kato, Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 30 (2004) 189-194.
- [7] P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J.L. Iborra, Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems, *Biotechnol. Progr.* 20 (2004) 661-669.
- [8] T. De Diego, P. Lozano, S. Gmouh, M. Vaultier, J.L. Iborra, Understanding structure-stability relationships of *Candida antartica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromol.* 6 (2005) 1457-1464.
- [9] R.A. Sheldon, R. Madeira Lau, M.J. Sorgedrager, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, Biocatalysis in ionic liquids, *Green Chem.* 4 (2002) 147-151.
- [10] R. Madeira Lau, M.J. Sorgedrager, G. Carrea, F. Van Rantwijk, F. Secundo, R.A. Sheldon, Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: Effects on structure and activity, *Green Chem.* 6 (2004) 483-487.
- [11] A.J. Walker, N.C. Bruce, Combined biological and chemical catalysis in the preparation of oxycodone, *Tetrahedron* 60 (2004) 561-568.

## 2. A cross-linked enzyme aggregate of CaLB is active in denaturing ionic liquids

---

- [12] S.A. Forsyth, D.R. MacFarlane, R.J. Thomson, M. Von Itzstein, Rapid, clean, and mild O-acetylation of alcohols and carbohydrates in an ionic liquid, *Chem. Commun.* 7 (2002) 714-715.
- [13] Q. Liu, M.H.A. Janssen, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon, Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations, *Green Chem.* 7 (2005) 39-42.
- [14] L. Cao, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase, *Org. Lett.* 2 (2000) 1361-1364.
- [15] P. Lopez-Serrano, L. Cao, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 1379-1383.
- [16] R. Schoevaart, M.W. Wolbers, M. Golubovic, M. Ottens, A.P.G. Kieboom, F. van Rantwijk, L.A.M. Van der Wielen, R.A. Sheldon, Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004) 754-762.
- [17] W.R.K. Schoevaart, L.M. Van Langen, R.T.M. Van den Dool, J.W.L. Boumans (CLEA Technologies), Method for the preparation of cross-linked enzyme aggregates with improved properties. PCT Int Appl WO 2006/046865.
- [18] K.-W. Kim, B. Song, M.-Y. Choi, M.-J. Kim, Biocatalysis in ionic liquids: Markedly enhanced enantioselectivity of lipase, *Org. Lett.* 3 (2001) 1507-1509.
- [19] V. Gotor, R. Brieva, F. Rebolledo, Enantioselective acylation of amino alcohols by porcine pancreas lipase, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1988) 957-958.
- [20] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, Industrial methods for the production of optically active intermediates, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 788-824.
- [21] F. Balkenbohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation, *J. Prakt. Chem.* 339 (1997) 381-384.
- [22] T. Wagegg, M.M. Enzelberger, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmidt, The use of methoxy acetoxy esters significantly enhances reaction rates in the lipase-catalyzed preparation of enantiopure 1-(4-chloro phenyl) ethyl amines, *J. Biotechnol.* 61 (1998) 75-78.

# 3

## Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids

Five different ionic liquids, based on dialkylimidazolium cations associated with perfluorinated and bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide anions, were used to investigate the scope and limitations of these new solvents as media for penicillin G acylase-catalyzed reactions. Deactivation of the native enzyme in ionic liquids (ILs) and in organic solvents (toluene, dichloromethane and 2-propanol) at low water content and 40 °C was investigated using the hydrolysis of penicillin G as activity test. Native penicillin G acylase shows greater stability in IL media than in organic solvents. For example, a half-life time of 23 h. was obtained in 1-ethyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide, [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], which was about 2000-fold higher than that in 2-propanol. An enhancement of the PGA stability was observed by the presence of substrate in ionic liquids based on tetrafluoroborate and hexafluorophosphate anions, achieving the highest increase of the half-life time in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]), which was about 9-fold higher as compared to the half-life time in absence of substrate.



## 3. STABILIZATION OF NATIVE PENICILLIN G ACYLASE BY IONIC LIQUIDS

### 3.1. INTRODUCTION

Penicillin G acylase (PGA; EC 3.5.1.11) is the key enzyme used in the industrial production of  $\beta$ -lactam penicillin antibiotics. This enzyme hydrolyzes the side chain of penicillin G and related  $\beta$ -lactam antibiotics, releasing 6-amino penicillanic acid (6-APA), which is the building block in the manufacture of semisynthetic penicillins. PGA can also be used for the production of semisynthetic  $\beta$ -lactam antibiotics, in which the enzyme catalyses the condensation of an acyl group and a 6-APA molecule.

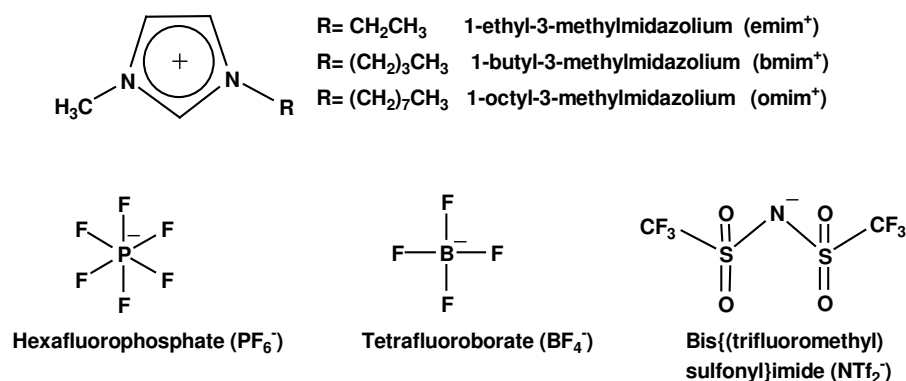
The use of organic solvents or water-cosolvent mixtures has increased the performance of enzymatic  $\beta$ -lactam synthesis [1-2]. Thermodynamic equilibrium could be shifted toward the synthesis using hydrophobic solvents in the reaction medium [3]. It has been demonstrated that PGA is highly active in apolar organic solvents, catalysing the resolution and protection of L-amino acids, D-amino acids and amines [4-7]. However, volatile organic solvents have a detrimental impact on the environment, and it is therefore necessary to develop new alternatives for enzyme-catalyzed synthesis in environmentally friendly reaction media [8]. In this sense, ILs could be an alternative to organic solvents, because of their lack of vapour pressure, their chemical and thermal stability [9] and their widely tunable properties with regard to polarity, hydrophobicity and solvent miscibility behavior through appropriate modification of the cation and anion [10-11]. They are therefore often referred to as designer solvents. The most commonly used ILs are based on dialkylimidazolium and tetraalkyl ammonium cations combined with anions having a strongly delocalized negative charge (e.g. hexafluorophosphate, tetrafluoroborate) [12]. ILs have recently been shown to be an appropriate non-aqueous media for many enzyme-catalyzed reactions, including the synthesis of aminoacids [13] and aliphatic esters [14-15], the kinetic resolution of *rac*-aromatic alcohols [16] and the carbohydrate ester synthesis [17]. This medium is not only known to have a positive influence on enzyme activity and enantioselectivity, but also on the stability of enzymes.

During the last decades, much effort has been devoted to developing of immobilized enzymes in order to make the production process economically viable, improving efficiency and allowing re-utilization. PGA has been immobilized on many matrix materials by various means, for instance, the use of solid supports [18-19], membrane entrapment [20], fiber entrapment [18], copolymers prepared from butyl acrylate and ethylene glycol dimethylacrylate, or vinyl copolymers containing epoxy groups [20-21], covalent binding [22], adsorption [23], etc. In this context, systems based on ILs with an aqueous solution of free PGA could be considered as carrier-free immobilized enzyme derivatives [16].



### 3. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids

Up to now, only one recent paper evaluated the activity and stability of a covalently immobilised form of penicillin G amidase (PGA-450) in several 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids based on  $[\text{PF}_6^-]$ ,  $[\text{BF}_4^-]$  and  $[\text{CH}_3\text{OSO}_3^-]$  anions at controlled water activity [24]. Here we attempted to evaluate the stability of penicillin G acylase (PGA) from *Escherichia coli* in their native form at low water content in absence and presence of substrate. The hydrolysis of penicillin G to 6-aminopenicillanic acid (6-APA) and phenyl acetic acid (PAA) was chosen as activity test. A deactivation mechanism with two steps in series is proposed to account for the variation in activity with time. The media selected for this study were four water-immiscible ionic liquids: (i) 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ( $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ ), (ii) 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ( $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ ), (iii) 1-ethyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide ( $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ), (iv) 1-butyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide ( $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ ); and one water-miscible ionic liquid: (v) 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ( $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ ). The ions involved in these ionic liquids are represented in **Figure 3.1**. A comparison of the stability of PGA in ionic liquids and conventional organic solvents was also performed.



**Figure 3.1.** Ions involved in the assayed ionic liquids.

## 3.2. MATERIALS AND METHODS

### 3.2.1. Materials

Penicillin G acylase (EC 3.5.1.11) from *Escherichia coli* was purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain), 29 U/mg. Activity units (U) are reported based on the manufacturer's determination of activity using the hydrolysis of a 2% (w/v)

### 3. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids

---

solution of penicillin G potassium salt (PG) in 0.1 M phosphate buffer pH 7 at 37 °C. [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] and [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] were purchased from Solvent Innovation (Cologne, Germany) (purity>99%). The ionic liquids [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (purity >99%) and [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (purity >99%) are commercially available from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain) and Strem Chemical Inc. (Bischheim, France), respectively. The chloride content, measured by ion chromatography, were in all cases < 100 ppm. Substrate (PG), solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain), and were of the highest purity available.

#### 3.2.2. HPLC analysis

Substrate and product concentrations were determined by HPLC using a LiChrospher RP-18 column (25 cm length and 4 mm internal diameter, 5 µm particle size and 10 nm pore size). Samples were eluted isocratically with 80% (v/v) 20 mM potassium phosphate buffer pH 6,0 and 20% (v/v) acetonitrile at a flow rate of 0.8 ml/min, and analysed by a UV detector at 220 nm. Substrate and product concentrations were calculated from calibration curves using stock solutions of pure compounds.

#### 3.2.3. Enzyme stability in ionic liquids

Into a screw-capped vial of 1.5 ml total volume containing 490 µl of IL ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]; [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]; [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]) or 2-propanol, 10 µl of 35 mg/ml of PGA in 0.1 M phosphate buffer were added and the mixture incubated at 40 °C. At different times, a 30 µl aliquot of the incubation medium was taken and the hydrolytic activity of PGA was measured as described below. For incubation in the presence of substrate, 10 µl 500 mM PG in water was added to 480 µl of the incubation medium. All the experiments were carried out in duplicate.

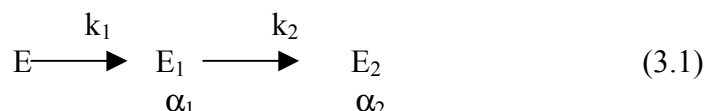
#### 3.2.4. Enzymatic hydrolysis of penicillin G

The reaction was started by adding a 30 µl aliquot of the incubation medium (PGA incubated in the IL or 2-propanol at 40°C as described in 2.3) into a screw-capped vial of 1.5 ml total volume containing 470 µl 50 mM PG in 0.25 M phosphate buffer pH 8 and run at 40 °C for 24 h. At different times, 50 µl aliquots were extracted and dissolved in 150 µl of 50 mM HCl to stop the reaction and then 50 µl of this solution were added to 575 µl of 0.72 mM resorcinol in 0.25 mM phosphate buffer (internal standard). Finally, 5 µl of the resulting solution was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). One unit of hydrolytic activity was defined as the amount of enzyme that produces 1 µmol of PAA per minute at 40°C pH 8 from 50 mM PG in 0.25 M phosphate buffer. All the experiments were carried out in duplicate.

### 3.3. RESULTS AND DISCUSSION

One key criterion for selecting an enzyme-IL system is the stability of the catalyst within the reaction medium. The influence of these new solvents on enzyme stability was studied by incubating PGA in several ILs: [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] at 40 °C in absence and presence of substrate (PG).

The multiphasic nature of the protein molecule during the deactivation process strengthens the suggestion that complex internal events take place during its conformational transition [25]. In this way, a series-type deactivation model involving two first-order steps with one active precursor and a final enzyme state with possible non-zero activity [26] was considered for analyzing PGA deactivation in ILs, as follows:



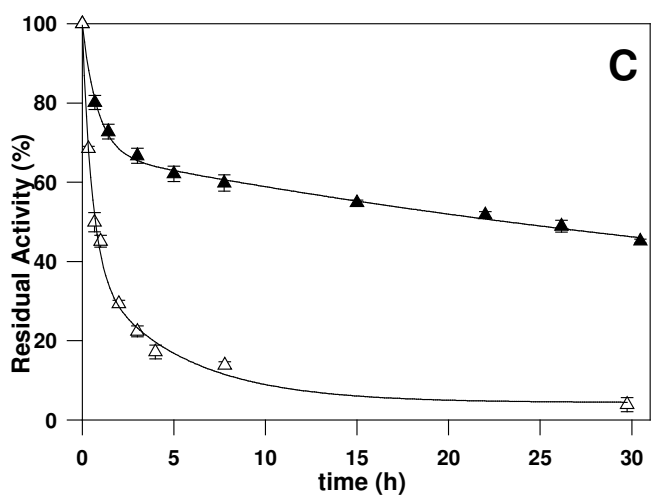
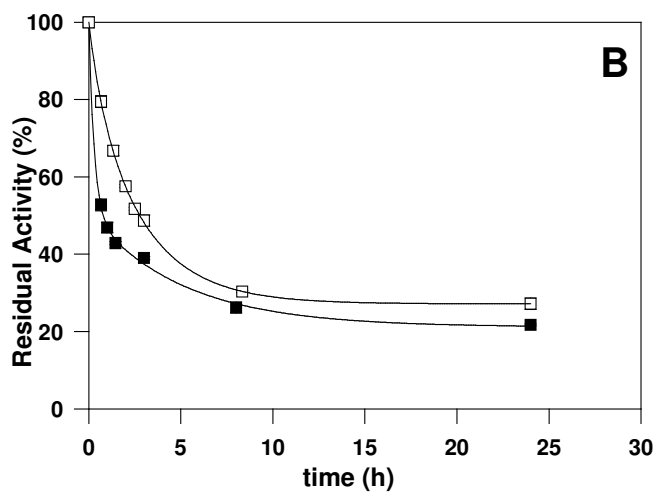
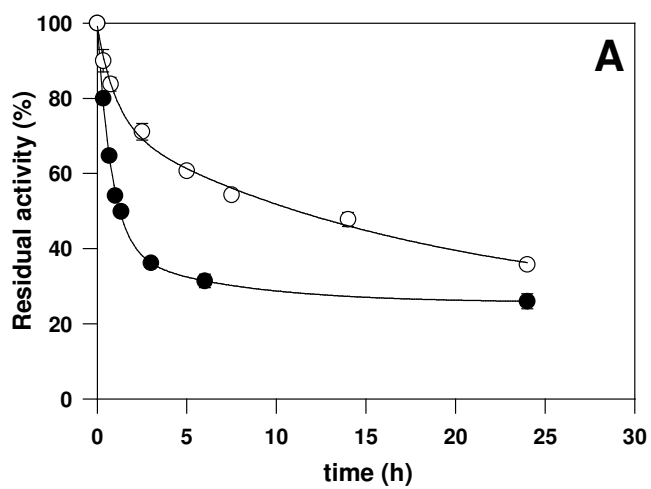
where E, E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> are homogeneous enzyme states that exhibit different specific activities; k<sub>1</sub> and k<sub>2</sub> are first-order deactivation rate constants (min<sup>-1</sup>), and α<sub>1</sub> and α<sub>2</sub> are the ratios of specific activities E<sub>1</sub>/E and E<sub>2</sub>/E, respectively. The residual activity, α, is given by integration of the deactivation rate equations of each step, and substitution in the weighted average expression, as follows:

$$\alpha = \frac{E + \alpha_1 \cdot E_1 + \alpha_2 \cdot E_2}{E} = \alpha_2 + \left[ 1 + \frac{\alpha_1 \cdot k_1}{k_2 - k_1} - \frac{\alpha_2 \cdot k_2}{k_2 - k_1} \right] \cdot [\exp(-k_1 \cdot t)] - (\alpha_1 - \alpha_2) \cdot \left[ \frac{k_1}{k_2 - k_1} \right] \cdot [\exp(-k_2 \cdot t)] \quad (3.2)$$

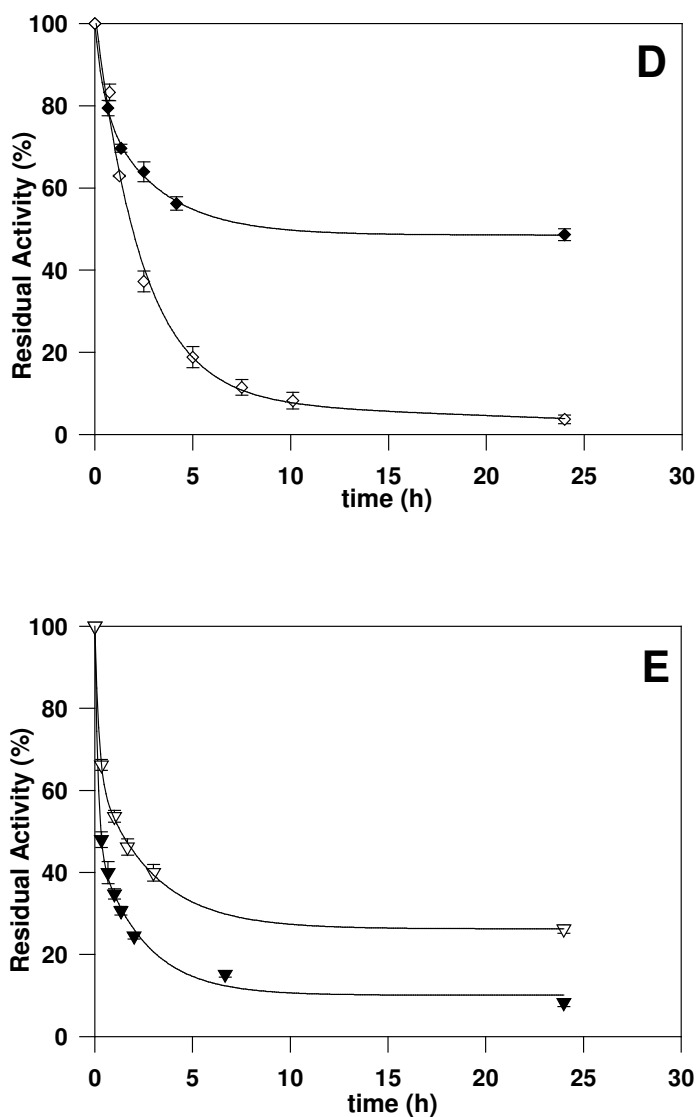
Several other models (e.g. linear, exponential and inverted linear models) were tested but the adjustments obtained were not satisfactory. The Henley and Sadana model has been also applied for modelling penicillin acylase deactivation by other authors [27].

**Figure 3.2** shows the deactivation profile of the enzyme in five different ILs ([bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]; [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] and [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]), in the presence and absence of substrate (PG).

### 3. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids



### 3. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids



**Figure 3.2.** Deactivation profiles of penicillin G acylase in different ionic liquids in presence (O, □, Δ, ◇,▽) and in absence (●,■,▲,◆,▼) of substrate (PG) at 40 °C. (A) [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; (B) [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]; (C) [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]; (D) [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]; (E) [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]. The depicted curves are theoretical and were obtained from the experimental data (points) by using the series-type deactivation model.

### 3. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids

The depicted curves represented in **Figure 3.2** are theoretical and were obtained from the experimental data (points) by using the series-type deactivation model. Good agreement between the experimental and theoretical data was taken as a correlation coefficient higher than 0.98 in each deactivation experiment. Deactivation profiles of PGA in 2-propanol in identical conditions (not depicted) showed similar deactivation profiles. Full enzyme deactivation was practically instantaneous in toluene and dichloromethane, so the only assayed organic solvent in which PGA showed significant stability at the assayed conditions was 2-propanol. The values calculated for the deactivation parameters ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $\alpha_1$  and  $t_{1/2}$ ) are included in **Table 3.1**.

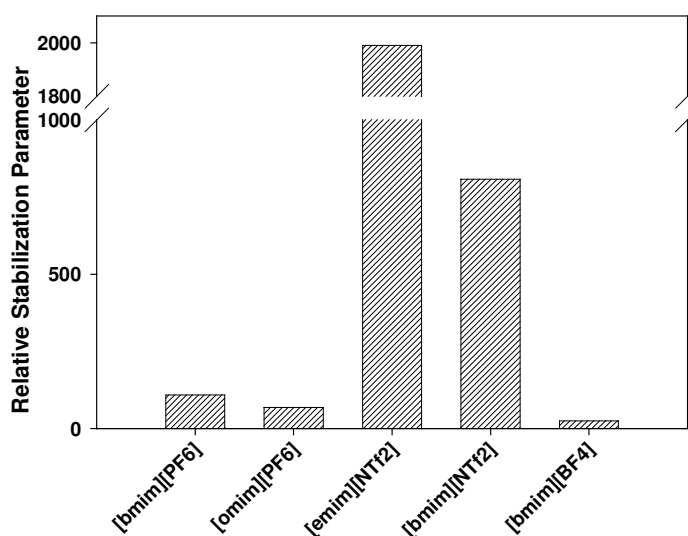
**Table 3.1.** Kinetic parameters of PGA deactivation in different media in absence of substrate (PG) at 40 °C obtained from the experimental data by using the series-type deactivation model.

medium	$\alpha_1$	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2 \times 10^4$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
[emim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.66	0.0193	2.06	1392.3
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.59	0.0157	1.33	565.0
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0.34	0.0188	2.01	76.1
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0.40	0.0351	5.00	47.7
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	0.33	0.0643	12.94	17.5
2-propanol	0.11	1.1834	240.59	0.7

In all cases the specific activity of the intermediate state ( $E_1$ ) was lower than the specific activity of the initial state, E, ( $\alpha_1 > 0$ ), whereas the final state ( $E_2$ ) was fully deactivated ( $\alpha_2 = 0$ , data not included in **Table 3.1**). As can be seen from **Table 3.1**, the  $k_1$  and  $k_2$  parameter values were clearly reduced in ILs and the half-life time of PGA in ILs was notably improved with respect to 2-propanol. The  $k_2$  parameter was very sensitive to the characteristics of the ILs, being considerably greater in the water-miscible IL.

To compare the effect of ILs on enzyme deactivation, a relative deactivation parameter can be defined as the ratio of PGA half-life time in these media and in an organic solvent, in this case, 2-propanol. It should be noticed how the presence of ILs enhance the stability of PGA and, in the case of [emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], an over-stabilization phenomenon is produced, increasing the half-life time by about 2000-fold with respect to 2-propanol (**Figure 3.3**).

### 3. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids



**Figure 3.3.** Relative stabilization parameter of PGA in several ionic liquids defined as the ratio of PGA half-life time in these media and in an organic solvent, 2-propanol, at 40°C.

The most important effect on PGA stability was observed by changing the nature of IL anions by comparing the half-life times of PGA in ionic liquids based on the same cation. As can be seen in **Table 3.1**, in ionic liquids containing the [bmim<sup>+</sup>] cation the half-life times increased in the following order: [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]. Bearing in mind the hydrophobicity sequence for the anions [BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] < [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] [28], the increase in half-life time was in agreement with the increase in this parameter. This could be explained by the fact the increase in hydrophobicity of the medium could allow the preservation of the essential water layer around the protein molecule, thus reducing direct protein-ion interactions. The low half-life time of PGA in [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], which is fully miscible with water, could be attributed to the interaction with the absolute amount of water indispensable for acquisition and maintenance of the catalytic conformation of the enzyme. This solvent could strip off the tightly bound water molecules, resulting in either alteration or sometimes distortion of the catalytic conformation and consequently result in deactivation of the enzyme [29].

The cation also exerts a strong effect on the denaturation of PGA, since the enzyme is more stable when suspended in the ILs containing cation with shorter 1-alkyl chain length. This effect was even more evident in the most hydrophobic ionic liquids, those based on [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] anions. This behavior has been also described by Basso et al. [24] using the enzyme in an immobilized form, PGA-450.

Incubation of the enzyme in ILs in the absence of substrates should be regarded as storage stability of the enzyme at 40 °C, which could be different from the stability

### 3. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids

behaviour in continuous operation [30]. To know the direct influence of the ionic liquid medium in these conditions on the enzyme, the stability of PGA was studied with the presence of substrate at 40 °C. The deactivation profiles depicted in **Figure 3.2** showed less activity decay in presence of substrate for those ILs based on hexafluorophosphate and tetrafluoroborate anions, allowing quantification of the extremely good half-life times presented in **Table 3.2**.

**Table 3.2.** Kinetic parameters of PGA deactivation by continuous operation in different media in presence of substrate (PG) at 40°C obtained from the experimental data by using the series-type deactivation model.

medium	$\alpha_1$	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2 \times 10^4$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0.67	0.0121	4.51	669.9
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	0.31	0.0078	91.70	165.7
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.07	0.0070	5.24	114.7
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	0.47	0.0435	4.13	79.5
[emim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0.28	0.0258	0.16	42.5

For example, the half-life time of PGA in [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] was increased about 9 times with respect to the incubation without substrates. The specific interaction of substrates with the active site of the enzyme should be borne in mind to explain these results, such interaction preventing the rapid enzyme deactivation that occurs in the absence of substrates. To our disappointment, PGA showed less stability in ILs based on bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide anions in presence of substrate. These ILs are the most hydrophobic ones within the assayed ionic liquid media and so involves an increase in free water molecules, which can act as nucleophile substrate. This fact together with the highest enzyme stability in the ILs based on [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] anions in the absence of substrate could cause the hydrolysis of PG in the incubation medium, yielding the hydrolytic products (PAA and 6-APA), which has been reported to inhibit PGA [31-32]. This issue is now being investigated further.



#### 3.4. CONCLUSIONS

We have shown that native PGA exhibits higher stability in the assayed ILs than in an organic solvent such as 2-propanol at low water content. A half-life time of 23 h. was obtained in 1-ethyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide ([emim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]) which was about 2000-fold higher than that in 2-propanol. It was found that the presence of substrate greatly improved enzyme stability in ionic liquids based on the tetrafluoroborate and hexafluorophosphate anions. Accordingly, the potential advantages of these new solvents, together with the unique stabilization effect on PGA, may open up the possibility to development of new biocatalytic processes for the production of semisynthetic  $\beta$ -lactam antibiotics and the resolution of racemic compounds, particularly for the production of enantiomerically pure amines.

#### 3.5. NOMENCLATURE

E	specific activity of the initial state ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{ mg protein}^{-1}$ )
E <sub>1</sub>	specific activity of the intermediate state ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{ mg protein}^{-1}$ )
E <sub>2</sub>	specific activity of the final state ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\text{ mg protein}^{-1}$ )
k <sub>1</sub> , k <sub>2</sub>	first-order deactivation rate constants ( $\text{min}^{-1}$ )
$\alpha_1$	ratio of specific activities E <sub>1</sub> /E
$\alpha_2$	ratio of specific activities E <sub>2</sub> /E
$\alpha$	residual activity
t <sub>1/2</sub>	half-life time (min)

#### 3.6. REFERENCES

- [1] A. Illanes, S. Anjari, R. Arrieta, C. Aguirre, Optimization of yield in kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in organic media, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 97 (2002) 165-180.
- [2] P. Travascio, E. Zito, M. Portaccio, V. Grano, S. Di Martino, T. Bertolini, S. Rossi, D.G. Mita, Enzyme reaction engineering: Effect of methanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized penicillin G acylase under isothermal and non-isothermal conditions, *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 975-985.
- [3] A. Illanes, A. Fajardo, Kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin in the presence of organic cosolvents, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 11 (2001) 587-595.
- [4] A. Basso, L. De Martín, C. Ebert, L. Gardossi, P. Linda, V. Zlatev, Activity of covalently immobilised PGA in water miscible solvents at controlled  $a_w$ , *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 11 (2001) 851-855.
- [5] A. Basso, P. Braiuca, C. Ebert, L. Gardossi, P. Linda, F. Benedetti, GRID / Tetrahedral intermediate computational approach to the study of selectivity of penicillin G acylase in amide bond synthesis, *Biochim. Biophys. Acta* 160 (2002) 85-92.
- [6] L.A. Blanchard, D. Hancu, E.J. Beckman, J.F. Brenneke, Green processing using ionic liquids and CO<sub>2</sub>, *Nature* 399 (1999) 28-29.
- [7] C. Carboni, P.J.L.M. Quaedflieg, Q.B. Broxterman, P. Linda, L. Gardossi, Quantitative enzymatic protection of D-amino acid methyl esters by exploiting "Relaxed" enantioselectivity of penicillin-G amidase in organic solvent, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 9649-9652.
- [8] D. Roche, K. Prasad, O. Repic, Enantioselective acylation of B-aminoesters using penicillin G acylase in organic solvents, *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 3665-3668.
- [9] M. Kosmulski, J. Gustafsson, J.B. Rosenholm, Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited, *Thermochim. Acta* 412 (2004) 47-53.
- [10] S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO<sub>2</sub> systems, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.

### 3. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids

---

- [11] J.M. Pringle, J. Golding, K. Baranyai, C.M. Forsyth, G.B. Deacon, J.L. Scott, D.R. MacFarlane, The effect of anion fluorination in ionic liquids-Physical properties of a range of bis(methanesulfonyl)amide salts, *New J. Chem.* 27 (2003) 1504-1510.
- [12] S.J. Nara, S.S. Mohile, J.R. Harjani, P.U. Naik, M.M. Salunkhe, Influence of ionic liquids on the rates and regioselectivity of lipase-mediated biotransformations on 3,4,6-tri-O-acetyl- $\beta$ -glucal, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 28 (2004) 39-43.
- [13] M. Eckstein, M. Sesing, U. Kragl, P. Adlercreutz, At low water activity  $\alpha$ -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 867-872.
- [14] J.A. Berberich, J.L. Kaar, A.J. Russell, Use of salt hydrate pairs to control water activity for enzyme catalysis in ionic liquids, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1029-1032.
- [15] P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J.L. Iborra, Criteria to desing green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 661-669.
- [16] M. Noël, P. Lozano, M. Vaultier, J.L. Iborra, Kinetic resolution of *rac*-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 301-306.
- [17] M.-J. Kim, M.Y. Choi, J.K. Lee, Y. Ahn, Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: Significantly enhanced reactivity and regioselectivity, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 26 (2003) 115-118.
- [18] D. Dinelli, Fiber-entrapped enzymes, *Process. Biochem.* 7 (1972) 9-12.
- [19] L.R.B. Gonçalves, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, R.L.C. Giordano, A kinetic study of synthesis of amoxicillin using penicillin G acylase immobilized on agarose, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84 (2000) 931-946.
- [20] W. Marconi, F. Cecere, F. Morisi, G. Della Penna, B. Rappuoli, The hydrolysis of penicillin G to 6-amino penicillanic acid by entrapped penicillin acylase, *J. Antibiot.* 26 (1973) 228-232.
- [21] E. Andersson, B. Mattiasson, B. Hahn-Hagerdal, Enzymatic conversion in aqueous two-phase systems: Deacylation of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid with penicillin acylase, *Enzyme Microb. Technol.* 6 (1984) 301-306.

### 3. Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids

---

- [22] L.C. Liao, C.S. Ho, W.T. Wu, Bioconversion with whole cell penicillin acylase in aqueous two-phase systems, *Process Biochem.* 34 (1999) 417-420.
- [23] P. Dhal, G.N. Babu, S. Sudhakaran, S.P. Borkar, Immobilization of penicillin acylase by covalent linkage on vinyl copolymers containing epoxy groups, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 6 (1985) 91-95.
- [24] A. Basso, S. Cantone, P. Linda, C. Ebert, Stability and activity of immobilised penicillin G amidase in ionic liquids at controlled  $a_w$ , *Green Chem.* 7 (2005) 671-676.
- [25] C.D. Lindsay, R.H. Pain, The folding and solution conformation of penicillin G acylase, *Eur. J. Biochem.* 192 (1990) 133-141.
- [26] A. Sadana, J.P. Henley, Single-step unimolecular non-firstorder enzyme deactivation kinetics, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1987) 717-723.
- [27] A.M. Azevedo, L.P. Fonseca, D.M.F. Prazeres, Stability and stabilisation of penicillin acylase, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (1999) 1110-1116.
- [28] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [29] S.J. Nara, J.R. Harjani, M.M. Salunkhe, Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: A comparative study, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 2979-2982.
- [30] A. Illanes, C. Altamirano, M.E. Zuñiga, Thermal inactivation of immobilized penicillin acylase in the presence of substrate and products, *Biotechnol. Bioeng.* 50 (1996) 609-616.
- [31] A. Erarslan, A. Guray, Kinetic investigation of penicillin G acylase from a mutant strain of *Escherichia Coli* ATCC 11105 Immobilized on oxirane-acrylic beads, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 51 (1991) 181-195.
- [32] M.H.A. Janssen, L.M. van Langen, S.R.M. Pereira, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration, *Biotechnol. Bioeng.* 78 (2002) 425-432.



# 4

## **Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol using supported liquid membranes based on ionic liquids**

A membrane bioreactor containing a supported liquid membrane based on ionic liquids was successfully applied to the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol catalysed by a commercial immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). Variables affecting the performance of the above bioreactor were studied. First of all, six ionic liquids were tested for use as liquid membrane phase supported in a Nylon membrane for the selective transport of the compounds involved in the reaction. The most suitable liquid membrane phase for the selective separation of the target compounds was [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]. Furthermore, the influence of the water content of the medium on the synthetic activity, selectivity and enantioselectivity of the enzyme was analysed in order to establish the optimal amount of water. Finally, the integrated reaction/separation process for the resolution of *rac*-1-phenylethanol was carried out at the optimal conditions. The effect of the enzyme concentration in the feed compartment on the efficiency of the integrated reaction/separation process was studied, and it was found that this parameter increased with increasing concentration of the enzyme within the experimental range assayed. Furthermore, when the effect of different vinyl esters as acyl-donors was analysed it was concluded that the efficiency of the overall process was enhanced with increasing alkyl chain length of the vinyl ester.



#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

#### 4. INTEGRATED REACTION/SEPARATION PROCESSES FOR THE KINETIC RESOLUTION OF RAC-1-PHENYLETHANOL USING SUPPORTED LIQUID MEMBRANES BASED ON IONIC LIQUIDS

##### 4.1. INTRODUCTION

Efficient methodologies for the production of enantiomerically pure or enriched compounds are of great academic and industrial importance, for which purpose (bio)catalytic kinetic resolution has been found to be an attractive option [1-2]. Lipase-catalyzed acylation of chiral alcohols is of particular interest as a preparative tool and as a benchmark reaction [1,3,4]. However, the main disadvantage for its practical application lies from the necessity to use chromatography for separation of the alcohol and ester, requiring the use of large volumes of organic solvents. A promising alternative to overcome this disadvantage is the use of enzymatic membrane reactors [5-7]. Due to their simplicity and wide applicability, enzymatic membrane reactors have received a great deal of attention as it is capable of integrating kinetic resolution and product separation into a single operation [8]. In this sense, some authors [9, 10] reported the kinetic resolution of chiral alcohols in transesterification processes performed in reactors containing different membrane configurations: hollow-fibre membrane [9], bifunctional polymer membrane [10], etc., which led to chiral products of high purity.

Among membrane-based processes, the use of supported liquid membranes (SLMs), porous supports whose pores are filled with a liquid, has numerous advantages such as the minimal amount of solvent needed and the fact that the processes of extraction and stripping are combined into one single stage [11]. Nevertheless, their industrial application is still limited, mainly due to concerns about SLM stability and long-term performance [12,13]. Supported liquid membranes with conventional liquids eventually deteriorate due to liquid vaporization, dissolution into a contacting phase, and displacement from the porous structure under low-pressure gradient (<10 kPa). The use of room temperature ionic liquids (ILs) as an immobilized phase in a supporting membrane is particularly interesting in this respect.

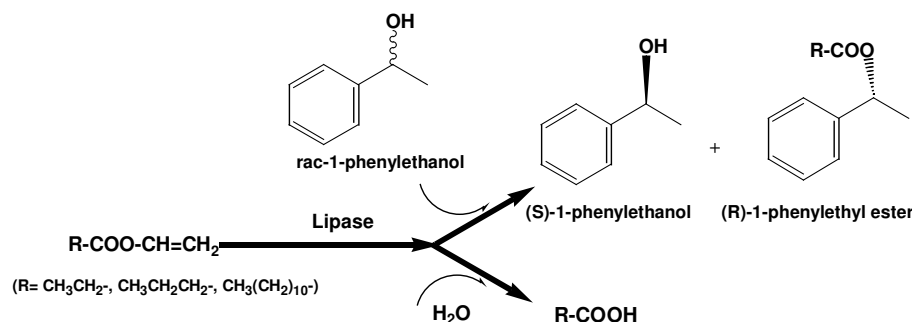
Ionic liquids (ILs) have recently been revealed as interesting clean alternatives to classical organic solvents [14]. They are organic salts that are liquid close to room temperature and which normally consist of an organic cation (usually dialkylimidazolium and tetraalkylammomium salts), and a polyatomic inorganic anion (e.g.  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ) [15]. Ionic liquids have been shown to be good solvents for a wide variety of chemical processes (e.g., extraction, reaction media, chemical catalysis, etc.) [16-18]. The use of these new solvents as a liquid membrane phase results in the stabilization of the SLMs due to their negligible vapour pressure, the possibility of



#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

minimizing their solubility in the surrounding phases by adequate selection of the cation and anion [19,20], and the greater capillary force associated with their high viscosity, which could reduce displacement of the liquids from the micron pores under pressure. Unlike the solvents previously used in SLMs, ILs possess other unique properties that are interesting in the context of liquid membranes. For instance, ILs show high thermal stability [21], high ion conductivity [21] and are non-flammable. Furthermore, they dissolve a wide range of inorganic and organic compounds [22,23] while being immiscible with many organic solvents [24] and even with water in some cases.

Recently, some researchers have reported that SLMs based on ILs can be used for the selective transport of organic compounds such as alcohols, esters, acids, ketones and amines [19,20,25,26]. In the present study, for the first time, a lipase-catalysed reaction has been combined with a supported liquid membrane based on ionic liquids to achieve the selective separation of *rac*-1-phenylethanol. The performance of the membrane bioreactor containing an SLM based on ionic liquids for the kinetic resolution of racemic 1-phenylethanol by transesterification with a vinyl ester catalysed by a commercial immobilized *Candida antarctica* lipase B (CaLB) (**Scheme 4.1**) was analysed. More specifically, the effect of various process variables including the nature of the liquid membrane phase, the water content of the medium, the enzyme concentration in the feed compartment and the nature of the vinyl esters used as acyl-donor, on the separation efficiency were investigated.



**Scheme 4.1.** Stoichiometric scheme of kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol catalyzed by CaLB.

## 4.2. EXPERIMENTAL

### 4.2.1. Materials

A commercial lipase (EC 3.1.1.3) was used as catalyst: *Candida antarctica* lipase B immobilized on a macroporous acrylic resin (Novozym 435), which was a gift from Novo España S.A. (Madrid, Spain).

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

Hydrophilic Nylon<sup>®</sup> -polyamide- membranes (25 mm diameter, 0.45  $\mu\text{m}$  pore size, 170 $\mu\text{m}$  thickness) were used as supporting membranes, which were supplied by Millipore S.A. (Madrid, Spain).

The ionic liquids 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] (purity > 99%), 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] (purity > 99%), 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] (purity > 99%), 1-octyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] (purity > 99%) were purchased from Solvent Innovation GmbH (Cologne, Germany). 1-Butyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide, [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (purity > 99%) was purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain) and 1-octyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide, [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (purity > 99%) from Merck KgaA (Darmstadt, Germany).

*rac*-1-Phenylethyl laurate was synthesized as describes in section 4.2.2. Other substrates, solvents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain), and were of the highest purity available. Solvents and reactants were dehydrated with 3Å molecular sieves before use.

#### **4.2.2. Chemical synthesis of racemic 1-phenylethyl laurate**

Racemic 1-phenylethyl laurate was obtained according to the following procedure. To a cooled (0°C, ice bath) solution of *rac*-1-phenylethanol (81.5 mmol) and pyridine (97.2 mmol) in dry diethyl ether (80 ml), lauryl chloride (97.2 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. After that time, the reaction mixture was diluted with diethyl ether and washed with 0.1 M aqueous HCl, water, saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and finally with water again. The ether solution was dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated and crude product was purified by column chromatography (silica gel, hexane-ethyl acetate, 22:1). The yield of the reaction was 76%. The compound was analysed by <sup>1</sup>H NMR (Varian Unity 300 spectrometer) and by IR (Perkin-Elmer 1430 spectrophotometer). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$ 0.90 (t, 3H), 1.28 (m, 16H), 1.55 (d, 3H), 1.64 (m, 2H), 2.39 (t, 2H), 5.91 (q, 1H), 7.29-7.37 (m, 5H). <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): 14.07, 22.21, 22.64, 24.92, 29.04, 29.21, 29.29, 29.41, 29.55, 31.87, 34.56, 71.93, 125.98, 127.71, 128.39, 141.80, 173.01.

#### **4.2.3. Preparation of supported liquid membranes**

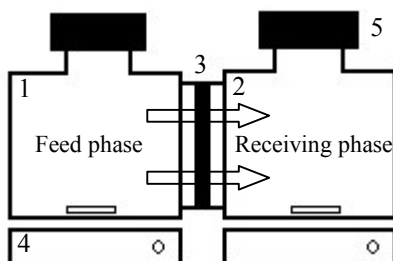
Immobilization was achieved by placing the membrane in a 10 mL Amicon<sup>TH</sup> ultrafiltration unit and adding 3 mL of ionic liquid. Nitrogen pressure at 2 bar was applied, and the ionic liquid flowed through the pores of the membrane. The pressure was released once a thin layer of ionic liquid was left on the upper surface of the membrane. This procedure was repeated three times to ensure that all the membrane pores were filled with liquid since the ionic liquids used are quite viscous. Then, the

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

membrane was left to drip overnight to remove the excess ionic liquid from the membrane surface.

##### 4.2.4. Experimental setup

The experimental setup consisted on a glass diffusion cell with two independent compartments, 30 mL each, separated by the SLM (**Figure 4.1**). O-rings were inserted on each side of the SLM. The entire assembly was held together by a threaded connector.



**Figure 4.1.** Schematic illustration of the glass diffusion cell set up with two independent compartments used for experiments: 1) feed solution containing solutes; 2) receiving solution containing fresh solvent; 3) supported liquid membrane; 4) magnetic stirrer; 5) septum.

##### 4.2.5. Transport studies

The transport of *rac*-1-phenylethanol, vinyl propionate, *rac*-1-phenylethyl propionate, propionic acid, vinyl butyrate, *rac*-1-phenylethyl butyrate, butyric acid, vinyl laurate, *rac*-1-phenylethyl laurate and lauric acid through the SLMs at 30 °C was evaluated. In each experiment, the initial solute concentrations in the feed phase were 100 mM in n-hexane. n-Hexane was used as a receiving phase in all cases. The transport experiment was begun by adding 30 mL of each solution to their respective compartments. The solute concentrations were monitored by sampling 100  $\mu$ L of each compartment at regular time intervals during a 48 h period. An hexane solution of butyl butyrate (internal standard) (100  $\mu$ L, 60 mM) and n-hexane (800  $\mu$ L) were added to the sampling vials and the resulting solution (5  $\mu$ L) was analyzed by GC as described in section 4.2.8.1.

Solute transport was analyzed by the permeability parameter ( $\bar{P}$ ), which was calculated using Eq. (4.1) [20], from the slope of the plot of  $\ln [(C_0 - 2 C_r) / C_0]$  versus  $t$ :

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

$$\ln \left[ \frac{(C_0 - 2C_r)}{C_0} \right] = \frac{-2 \bar{P} A}{V} t \quad (4.1)$$

where  $C_0$  is initial solute concentration in the feed phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $C_r$  is the solute concentration in the receiving phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $A$  is the membrane area ( $\text{cm}^2$ ) and  $V$  is the volume of the compartments (mL).

Furthermore, the average permselectivity ( $r\bar{P}$ ) of the membrane [20] was determined as a numerical criterion to compare the ability of the supported liquid membrane to separate the target compounds (Eq. 4.2).

$$r\bar{P} = \frac{\sum_i^n rP_i}{n} \quad \text{with } rP_i > 1 \quad (4.2)$$

where  $rP_i$  is the membrane permselectivity between two compounds (e.g. 1-butanol and vinyl butyrate) and  $n$  is the number of possible pairs of different compounds.  $rP_i$  can be expressed as follows:

$$rP_i = \frac{\bar{P}_A}{P_B} \quad (4.3)$$

This parameter indicates the efficiency of the membrane in separating the compounds: the higher  $r\bar{P}$ , the more selective it is in separating the target compounds.

#### 4.2.6. Reaction studies

In all reaction experiments performed, reaction medium consisted of the stoichiometric mixture of substrates and different percentages of added water. Vinyl ester (1 mmol), *rac*-1-phenylethanol (1 mmol) and the corresponding amount of water were added into 22 mL screw-capped vials and n-hexane was added up to 10 ml total volumen. The water content was controlled by Karl Fisher titration as described in section 4.2.8.2. The reaction was started by adding 26.6 mg of Novozym 435 and run for 2 h at 30°C. At regular time intervals, 30  $\mu\text{L}$  aliquots were taken, diluted with 470  $\mu\text{L}$  n-hexane and cooled in ice bath. Then, 400  $\mu\text{L}$  of the hexane solution were added to 100  $\mu\text{L}$  30 mM internal standard (butyl butyrate) in n-hexane and 5  $\mu\text{L}$  of the resulting solution was analyzed by GC as described in section 4.2.8.1. All experiments were carried out in duplicate and mean values are reported. The efficiency of the catalytic action was

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

measured by three parameters: the synthetic activity (U), defined as the amount of enzyme that produces 1  $\mu\text{mol}$  of ester per minute, the selectivity as the ratio between this parameter and the acyl-donor consumption rate, which takes into account the competitive hydrolytic reaction of the acyl-donor (see **Scheme 4.1**) and the enantiomeric excess of the synthetic product which is determined using Eq. (4.4):

$$e.e(\%) = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \times 100 \quad (4.4)$$

where  $C_R$  and  $C_S$  are the concentration of the (R) and (S) enantiomer, respectively.

##### **4.2.7. Reaction/separation studies**

The reaction/separation experiments were performed at 30°C using the experimental setup shown in Figure 4.1. Typically, the feed phase consisted of 100 mM (rac)-1-phenylethanol and 100 mM vinyl ester in n-hexane and the receiving solution was n-hexane. The corresponding amount of immobilized enzyme (Novozym 435) was placed into the feed compartment and the experiment was begun by adding 30 mL of each solution into their respective compartments. Both compartments were mechanically stirred. The reaction/separation process was monitored by GC, sampling 100  $\mu\text{L}$  of each compartment at regular time intervals during 72 h. A hexane solution of butyl butyrate (internal standard) (100  $\mu\text{L}$ , 60 mM) and n-hexane (800  $\mu\text{L}$ ) were added to the sampling vials and the resulting solution (5  $\mu\text{L}$ ) was analyzed by GC as described in section 4.2.8.1.

To determine the efficiency of the separation of the two enantiomeric forms in the integrated reaction/separation process, the separation factor ( $\alpha_{S/R}$ ) was calculated using Eq. (4.5).

$$\alpha_{S/R} = \frac{\frac{C_{r,S}}{C_{f,S}}}{\frac{C_{r,R}}{C_{f,R}}} \quad (4.5)$$

where  $C_{r,S}$  and  $C_{r,R}$  are the concentration of the (S) and (R) enantiomer in the receiving phase, respectively, and  $C_{f,S}$  and  $C_{f,R}$  are the concentration of the (S) and (R) enantiomer in the feed phase, respectively.

## 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

### 4.2.8. Analytical methods

#### **4.2.8.1. Gas chromatographic analysis**

GC analysis was performed with a Hewlett Packard 6890 instrument equipped with FID detector and a  $\beta$  DEX-120 capillary column (30m  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25 $\mu$ m, Supelco), in the following conditions: carrier gas (He) at 19.9 psi (1.9 mL/min total flow), split ratio: 30/1; detector: 300 °C.

*Resolution of 1-phenylethanol with vinyl propionate:* 2 min at 60 °C, then 15 °C/min to 120 °C followed by 20 min at 120 °C. Retention times of the peaks were as follows: n-hexano, 2.6 min; vinyl propionate, 3.1 min; propionic acid, 6.7 min; butyl butyrate (internal standard), 7.4 min; (R)-1-phenylethanol, 17.1 min; (S)-1-phenylethanol, 17.8 min; (S)-1-phenylethyl propionate, 21.4 min; and (R)-1-phenylethyl propionate, 21.9 min.

*Resolution of 1-phenylethanol with vinyl butyrate:* 2 min at 60 °C, then 15 °C/min to 120 °C followed by 30 min at 120 °C. Retention times of the peaks were as follows: n-hexano, 2.6 min; vinyl butyrate, 4.2 min; butyric acid, 8.3 min; butyl butyrate (internal standard), 7.4 min; (R)-1-phenylethanol, 17.1 min; (S)-1-phenylethanol, 17.8 min; (S)-1-phenylethyl butyrate, 31.0 min; and (R)-1-phenylethyl butyrate, 31.6 min.

*Resolution of 1-phenylethanol with vinyl laurate:* 2 min at 60 °C, 15 °C/min to 120 °C, 13 min at 120 °C, 15 °C/min to 190 °C followed by 60 min at 190 °C. Retention times of the peaks were as follows: n-hexano, 2.6 min; butyl butyrate (internal standard), 7.4 min; (R)-1-phenylethanol, 17.1 min; (S)-1-phenylethanol, 17.8 min; vinyl laurate, 26.9 min; lauric acid, 30.4 min; (rac)-1-phenylethyl laurate, 67.3 min.

#### **4.2.8.2. Water content analysis**

The water content of the liquid phase was measured with a Metrohm 831 KF coulometric Karl Fisher apparatus. For that a sample weighed exactly was titrated by using HYDRANAL-Coulomat AG (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Madrid, Spain) as the Karl Fischer reagent.

## **4.3. RESULTS AND DISCUSSION**

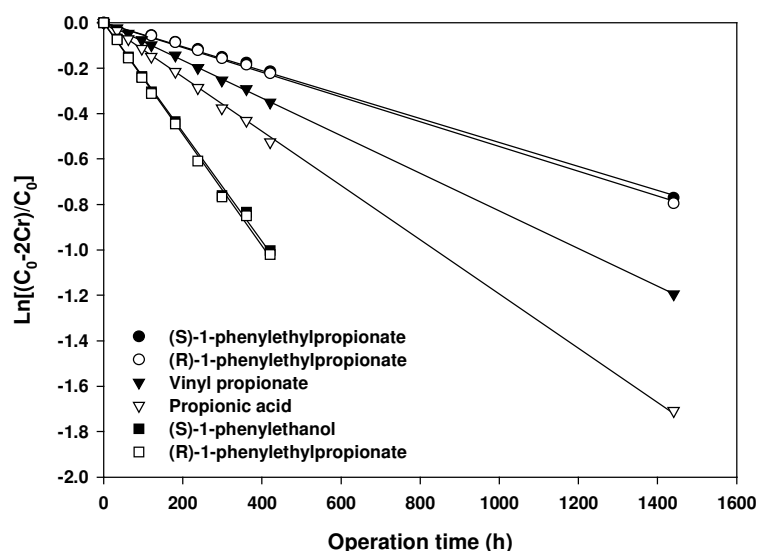
### **4.3.1. Selection of the supported liquid membrane**

In a first set of experiments, the permeability of the compounds involved in the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol by transesterification with vinyl propionate ((R)-1-phenylethanol, (S)-1-phenylethanol, vinyl propionate, (R)-1-phenylethylpropionate, (S)-1-phenylethylpropionate and propionic acid) through different SLMs based on ionic liquids was analyzed in order to investigate the influence of the ionic liquid phase on the solute transport. Since in previous works [20] the hydrophilic/ hydrophobic character of the IL was shown to be a key factor in the selective separation of transesterification

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

reaction products, ILs with quite different hydrophilic/ hydrophobic character have been chosen for the present study. These ionic liquids were based on two 1-alkyl-3-methylimidazolium cations, n-butyl and n-octyl, and three different anions, namely, hexafluorophosphate ( $\text{PF}_6^-$ ), tetrafluoroborate ( $\text{BF}_4^-$ ) and bis{(trifluoromethyl)sulfonyl} imide ( $\text{NTf}_2^-$ ).

The experimental concentrations of (R)-1-phenylethanol, (S)-1-phenylethanol, vinyl propionate, (R)-1-phenylethylpropionate, (S)-1-phenylethylpropionate and propionic acid in the feed and receiving phases as a function of run time were monitored, using the concentrations in the receiving phase to calculate the individual permeability ( $P$ ) of the species. In this way, the permeability values were calculated from the slopes of the plots of  $\ln[(C_0 - 2C_t)/C_0]$  for each compound versus  $t$  using Eq. (4.2). As an example, **Figure 4.2** shows the plots used for the calculation of the compound permeabilities through the Nylon membrane with immobilized  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ .



**Figure 4.2.** Plots of  $\ln[(C_{A0} - 2C_t)/C_{A0}]$  vs. operation time for the transport of (R)-1-phenylethanol, (S)-1-phenylethanol, vinyl propionate, (R)-1-phenylethylpropionate, (S)-1-phenylethylpropionate and propionic acid through Nylon membrane with supported  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  (conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.).

The permeability values for each compound through the different supported liquid membranes are presented in **Table 4.1**. As can be seen, the use of  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  and  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  as liquid membrane phase resulted in a lower permeability values of all compounds with respect to those obtained for others ILs. In addition, no significant permeability differences between (R)-1-phenylethanol and (S)-1-phenylethanol or

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

between (R)-1-phenylethyl propionate and (S)-1-phenylethyl propionate were observed with the assayed SLMs. However, substantial permeability differences were found related with the functional group of the compounds, increasing in the order: ester < acid < alcohol.

**Table 4.1.** Effect of the ionic liquid membrane on the transport of ((R)-1-phenylethanol, (S)-1-phenylethanol, vinyl propionate, (R)-1-phenylethyl propionate, (S)-1-phenylethyl propionate and propionic acid.

SLM	Permeability $\times 10^6$ (cm/s)					
	(R)-1-phenylethanol	(S)-1-phenylethanol	Vinyl propionate	(R)-1-phenylethyl propionate	(S)-1-phenylethyl propionate	Propionic acid
Nylon with [bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	152.0	151.7	21.6	13.1	11.7	107.7
Nylon with [bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	43.1	42.5	12.7	6.6	6.3	23.2
Nylon with [bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	147.7	144.6	49.9	32.8	31.7	71.9
Nylon with [omim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	157.5	156.2	42.7	28.8	27.7	98.8
Nylon with [omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	59.4	59.2	38.6	17.1	15.8	34.3
Nylon with [omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	148.6	148.7	77.4	51.4	49.7	78.8

Conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.

The average permselectivities of the SLMs were calculated and are presented in **Table 4.2**.

**Table 4.2.** Average Permselectivity of the assayed SLMs.

Ionic liquid	Average Permselectivity
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	6.3
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	3.5
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	2.6
[omim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	3.1
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	2.2
[omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	1.9



#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

As can be observed in this table, the SLM based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was the most suitable SLM for the selective separation of the target compounds since it exhibited the highest average permselectivity value. Furthermore, it was observed that the average permeoselectivity values increased for a given cation in the sequence: [NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] < [PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], and for a given anion, in the sequence: [omim<sup>+</sup>] < [bmim<sup>+</sup>], which is in perfect agreement with the increase in the hydrophilicity of the IL [27].

Since the SLM based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was seen to be the most suitable supporting liquid membrane, the permeability of the compounds involved in the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol by transesterification with vinyl butyrate and vinyl laurate ((*R*)-1-phenylethanol, (*S*)-1-phenylethanol, vinyl butyrate, (*R*)-1-phenylethyl butyrate, (*S*)-1-phenylethyl butyrate, butyric acid, vinyl laurate, (*R*)-1-phenylethyl laurate, (*S*)-1-phenylethyl laurate and lauric acid) through SLMs based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was also analysed. The permeability values for each compound and the average permselectivity obtained are presented in **Table 4.3**.

**Table 4.3.** Permeability values of (*R*)-1-phenylethanol, (*S*)-1-phenylethanol, vinyl butyrate, (*R*)-1-phenylethyl butyrate, (*S*)-1-phenylethyl butyrate, butyric acid, vinyl laurate, (*R*)-1-phenylethyl laurate, (*S*)-1-phenylethyl laurate and lauric acid through the SLM based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>].

Compound	Permeability × 10 <sup>6</sup> (cm/s)	Average Permselectivity
<b>Reaction system 2</b>		
( <i>R</i> )-1-phenylethanol	134.18	10.98
( <i>S</i> )-1-phenylethanol	133.24	
Vinyl butyrate	9.66	
( <i>R</i> )-1-phenylethyl butyrate	4.41	
( <i>S</i> )-1-phenylethyl butyrate	4.43	
Butyric acid	51.35	
<b>Reaction system 3</b>		
( <i>R</i> )-1-phenylethanol	105.97	711.7
( <i>S</i> )-1-phenylethanol	105.15	
Vinyl laurate	0.09	
( <i>R</i> )-1-phenylethyl laurate	0.06	
( <i>S</i> )-1-phenylethyl laurate	0.06	
Lauric acid	0.09	

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

As can be observed in this table, the average permselectivity values increased with the increase in the alkyl chain length of the vinyl ester used as acyl donor, which was mainly due to the fact that higher differences between the permselectivity values of racemic alcohols and the alkyl esters formed were reached in those cases.

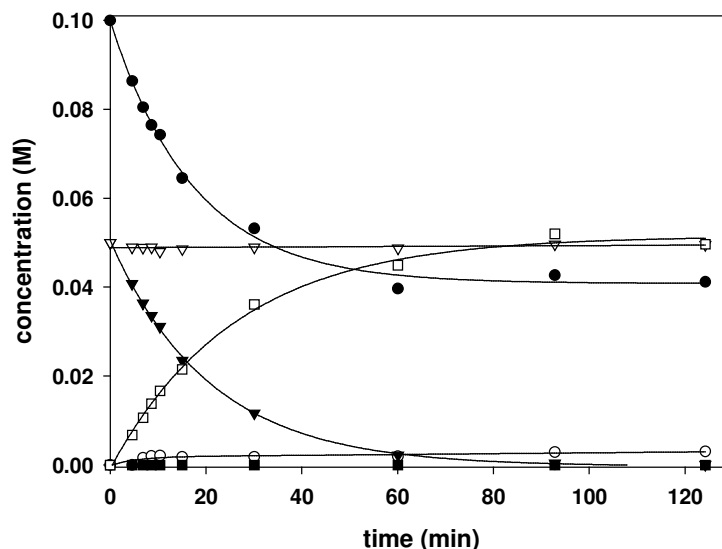
Since the SLM based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was seen to be the most suitable supporting liquid membrane, all further studies were conducted with this SLM.

##### 4.3.2. Kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol in n-hexane: effect of vinyl ester and water content

The kinetic resolutions of *rac*-1-phenylethanol catalysed by immobilized *Candida antarctica* lipase B (CaLB) were studied using three acyl donors (vinyl propionate, vinyl butyrate and vinyl laurate) in n-hexane at 30 °C and different water contents. n-Hexane was used as reaction medium because it was the solvent used as feed and receiving phase in the reaction/separation experiments. As a kinetically controlled process catalyzed by a serine hydrolase (CaLB), the transformation of the vinyl ester is highly dependent on the nucleophile acceptors present in the reaction medium and involves a competitive distribution of the rapidly formed acyl-enzyme intermediate between water (hydrolysis) or another nucleophile reagent, such as *rac*-1-phenylethanol (transesterification) (see **Scheme 4.1**). In this way, the latter synthetic pathway can be enhanced by the use of activated acyl-donors [28,29], such as vinyl esters, very low water content media and high nucleophile (e.g. *rac*-1-phenylethanol) concentration. In this context, the efficiency of the resolution of *rac*-1-phenylethanol can be measured by three parameters, the synthetic activity, the selectivity for the synthetic reaction and the enantiomeric excess (e.e) of the synthetic product.

As an example, **Figure 4.3** shows the time course of the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol catalysed by immobilized CaLB in n-hexane using vinyl propionate as acyl donor, at 50 ppm water content and 30°C.

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol



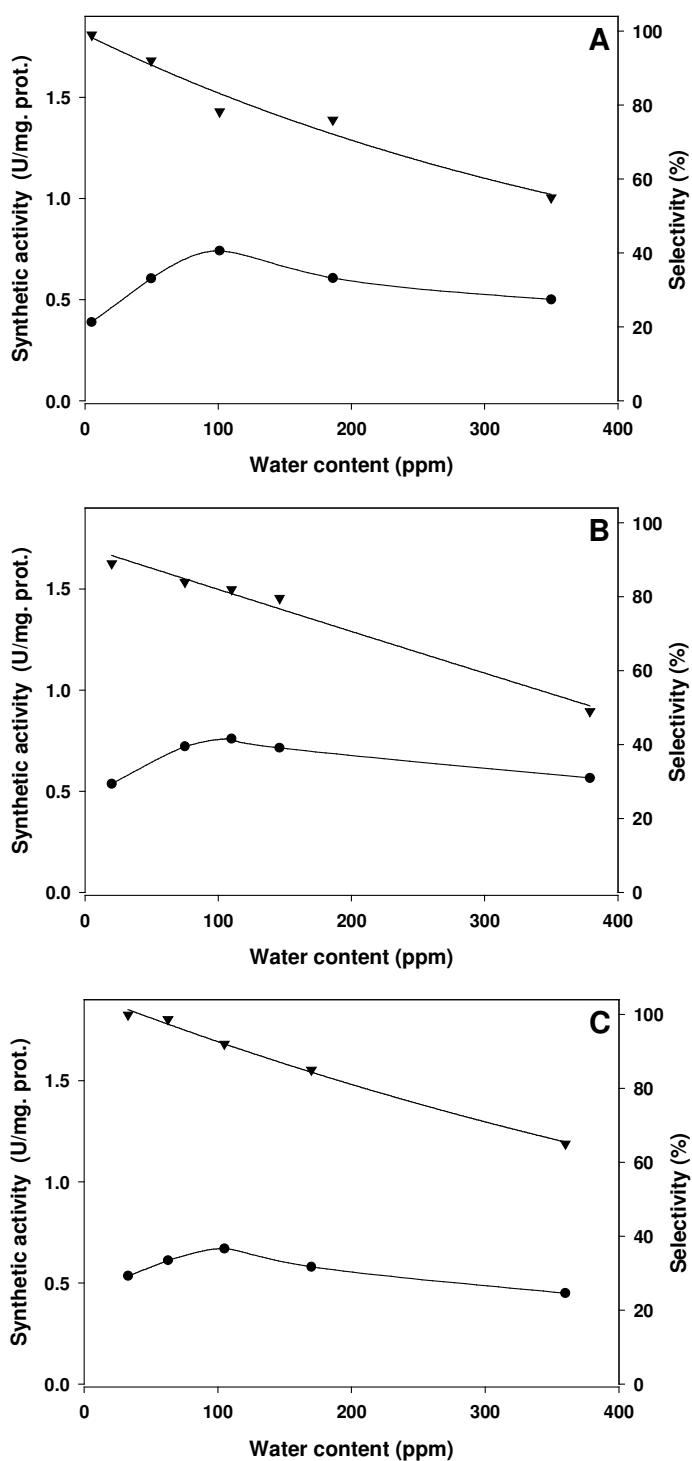
**Figure 4.3.** Time-course of CaLB-catalyzed kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol in n-hexane at 50 ppm water content and 30°C, using vinyl propionate (●) as acyl donor. (▼) (R)-1-Phenylethanol, (▽) (S)-1-phenylethanol, (□) (R)-1-phenylethyl propionate, (■) (S)-1-phenylethyl propionate, (○) propionic acid.

As can be seen, the consumption of acyl-donor substrate (vinyl propionate) is followed by a concomitant increase in both synthetic (1-phenylethyl propionate) and hydrolytic (propionic acid) products. The consumption of *rac*-1-phenylethanol exactly fit with the synthesis of the corresponding ester, which in all cases is (R)-1-phenylethyl propionate in a high enantiomeric excess (e.e. > 99.99%).

The synthetic activity, selectivity and enantioselectivity of immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) for the racemic resolution of *rac*-1-phenylethanol was determined at 30°C, using the different vinyl esters (vinyl propionate, vinyl butyrate and vinyl laurate) as acyl donors and different water contents (from 5 to 380 ppm). The control of the water content of the media is necessary because a minimal amount of water seems to be essential for the activity of most biocatalysts [29,30].

**Figure 4.4** shows the evolution of the synthetic activity and selectivity exhibited by CaLB for the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol with the different vinyl esters as a function of the water content.

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol



**Figure 4.4.** Synthetic activity (●) and selectivity (▼) exhibited by CaLB in the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol in *n*-hexane at 30°C, as a function of the water content, using vinyl propionate (A), vinyl butyrate (B), vinyl laurate (C) as acyl donors.

#### **4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol**

As can be observed, for all vinyl esters the synthetic activity exhibited by CaLB showed a bell curve, with a maximum at about 100 ppm water content and after this optimum, the synthetic activity decreased with increasing amounts of water. On the other hand, an increase in the water content led to a decrease in the selectivity within the experimental interval. As expected, the increase in the water content favoured the hydrolytic pathway of the catalytic mechanism. It is worth noting that not important differences in activity and selectivity were found for the different vinyl esters used. Regarding to the enantioselectivity, the (*S*)-1-phenylethyl propionate product was never detected, which is in accordance with the *R*-enantioselectivity of lipases for these kinds of substrate [31], demonstrating the excellent enantioselectivity of CaLB for the proposed resolution.

Therefore, depending on whether high activity or selectivity values are required, different water content conditions must be employed for each specific reaction.

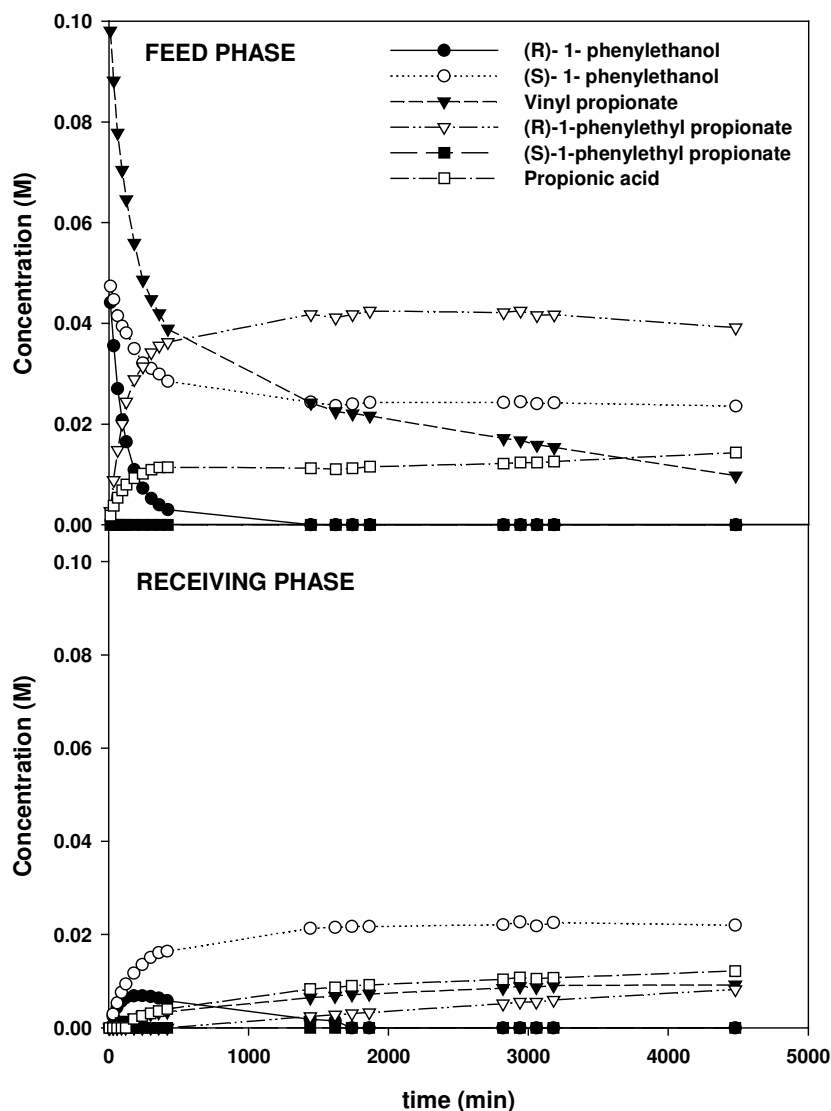
##### **4.3.3. Reaction/separation process for the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol**

###### **4.3.3.1. Effect of enzyme concentration**

Once the most suitable SLM for the separation process (Nylon with [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]) has been selected, this membrane was used in the integrated reaction/separation process. The optimal water content (100 ppm) was also added to the reaction medium in all reaction/separation experiments.

First of all, the effect of enzyme concentration in the feed compartment on the efficiency of the integrated reaction/separation process was investigated by adding different amounts of the immobilized enzyme (20, 40 and 80 mg) to the feed compartment. **Figure 4.5** depicts the time course of the reaction/separation process in the feed and receiving phases when 20 mg of enzyme was added to the feed compartment. With other amounts of enzyme added the time course of the reaction/separation process (not shown) showed a similar tendency.

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol



**Figure 4.5.** Time courses for (R)-1-phenylethanol, (S)-1-phenylethanol, vinyl propionate, (R)-1-phenylethyl propionate and propionic acid in the feed and receiving phase using the Nylon membrane with [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] when 20 mg of enzyme was added to the feed compartment (conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 72 h.).

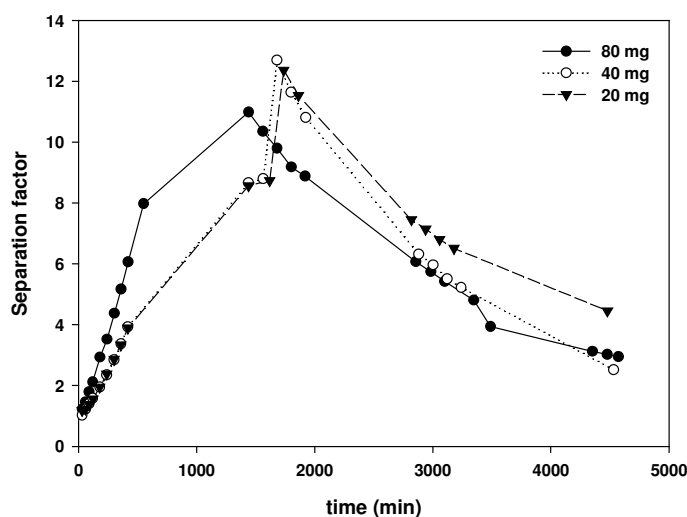
As can be seen in **Figure 4.5**, the (S)-1-phenylethanol isomer in the feed compartment did not react with vinyl propionate since (S)-1-phenylethyl propionate was not detected, so the enantioselectivity exhibited by the enzyme was very high (e.e.<sub>Product</sub> > 99.9%). Therefore, the (S)-1-phenylethanol diffused to the receiving phase until their equilibrium concentration was reached. In contrast, the (R)-1-phenylethanol reacted

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

with the vinyl ester in the feed compartment to form (R)-1-phenylethyl propionate. In the early stage of the experiment the unreacted (R)-1-phenylethanol diffused to the receiving phase but, when the concentration of this substrate in the feed phase was lower than that in the receiving phase, the (R)-1-phenylethanol presented in the receiving phase returned to the feed phase, where it reacted with the vinyl ester until no (R)-1-phenylethanol was detected.

As can also be observed in **Figure 4.5**, a competitive hydrolytic reaction of the acyl-donor (see Scheme 4.1) occurred to some extent since the hydrolytic product (propionic acid) was detected in the feed phase, which involves a decrease in the selectivity of the reaction process.

To determine the effect of enzyme concentration in the feed compartment on the efficiency of the integrated reaction/separation process, the evolution of the separation factor ( $\alpha_{S/R}$ ) with time was determined for the different concentrations of enzyme (**Figure 4.6**). The separation factor reached a maximum at about 1400-1700 min. and then decreased continuously. It is due to the fact that the (S)-1-phenylethanol practically reached the equilibrium concentration in the feed and receiving phases at that time while the (R)-1-phenylethyl propionate concentration continued increasing in the receiving phase. Therefore, as can be seen in **Figure 4.6**, at higher concentrations of the enzyme, the maximum separation factor was shifted to shorter times because the reaction rate was higher and so the (R)-1-phenylethyl propionate had more time to diffuse to the receiving phase.



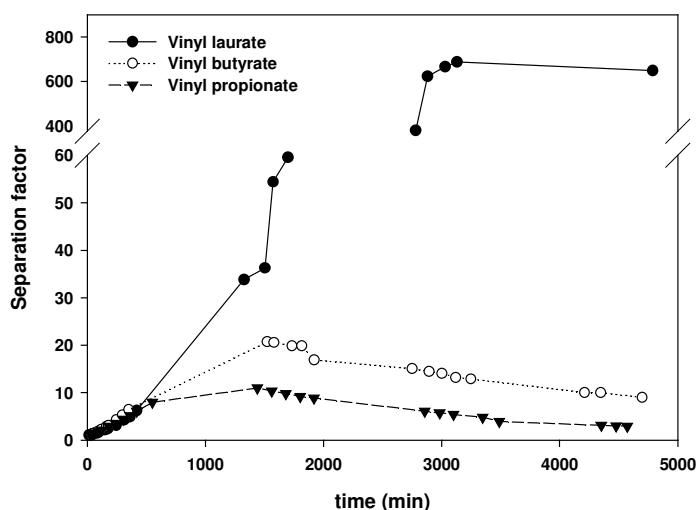
**Figure 4.6.** Evolution of the separation factor ( $\alpha_{S/R}$ ) with time for different concentrations of enzyme in the feed compartment.

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

The reaction/separation process efficiency will be determined by the separation factor values ( $\alpha_{S/R}$ ) at short times. As can be seen in **Figure 4.6**, higher concentrations of enzyme resulted in higher separation factors at short times, within the experimental interval. Therefore, the greater efficiency of the reaction/separation process was achieved with 80 mg of immobilized enzyme, so further studies were conducted with this amount of enzyme.

##### 4.3.3.2 Effect of vinyl esters

Vinyl esters with different alkyl chain lengths (vinyl propionate, vinyl butyrate and vinyl laurate) were tested as acyl donors to analyze the effect of this parameter on the efficiency of the integrated reaction/separation process at 30°C. With this aim, the evolution of the separation factor ( $\alpha_{S/R}$ ) with time was determined for the different vinyl esters (**Figure 4.7**).



**Figure 4.7.** Evolution of the separation factor ( $\alpha_{S/R}$ ) with time for different vinyl esters used as acyl donors in the transesterification reaction.

As can be seen in **Figure 4.7**, longer vinyl esters resulted in higher separation factors, which indicates a higher efficiency of the reaction/separation process, being the highest efficiency achieved with vinyl laurate. This could be explained by the fact that the (R)-1-phenylethyl laurate formed in the feed phase found difficult to cross the supported liquid membrane from the feed to the receiving phase due the low permeability of this compound as demonstrated in the above transport experiments. The separation factor reached a maximum at about 1400 and 1500 min. for vinyl propionate and vinyl

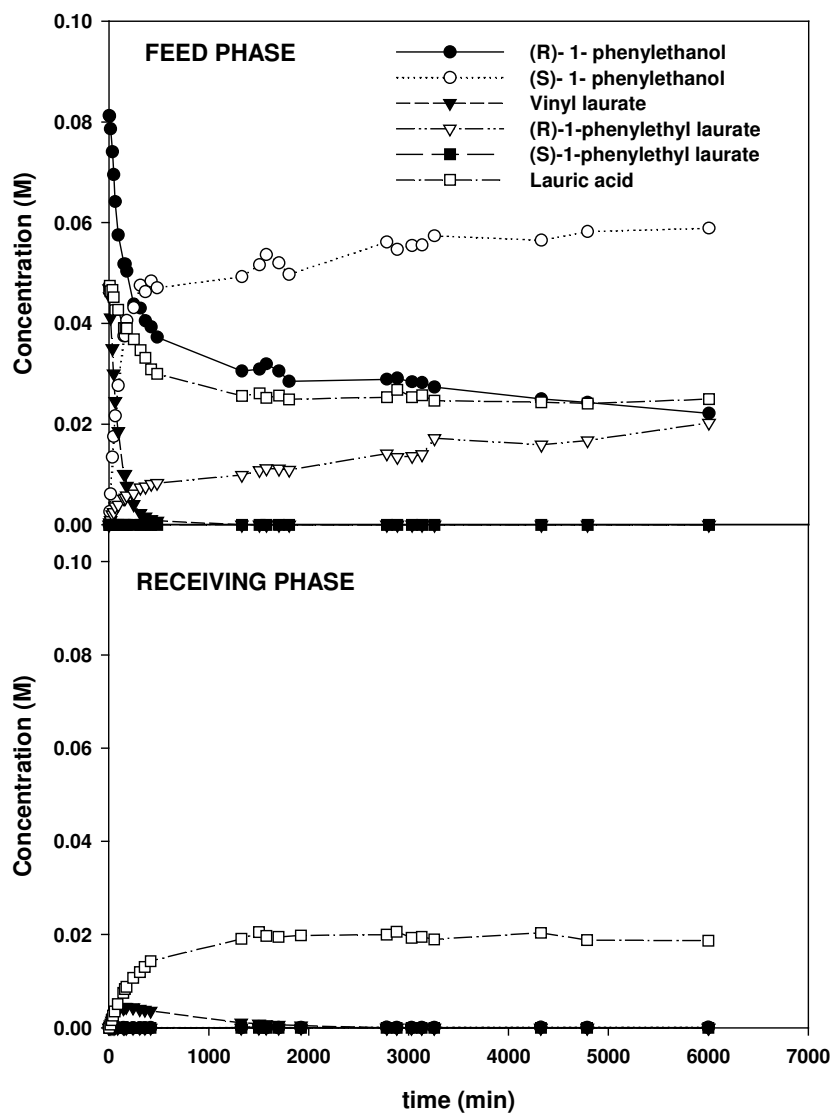


#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

butyrate, respectively. When vinyl laurate was used the separation factor increased continuously, keeping in a constant value after 3100 min.

**Figure 4.8** depicts the time course of the reaction/separation process in the feed and receiving phases when vinyl laurate was used as acyl donor. As can be seen in this Figure, (R)-1-phenylethyl laurate and lauric acid were no detected in the receiving phase during the experiment. The absence of (R)-1-phenylethyl laurate in the receiving phase explain the continuous increase in the separation factor. It is worthing to point out that, after 24 h of operation, the receiving phase was practically constituted by (S)-1-phenylethanol. Therefore, as can be concluded from **Figure 4.8**, the (S)-1-phenylethanol isomer could be separated in the received phase from the (R)-1-phenylethanol isomer, which remained in the feed phase as the ester product ((R)-1-phenylethyl laurate).

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol



**Figure 4.8.** Time courses for (R)-1-phenylethanol, (S)-1-phenylethanol, vinyl laurate, (R)-1-phenylethyl laurate and lauric acid in the feed and receiving phase using the Nylon membrane with [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] (conditions: initial solute concentrations, 100 mM; amount of enzyme, 80 mg; temperature, 30 °C; time, 72 h.).

### 4.4. CONCLUSIONS

The kinetic resolution of (rac)-1-phenylethanol by transesterification with vinyl esters catalysed by a commercial immobilized *Candida antarctica* lipase B was successfully carried out in a membrane bioreactor containing an SLM based on ionic liquids. This system integrated the enantioselective catalytic action of the enzyme and the selective permeability of the compounds through the SLM. Various process variables such as the nature of the liquid membrane phase, water content in the medium, the enzyme concentration in the feed compartment and the nature of the vinyl esters used as acyl-donor were investigated in order to optimize the integrated reaction/separation process. After testing six different ILs for use as liquid membrane phase, the SLM based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was seen to be the most suitable SLM for the selective separation of the compounds involved in the transesterification reaction. Furthermore, water content of the medium was found to be a key parameter for both the synthetic activity and selectivity of the process, being the optimal amount of water about 100 ppm. The effect of enzyme concentration in the feed compartment on the efficiency of the process was also analyzed, and an increase in the efficiency was observed with increasing concentrations of the enzyme. Our results also showed that the greatest efficiency in the process was achieved with the longest vinyl esters, vinyl laurate. With this ester, after 24 h of operation, the (S)-phenylethanol is nearly completely separated in the receiving phase.

In conclusion, our investigations demonstrate that the coupling of lipases with an SLM based on IL provides a promising basis for the development of environmentally friendly methodologies for practical production of enantiomerically pure or enriched compounds.

### 4.5. NOMENCLATURE

$P$	permeability of the membrane ( $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ )
$C_f$	solute concentration in the feed phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_r$	solute concentration in the receiving phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$A$	membrane area ( $\text{cm}^2$ )
$t$	time (min)
$V$	volume of the compartments (mL)
$C_0$	initial solute concentration in the feed phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$rP$	permselectivity of the membrane (adimensional)
$r\bar{P}$	average permselectivity of the membrane (adimensional)
$\alpha_{S/R}$	separation factor (adimensional)

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

##### 4.6. REFERENCES

- [1] K. Drauz, H. Waldmann (Eds.), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, 3, Volumes, 2<sup>nd</sup> edn., Wiley-VCH, Weinheim (2002).
- [2] E. Vedejs, E. Rozners, Parallel kinetic resolution under catalytic conditions: A three-phase system allows selective reagent activation using two catalysts, *J. Am. Chem.Soc.* 123 (2001) 2428-2429.
- [3] A.M. Klibanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature* 409 (2001) 241-246.
- [4] M.T. Reetz, Lipases as practical biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6 (2002) 145-150.
- [5] W.S. Long, A. Kamaruddin, S. Bathia, Chiral resolution of racemic ibuprofen in an enzymatic membrane reactor, *J. Memb. Sci.* 247 (2005) 185-200.
- [6] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Villora, A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B:Environmental* 67 (2006) 121-126.
- [7] E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya and M. Goto, Use of ionic liquids in a lipase-facilitated supported liquid membrane, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 805-808.
- [8] W.S. Long, S. Bathia, A. Kamaruddin, Modeling and simulation of enzymatic membrane reactor for chiral resolution of ibuprofen ester, *J. Memb. Sci.* 219 (2003) 69-88.
- [9] J. Ceynowa, M. Rauchfleisz, Resolution of racemic trans-2-methyl-1-cyclohexanol by lipase-catalysed transesterification in a membrane reactor, *J. Mol. Catal. B:Enzymatic* 15 (2001) 71-80.
- [10] I. Koter, J. Ceynowa, Kinetic resolution of chiral alcohols in bifunctional membrane exhibiting enzyme activity and enantioselective permeation, *J. Mol. Catal. B:Enzymatic* 24-25 (2003) 17-26.
- [11] X.J. Yang, A.G. Fane, K. Soldenhoff, Comparison of liquid membrane processes for metal separations: Permeability, stability and selectivity, *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (2003) 392-403.

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

- [12] M. Teramoto, Sakaida, S.S. Fu, N. Ohnishi, H. Matsuyama, T. Fukui, K. Arai, Attempt for the stabilization of supported liquid membrane, *Sep. Purif. Technol.* 21 (2000) 137-142.
- [13] A.J.B. Kemperman, D. Bargeman, T. Boomgaard, H. Strathmann, Stability of supported liquid membranes: State of the art, *Sep. Sci. Technol.* 31 (1996) 2733-2762.
- [14] M.J. Earle, K.R. Seddon, Ionic liquids. Green solvents for the future, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1391-1398.
- [15] J.F. Brennecke, E.J. Maginn, Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [16] M. Freemantle, News horizons for ionic liquids, *Chem. Engin. News* 79 (2001) 21- 25.
- [17] A. Ruiz, A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, M.H.A. Janssen, R. Schoevaart, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, A cross-linked enzyme aggregate of *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1095-1099.
- [18] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, M. Rubio, D. Gómez, G. Villora, Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 190-195.
- [19] L.C. Branco, J.G. Grespo, C.A.M. Afonso, Studies on the selective transport of organic compounds by using ionic liquids as a novel supported liquid membranes, *Chem. Eur. J.* 8 (2002) 3865-3871.
- [20] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez, G. Villora, A novel application of supported liquid membranes based on ionic liquids to the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction, *J. Memb. Sci.* 293 (2007) 73-80.
- [21] P. Bonhôte, A.-P. Dias, N. Papageorgio, K. Kalayanasundaram, M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168-1178.
- [22] T. Welton, Room-temperature ionic liquids, solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2083.

#### 4. Integrated reaction/separation processes for the kinetic resolution of 1-phenylethanol

- [23] L.A. Blanchard, J.F. Brenneke, Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287-292.
- [24] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatloski, A.E. Visser, R.D. Rogers, Room temperature ionic liquids as novel media for “clean” liquid-liquid extraction, *Chem. Commun.* 16 (1998) 1765-1766.
- [25] P. Scovazzo, A.E. Visser, J.H. Davis Jr., R.D. Rogers, C.A. Koval, D.L. DuBois, R.D. Noble, Supported ionic liquid membranes and facilitated ionic liquid membranes, in: R.D. Rogers, K. R. Seddon (Eds.), *Ionic Liquids: Industrial applications to Green Chemistry*, ACS Symposium Series 818, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 2002, p.68.
- [26] L.C. Branco, J.G. Crespo, C.A.M. Afonso, High selective transport of organic compounds by using supported liquid membranes based on ionic liquids, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 2771-2773.
- [27] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [28] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzymatic catalysis in ionic liquids: Lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* (2001) 425-426.
- [29] M. Noël, P. Lozano, M. Vaultier, J.L. Iborra, Kinetic resolution of rac-2- pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 301-306.
- [30] A.J. Messiano, E.J. Beckman, A.J. Russell, Supercritical biocatalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 623.
- [31] F. Cárdenas, M.S. De Castro, J.M. Sánchez-Montero, J.V. Sinisterra, M. Balmaceda, S.W. Elson, E. Alvarez, Novel microbial lipases: Catalytic activity in reactions in organic media, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 145-154.



# 5

## **On the development of a new integrated membrane process with ionic liquids for the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol**

A membrane bioreactor containing a supported liquid membrane based on ionic liquids was successfully applied to the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol catalysed by a commercial immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). Variables affecting the performance of the above bioreactor were studied. First of all, six ionic liquids were tested for use as liquid membrane phase supported in a Nylon membrane for the selective transport of the compounds involved in the reaction. [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was found to be the most suitable liquid membrane phase for the selective separation of the target compounds. The influence of the water content of the medium on the synthetic activity, selectivity and enantioselectivity of the enzyme was then analysed in order to establish the optimal amount of water. Finally, the integrated reaction/separation process for the resolution of *rac*-2-pentanol was carried out at the optimal conditions found, using vinyl propionate and vinyl butyrate as acyl donors. The greatest efficiency was achieved with the longest vinyl ester, vinyl butyrate.





**5. ON THE DEVELOPMENT OF A NEW INTEGRATED MEMBRANE PROCESS WITH IONIC LIQUIDS FOR THE KINETIC RESOLUTION OF RAC-2-PENTANOL**

**5.1. INTRODUCTION**

In recent years, the demand for enantiopure compounds has increased dramatically [1], the pharmaceutical industry being the main contributor and driving force behind this tendency. Indeed, when racemic mixtures are administered as a drug, very often only one of the enantiomers is biologically active, while the other one might contribute to side-effects, displaying toxicity, or acting as antagonist [2,3]. As a consequence, numerous techniques of enantioseparation have been developed over the last two decades [4]. One of these techniques is kinetic resolution by means of enantioselective catalysts, especially combined with separation systems, such as membrane operations, able to separate the produced enantiomer from the racemic substrate. The combination of the enantioselective properties of the catalyst and the separative properties of the membrane allows the conversion and separation of the enantiomer in a single step [5,6].

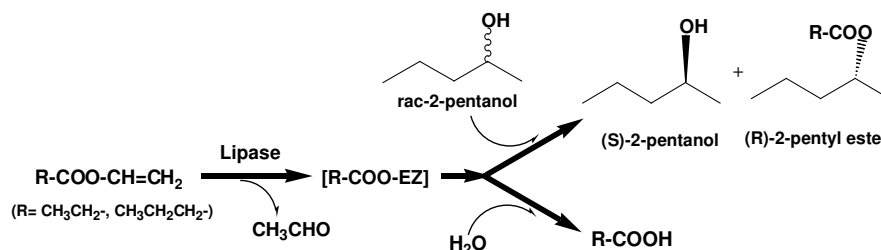
Among membrane-based processes, the use of supported liquid membranes (SLMs), porous supports whose pores are filled with a liquid, has numerous advantages such as the minimal amount of solvent needed and the fact that the processes of extraction and stripping are combined into one single stage [7]. Nevertheless, their industrial application is still limited, mainly due to concerns about SLM stability and long-term performance [8,9]. Supported liquid membranes with conventional solvents eventually deteriorate due to liquid vaporization, dissolution into a contacting phase and displacement from the porous structure under a low-pressure gradient. In addition, the solvents generally used for liquid membrane processes are flammable, volatile and toxic, and their use can lead to environmental and safety risks. One promising alternative is to use ionic liquids as supported liquid phase.

Ionic liquids (ILs) are organic salts that are liquid close to room temperature. They usually consist of an organic cation, the most commonly used being dialkylimidazolium and tetraalkylammomium, and a polyatomic inorganic anion (e.g.  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ) [10]. Due to their non-measurable vapour pressure, combined with the greater capillary force associated with their relatively high viscosity and the possibility of minimizing their solubility in the surrounding phases by suitable selection of the cation and anion [11], it is possible to obtain very stable and environmentally friendly supported liquid membranes using ionic liquids as supported liquid phase [12-14].

Recently, some researchers have reported that SLMs based on ILs can be used for the selective transport of organic compounds such as alcohols, esters, acids, ketones and amines [11,15-19]. In the present study, for the first time, a lipase-catalysed reaction has

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol

been combined with a supported liquid membrane based on ionic liquids to achieve the selective separation of *rac*-2-pentanol. S-2-pentanol is a chiral intermediate in the synthesis of several potential anti-Alzheimer's drugs that inhibit  $\beta$ -amyloid peptide release and/or its synthesis [20]. The performance of the membrane bioreactor containing an SLM based on ionic liquids for the kinetic resolution of racemic 2-pentanol by transesterification with a vinyl ester catalysed by a commercial immobilized *Candida antarctica* lipase B (CaLB) (**Scheme 5.1**) was analysed. More specifically, the effect of various process variables, including the nature of the liquid membrane phase and the nature of the vinyl esters used as acyl-donor and the water content in the medium, on the separation efficiency was investigated.



**Scheme 5.1.** Stoichiometric scheme of kinetic resolution of *rac*-2-pentanol catalyzed by CaLB.

## 5.2. EXPERIMENTAL

### 5.2.1. Materials

A commercial lipase (EC 3.1.1.3) was used as catalyst: *Candida antarctica* lipase B immobilized on a macroporous acrylic resin (Novozym 435), which was a gift from Novo España S.A. (Madrid, Spain).

Hydrophilic Nylon<sup>®</sup> -polyamide- membranes (25 mm diameter, 0.45  $\mu\text{m}$  pore size, 170 $\mu\text{m}$  thickness) were used as supporting membranes, which were supplied by Millipore S.A. (Madrid, Spain).

The ionic liquids 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate,  $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$  (purity >99%), 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate,  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  (purity >99%), 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate,  $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$  (purity >99%), 1-octyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate,  $[\text{omim}^+][\text{BF}_4^-]$  (purity >99%) were purchased from Solvent Innovation GmbH (Cologne, Germany). 1-Butyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide,  $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$  (purity >99%) was purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain) and

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol

1-octyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide, [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (purity >99%) from Merck KgaA (Darmstadt, Germany).

*Rac*-2-pentyl propionate was synthesized as describes in section 5.2.2. Other substrates, solvents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain), and were of the highest purity available. Solvents and reactants were dehydrated with 3 Å molecular sieves before use.

### **5.2.2. Chemical synthesis of racemic 2-pentyl propionate**

Racemic 2-pentyl propionate was obtained according to the following procedure. Concentrate sulphuric acid (500 µL) was added dropwise to a mixture of *rac*-2-pentanol (90.96 mmol) and propionic acid (118.24 mmol). The mixture was stirred and heated under reflux for 24 h. After that time, the reaction mixture was diluted with diethyl ether and washed firstly with distilled water, followed by an Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturated solution, and finally with distilled water again. The ether solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and finally diethyl ether was evaporated under vacuum. The yield of the reaction was 87%. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 0.85 (t, 3H), 1.07 (t, 3H), 1.15 (d, 3H), 1.28 (m, 2H), 1.35 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 2.24 (q, 2H), 4.85 (m, 1H). <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ 9.19, 13.78, 18.56, 19.88, 27.82, 38.03, 70.40, 174.03.

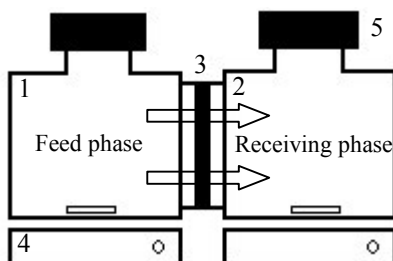
### **5.2.3. Preparation of supported liquid membranes**

Immobilization was achieved by placing the membrane in a 10 mL Amicon<sup>TH</sup> ultrafiltration unit and adding 3 mL of ionic liquid. Nitrogen pressure at 2 bar was applied, and the ionic liquid flowed through the pores of the membrane. The pressure was released once a thin layer of ionic liquid was left on the upper surface of the membrane. This procedure was repeated three times to ensure that all the membrane pores were filled with liquid since the ionic liquids used are quite viscous. Then, the membrane was left to drip overnight to remove the excess ionic liquid from the membrane surface.

### **5.2.4. Experimental setup**

The experimental setup consisted on a glass diffusion cell with two independent compartments, 30 mL each, separated by the SLM (**Figure 5.1**). O-rings were inserted on each side of the SLM. The entire assembly was held together by a threaded connector.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol



**Figure 5.1.** Schematic illustration of the glass diffusion cell set up with two independent compartments used for experiments: 1) feed solution containing solutes; 2) receiving solution containing fresh solvent; 3) supported liquid membrane; 4) magnetic stirrer; 5) septum.

### 5.2.5. Transport studies

The transport of *rac*-2-pentanol, vinyl propionate, *rac*-2-pentyl propionate, propionic acid, vinyl butyrate, *rac*-2-pentyl butyrate, butyric acid, vinyl laurate, *rac*-2-pentyl laurate and lauric acid through the SLMs at 30 °C was evaluated. In each experiment, the initial solute concentrations in the feed phase were 100 mM in n-hexane. n-Hexane was used as a receiving phase in all cases. The transport experiment was begun by adding 30 mL of each solution to their respective compartments. The solute concentrations were monitored by sampling 100  $\mu$ L of each compartment at regular time intervals during a 48 h period. A hexane solution of ethyl propionate (internal standard) (100  $\mu$ L, 60 mM) and n-hexane (800  $\mu$ L) were added to the sampling vials and the resulting solution (5  $\mu$ L) was analyzed by GC, as described in section 5.2.8.1.

Solute transport was analyzed by the permeability parameter ( $\bar{P}$ ), which was calculated using Eq. (5.1) [15], from the slope of the plot of  $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$  versus  $t$ :

$$\ln \left[ \frac{(C_0 - 2C_r)}{C_0} \right] = \frac{-2 \bar{P} A}{V} t \quad (5.1)$$

where  $C_0$  is initial solute concentration in the feed phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $C_r$  is the solute concentration in the receiving phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $A$  is the membrane area ( $\text{cm}^2$ ) and  $V$  is the volume of the compartments (mL).

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol

Furthermore, the average permselectivity ( $r\bar{P}$ ) of the membrane [15] was determined as a numerical criterion to compare the ability of the different membranes to separate the target compounds (Eq. 5.2).

$$r\bar{P} = \frac{\sum_i^n rP_i}{n} \quad \text{with} \quad rP_i > 1 \quad (5.2)$$

where  $rP_i$  is the membrane permselectivity between two compounds (e.g. 1-butanol and vinyl butyrate) and  $n$  is the number of possible pairs of different compounds.  $rP_i$  can be expressed as follows:

$$rP_i = \frac{\bar{P}_A}{\bar{P}_B} \quad (5.3)$$

This parameter indicates the efficiency of the membrane in separating the compounds: the higher  $r\bar{P}$ , the more selective it is at separating the target compounds.

### 5.2.6. Reaction studies

In all the reaction experiments performed, the reaction medium consisted of the stoichiometric mixture of substrates and different percentages of added water. Vinyl ester (1 mmol), 2-pentanol (1 mmol) and the corresponding amount of water were added in 22 mL screw-capped vials and n-hexane was added up to 10 ml total volume. The water content was controlled by Karl Fisher titration, as described in section 2.8.2. The reaction was started by adding 26.6 mg of Novozym 435 and run for 2 h at 30°C. At regular time intervals, 30  $\mu$ L aliquots were taken, diluted with 470  $\mu$ L n-hexane and cooled in an ice bath. Then, 400  $\mu$ L of the hexane solution were added to 100  $\mu$ L 30 mM ethyl propionate (internal standard) in n-hexane and 5  $\mu$ L of the resulting solution was analyzed by GC, as described in section 5.2.8.1. All experiments were carried out in duplicate and the mean values are reported. The efficiency of the catalytic action was measured by three parameters: the synthetic activity (U), defined as the amount of enzyme that produces 1  $\mu$ mol of ester per minute, the selectivity, defined as the ratio between this parameter and the acyl-donor consumption rate, which takes into account the competitive hydrolytic reaction of the acyl-donor, and the enantiomeric excess of the synthetic product, which is determined using Eq. (5.4):

$$e.e(\%) = \frac{[(R)\text{-}2\text{-pentylester}] - [(S)\text{-}2\text{-pentylester}]}{[(R)\text{-}2\text{-pentylester}] + [(S)\text{-}2\text{-pentylester}]} \times 100 \quad (5.4)$$

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol

### 5.2.7. Reaction/separation studies

The reaction/separation experiments were performed at 30°C using the experimental setup shown in **Figure 5.1**. Typically, the feed phase consisted of 100 mM rac-2-pentanol and 100 mM vinyl ester in n-hexane and the receiving solution was n-hexane. 80 mg of the immobilized enzyme (Novozym 435) was placed into the feed compartment and the experiment was begun by adding 30 mL of each solution to their respective compartments. Both compartments were mechanically stirred. The reaction/separation process was monitored by GC analysis, sampling 100 µL of each compartment at regular time intervals during 72 h. A hexane solution of ethyl butyrate (internal standard) (100 µL, 60 mM) and n-hexane (800 µL) were added to the sampling vials and the resulting solution (5 µL) was analyzed by GC as described in section 2.8.1. To determine the efficiency of the separation of the two enantiomeric forms in the integrated reaction/separation process, the separation factor ( $\alpha_{S/R}$ ) was calculated using Eq. (5.5).

$$\alpha_{S/R} = \frac{\frac{C_{r,S}}{C_{f,S}}}{\frac{C_{r,R}}{C_{f,R}}} \quad (5.5)$$

where  $C_{r,S}$  and  $C_{r,R}$  are the concentration of the (S) and (R) enantiomer in the receiving phase, respectively, and  $C_{f,S}$  and  $C_{f,R}$  are the concentration of the (S) and (R) enantiomer in the feed phase, respectively.

### 5.2.8. Analytical methods

#### 5.2.8.1. Gas chromatographic analysis

GC analysis was performed with a Hewlett Packard 6890 instrument equipped with FID detector and a  $\beta$ -DEX-120 capillary column (30m  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25µm, Supelco), in the following conditions: carrier gas (He) at 10 psi, split ratio: 70/1; detector: 300 °C.

*Resolution of rac-2-pentanol with vinyl propionate:* 25 min at 50 °C, then 10 °C/min to 90°C followed by 11 min at 90 °C. The retention times of the peaks were as follows: n-hexane, 4.6 min; vinyl propionate, 8.1 min; ethyl propionate (internal standard), 9.9 min; (R)-2-pentanol, 22.3 min; (S)-2-pentanol, 22.9 min; (S)-2-pentylpropionate, 31.6 min; (R)- 2-pentylpropionate, 32.5 min and propionic acid, 34.9 min.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol

*Resolution of rac-2-pentanol with vinyl butyrate:* 25 min at 50 °C, then 10 °C/min to 100 °C followed by 15 min at 100 °C. The retention times of the peaks were as follows: n-hexane, 4.6 min; ethyl propionate (internal standard), 9.9 min; vinyl butyrate, 14.9 min; (R)-2-pentanol, 22.3 min; (S)-2-pentanol, 22.9 min; (S)-2-pentyl butyrate, 35.1 min; (R)- 2-pentyl butyrate, 36.6 min and butyric acid, 41.1 min.

### 5.2.8.2. Water content analysis

The water content of the liquid phase was measured with a Metrohm 831 KF coulometric Karl Fisher apparatus. For this, an accurately weighed sample was titrated by using HYDRANAL-Coulomat AG (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Madrid, Spain) as the Karl Fischer reagent.

## 5.3. RESULTS AND DISCUSSION

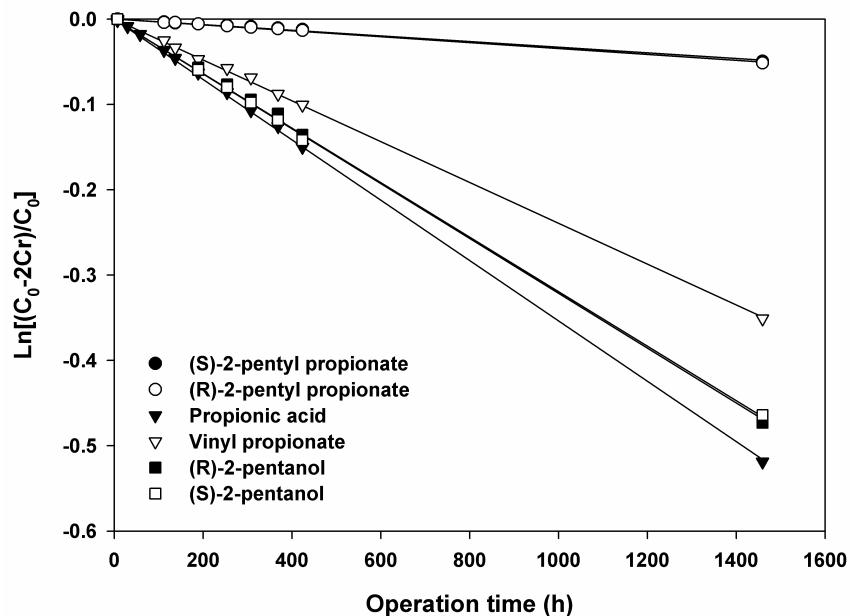
### 5.3.1. Selection of the supported liquid membrane

In a first set of experiments, we analysed the permeability of the compounds involved in the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol by transesterification with vinyl propionate ((R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, vinyl propionate, (R)-2-pentyl propionate, (S)-2-pentyl propionate and propionic acid) through different SLMs based on ionic liquids in order to investigate the influence of the ionic liquid phase on the solute transport. Since in a previous work [15] the hydrophilic/ hydrophobic character of the IL was shown to be a key factor in the selective separation of the transesterification reaction products, ILs with quite different hydrophilic/ hydrophobic character were chosen for the present study. These ionic liquids were based on two 1-alkyl-3-methylimidazolium cations, n-butyl and n-octyl, and three different anions, namely, hexafluorophosphate ( $\text{PF}_6^-$ ), tetrafluoroborate ( $\text{BF}_4^-$ ) and bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide ( $\text{NTf}_2^-$ ).

The experimental concentrations of (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, vinyl propionate, (R)-2-pentyl propionate, (S)-2-pentyl propionate and propionic acid in the feed and receiving phases as a function of run time were monitored, using the concentrations in the receiving phase to calculate the individual permeability ( $\bar{P}$ ) of the species. In this way, the permeability values were calculated from the slopes of the plots of  $\ln [(C_0 - 2 C_t) / C_0]$  for each compound versus  $t$  using Eq. (5.1). As an example, **Figure 5.2** shows the plots used for the calculation of the compound permeabilities through the Nylon membrane with immobilized  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ .



## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol



**Figure 5.2.** Plots of  $\ln[(C_0-2C_r)/C_0]$  vs. operation time for the transport of (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, vinyl propionate, (R)-2-pentyl propionate, (S)-2-pentyl propionate and propionic acid through Nylon membrane with supported  $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$  (conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.).

The permeability values for each compound through the different supported liquid membranes are presented in **Table 5.1**.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol

**Table 5.1.** Effect of the ionic liquid membrane on the transport of (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, vinyl propionate, (R)-2-pentyl propionate, (S)- 2-pentyl propionate and propionic acid.

SLM	Permeability $\times 10^6$ (cm/s)					
	(R)-2-pentanol	(S)- 2-pentanol	Vinyl propionate	(R)-2-pentyl propionate	(S)-2-pentyl propionate	Propionic acid
Nylon with [bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	26.28	26.35	15.50	0.46	0.48	46.61
Nylon with [omim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	50.37	49.95	30.50	2.19	1.96	50.43
Nylon with [bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	25.80	26.20	20.99	0.63	0.57	40.98
Nylon with [omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	18.70	18.77	21.28	2.07	1.98	14.50
Nylon with [bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	48.46	48.37	46.05	6.02	5.92	44.55
Nylon with [omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	84.6	83.2	71.95	26.01	26.33	51.69

Conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.

The influence of the ionic liquid on the permeability values can be appreciated by comparing the value of this parameter for identical organic molecules. As can be observed in **Table 5.1**, the permeability values obtained for the SLM based on [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] were higher than those obtained when [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was immobilized in the Nylon membrane, which means that an increase in the alkyl chain length of the cation of the ionic liquid involves an increase in the permeability values. The same conclusion is reached when the [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]/[bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] and [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]/[bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] pairs are compared, except in the case of (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol and propionic acid, which exhibited higher values in [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] than in [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. In addition, no significant permeability differences between (R)-2-pentanol and (S)-2-pentanol or between (R)-2-pentyl propionate and (S)-2-pentyl propionate were observed with the assayed SLMs.

The average permselectivities of the SLMs were calculated and are presented in **Table 5.2**.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol

**Table 5.2.** Average permselectivity of the assayed SLMs.

Ionic liquid	Average Permselectivity
[bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	32.5
[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	25.2
[omim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	11.3
[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	5.1
[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	4.4
[omim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	2.0

As can be observed in this table, the most effective supported liquid membrane for separating the selected organic compounds was the one based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], which showed the highest average permselectivity value (32.5). Furthermore, the following sequence for the average permselectivity values can be arranged from **Table 5.2**: [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] < [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] ~ [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] < [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]. Comparison with the sequence for the hydrophilic character of the ionic liquids determined in a previous work [15], [omim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] < [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] < [omim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] < [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>], confirms that an increase in the hydrophilic character of the ionic liquids results in an increase in the permselectivity for the separation of the assayed organic compounds.

Since the SLM based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was seen to be the most suitable supporting liquid membrane, the permeability of the compounds involved in the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol by transesterification with vinyl butyrate ((*R*)-2-pentanol, (*S*)-2-pentanol, vinyl butyrate, (*R*)-2-pentyl butyrate, (*S*)-2-pentyl butyrate and butyric acid) through SLMs based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was also analysed. The permeability values for each compound and the average permselectivity obtained are presented in **Table 5.3**.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol

**Table 5.3.** Permeability values of (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, vinyl butyrate, (R)-2-pentyl butyrate, (S)-2-pentyl butyrate and butyric acid through the SLM based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] and the average permselectivity of the SLM.

SLM	$\bar{rP}$	Permeability $\times 10^6$ (cm/s)					
		(R)-2-pentanol	(S)-2-pentanol	Vinyl butyrate	(R)-2-pentyl propionate	(S)-2-pentyl propionate	Butyric acid
Nylon with [bmim <sup>+</sup> ][BF <sub>4</sub> <sup>-</sup> ]	34.0	28.70	27.52	7.08	0.32	0.31	27.13

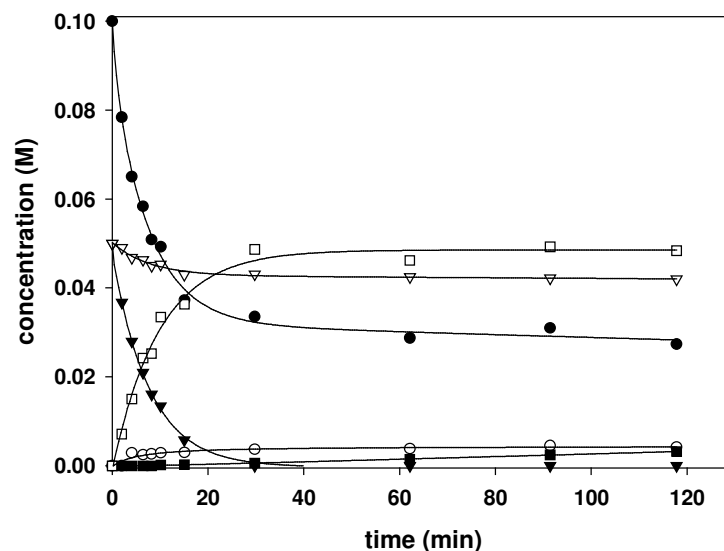
Conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.

As can be observed from this table, the average permselectivity of the SLM based [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] for this reaction system was higher than that obtained for the same membrane when the reaction system consisted of (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, vinyl propionate, (R)-2-pentyl propionate, (S)-2-pentyl propionate and propionic acid (Table 5.2).

### 5.3.2. Kinetic resolution of *rac*-2-pentanol in n-hexane: effect of vinyl ester and water content

The resolution of *rac*-2-pentanol catalysed by immobilized *Candida antarctica* lipase B (CaLB) was studied using two acyl donors (vinyl propionate and vinyl butyrate) in n-hexane at 30 °C and different water contents. n-Hexane was used as reaction medium because it was the solvent used as feed and receiving phase in the reaction/separation experiments. As a kinetically controlled process catalysed by a serine hydrolase (CaLB), the reaction mechanism is dependent on the nucleophile acceptors present in the reaction medium, involving a competitive distribution of the rapidly formed acyl-enzyme intermediate between water (hydrolysis) or another nucleophile reagent, such as both isomers of 2-pentanol (transesterification) (see Scheme 5.1). In this way, the latter synthetic pathway can be enhanced by the use of (i) activated acyl-donors such as vinyl esters, because the vinyl alcohol released in the degradation of the vinyl ester tautomerizes to acetaldehyde, which cannot act as a substrate for the enzyme [21, 22], (ii) very low water content media and (iii) high nucleophile (e.g. 2-pentanol) concentration. In this context, the efficiency of the resolution of *rac*-2-pentanol can be measured by three parameters: (i) the synthetic activity, (ii) the selectivity for the synthetic reaction and (iii) the enantiomeric excess (e.e) of the synthetic product. Figure 5.3 shows the time course of the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol catalysed by immobilized CaLB in n-hexane using vinyl propionate as acyl donor, at 107 ppm water content and 30°C.

### 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol

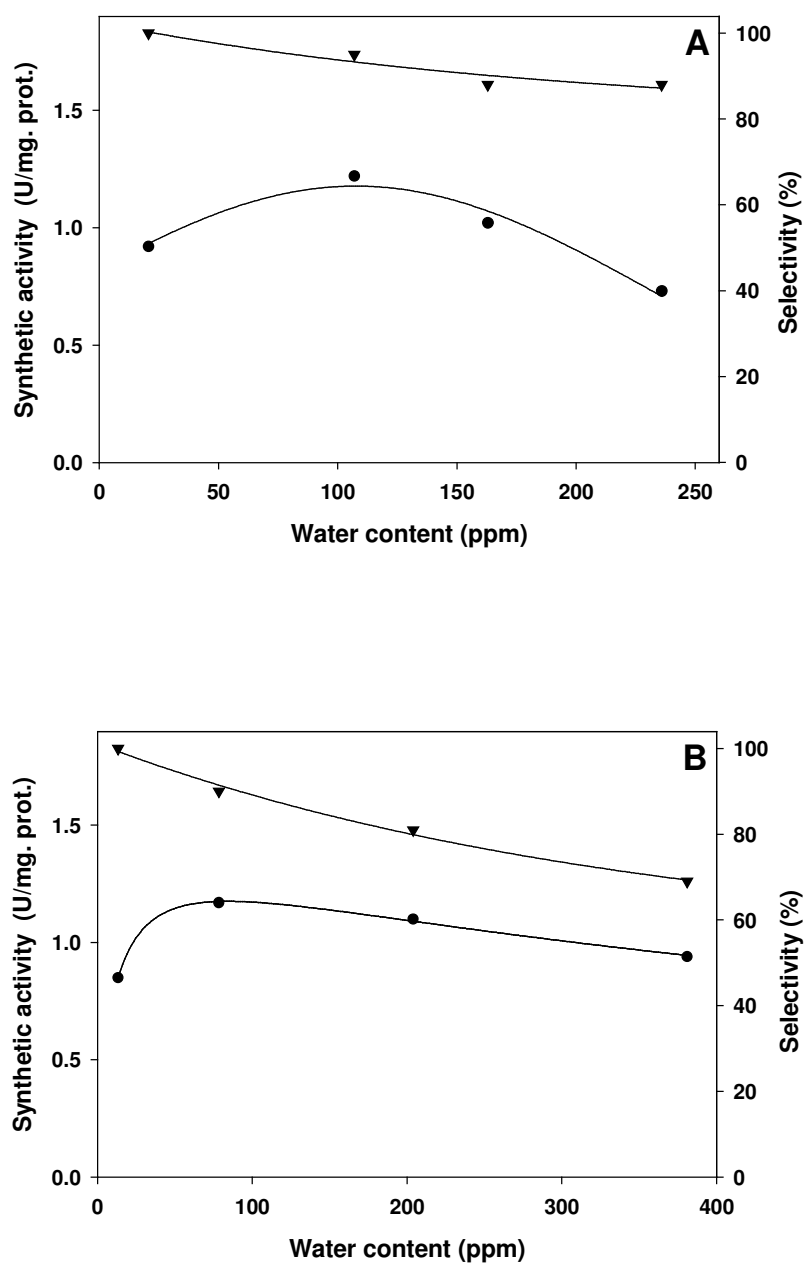


**Figure 5.3.** Time-course of CaLB-catalyzed kinetic resolution of *rac*-2-pentanol in n-hexane at 107 ppm water content and 30°C, using vinyl propionate (●) as acyl donor. (▼) (*R*)-2-Pentanol, (▽) (*S*)-2-pentanol, (□) (*R*)-2-pentyl propionate, (■) (*S*)-2-pentyl propionate, (○) propionic acid.

As can be seen, the consumption of acyl-donor substrate (vinyl propionate) is followed by a concomitant increase in both synthetic (2-pentyl propionate) and hydrolytic (propionic acid) products. It should be noted how the assayed lipase showed a different preference for each stereomer of 2-pentanol, which is in accordance with the *R*-enantioselectivity of lipases for these kinds of substrate [23]. As can be observed in **Figure 5.3**, (*R*)-2-pentyl propionate synthesis was not totally enantioselective in these reaction conditions since only a small amount of (*S*)-2-pentyl propionate was detected.

The synthetic activity, selectivity and enantioselectivity of immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) for the racemic resolution of *rac*-2-pentanol, using vinyl butyrate and vinyl propionate as acyl donors, was determined at 30 °C and different water contents. The control of the water content of the media is necessary because a minimal amount of water seems to be essential for the activity of most biocatalysts, even if the quantity may seem surprisingly small [22,24]. **Figure 5.4** shows the evolution of the synthetic activity and selectivity exhibited by CaLB as a function of the water content for both reaction systems.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol



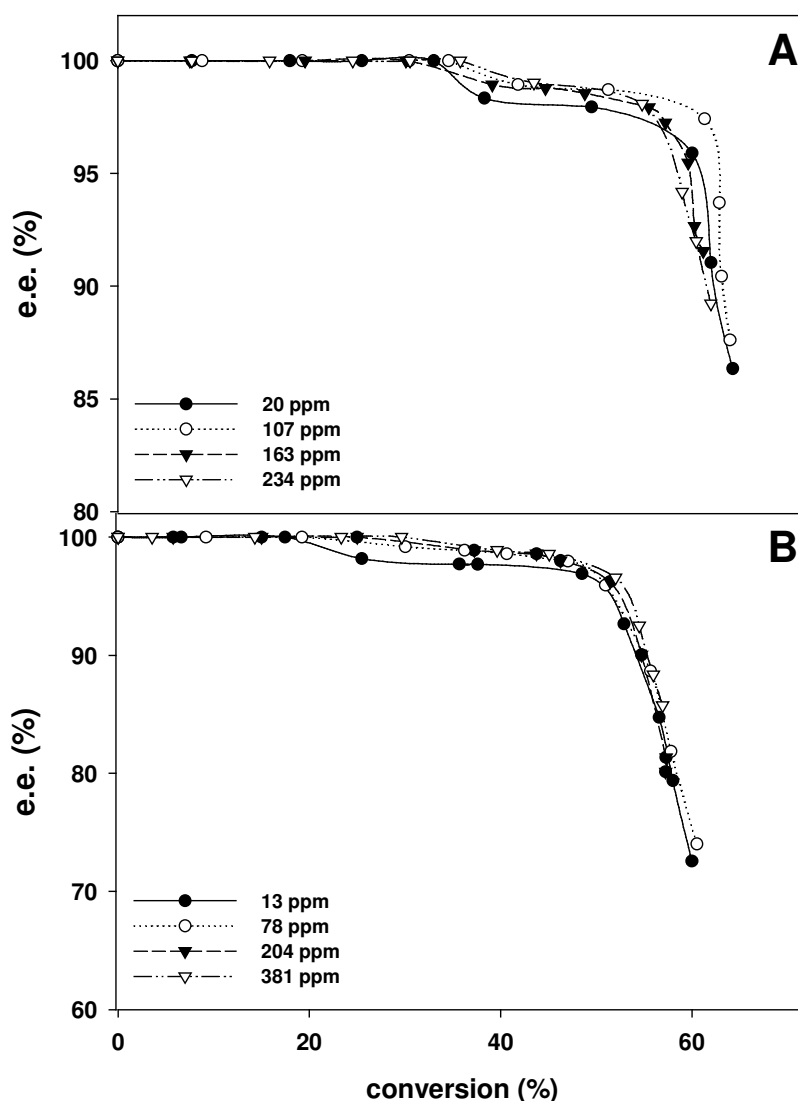
**Figure 5.4.** Synthetic activity (●) and selectivity (▼) exhibited by CaLB in the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol in *n*-hexane at 30°C, as a function of the water content, using vinyl propionate (A) and vinyl butyrate (B) as acyl donors.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol

As can be observed, in both cases the synthetic activity exhibited by CaLB showed a bell curve, with a maximum at about 100 ppm water content, after which the synthetic activity decreased with increasing amounts of water. On the other hand, an increase in the water content led to a decrease in the selectivity within the experimental interval in both cases. As expected, the increase in the water content favoured the hydrolytic pathway of the catalytic mechanism. Note that the activity showed by CaLB when vinyl butyrate was used as acyl donor was slightly higher than that obtained with vinyl propionate but the selectivity reached by the former vinyl ester was lower than that obtained when vinyl propionate was used.

**Figure 5.5** shows the enantiomeric excess profiles exhibited by CaLB at 30 °C and different water contents in n-hexane, using vinyl propionate and vinyl butyrate as vinyl donors, as a function of *rac*-2-pentanol conversion.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol



**Figure 5.5.** Enantiomeric excess profiles exhibited by CaLB in the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol in *n*-hexane at 30°C versus conversion, as a function of the water content, using vinyl propionate (A) and vinyl butyrate (B) as acyl donors.

As can be observed from **Figure 5.5**, the enantioselectivity exhibited by Novozym 435 was practically independent of the assayed water content in both cases. In this respect, Martins *et al.* [25] described the effect of several organic solvents on the kinetics of porcine pancreas lipase (PPL) for the resolution of *rac*-glycidol through esterification with butyric acid in organic solvents, and concluded that enzyme enantioselectivity did



## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol

not depend on the water content of the medium. It should be noted that the enantiomeric excess reached in the kinetic resolution of (*S*)-2-pentanol by Novozym 435 at low conversion percentages was close to 100%. A slight decrease in the enantiomeric excess was observed at 30% and 20% conversion for vinyl propionate and vinyl butyrate, respectively. At 50% conversion, the enantiomeric excess exhibited by CaLB was  $98.5 \pm 0.5\%$  for vinyl propionate and  $98 \pm 0.5\%$  for vinyl butyrate. As can be observed in **Figure 5.5**, when all the (*S*)-2-pentanol was consumed, at about 55 % total conversion, the enantiomeric excess fell dramatically. Comparing both acyl donor assayed, the best results were obtained with vinyl propionate, higher enantioselective values being reached with this acyl donor, although the differences were not very significant.

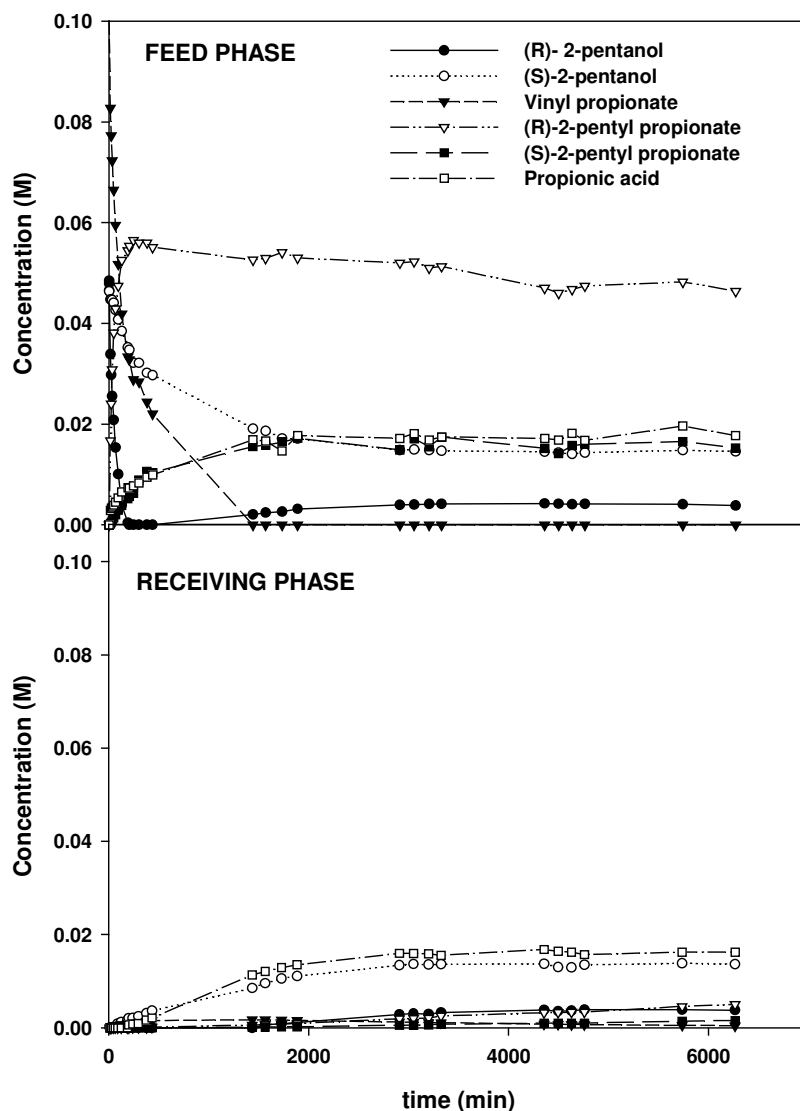
Therefore, depending on whether high activity or selectivity is required, different water content conditions must be employed. In our case, for the reaction/ separation experiments, 100 ppm water content was used because maximum activity was achieved with this amount of water, the selectivity being higher than 91-95%, depending on the vinyl ester used.

### 5.3.3. Reaction/separation process for the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol

Once the most suitable SLM for the separation process (Nylon with [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]) and the optimal water content had been selected (100 ppm), the integrated reaction/separation process was carried out.

**Figure 5.6** depicts the time course of the reaction/separation process in the feed and receiving phases when vinyl propionate was used as acyl donor.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol



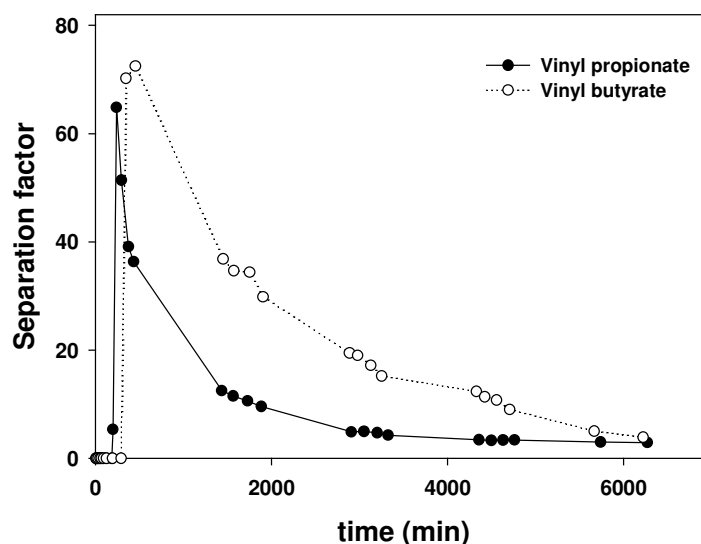
**Figure 5.6.** Time courses for (R)-2-pentanol, (S)-2-pentanol, vinyl propionate, (S)-2-pentyl propionate, (R)-2-pentyl propionate and propionic acid in the feed and receiving phase using the Nylon membrane with [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] when vinyl propionate was used as acyl donor.

As can be seen in **Figure 5.6**, in the feed compartment at about 200 min, the (R)-2-pentanol isomer was totally consumed by reaction with vinyl propionate, yielding (S)-2-pentyl propionate. By that time, only 30% of (S)-2-pentanol had reacted, which demonstrated the high R-enantioselectivity of the enzyme. The non-reacted (S)-2-pentanol diffused to the receiving phase until their equilibrium concentration was reached. In contrast, the (R)-2-pentyl propionate and the (S)-2-pentyl propionate formed

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol

in the feed phase found it difficult to cross the supported liquid membrane from feed to receiving phase due the low permeability of these compounds. As can also be observed in **Figure 5.6**, a competitive hydrolytic reaction of the acyl-donor (see **Scheme 5.1**) occurred to some extent since the hydrolytic product (propionic acid) was detected in the feed phase and some time after in the receiving phase, which involves a decrease in the selectivity of the reaction process. Therefore, as can be concluded from **Figure 5.6**, the (S)-2-pentanol isomer could be separated in the receiving phase from the (R)-2-pentanol isomer, which remained in the feed phase as the ester product ((R)-2-pentyl propionate).

In order to determine the effect of the acyl donor used on the efficiency of the integrated reaction/separation process, the evolution of the separation factor ( $\alpha_{S/R}$ ) with time was determined for both vinyl esters (vinyl propionate and vinyl butyrate) (**Figure 5.7**).



**Figure 5.7.** Evolution of the separation factor ( $\alpha_{S/R}$ ) with time for different vinyl esters (vinyl propionate and vinyl butyrate) used as acyl donors in the kinetic resolution of *rac*-2-pentanol using the integrated reaction/separation process.

As can be seen in **Figure 5.7**, high separation factor values were achieved with both vinyl esters. In this respect, when vinyl propionate was used as acyl donor, the separation factor reached a maximum value (65) at 240 min, after which it decreased steadily as (R)-2-pentyl propionate started to appear in the receiving phase. In the case of vinyl butyrate, a higher maximum value for the separation factor (72) was reached, but at longer times (450 min). It is worth to noting that the separation factor decreased

## **5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of *rac*-2-pentanol**

---

more slowly when vinyl butyrate was used than in the case of vinyl propionate. This could be explained by the the lower permeability of the butyrate-derivate through the supported liquid membrane, as demonstrated in the above transport experiments, which allows slower diffusion of the (R)-2-pentyl butyrate to the receiving phase compared with the (R)-2-pentyl propionate and therefore leads to higher values of the separation factor.

### **5.4. CONCLUSIONS**

The kinetic resolution of *rac*-2-pentanol by transesterification with vinyl esters catalysed by a commercial immobilized *Candida antarctica* lipase B (Novozyme) was succesfully carried out in a membrane bioreactor containing a supported liquid membrane based on ionic liquids. Various process variables, such as the nature of the liquid membrane phase, the water content of the reaction media and the nature of the vinyl esters used as acyl-donor, were investigated in order to optimize the integrated reaction/separation process. After testing six different ILs for use as liquid membrane phase, the SLM based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was seen to be the most suitable SLM for the selective separation of the compounds involved in the transesterification reaction. Furthermore, the water content of the medium was found to be a key parameter for both the synthetic activity and selectivity of the process, the optimal amount of water being about 100 ppm. Finally, the integrated reaction/separation process for the resolution of *rac*-2-pentanol was carried out on the optimal conditions, using vinyl propionate and vinyl butyrate as acyl donors. Our results showed that the greatest efficiency in the process was achieved with the longest vinyl ester, vinyl butyrate.

In conclusion, our investigations demonstrate the exciting potencial of coupling enantioselectivity of lipases with the selectivity of supported liquid membranes based on ionic liquids for the development of new methodologies for practical production of enantiomerically pure or enriched compounds.

**5.5. NOMENCLATURE**

$\bar{P}$	permeability of the membrane ( $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ )
$C_f$	solute concentration in the feed phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_r$	solute concentration in the receiving phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$A$	membrane area ( $\text{cm}^2$ )
$t$	time (min)
$V$	volume of the compartments (mL)
$C_0$	initial solute concentration in the feed phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$rP$	permselectivity of the membrane (adimensional)
$r\bar{P}$	average permselectivity of the membrane (adimensional)
e.e.	enantiomeric excess (%)
$\alpha_{S/R}$	separation factor (adimensional)
$C_{r,S}$	concentration of the (S) enantiomer in the receiving phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_{r,R}$	concentration of the (R) enantiomer in the receiving phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_{f,S}$	concentration of the (S) enantiomer in the feed phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
$C_{f,R}$	concentration of the (R) enantiomer in the feed phase ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

**5.6. REFERENCES**

- [1] B. Schulze, M.G. Wubbolts, Biocatalysis for industrial production of fine chemicals, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 609-615.
- [2] E.J. Ariëns, Stereochemistry: A source of problems in medicinal chemistry, *Med. Res. Rev.* 6 (1986) 451-456.
- [3] I.W. Wainer, *Drug stereochemistry*, in: Analytical Methods and Pharmacology, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 1993.
- [4] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, Separation of enantiomers: Needs, challenges, perspectives, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3-33.
- [5] J. Ceynowa, M. Rauchfleisz, Resolution of racemic trans-2-methyl-1-cyclohexanol by lipase-catalysed transesterification in a membrane reactor, *J. Mol. Catal. B:Enzymatic.* 15 (2001) 71-80.
- [6] I. Koter, J. Ceynowa, Kinetic resolution of chiral alcohols in bifunctional membrane exhibiting enzyme activity and enantioselective permeation, *J. Mol. Catal. B:Enzymatic.*, 24-25 (2003) 17-26.
- [7] X.J. Yang, A.G. Fane, K. Soldenhoff, Comparison of liquid membrane processes for metal separations: Permeability, stability and selectivity, *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (2003) 392-403.
- [8] M. Teramoto, Sakaida, S.S. Fu, N. Ohnishi, H. Matsuyama, T. Fukui, K. Arai, Attempt for the stabilization of supported liquid membrane, *Sep. Purif. Technol.* 21 (2000) 137-142.
- [9] A.J.B. Kemperman, D. Bargeman, T. Boomgaard, H. Strathmann, Stability of supported liquid membranes: State of the art, *Sep. Sci. Technol.* 31 (1996) 2733-2762.
- [10] J.F. Brennecke, E.J. Maginn, Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [11] L.C. Branco, J.G. Grespo, C.A.M. Afonso, Studies on the selective transport of organic compounds by using ionic liquids as a novel supported liquid membranes, *Chem. Eur. J.* 8 (2002) 3865-3871.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol

- [12] R. Fortunato, C.A.M. Afonso, J. Benavente, E. Rodriguez-Castellón, J.G. Crespo, Stability of supported ionic liquid membranes as studied by X-ray photoelectron spectroscopy, *J. Membr. Sci.* 256 (2005) 216-223.
- [13] R. Fortunato, L.C. Branco, C.A.M. Afonso, J. Benavente, J.G. Crespo, Electrical impedance spectroscopy characterisation of supported ionic liquid membranes, *J. Membr. Sci.* 270 (2006) 42-49.
- [14] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, J.M. Palacios, D. Gómez, M. Rubio, G. Villora, A SEM-EDX study of highly stable supported liquid membranes based on ionic liquids, *J. Membr. Sci.* 300 (2007) 88-94.
- [15] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, M. Rubio, D. Gómez, G. Villora, On the importance of the nature of the ionic liquids in the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction through supported ionic liquid membranes, *J. Membr. Sci.*, 307 (2008) 233-238.
- [16] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez, G. Villora, A novel application of supported liquid membranes based on ionic liquids to the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction, *J. Membr. Sci.* 293 (2007) 73-80.
- [17] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez, G. Villora, Prediction of the selectivity in the recovery of transesterification reaction products using supported liquid membranes based on ionic liquids, *J. Membr. Sci.* 307 (2008) 225-232.
- [18] P. Scovazzo, A.E. Visser, J.H. Davis Jr., R.D. Rogers, C.A. Koval, D.L. DuBois and R.D. Noble, Supported ionic liquid membranes and facilitated ionic liquid membranes, in: R.D. Rogers, K. R. Seddon (Eds.), *Ionic Liquids: Industrial applications to Green Chemistry*, ACS Symposium Series 818, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 2002, p.68.
- [19] L.C. Branco, J.G. Crespo, C.A.M. Afonso, High selective transport of organic compounds by using supported liquid membranes based on ionic liquids, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 2771-2773.
- [20] J.E. Audia, T.C. Britton, J.J. Droste, B.K. Folmer, G.W. Huffman, V. John, L.H. Latimer, T.E. Mabry, J.S. Nissen, W.J. Porter, J.K. Reel, E.D. Thorsett, J.S. Tung, J. Wu, C.N. Eid, W.L. Scott, Patent WO 98/22494, 1998.

## 5. Integrated membrane process with ionic liquids for the resolution of rac-2-pentanol

- [21] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzymatic catalysis in ionic liquids: Lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chem. Commun.* (2001) 425-426.
- [22] M. Noël, P. Lozano, M. Vaultier, J.L. Iborra, Kinetic resolution of *rac*-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 301-306.
- [23] F. Cárdenas, M.S. De Castro, J.M. Sánchez-Montero, J.V. Sinisterra, M. Balmaceda, S.W. Elson, E. Alvarez, Novel microbial lipases: Catalytic activity in reactions in organic media, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 145-154.
- [24] A.J. Messiano, E.J. Beckman, A.J. Russell, Supercritical biocatalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 623.
- [25] J.F. Martins, T. Corrêa de Sampaio, I. Borges de Carvalho, S. Barreiros, Lipase catalyzed esterification of glycidol in nonaqueous solvents: Solvent effects on enzymatic activity, *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994) 119-124.





# 6

## A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems

The synthesis of butyl propionate in a recirculating bioreactor in room temperature ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems at 50°C and 80 bar was studied. In these systems,  $\alpha$ -alumina microporous membranes with immobilized *Candida antarctica* lipase B were coated with four different ionic liquids based on 1-n-alkyl-3-imidazolium cations and hexafluorophosphate and bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide anions. Selectivity increased (reaching >99.5%) when room temperature ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems were used rather than in supercritical carbon dioxide alone. To understand the behaviour of the enzyme and the mass-transfer phenomena in these biphasic systems, the reaction was also carried out in ionic liquids and in ionic liquid/hexane biphasic systems, and the ionic liquid/hexane partition coefficients of the compounds involved in the transesterification reaction were determined. It was observed that the activity in room temperature ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems depends on the effect of the ionic liquid media on the enzyme and the diffusional limitations across the IL-layer around the biocatalyst.

Additionally, a model based on the Ping Pong Bi-Bi mechanism with competitive alcohol inhibition is proposed to describe the kinetics of the transesterification reaction in supercritical carbon dioxide.



**6. A NEW RECIRCULATING ENZYMATIc MEMBRANE REACTOR FOR ESTER SYNTHESIS IN IONIC LIQUID/SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE BIPHASIC SYSTEMS**

**6.1. INTRODUCTION**

The use of biocatalysis in non-aqueous environments has received growing attention during the last two decades due to the advantages they offer, such as the possibility of carrying out synthetic reactions by hydrolytic enzymes, increasing the solubility of organic substrates and facilitating enzyme and product recovery to be applied in fine chemistry [1,2]. However, the use of volatile organic solvents (VOS) in chemical processes has a detrimental impact on the environment and human health. Because of this fact, it is necessary to develop green and clean reaction media before scaling-up biocatalytic processes of industrial interest [3]. Supercritical fluids (SCFs) and room temperature ionic liquids (ILs) have recently been revealed as interesting clean alternatives to classical organic solvents [4].

Supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) is especially advantageous because it is cheap, non-toxic, non-inflammable, has a near ambient critical temperature (31.1 °C) and a moderate critical pressure [5-6]. Much evidence has been put forward in the literature concerning the suitability of scCO<sub>2</sub> as a medium for enzymatic reactions [5-7]. Most importantly, it is readily removable by post reaction depressurization and the reaction products can be separated by tuning their solubility as a function of operating conditions, which makes it more attractive to be used as a “green designer” solvent. On the other hand, scCO<sub>2</sub> has been shown to adversely affect enzyme activity, including lowering the pH of the enzyme microenvironment, covalent modification of free amino groups on the surface of the protein to form carbamates, and deactivation by pressurization/depressurization cycles, meaning that new strategies are needed for enzyme stabilization [7-8].

Room temperature ionic liquids have been shown to be good solvents for use in many chemical [9] and biochemical [10] processes, where they have an exceptional ability to stabilize enzymes during continuous operations [11]. The most important advantage of ILs is their non-detectable vapour pressure, which make them environmentally benign solvents compared with VOS. Furthermore, they show good chemical and thermal stability and can be used at high temperatures [12].

Recent researches have demonstrated the possibility of carrying out integral green biocatalytic processes by combining these two different neoteric solvents, ILs and scCO<sub>2</sub> [13,14]. The success of this biphasic system is based on the high solubility of the scCO<sub>2</sub> in the IL phase, while the same IL shows non-detectable solubility in the scCO<sub>2</sub>

## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>

phase. Moreover, it was found that scCO<sub>2</sub> can be used to extract organic substances from ILs without any cross-contamination of the extract with the ILs [15,16]. In addition, IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems have clearly been demonstrated to have a stabilizing effect against enzyme deactivation even under extremely severe conditions [17].

The use of membrane reactors constitutes an attempt to integrate catalytic conversion, product separation and/or concentration and catalyst recovery into a single operation. A significant number of applications of enzymatic membrane reactors use lipases. The fact that lipases are activated by interfaces probably makes them perfect biocatalysts for use in membrane reactors, which promote interfacial contact between enzymes and substrates [18]. *Candida antarctica* lipase B (CaLB) is an interesting enzyme because of its potential application in many industrial processes, such as the synthesis of numerous esters. The enzyme has also shown a high level of activity, stability and stereoselectivity in non-conventional media such as organic, supercritical carbon dioxide and ionic liquid media [7,19,20].

This paper presents a synthetic biocatalytic process combining SCFs, ILs and membrane technology. Butyl propionate synthesis from vinyl propionate and 1-butanol catalyzed by CaLB has been chosen as reaction model. Firstly, the synthetic activity of CaLB, covalently attached to a polymer layer previously adsorbed on  $\alpha$ -alumina tubular membranes, in supercritical carbon dioxide, was tested into a tangential-flow reactor. According to the initial rates, a model based on the Ping Pong Bi-Bi mechanism with competitive alcohol inhibition was proposed. Then, the immobilized enzyme was coated with four different ILs (i) 1-butyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethylsulfonyl)imide} ([bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>]), (ii) 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]), (iii) 1-butyl-2,3-dimethyl imidazolium hexafluorophosphate ([bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]), (iv) 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]), in order to study the influence of these media on both the activity and selectivity of CaLB. Finally, in order to get a better understanding of the behaviour of the enzyme and the mass-transfer phenomena in these biphasic systems, the reaction was also carried out in ionic liquids and in ionic liquid/hexane biphasic systems, and the ionic liquid/hexane partition coefficients of the compounds involved in the transesterification reaction were determined.

## 6.2. EXPERIMENTAL

### 6.2.1. Materials

A commercial lipase (EC 3.1.1.3) preparation were used as catalyst: free *Candida antarctica* lipase B aqueous solution (Novozym 525F), which was a gift from Novo España S.A (Madrid, Spain). The free enzyme solution was ultrafiltered to eliminate all low molecular weight additives as follows: 25 ml Novozym 525F were diluted in 225

## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in IL/scCO<sub>2</sub>

ml water and then concentrated 10-fold by ultrafiltration at 4°C using a Minitan (Millipore, Madrid, Spain) system equipped with polysulfone membranes (5 000 Da cut-off). This process was repeated 3 times, resulting in a CaLB solution of 14.9 mg protein · ml<sup>-1</sup>, as determined by the Lowry method, and a purification degree of 1.4-fold. α-Alumina microporous tubular supports (150 mm length, 7 mm ID, 0.2 μm pore size, 15 g weight, 33 cm<sup>2</sup> effective surface) were supplied by Exekia (Bazet, France). [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] and [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] were purchased from Solvent Innovation GmbH (Cologne, Germany) (purity > 98%). [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] (purity >99%) were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain). The water content of the ILs, as determined by Karl Fischer titration, was as follows: [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], 450 ppm, [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], 474.5 ppm; [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], 483 ppm, and [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], 416.3 ppm. Substrates, solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (Madrid, Spain), and were of the highest purity available.

### 6.2.2. Preparation of active membranes

The enzyme immobilization process on α-alumina membranes was previously described in detail [21]. In brief, the procedure involves three main steps: the formation of dynamic membranes by cross-flow filtration of an aqueous solution of gelatine-polyethyleneimine, the activation of free amino groups with a cross-linking agent (glutaraldehyde) and the enzyme attachment. The obtained active membrane with immobilized lipase was stored in dry conditions by using P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> at 4°C.

### 6.2.3. Preparation of active membranes coated with IL

Active membranes, previously prepared as described above, were coated with four different ILs, [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] and [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] as follows: 2 mL of IL was placed in the membrane and shaken using a rock'n roller for 30 min by means of which the IL was deposited on the active surface in a very thin film. After this process, the membrane was placed vertically in order to eliminate the excess of IL. The active membrane impregnated with IL was stored at 4°C.

### 6.2.4. Butyl propionate synthesis catalyzed by CaLB in ILs and n-hexane as reaction media

To 477.1 μL of IL or n-hexane, 8.3 μl (75 μmol) vinyl propionate and 4.6 μL (50 μmol) 1-butanol were added into a screw-capped vial of 1.5 mL total volume. The reaction was started by adding 10 μL (8.5 mg *Candida antarctica* lipase B mL<sup>-1</sup> in 20 mM phosphate buffer at pH 7) and run for 2 h at 50°C. At different times, 15 μL aliquots were extracted and suspended in 485 μL n-hexane. The biphasic mixture was shaken, and cooled in an ice bath. Then, 400 μL of the hexane extract were added to 100 μL 75 mM ethyl hexanoate (internal standard) solution in n-hexane and 5 μL of the resulting solution was analyzed by GC. All the experiments were carried out in

## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in IL/scCO<sub>2</sub>

duplicate and the mean values are reported. The synthetic activity was defined as the amount of enzyme that produces 1  $\mu\text{mol}$  of butyl propionate per minute.

### 6.2.5. Butyl propionate synthesis catalyzed by CaLB in IL/hexane biphasic system

Reactions were carried out in 1.5 mL screw-capped vials. The reaction was started by adding 10  $\mu\text{L}$  of *Candida antarctica* lipase B (8.5  $\text{mg mL}^{-1}$  in 20 mM phosphate buffer at pH 7) suspended in 100  $\mu\text{L}$  of IL into a 390  $\mu\text{L}$  hexane solution containing 8.3  $\mu\text{L}$  (75  $\mu\text{mol}$ ) of vinyl propionate and 4.6  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{mol}$ ) 1-butanol and run for 2 h at 50°C. At different times, 15  $\mu\text{L}$  aliquots were extracted from the hexane phase and suspended in 485  $\mu\text{L}$  n-hexane. The biphasic mixture was cooled in an ice bath. Then, 400  $\mu\text{L}$  of the hexane extract were added to 100  $\mu\text{L}$  75 mM ethyl hexanoate (internal standard) solution in n-hexane and 5  $\mu\text{L}$  of the resulting solution was analyzed by GC. All experiments were carried out in duplicate and the mean values are reported.

### 6.2.6. Butyl propionate synthesis catalyzed by the active membranes in scCO<sub>2</sub> and IL/scCO<sub>2</sub> biphasic system

Butyl propionate synthesis catalyzed by CaLB-dynamic membrane was carried out in a recirculating reactor (Figure 6.1).

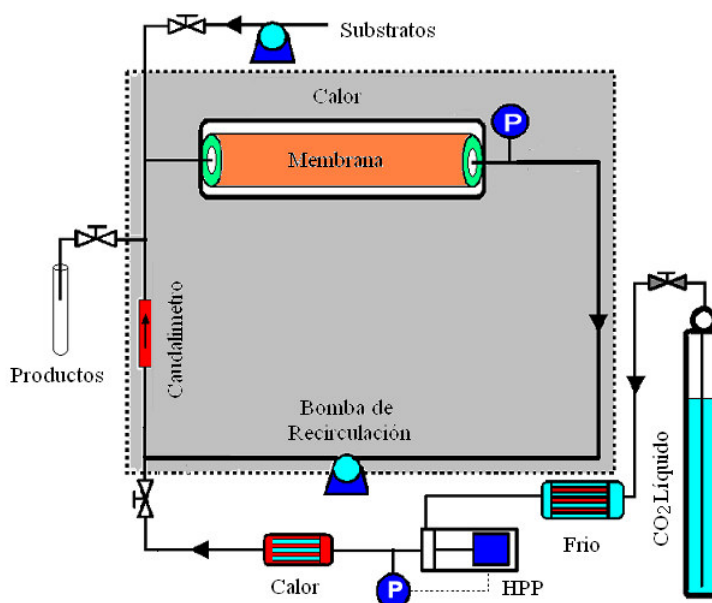


Figure 6.1. Experimental set-up of the recirculating enzymatic reactor with scCO<sub>2</sub>.

## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>

This reactor was constructed of stainless steel (internal volume = 178 mL) equipped with valves, pressure and flow controls, and placed in a warm room at a controlled temperature (50 °C). First, the active membrane (with or without IL) was introduced into the reactor case and the reactor was filled by pumping liquid CO<sub>2</sub> with a high-pressure pump (HHP, Dosapro, Milton-Roy, USA) up to the desired pressure (80 bar). Then, the scCO<sub>2</sub> was recirculated by a magnetic pump (RP, Micropump Mod. 219, USA) and the flow was measured by a mass-flowmeter (Rheonik, Germany). The reaction was started by pumping a solution of substrates in n-hexane (5% v/v overall volume) by a HPLC pump (Shimadzu LC 10, Japan) at a constant flow rate (5 ml/min). At regular intervals of time, a sample of the reaction mixture was taken by depressurizing through a calibrated thermostated restrictor (50 °C) in n-hexane placed on an ice-bath for 1 min. After each sample collection, the pressure of the system was set to the operational conditions by repressuring with fresh CO<sub>2</sub>. Then, 900 µL of the resulting sample were mixed with 100 µL of 150 mM ethyl hexanoate (internal standard) solution in n-hexane and 5 µL of the final solution was analyzed by GC.

### 6.2.7. Determination of the partition coefficients of substrates and products between ILs and n-hexane

In order to find a parameter related with the partition coefficients of the substrates between scCO<sub>2</sub> and IL phases (K), n-hexane was chosen as reference organic solvent because its solvent capability is comparable to that of scCO<sub>2</sub> in mild operating conditions. In this sense, the partition coefficient of the different substrates between the ILs and the hexane solution was determined in the reaction conditions by the flash-shake method. The composition of the organic phase before and after shaking with the IL phase was analysed by GC. Equation (6.1) was used to calculate the partition coefficients:

$$K = \left( \frac{[A]_{H(i)} - [A]_{H(f)}}{[A]_{H(f)}} \right) \frac{V_H}{V_{IL}} \quad (6.1)$$

where  $[A]_{H(i)}$  and  $[A]_{H(f)}$  are the measured concentrations of the analyte in the hexane donor phase before and after the extraction process, respectively, and  $V_H$  and  $V_{IL}$  are the volumes of the hexane phase and the IL phase, respectively.

### 6.2.8. Gas chromatographic analysis

GC analysis was performed with a Hewlett Packard 6890 instrument equipped with FID detector and a Nukol™ capillary column (15m × 0.53mm × 0.5µm, Supelco), in the following conditions: carrier gas (N<sub>2</sub>) at 1.5 psi (39.9 ml/min total flow); temperature



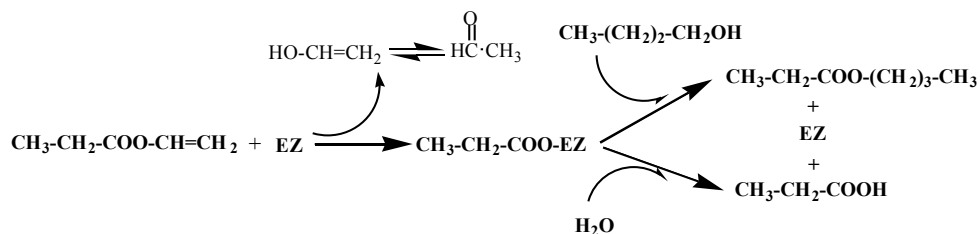
## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in IL/scCO<sub>2</sub>

program: 40 °C, 3min; 5 °C/min, 70 °C; 15 °C/min, 180 °C; split ratio: 7.9/1; detector: 220°C. Retention times of the peaks were as follows: vinyl propionate, 2.8 min; butyl propionate, 6.6 min; 1-butanol, 7.1 min; ethyl hexanoate, 9.3 min; and butyric acid 13.6 min.

### 6.3. RESULTS AND DISCUSSION

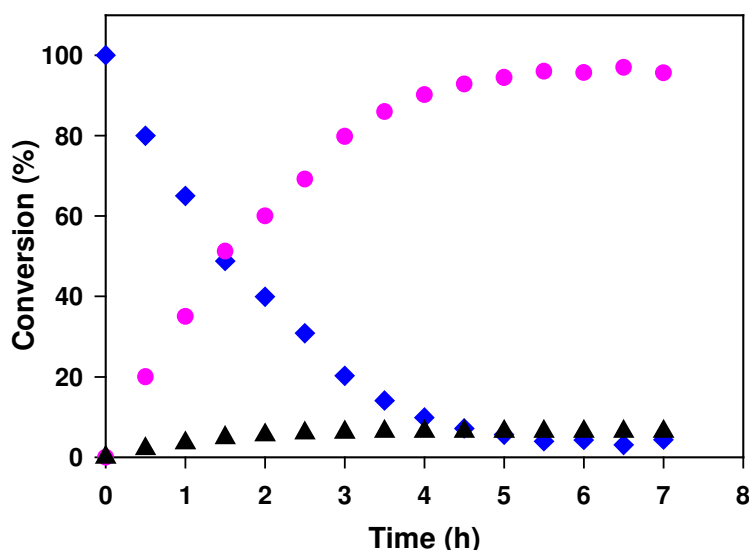
#### 6.3.1. Synthesis of butyl propionate catalyzed by the active membranes in scCO<sub>2</sub>

The catalytic performance of CaLB immobilized on dynamic membranes in the butyl propionate synthesis from vinyl propionate and 1-butanol at 50°C and 80 bar was studied in scCO<sub>2</sub>. As a kinetically controlled process catalyzed by a serine hydrolyse (CaLB), the transformation of vinyl propionate is highly dependent on the nucleophile acceptors present in the reaction medium and involves a competitive distribution of the rapidly formed acyl-enzyme intermediate between water (hydrolysis) or another nucleophile reagent, such as 1-butanol (transesterification) (**Scheme 6.1**). In this way, the latter synthetic pathway can be enhanced by the use of activated acyl-donors such as vinyl esters, very low water content media and high nucleophile (e.g. 1-butanol) concentration. In this context, the efficiency of the catalytic action can be measured by two parameters, the synthetic rate and the ratio between this parameter and the acyl-donor consumption rate (selectivity).



**Scheme 6.1.** Stoichiometric scheme of kinetically controlled synthesis of butyl propionate from vinyl propionate and 1-butanol catalyzed by CaLB.

Figure 6.2 shows the time course for the reaction assayed catalyzed by the enzymatic membrane at 50 °C and 80 bar.



**Figure 6.2.** Time-course of butyl propionate (●) and propionic acid (▲) synthesis from vinyl propionate (150 mM) (not-depicted) and 1-butanol (◆) (75 mM) by active membranes with immobilized CaLB in scCO<sub>2</sub> (50 °C, 80 bar) using a 5% v/v liquid volume in the reactor (overall volume: 178 ml)

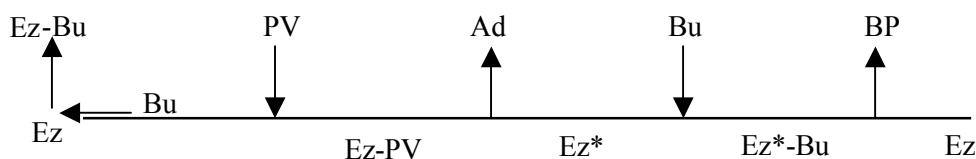
The consumption of nucleophile substrate (1-butanol) is followed by a concomitant increase in both synthetic (butyl propionate) and hydrolytic (propionic acid) products. The reaction proceeds with a high degree of efficiency, as can be seen in the selectivity (93.3%) and synthetic activity (1.82 U/cm<sup>2</sup>) values.

### **6.3.2. Kinetic model for butyl propionate synthesis catalyzed by active membranes in scCO<sub>2</sub>**

The effect of both vinyl propionate ester and 1-butanol concentrations on the reaction rate was investigated in order to propose a velocity equation. The initial substrate concentration ranges were 75-200 mM for both substrates, vinyl propionate and 1-butanol. In these ranges, strong alcohol inhibition was observed. Alcohol inhibition is generally observed during lipase esterification and transesterification reactions. Some authors have demonstrated, in both conventional and non-conventional media (e.g scCO<sub>2</sub>), that the kinetic mechanism for these reactions was a Ping Pong Bi Bi with competitive alcohol inhibition [22,23]. In these reactions, the lipase may react with

## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>

1-butanol to yield a dead-end enzyme-1-butanol complex or with vinyl propionate to yield the lipase-vinyl propionate complex. Then, the lipase-vinyl propionate complex yields an enzyme–acyl intermediate and vinyl alcohol, which tautomerizes to acetaldehyde. This is followed by the interaction of the enzyme–acyl intermediate with 1-butanol to form another binary complex, which then yields the propyl butyrate and free lipase (**Scheme 6.2**).



**Scheme 6.2.** Ping-Pong Bi Bi with competitive alcohol inhibition reaction mechanism, where Ez is free enzyme, Ez-PV enzyme-vinyl propionate complex, Ez\* enzyme-acyl complex, Ad acetaldehyde, Bu 1-butanol, Ez\*-Bu binary complex of acyl enzyme and 1-butanol, BP butyl propionate and Ez-Bu enzyme-1-butanol complex.

The experimental device considered in this paper is a recirculating enzymatic reactor, with the enzyme immobilized on the surface of the membrane. As the recirculation rate is high enough, the conversion per pass is low, so the system acts as an ordinary batch reactor, which could be represented by the following continuity equation, with time

corrected through the ratio  $\frac{S}{V_{total}}$ :

$$\left( \frac{S}{V_{total}} \times dt \right) = \frac{dCa}{(-ra)} \quad (6.2)$$

where  $S$  is the membrane internal surface (cm<sup>2</sup>),  $V_{total}$  the reactor internal volume (mL),  $t$  the reaction time (min),  $Ca$  the product concentration in the reactor (mol · L<sup>-1</sup>) and  $ra$  the reaction rate (mmol · min<sup>-1</sup> · cm<sup>-2</sup>)

The initial reaction rate, referring to the effective surface of the membrane, was obtained from the initial rate of change of the concentration as follows:

## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>

$$V_0 = \left( \frac{V_{total}}{S} \right) \times \left( \frac{dCa}{dt} \right)_0 \quad (6.3)$$

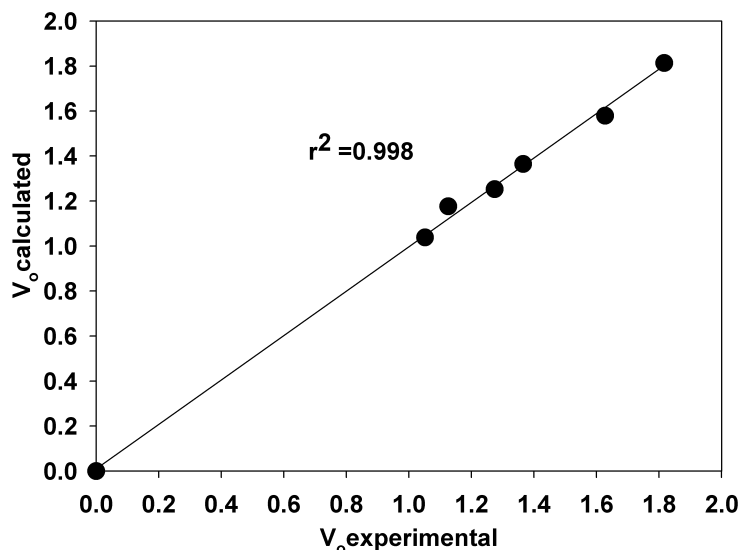
As mentioned above, a Ping Pong Bi-Bi mechanism with competitive alcohol inhibition could be expected for this reaction. The corresponding kinetic equation for this mechanism was used to fit the experimental data, determining the kinetic parameters by the following expression:

$$V_0 = V_{max} \cdot \frac{[PV] \cdot [Bu]}{[Bu] \cdot \left( K_{mPV} \cdot \left( \frac{[Bu]}{K_I} + 1 \right) \right) + (K_{mBU} + [Bu]) \cdot [PV]} \quad (6.4)$$

where  $V_0$  and  $V_{max}$  are the initial and the maximum reaction rates, respectively,  $[PV]$  and  $[Bu]$  the initial vinyl propionate and 1-butanol molar concentrations,  $K_{mPV}$  and  $K_{mBU}$  the Michaelis constants of vinyl propionate and 1-butanol, and  $K_I$  the inhibition constant of 1-butanol.

The parameters in the model equation were estimated by minimization of the sum of residuals squares using the solver from Microsoft Excel. The results for the kinetic parameters involved:  $V_{max} = 0.851 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $K_{mPV} = 0.9985 \text{ M}$ ;  $K_{mBU} = 0.0102 \text{ M}$ ;  $K_I = 0.0776 \text{ M}$  and the sum of the mean square error was  $5.77 \times 10^{-6}$ . The kinetic parameters obtained may be considered as apparent values because of the possibility of internal and/or external diffusional limitations.

A plot of the experimental rate values versus the calculated rate values, obtained using the parameters reported above, gives a straight-line which passes through the origin, showing that the experimental rate data match the values calculated by the model (**Figure 6.3**).



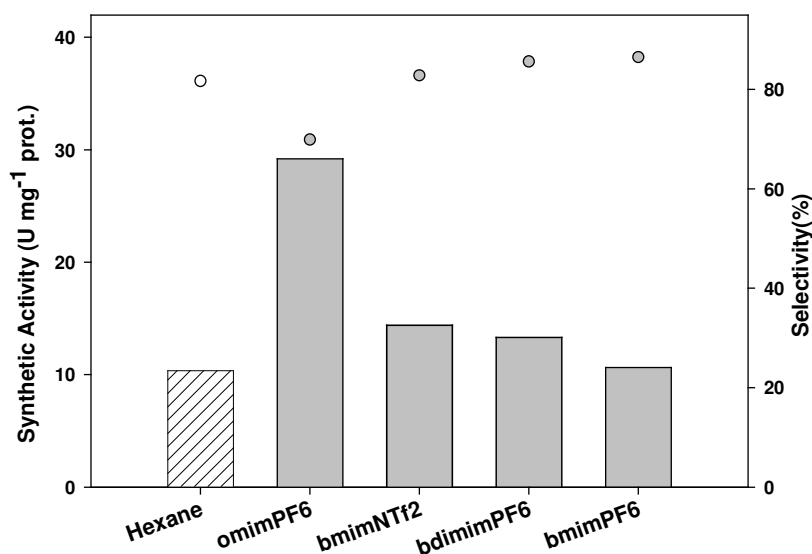
**Figure 6.3.** Comparison of experimental rate data and the rate data calculated by the kinetic model ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ).

### 6.3.3. Effect of ionic liquid media on free CaLB

The effect of four different ionic liquids ([bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bdmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]) on the activity and selectivity of free *Candida antarctica* lipase B for the synthesis of butyl propionate by transesterification from vinyl butyrate and 1-butanol at 50°C was studied. The enzymatic reaction was also carried out in n-hexane, a classical organic solvent for lipase-catalyzed ester synthesis in non-aqueous environments [24], in the same conditions to compare the efficiency of ionic liquids for use as reaction media.

**Figure 6.4** shows the synthetic activity and selectivity exhibited by the enzyme in n-hexane and in the different ionic liquids.

## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>



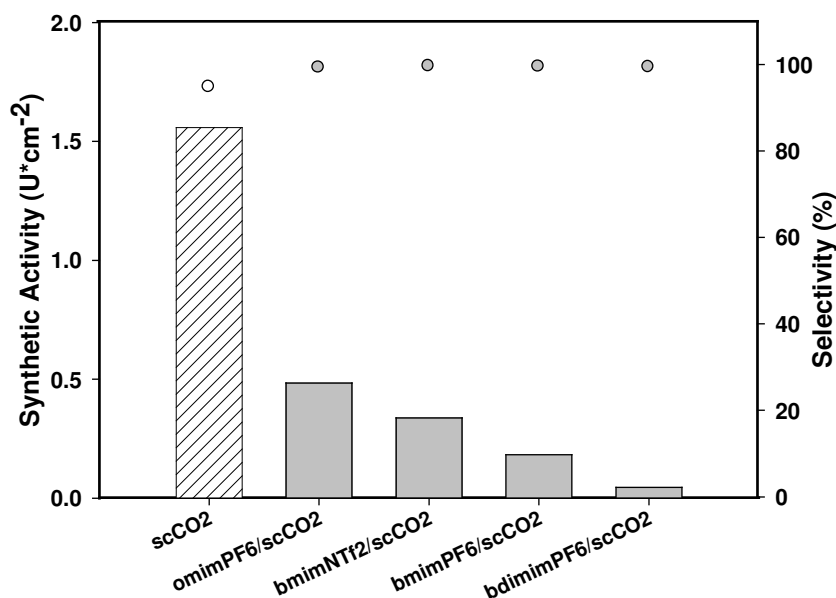
**Figure 6.4.** Initial reaction rate (bars) and selectivity (points) exhibited by free *Candida antarctica* lipase B for butyl propionate synthesis in n-hexane and in four ionic liquids ([bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bdmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]). The reaction conditions were T = 50°C, vinyl propionate 150 mM and 1-butanol 100 mM.

As can be seen in **Figure 6.4**, enzyme activity in all the assayed ILs was much higher than that obtained in n-hexane, demonstrating the greater suitability of these neoteric solvents for the proposed reaction. The sequence of enzyme activity observed was the following: [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] > [bdmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. In general, for the ILs based on the same anion, the hydrophobicity increased with increasing length of the alkyl group on the cation [25]. According to the data shown in **Figure 6.4**, the synthetic activity was gradually enhanced by increasing hydrophobicity of ILs for the same anion, which could be explained by the fact that the increase in hydrophobicity of the medium could allow the preservation of the essential water layer around the protein molecule, thus reducing direct protein-ion interactions. We reported this effect in a previous work for the butyl butyrate synthesis in water-miscible and water-immiscible ionic liquids [20]. On the other hand, the differences in selectivity between the assayed ILs (data included in **Figure 6.4**) could be attributed to their specific abilities to reduce water activity (A<sub>w</sub>) in the enzyme microenvironment. In this sense, an increase in the hydrophobicity of the IL generally involves an increase in free water molecules, which can act as nucleophile acceptors in the transesterification reaction and so lead to a loss in selectivity.

### 6.3.4. Synthesis of butyl propionate catalyzed by the active membranes in scCO<sub>2</sub> and IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems

The efficiency of the butyl propionate synthesis from vinyl propionate and 1-butanol catalysed by CaLB immobilized on dynamic membranes at 50°C and 80 bar in scCO<sub>2</sub> and IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems were analyzed. Initial substrate concentrations were 150 mM vinyl propionate and 100mM 1-butanol. In the biphasic systems, the ionic liquid provides an adequate microenvironment for the catalytic action of the enzyme, while scCO<sub>2</sub> acts as bulk phase. Four ionic liquids, namely [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] and [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], were used to study the influence of different cations and anions on activity and selectivity of immobilized *Candida antarctica* lipase B.

**Figure 6.5** shows the synthetic activity and selectivity of immobilized CaLB on ceramic membranes in scCO<sub>2</sub> medium and in the four different IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems.

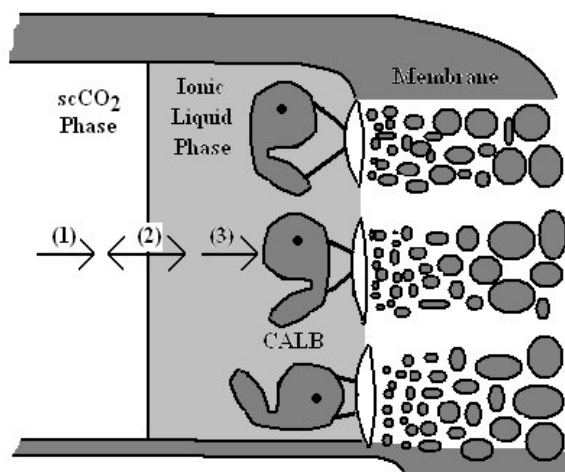


**Figure 6.5.** Initial reaction rate (bars) and selectivity (points) of immobilized CaLB in scCO<sub>2</sub> media and in four different IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems: [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] and [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. The reaction conditions were T = 50°C, P =80 bar, vinyl propionate 150 mM and 1-butanol 100 mM.

## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>

As can be seen, the synthetic activity of the immobilized lipase in IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems is lower than in scCO<sub>2</sub> assayed alone. Similar results were found by Mori et al. [26] in IL/hexane biphasic systems. These authors reported that the enzymatic membranes prepared by simple adsorption of CaLB onto the surface were more reactive than membranes prepared with ILs. For the assayed IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems, the initial reaction rate increased in the following sequence: [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] < [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], which was practically in agreement with the activity sequence exhibited by free *Candida antarctica* lipase B in homogeneous ionic liquid systems ([bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [bdmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] < [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] < [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]), with the exception of [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] and [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

These results may be explained taking into account that biotransformation occurs within the ionic liquids phases, so substrates have to be transported from scCO<sub>2</sub> to the ionic liquid phase. The mechanism of substrate transport involves three consecutive steps (**Figure 6.6**): diffusion of the substrates through the diffusion layer from the bulk of the scCO<sub>2</sub> phase to the IL/scCO<sub>2</sub> interface (step 1); partitioning of the substrates between the scCO<sub>2</sub> and the IL phase (step 2), and diffusion into the IL phase towards the immobilized enzyme (step 3).



**Figure 6.6.** Mechanism of substrate transport from scCO<sub>2</sub> phase to the immobilized enzyme in a IL/scCO<sub>2</sub> biphasic system.



## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>

In order to analyze step 2, the partition coefficients of the substrates and products of the transesterification reaction between the ILs and n-hexane were determined (**Table 6.1**). n-Hexane was chosen as reference organic solvent because its solvent capability is comparable to that of scCO<sub>2</sub> in mild operating conditions.

**Table 6.1.** IL/hexane partition coefficient values of 1-butanol, vinyl propionate, butyl propionate and propionic acid in four ILs: [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] and [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>].

	[bmim <sup>+</sup> ][NTf <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	[omim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	[bmim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]	[bdimim <sup>+</sup> ][PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> ]
Vinyl propionate	1.10	1.15	0.71	0.22
1-Butanol	5.21	3.63	2.46	0.68
Butyl propionate	0.51	0.49	0.15	0.03
Propionic acid	6.77	2.43	2.66	1.31

As can be observed in **Table 6.1**, the sequence found in the partition coefficients of the substrates was the following: [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] > [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] > [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. Compounds with high IL/hexane partition coefficients were more strongly absorbed in ILs. This sequence could explain the change in the initial reaction rate sequence between [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] and [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] in the IL/scCO<sub>2</sub> biphasic respect to the ionic liquid used as homogeneous medium, since the higher K value for [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] indicates greater absorption of the substrates in this ionic liquid and therefore an easier contact between the substrates and the catalytic core of the enzyme. Furthermore, K values show that the substrates of the reaction are more strongly absorbed in [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] than in [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. This fact could explain the lower difference in the activity values between [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>] and [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] in the biphasic systems (**Figure 6.5**) compared with that observed in the homogeneous media (**Figure 6.4**).

The observed activity decrease in IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems could be due to limitations in the mass-transfer phenomena across the IL-layer around the biocatalyst, rather than to an enzyme deactivation phenomenon. In fact, the protective effect of ILs on enzymes against both non-aqueous environments [11] and scCO<sub>2</sub> [17] in extreme conditions has been reported. It might be concluded that the activity shown by CaLB immobilized in the IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems depends on two factors: the specific enzyme-IL interactions and the mass-transfer limitations between scCO<sub>2</sub> and ILs. Therefore, the appropriate selection of the IL can greatly improve the enzymatic activity and the mass-transfer phenomena, permitting better design of IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems.

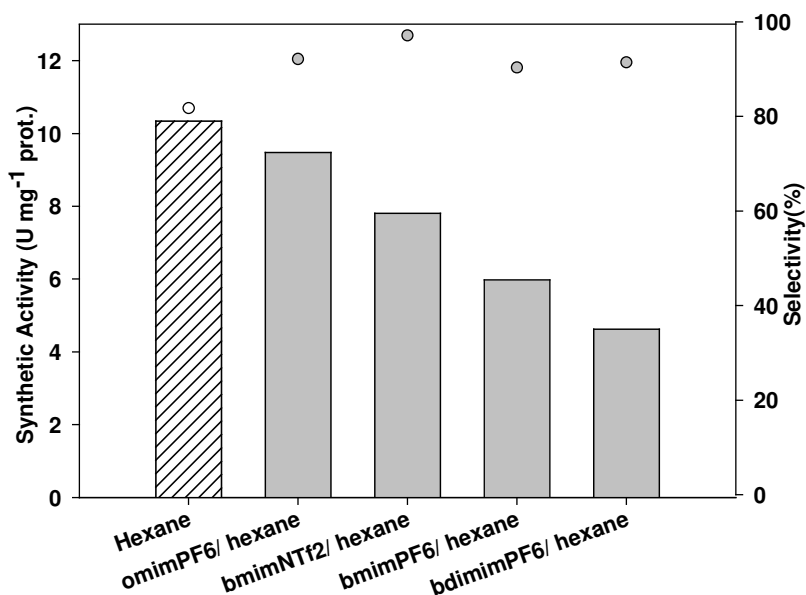
## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>

The selectivity was also determined to quantify the catalytic efficiency of the reaction in the IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems. An increase in the selectivity was observed in these media (>99.5 %) with respect to scCO<sub>2</sub> assayed alone (95%) (**Figure 6.5**). These results could be explained by the fact that water immiscible ILs were used, which have a specific ability to reduce water activity in the enzyme microenvironment. Therefore, ILs provide an adequate microenvironment for the enzyme, allowing high selectivity, while the use of supercritical carbon dioxide as a second phase in biphasic systems facilitates recovery of the products without any cross-contamination of the extract with the ILs.

### 6.3.5. Synthesis of butyl propionate catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in IL/hexane biphasic systems

The ability of free CaLB to catalyze butyl propionate synthesis from vinyl propionate (150 mM) and 1-butanol (100 mM) was studied in IL/hexane biphasic systems at 50 °C in order to better understand of reaction in IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems. It is necessary to point out that CaLB acts in the ionic liquids phase and that n-hexane was chosen as second phase because its solvent capability is comparable to that of scCO<sub>2</sub> in mild operating conditions.

**Figure 6.7** show the initial reaction rate and selectivity exhibited by CaLB in n-hexane and in different IL/hexane biphasic systems.



**Figure 6.7.** Initial reaction rate (bars) and selectivity (points) of free CaLB in scCO<sub>2</sub> media and in four different IL/hexane biphasic systems: [omim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][NTf<sub>2</sub><sup>-</sup>], [bmim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>] and [bdimim<sup>+</sup>][PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]. The reaction conditions were T=50°C, vinyl propionate 150 mM and 1-butanol 100 mM.

As can be observed in **Figure 6.7**, the synthetic activity shown by the free lipase in IL/hexane biphasic systems was lower than in n-hexane assayed alone, contrary what happened in ionic liquid homogeneous systems. Therefore, the use of IL/hexane biphasic systems involves important mass-transfer limitations. It has also been observed that, as expected, the increase in the initial reaction rate in the assayed IL/hexane biphasic systems follows the same sequence as the initial reaction rate in IL/scCO<sub>2</sub> biphasic system. Thus, the observed results in IL/hexane ratify that obtained in IL/ scCO<sub>2</sub> and, once again, emphasise the importance of considering the effect of ionic liquid on enzyme activity and mass transfer phenomena in the design of IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems.

In IL/hexane biphasic systems, selectivity was greater than when n-hexane was assayed alone (**Figure 6.7**). The same behaviour was showed by the immobilized enzyme in IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems compared with that observed when scCO<sub>2</sub> was used as reaction medium. In this sense, it can be observed that when the enzyme acts in a water immiscible ionic liquid, which got a low water activity around the enzyme, selectivity was increased.

### 6.4. CONCLUSIONS

CaLB immobilized on  $\alpha$ -alumina microporous membranes was successfully used as catalyst for the synthesis of butyl propionate from vinyl propionate and 1-butanol in IL/ scCO<sub>2</sub> biphasic systems at 50°C and 80 bar. When IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems were used, the selectivity of the process increased up to >99.5% compared with when supercritical carbon dioxide assayed alone, although the synthetic activity was lower. To improve our understanding of catalysis in IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems, the synthesis of butyl propionate was also carried out in IL media and in IL/hexane biphasic systems and the mass-transfer phenomena were studied by reference to the IL/hexane partition coefficients. These studies showed that the efficiency of these systems were dependent on both the specificity of the enzyme-IL interactions and the mass-transfer phenomena between IL and scCO<sub>2</sub> immiscible phases. The observed activity loss in IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems may be due to limitations in the mass-transfer phenomena across the IL-layer around the biocatalyst. In addition, the initial rate values fitted a model based on the Ping Pong Bi-Bi mechanism with competitive alcohol inhibition in scCO<sub>2</sub> medium.

This work clearly demonstrates the exciting potencial of combining ILs, scCO<sub>2</sub> and membrane technology for carrying out synthetic biocatalytic green processes in anhydrous conditions. ILs provide an adequate microenvironment for the enzyme, allowing high selectivity, while the use of supercritical carbon dioxide as a second phase in biphasic systems make possible the easy recovery of the products without any cross-contamination of the extract with the ILs.

### 6.5. NOMENCLATURE

[A]<sub>H(i)</sub> concentrations of the analyte in the hexane donor phase before the extraction process (mol · L<sup>-1</sup>)

[A]<sub>H(f)</sub> concentrations of the analyte in the hexane donor phase after the extraction process (mol · L<sup>-1</sup>)

V<sub>H</sub> volume of the hexane phase in the extraction process (mL)

V<sub>IL</sub> volume of the IL phase in the extraction process (mL)

S the membrane internal surface (cm<sup>2</sup>)

V<sub>total</sub> reactor internal volume (mL)

t reaction time (min)

Ca product concentration in the reactor (mol · L<sup>-1</sup>)

ra the reaction rate (mmol · min<sup>-1</sup> · cm<sup>-2</sup>)

V<sub>0</sub> initial reaction rate (mmol · min<sup>-1</sup> · cm<sup>-2</sup>)

V<sub>max</sub> maximum reaction rate (mmol · min<sup>-1</sup> · cm<sup>-2</sup>)

[PV] initial vinyl propionate concentration (mol · L<sup>-1</sup>)

[Bu] initial 1-butanol concentration (mol · L<sup>-1</sup>)

K<sub>mPV</sub> Michaelis constants of vinyl propionate (mol · L<sup>-1</sup>)

K<sub>mBU</sub> Michaelis constants of 1-butanol (mol · L<sup>-1</sup>)

K<sub>I</sub> inhibition constant of 1-butanol (mol · L<sup>-1</sup>)

## 6.6. REFERENCES

- [1] A.M. Klivanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature* 409 (2001) 241-246.
- [2] P. Halling, Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 178 -206.
- [3] M. Freemantle, Cleaning up hydrogenations, *Chem. Eng. News* 79 (2001) 21-25.
- [4] S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid/supercritical CO<sub>2</sub> systems, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.
- [5] T. Dumont, D. Barth, C. Corbier, G. Branlant, M. Perrut, Optimization of enzyme environment, *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992) 329-333.
- [6] S. Srivastava, G. Madras, J. Modak, Esterification of myristic acid in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluid.* 27 (2003) 55-64.
- [7] P. Lozano, G. Villora, D. Gómez, A.B. Gayo, J.A. Sánchez-Conesa, M. Rubio, J.L. Iborra, Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluid.* 29 (2004) 121-128.
- [8] B. Al-Duri, R. Goddard, J. Bosley, Characterisation of a novel support for biocatalysis in supercritical carbon dioxide, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11 (2001) 825-834.
- [9] J.D. Holbrey, K.R. Seddon, Ionic liquids, *Clean Prod. Proc.* 1 (1999) 223-236.
- [10] F. van Rantwijk, R. Madeira Lau, R.A. Sheldon, Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 131-138.
- [11] P. Lozano, T. De Diego, D. Carré, M. Vaultier, J.L. Iborra, Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis, *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 1529-1533.
- [12] R.A. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.

## 6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>

---

- [13] M.T. Reetz, W. Wiesenhöfer, G. Franciò, W. Leitner, Biocatalysis in ionic liquids: Batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase, *Chem. Commun.* 9 (2002) 992-993.
- [14] P. Lozano, T. de Diego, S. Gmouh, M. Vaultier, J.L. Iborra, Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 661-669.
- [15] L.A. Blanchard, Z. Gu, J.F. Brennecke, High-pressure phase behavior of ionic liquid/CO<sub>2</sub> systems, *J. Phys. Chem. B.* 105 (2001) 2437-2444.
- [16] L.A. Blanchard, J.F. Brennecke, Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287-292.
- [17] P. Lozano, T. de Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra, Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150 °C, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 380-382.
- [18] D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, Enzymatic membrane bioreactors and their applications, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 738-750.
- [19] A.R. Toral, A.P. de los Ríos, F.J. Hernández, M.H.A. Janssen, R. Schoevaart, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1095-1099.
- [20] A.P. de los Ríos, F.J. Hernández-Fernández, F.A. Martínez, M. Rubio, G. Villora, The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of *Candida antarctica* lipase B in ester synthesis, *Biocatal. Biotrans.* 25 (2007) 151-156.
- [21] P. Lozano, A.B. Pérez-Marín, T. de Diego, D. Gómez, D. Paolucci-Jeanjean, M.P. Belleville, G.M. Rios, J.L. Iborra, Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: Preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media, *J. Membr. Sci.* 201 (2002) 55-64.
- [22] A.V. Paiva, D.V. Rossum, F.X. Malcasa, Kinetics of lipase-mediated synthesis of butyl butyrate in n-hexane, *Biocatal. Biotransform.* 20 (2002) 43-51.
- [23] R. Goddard, J. Bosley, B. Al-Duri, Esterification of oleic acid and ethanol in plug flow (packed bed) reactor under supercritical conditions Investigation of kinetics, *J. Supercrit. Fluid.* 18 (2000) 121-130.

## **6. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester síntesis in IL/scCO<sub>2</sub>**

---

- [24] M. Persson, U.T. Bornscheuer, Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 22 (2003) 21-27.
- [25] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [26] M. Mori, R. Gomez Garcia, M.P. Belleville, D. Paolucci-Jeanjean, J. Sanchez, P. Lozano, M. Vaultier, G. Rios, A new way to conduct enzymatic synthesis in an active membrane using ionic liquids as catalyst support, *Catal. Today* 104 (2005) 313-317.

# 7

## **Conclusions and Outlook**





### 7. CONCLUSIONS AND OUTLOOK

#### 7.1. CONCLUSIONS

This thesis has focused on the use of ionic liquids, supercritical carbon dioxide and membrane technology as combined reaction and separation media in order to both improve the efficiency of the bioprocesses and minimize waste generation and energy consumption.

- Regarding the use of *ionic liquids* as reaction media in biocatalytic processes:

1. All the treatments applied to ionic liquids, including equilibration with aqueous solutions of salts, NaHCO<sub>3</sub> or Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, or the addition of catalytic amounts of a non-reactive organic base (triethylamine) to the reaction mixture resulted in enhanced activity and/or selectivity of *Candida antarctica* lipase B. These treatments represent easy-to-use approaches that could be used to improve the efficiency of enzymatic reactions in ionic liquids when the reaction does not proceed smoothly.
2. The immobilization of *Candida antarctica* lipase B as a crosslinked enzyme aggregate (CLEA) showed itself as a promising approach to render enzymes tolerant to denaturing ionic liquids, successfully catalysing the acylation of 1-phenylethanol and 1-phenylethylamine in [bmim<sup>+</sup>][NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] and [bmim<sup>+</sup>][dca] with high enantioselectivity.
3. Ionic liquids were also seen to be a suitability reaction media for the enzyme Penicillin G acylase (PGA; EC 3.5.1.11). Native penicillin G acylase exhibited higher stability in the assayed ILs than in organic solvents such as 2-propanol at low water content. Moreover, an enhancement of the PGA stability was observed in the presence of substrate in the ionic liquids based on tetrafluoroborate and hexafluorophosphate anions.

- Furthermore, supported liquid membranes (SLMs) based on *ionic liquids* have been shown to be promising **membranes** for use in integrated reaction/separation processes, specifically applied to the racemic resolution of *rac*-1-phenylethanol and *rac*-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. The integrated reaction/separation processes were carried out successfully since the (S)- alcohol isomer was separated in the receiving phase from the (R)-alcohol isomer, which remained in the feed phase as the ester product. The following conclusions resulted from the analysis of the process variables:

1. The SLM based on [bmim<sup>+</sup>][BF<sub>4</sub><sup>-</sup>] was seen to be the most suitable SLM for the selective separation of the compounds involved in the kinetic resolutions.
2. The water content of the medium was a key parameter for both the synthetic activity and selectivity of the process.
3. The efficiency of the processes increased with increasing concentrations of the enzyme within the experimental interval.
4. The greatest efficiency in the processes was achieved when the longest vinyl ester was used as acyl donor in the transesterification reactions.

- A new bioprocess based on **ionic liquids, supercritical carbon dioxide** and **membrane technology** has been developed for the synthesis of alquil esters:

1. Synthetic  $\alpha$ -alumina microporous membranes with immobilized *Candida antarctica* lipase B (CaLB) were successfully used as catalyst for the synthesis of butyl propionate from vinyl propionate and 1-butanol in IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems at 50 °C and 80 bar. In these systems, the immobilized enzyme showed an increase in the selectivity of the process compared with supercritical carbon dioxide assayed in the absence of IL. Therefore, the ILs provide an adequate microenvironment for the enzyme, allowing high selectivity, while the use of supercritical carbon dioxide as a second phase in biphasic systems facilitates the recovery of the products without any cross-contamination of the extract with the ILs.
2. The efficiency of the IL/scCO<sub>2</sub> biphasic systems was found to be dependent on both the specificity of the enzyme–IL interactions and the mass-transfer phenomena between IL and scCO<sub>2</sub> immiscible phases.

### 7.2. OUTLOOK

The results of this thesis not only contribute to replacing the traditional volatile organic compounds used in reaction and separation processes, but also shed light on another topic in green chemistry: “*Process Intensification*”, which consists of the integration of several units of operation into one process step. The results reported could contribute to the design of an intensified method of producing enantiomerically pure or enriched compounds using ionic liquid membrane reactors, which integrate catalytic conversion, product separation and/or concentration and catalyst recovery into a single operation.

As ionic liquids can be designed for a specific application, it is expected that the bioprocesses developed in this thesis using ionic liquids, carbon dioxide and membrane technology will be applicable to many industrial processes, especially in the fine chemical and pharmaceutical industry. In these industries, the use of this new technology could lead to enormous savings in waste generation and energy consumption, while providing high product quality (food-grade, without any ionic liquid contamination). Therefore, it is recommended to extend the research to other useful products where the new production method would be a solution to the enormous amounts of waste produced and energy consumed, the low purity of products and associated catalyst recovery problems.

Before the widespread industrial application of ionic liquids, ionic liquid research in the near future should focus on the long-term use and environmental impact of ionic liquids (long-term stability, toxicity, biodegradability, etc.). More models should be developed that predict the physical and chemical properties of ionic liquids based on a choice of cation and anion. This will make it possible to select a suitable ionic liquid for each application, without expensive time-consuming experimentation in the laboratory. The ability to tailor the properties of ionic liquids will be used more and more to design perfect solvents for each application.

The use of ionic liquids in combination with supercritical carbon dioxide in chemical processes could lead to economic and environmental benefits compared with conventional production processes. Reductions in the use of catalyst and volatile organic solvents lead to lower costs for raw materials and lower waste disposal costs. The energy costs for pressurizing the carbon dioxide in the ionic liquid/supercritical carbon dioxide process are lower than the energy costs for evaporating the solvent in conventional processes. From an economic and an environmental point of view, fast implementation of the new process-set up is desirable. However, although many new applications of these systems will be found, it is expected that initially they will only be applied industrially for the production of specific chemicals, where they offer huge advantages over the conventional production processes.

