



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

*Los líquidos iónicos como nuevos
medios de reacción y separación
en reacciones de
transesterificación enzimáticas*

Memoria que presenta

ANTONIA PÉREZ DE LOS RÍOS

Ingeniera Química, para optar al
Grado de Doctora por la Universidad de Murcia

2007

D^a. Maria Gloria Vllora Cano, Profesora Titular de Universidad del Área de Ingeniería Química en el Departamento de Ingeniería Química

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Los líquidos iónicos como nuevos medios de reacción y separación en reacciones de transesterificación enzimáticas*” realizada por D^a. Antonia Pérez de los Ríos, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Ingeniería Química, y que presenta para la obtención del Grado de Doctora por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 6 de Julio de 2007

D. Demetrio Gómez Pérez, Profesor Titular del Área de Ingeniería Química en el Departamento de Ingeniería Química

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Los líquidos iónicos como nuevos medios de reacción y separación en reacciones de transesterificación enzimáticas*” realizada por D^a. Antonia Pérez de los Ríos, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Ingeniería Química, y que presenta para la obtención del Grado de Doctora por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 6 de Julio 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 “*Los líquidos iónicos como nuevos medios de reacción y separación en reacciones de transesterificación enzimáticas*” ha sido realizada por D^a. Antonia Pérez de los Ríos, bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a. Maria Gloria Vállora Cano y D. Demetrio Gómez Pérez , y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 6 de Julio de 2007

Trabajo presentado para optar al Grado
de Doctora en Ingeniería Química por
la Universidad de Murcia.
Modalidad: Doctorado Europeo

Murcia, a 6 de Julio de 2007

Antonia Pérez de los Ríos
Ingeniera Química

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 autora, Antonia Pérez de los Ríos, ha disfrutado de una beca F.P.I. (Formación del Personal Investigador) del Ministerio de Educación y Ciencia y de una beca de Investigación de la Caja de Ahorros del Mediterráneo.

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dedicarle un especial agradecimiento a la Dra. Dña. María Gloria Vllora Cano. Para mi es un honor que una persona como ella me haya dirigido la tesis y por ello me gustaría darle las gracias de corazón por su inestimable ayuda, comprensión y confianza y sobre todo por la incondicional amistad que me ha ofrecido durante todos estos años. Todo lo que pueda decir no sería suficiente para expresarte mi gratitud.

Deseo también agradecer al Dr. D. Demetrio Gómez Pérez, codirector de la presente Tesis, su inestimable apoyo y estímulo durante estos años.

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

También deseo expresar mi agradecimiento a Dña. Paquita Tomás por su gran ayuda, especialmente en la última etapa de la Tesis, pero sobre todo por brindarme su amistad. Muchas gracias por todo.

A los doctores Roger Sheldon y Fred van Rantwijk del grupo de investigación Biocatalysis and Organic Chemistry 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.

A D. José María Palacios y a Dña. Maria Loreto Bajón, pertenecientes al Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (Madrid), por su aportación a la realización de este trabajo.

Quiero también expresar mi agradecimiento a D. Jose Luis Iborra 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 Pepe Ruiz y Venancio Rodríguez por iniciarme en el apasionante mundo de la investigación, y sobre todo por su amistad, confianza y comprensión.

Agradecimientos

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 tener siempre una sonrisa para mí.

A Mercedes Lloréns, Toñi Baeza y Asunción Hidalgo por su ayuda y enseñanza en mis primeros pasos en la docencia. Ha sido todo un placer compartir prácticas con vosotras. Muchas gracias por todo.

A Juan Ortuño y Víctor Meseguer por saber siempre cómo hacerme reír. Juan, muchas gracias por pasar a *darnos vuelta* todos los días antes de irte. Gracias por vuestra amistad.

A Fuensanta Máximo y Maribel Aguilar por todo lo que hemos compartido, tanto material (vino de Canaán, caramelos, bombones, etc.), espacial (aeróbic, guateques, prácticas, etc.) como sentimental (amistad). Habéis hecho estos años inolvidables.

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

A Claudia por su motivación y buenos consejos.

A Joaquín Herráiz por estar siempre dispuesto para ayudarme 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: Paco, Ana Belén, María, María Dolores, Javi, Antonio, Vicente, Angel, Juan, Emilio, Alberto, María Jiménez, Juani, Irene, Gloria, Eric, Esther, Imma, Noelia, etc. Gracias por los buenos momentos que hemos compartido (viajes, cafetería, discusiones sobre “temas trascendentales”) y los que nos quedan por compartir (nos debemos un viaje no oficial). Especialmente me gustaría dar las gracias a Ana Belén, a María y a María 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.

Agradecimientos

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

A mis padres, Mateo y Toñi, siempre alentadores y reconfortantes en los momentos bajos y a los que es imposible pagar su comprensión, paciencia y cariño como se merecen. Gracias también por transmitirme los valores de esfuerzo, responsabilidad y paciencia, que son sin duda los responsables de que este trabajo haya llegado a buen término. Os quiero mucho.

A mis hermanos, Juanjo, Mentxu y Laura por su cariño y apoyo incondicional. Por poder contar con ellos siempre para todo y hacer inolvidables todos los momentos que compartimos. Os quiero mucho.

A mi abuela Antonia y mi abuelo Jaipe, por su cariño incondicional y su continua motivación. Habéis sido el pilar de mi desarrollo personal. Gracias por esperarme siempre con una sonrisa. A mi abuelo Laureano y mi abuela Carmen, por su cariño y por hacerme pasar tan buenos ratos a su lado. Sois los mejores abuelos del mundo.

A mis padrinos (Pepe y Juana) y a mis tíos, por su cariño y por su constante apoyo en todos los proyectos que he emprendido a lo largo de mi vida . Muchas gracias.

A mi sobrina “Chikinkira” (Carmen), 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. Gracias por ser como eres. Te quiero muchísimo.

A Lola, Paco, Luisa, Pedro, Jesús y Mari Carmen por todo el cariño que me han demostrado estos años. A José Antonio Dehesa, por los buenos momentos que hemos compartido. Gracias por vuestra continua ayuda, motivación y estímulo. Por estar siempre a nuestro lado, hasta en estancias y congresos (Holanda, Tenerife, Córdoba, etc.). Muchas gracias por todos los momentos que compartimos. Lola, muchas gracias por los dulces (tarta de manzana, pan de Calatrava, etc) que me han endulzado estos años. Gracias de corazón. Os quiero mucho.

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

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

Agradecimientos

Y me dejo lo mejor para el final. PACO, sin ti esto hubiese sido inimaginable. Tú has sido estos años mi principal apoyo y mi fuente de motivación e inspiración. Hemos compartido experiencias inolvidables y hemos aprendido mucho juntos durante estos años. Has estado a mi lado en todos los momentos de mi vida tanto profesionales como personales. No sabes lo que significa para mí girar la cabeza y verte sentado a mi lado. Gracias por compartir todo esto conmigo, por estar a mi lado incondicionalmente, por hacer realidad todos mis sueños. MUCHAS GRACIAS. TE QUIERO MUCHÍSIMO.

A mis padres

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL TRABAJO.....	7
2.1. Objetivos.....	8
2.2. Estructura del trabajo.....	8
3. ANTECEDENTES.....	10
3.1. Empleo de disolventes alternativos a los disolventes orgánicos.....	11
3.1.1. Disolventes obtenidos a partir de materias primas renovables.....	13
3.1.2. Agua.....	13
3.1.3. Disolventes fluorados.....	15
3.1.4. Fluidos supercríticos.....	16
3.1.5. Líquidos iónicos.....	18
3.2. Líquidos iónicos: Obtención, propiedades y aplicaciones.....	19
3.2.1. Composición química.....	19
3.2.2. Desarrollo histórico.....	20
3.2.3. Obtención de los líquidos iónicos.....	22
2.2.3.1. <i>Reacciones de cuaternización.....</i>	<i>23</i>
2.2.3.2. <i>Reacciones de intercambio del anión.....</i>	<i>25</i>
3.2.4. Propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos.....	28
3.2.5. Los líquidos iónicos como disolventes “verdes”.....	39
3.2.6. Aplicaciones generales de los líquidos iónicos.....	40

3.3. Aplicaciones de los líquidos iónicos en reacciones químicas y bioquímicas.....	42
3.3.1. Aplicaciones de los líquidos iónicos en reacciones químicas.....	42
3.3.1.1. Como disolventes.....	42
3.3.1.2. Como catalizadores	43
3.3.1.3. Como co-catalizadores	44
3.3.2. Aplicación de los líquidos iónicos como disolventes en reacciones biocatalíticas.....	44
3.3.2.1. Utilización de disolventes no acuosos en reacciones biocatalíticas	44
3.3.2.2. Las lipasas como candidatas más idóneas a ser utilizadas en líquidos iónicos.....	50
3.3.2.3. Los líquidos iónicos como medios no convencionales en reacciones biocatalíticas	58
3.4. Aplicaciones de los líquidos iónicos en procesos de separación a través de membranas.....	62
3.4.1. Tecnología de membranas.....	62
3.4.1.1. Clasificación de las membranas.....	63
3.4.1.2. Procesos de membrana.....	66
3.4.2. Membranas líquidas	70
3.4.2.1. Membranas de volumen líquido.....	71
3.4.2.2. Membranas líquidas emulsionadas.....	72
3.4.2.3. Membranas líquidas soportadas.....	72
3.4.3. Membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos.....	78
3.5. Bibliografía.....	80

4. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN EN REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICAS EN MEDIOS LÍQUIDO IÓNICO.....	99
4.1. Introducción.....	100
4.2. Materiales y métodos.....	102
4.2.1. Enzima y materiales.....	102
4.2.2. Ensayos de actividad enzimática.....	102
4.2.3. Análisis cromatográfico.....	103
4.2.4. Determinación de la actividad y selectividad enzimática.....	118
4.3. Resultados y discusión.....	119
4.3.1. Efecto del medio de reacción en la actividad y selectividad de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	119
4.3.2. Influencia del pH sobre la actividad y selectividad de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en líquidos iónicos.....	120
4.3.3. Influencia de la temperatura en la actividad y selectividad de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en líquidos iónicos.....	121
4.3.4. Efecto del dador de acilo en reacciones de transesterificación catalizadas por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en líquidos iónicos.	123
4.3.5. Efecto del alcohol en reacciones de transesterificación catalizadas por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en líquidos iónicos.	125
4.4. Conclusiones.....	127
4.5. Bibliografía.....	128

5. EFECTO DEL MEDIO LÍQUIDO IÓNICO EN LA ACTIVIDAD, SELECTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE CALB EN REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN	130
5.1. Introducción.....	131
5.2. Materiales y métodos.....	133
5.2.1. Enzima y materiales.....	133
5.2.2. Síntesis de líquidos iónicos.....	133
5.2.3. Ensayos de actividad enzimática.....	135
5.2.4. Ensayos de estabilidad enzimática.....	136
5.2.5. Métodos analíticos.....	137
5.2.5.1. <i>Análisis de resonancia magnética nuclear</i>	137
5.2.5.2. <i>Test de determinación de cloruros</i>	137
5.2.5.2. <i>Análisis cromatográfico</i>	137
5.3. Resultados y discusión.....	138
5.3.1. Efecto del medio líquido iónico en la actividad y selectividad de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	138
5.3.2. Análisis de la estabilidad de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en líquidos iónicos.....	142
5.4. Conclusiones.....	147
5.5. Bibliografía.....	148

6. DESARROLLO DE NUEVOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS DE LIPASA B DE CANDIDA ANTARCTICA ACTIVOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS DESNATURALIZANTES.....	150
6.1. Introducción.....	151
6.2. Materiales y métodos.....	153
6.2.1. Enzima y materiales.....	153
6.2.2. Preparación de derivados enzimáticos entrecruzados de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	154
6.2.2.1. Agregado enzimático entrecruzado covalentemente de lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	154
6.2.2.2. Derivado enzimático de lipasa B de <i>Candida antarctica</i> entrecruzado covalentemente sobre un soporte de polipropileno.....	154
6.2.3. Síntesis de líquidos iónicos.....	154
6.2.4. Ensayos de actividad enzimática.....	155
6.2.5. Métodos analíticos.....	155
6.2.5.1. Análisis de resonancia magnética nuclear.....	155
6.2.5.3. Análisis cromatográfico.....	156
6.3. Resultados y discusión.....	156
6.4. Conclusiones.....	159
6.5. Bibliografía.....	160

7. APLICACIÓN DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS A LA SEPARACIÓN SELECTIVA DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN.....	161
7.1. Introducción.....	162
7.2. Materiales y métodos.....	163
7.2.1. Membranas y materiales.....	163
7.2.2. Preparación de membranas líquidas soportadas.....	165
7.2.3. Estudios de transporte.....	166
7.2.4. Determinación de los coeficientes de reparto de los compuestos entre líquido iónico y n-hexano.....	168
7.2.5. Análisis cromatográfico.....	169
7.2.6. Cálculo de la permeabilidad de compuestos a través de membranas líquidas soportadas.....	170
7.3. Resultados y discusión.....	172
7.3.1. Selección de la membrana polimérica.....	172
7.3.2. Efecto de la fase líquida soportada.....	177
7.3.3. Estabilidad operacional de membranas líquidas soportadas.....	180
7.4. Conclusiones.....	182
7.5. Nomenclatura.....	183
7.6. Bibliografía.....	184

8. ESTUDIO DEL MECANISMO DE TRANSPORTE DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS.....	186
8.1. Introducción.....	187
8.2. Materiales y métodos.....	187
8.2.1. Membranas y materiales.....	187
8.2.2. Preparación de membranas líquidas soportadas.....	188
8.2.3. Estudios de transporte.....	188
8.2.4. Determinación de los coeficientes de reparto de los compuestos entre líquido iónico y n-hexano.....	189
8.2.5. Análisis cromatográfico.....	189
8.3. Resultados y discusión.....	194
8.3.1. Estudios de transporte.....	194
8.3.2. Estimación de los valores de permeabilidad de sustratos y productos de reacciones de transesterificación a través de membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos.....	199
8.4. Conclusiones.....	207
8.5. Nomenclatura.....	208
8.6. Bibliografía.....	209

9. EFECTO DEL MEDIO LÍQUIDO IÓNICO EN LA SEPARACIÓN SELECTIVA DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS.....	210
9.1. Introducción.....	211
9.2. Materiales y métodos.....	212
9.2.1. Membranas y materiales.....	212
9.2.2. Preparación de membranas líquidas soportadas.....	212
9.2.3. Estudios de transporte.....	212
9.2.4. Determinación de los coeficientes de reparto octanol/agua de los líquidos iónicos.....	214
9.2.5. Métodos analíticos.....	215
9.2.5.1. <i>Análisis cromatográfico</i>	215
9.2.5.2. <i>Análisis ultravioleta-visible</i>	216
9.3. Resultados y discusión.....	217
9.3.1. Coeficientes de reparto octanol/agua.....	217
9.3.2. Estudios de transporte.....	219
9.4. Conclusiones.....	223
9.5. Nomenclatura.....	224
9.6. Bibliografía.....	225

10. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD OPERACIONAL DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS.....	226
10.1. Introducción.....	227
10.2. Materiales y métodos.....	228
10.2.1. Membranas y materiales.....	228
10.2.2. Preparación de membranas líquidas soportadas.....	229
10.2.3. Estudios de estabilidad operacional de membranas.....	229
10.2.4. Caracterización de las membranas por SEM-EDX.....	229
10.3. Resultados y discusión.....	230
10.3.1. Caracterización de las membranas comerciales.....	230
10.3.2. Caracterización de las membranas líquidas soportadas.....	231
10.3.3. Estabilidad operacional de membranas líquidas soportadas.....	238
10.3.3.1. <i>Caracterización de las membranas de Nylon con líquidos iónicos inmovilizados después de siete días de operación.....</i>	238
10.3.3.2. <i>Caracterización de las membranas de Mitex con líquidos iónicos inmovilizados después de siete días de operación.....</i>	242
10.4. Conclusiones.....	246
10.5. Bibliografía.....	247

11. CONCLUSIONES GENERALES.....	249
12. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	253
13. ANEXOS.....	256
Anexo 1. Perfiles de reacción.....	257
Anexo 2. Linealización de la 1ª ley de Fick para el cálculo de las permeabilidades de los compuestos a través de membranas líquidas soportadas.....	272
14. RESUMEN EN INGLÉS DE LA TESIS DOCTORAL	304

1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

El principal desafío del desarrollo humano en el siglo XXI es conciliar la ciencia y la tecnología orientadas hacia la innovación productiva con la preservación de la naturaleza y la satisfacción de las necesidades sociales de toda la humanidad en un marco de sostenibilidad. La Estrategia Europea para un Desarrollo Sostenible aprobada en la Cumbre de Gotemburgo en junio de 2001[1], definía el nuevo objetivo estratégico para la Unión Europea: "convertirse en la economía del conocimiento más competitiva y dinámica del mundo, capaz de un crecimiento económico sostenible con más y mejor empleo y una mayor cohesión social, yendo todo ello de la mano de la adecuada protección del medio ambiente". Ante este panorama han surgido numerosos programas de actuación como el de "Química Verde" que promueve el diseño, desarrollo e implementación de productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen el uso y producción de sustancias peligrosas para el medio ambiente y para la salud. La motivación de este programa es tratar de solventar problemas actuales de la sociedad tales como la elevada contaminación, generación de residuos tóxicos y consumo de recursos no renovables.

Muchos de los procesos productivos implantados en la industria química, y especialmente en las industrias de química fina y farmacéutica, requieren elevados consumos de energía y generan grandes cantidades de residuos. Algunos datos pueden ilustrar esta afirmación, por ejemplo, el consumo de energía de la industria química supone el 34% del consumo de energía mundial [2] y la cantidad total de residuos generados en la Unión Europea es de 350 millones de toneladas/año [3] de residuos no peligrosos y de 62 millones de toneladas/año [3] de residuos peligrosos. Conforme los intereses medioambientales y las legislaciones van siendo más estrictos, se incrementa la necesidad de reemplazar los procesos existentes por nuevas tecnologías de impacto medioambiental nulo (cero emisiones, generación de residuos nula, uso de energías renovables y consumo de energía nulo). Así, el continuo desarrollo tecnológico que se está llevando a cabo en todas las áreas, y en particular en la química, va orientado al diseño, desarrollo e implementación de productos y 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 el menor impacto sobre el medio ambiente.

Uno de estos retos lo constituye la búsqueda de disolventes alternativos a los disolventes orgánicos convencionales. El elevado consumo de estos disolventes como medios de reacción y extracción en la industria química le supone a ésta unos costes estimados a nivel mundial de 6.000 millones de Euros/año. Esto unido a sus conocidos efectos perjudiciales sobre el medio ambiente, la seguridad y la salud ha supuesto un enorme incentivo para minimizar su uso, originando un fuerte impulso en el desarrollo de procesos libres de disolvente y de procesos que emplean nuevos disolventes más

respetuosos con el medio ambiente que los convencionales. El grupo de investigación en el que se ha desarrollado el presente trabajo ha centrado sus esfuerzos durante los últimos años en abordar esta problemática, desarrollando nuevos procesos de reacción y separación basados en el empleo de disolventes respetuosos con el medio ambiente tales como los fluidos supercríticos y los líquidos iónicos [4-9].

Los líquidos iónicos representan una alternativa con enorme potencial. Son sales orgánicas que se encuentran en estado líquido a temperaturas próximas a la ambiente. A estos nuevos disolventes se les ha atribuido el calificativo de “verdes” por el hecho de presentar una presión de vapor despreciable a temperatura ambiente [10], siendo además fácilmente reciclables y reutilizables. Así, su empleo como medios de reacción y separación podría ofrecer una solución a los problemas de emisión de disolventes y de generación de residuos. Además, las propiedades de los líquidos iónicos son fácilmente modulables mediante la adecuada selección del anión y catión constituyentes del líquido iónico[11,12], lo que permitiría diseñar un líquido iónico para cada aplicación concreta. Esta propiedad de los líquidos iónicos haría también posible el diseño de líquidos iónicos de baja toxicidad y alta degradabilidad.[13-16].

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 [17]. 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 1, 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.

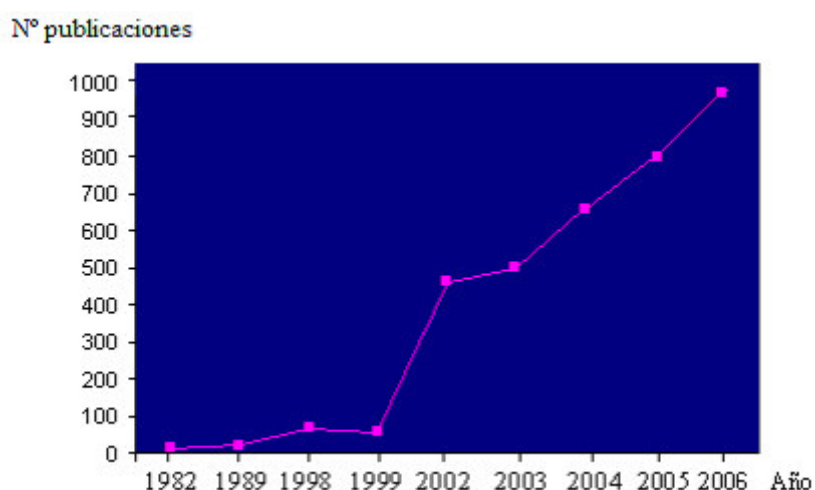


Figura 1.1. Artículos publicados sobre líquidos iónicos en los últimos años.

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 se fundamenta en la sustitución de los disolventes orgánicos convencionales por líquidos iónicos en procesos de síntesis enzimática. Específicamente, se concreta en la utilización de líquidos iónicos como medios de reacción en la biosíntesis de ésteres y como fase líquida en membranas líquidas soportadas para la separación de los reactivos y productos implicados en dichas reacciones. La realización del presente trabajo de investigación permitirá sentar las bases para el diseño posterior de nuevos procesos integrados de reacción/separación (intensificación de procesos) basados en líquidos iónicos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Consejo Europeo de Gotemburgo de 15 y 16 de Junio de 2001. Conclusiones de la Presidencia, http://europa.eu/european_council/conclusions/index_es.htm
- [2] Energy Information Administration, World energy consumption per capita 1970-2025, <http://www.eia.doe.gov/>
- [3] Eurostat, Statistics on population, economics, industry, agriculture, trade, transport, science, technology, and environment of the EU countries, <http://epp.eurostat.cec.eu.int/>
- [4] P. Lozano, D. Delgado, D. Gómez, M. Rubio, J.L. Iborra, A non-destructive method to determine the safranal content of saffron using supercritical extraction combined with HPLC and GC, *J. Biochem. Biophys. Methods* 43 (2000) 367-378.
- [5] P. Lozano, G. Vllora, D. Gómez, A.B. Gayo, J. A. Sánchez-Conesa, M. Rubio y J.L. Iborra, Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide, *J. Supercritic. Fluids* 29 (2004) 121-128.
- [6] F. J. Hernández, A. P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Vllora, A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B: Environmental* 67 (2006) 121-126.
- [7] A. Ruiz Toral, A. P. de los Ríos, F. J. Hernández, Michiel H.A. Janssen, Rob Schoevaart, Fred van Rantwijk, Roger 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.
- [8] A. P. de los Ríos, F. J. Hernández, M. Rubio, D. Gómez, G. Vllora, Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 190-195.
- [9] F. J. Hernández-Fernández, A. P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez and G. Vllora, A novel application of supported liquid membranes based on ionic liquids to the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction, *J. Membrane Sci.* 293 (2007) 73-80.
- [10] R. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.

- [11] S. Dzyuba, A. Bartsch, Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid-supercritical carbon dioxide systems. *Angew. Chem. Int. Edit.* 42 (2003) 148-150.
- [12] 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.
- [13] H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, Ionic liquids: Perspectives for organic and catalytic reactions, *J. Mol. Catal. A* 182-183 (2002) 419-437.
- [14] E. J. Beckman, Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing, *J. Supercrit. Fluids* 28 (2003) 121-191.
- [15] P. Wasserscheid, T. Welton, Eds. *Ionic Liquids in Synthesis*; Wiley-VHC Verlag: Weinheim, Germany, 2003.
- [16] M. J. Earle, J. M. S. S. Esperança, M. A. Gilea, J. N. C. Lopes, L. P.N. Rebelo, J. W. Magee, K. R. Seddon, J. A. Widegren, The distillation and volatility of ionic liquids, *Nature* 439 (2006) 831-834.
- [17] 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/>

2

Objetivos y estructura del trabajo

2. OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DEL TRABAJO

2.1. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo consiste en la evaluación del uso de los líquidos iónicos como nuevos medios de reacción y separación en reacciones de transesterificación enzimáticas.

Para alcanzarlo se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto del líquido iónico sobre la eficacia catalítica y la estabilidad de la enzima lipasa B de *Candida antarctica* en estado libre.
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. Desarrollar nuevas membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos que permitan la separación selectiva de sustratos y productos de reacciones de transesterificación.
4. Evaluar el efecto de la membrana soporte y del líquido iónico inmovilizado en la misma sobre la selectividad de la separación de los compuestos de interés.
5. Analizar el mecanismo molecular del proceso de transporte de los compuestos a través de membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos.
6. Evaluar la estabilidad operacional de las membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos.

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 los líquidos iónicos. Se realiza una revisión exhaustiva de sus propiedades y aplicaciones haciendo especial hincapié en su empleo como medios de reacción en síntesis química y bioquímica y en procesos de separación basados en la tecnología de membranas.

Los **Capítulos 4, 5 y 6** están dedicados al estudio de los líquidos iónicos como nuevos medios de reacción en la síntesis de ésteres mediante reacciones de transesterificación

catalizadas por la enzima lipasa B de *Candida antarctica*. Así, en el **Capítulo 4** se evalúa el efecto de diversos parámetros tales como el pH, la temperatura y la naturaleza del dador de acilo en la actividad y selectividad enzimática en medios líquido iónico, con el fin de seleccionar unas condiciones adecuadas de operación para llevar a cabo las reacciones de transesterificación en estos nuevos medios. Una vez establecidas estas condiciones de reacción, en el **Capítulo 5** se analiza la actividad, selectividad y estabilidad de esta enzima, en su forma libre, en una amplia variedad de líquidos iónicos, con el fin de determinar qué combinaciones de cationes y aniones resultan más adecuadas para llevar a cabo reacciones de transesterificación. Dado que se observó que algunos líquidos iónicos originaban la desnaturalización de la enzima libre, disminuyendo, por tanto su eficacia catalítica, en el **Capítulo 6** se han desarrollado varios derivados enzimáticos entrecruzados de lipasa B de *Candida antarctica* y se ha evaluado su comportamiento en líquidos iónicos desnaturalizantes, con el fin de comprobar si este tipo de inmovilización enzimática hace posible la estabilización de la enzima.

En los **Capítulos 7, 8, 9 y 10** se aborda el estudio de los líquidos iónicos como nuevos medios de separación de los sustratos y productos de reacciones de transesterificación. El estudio se centra en los procesos de separación a través de membranas líquidas soportadas (SLM) basadas en líquidos iónicos, debido a las enormes ventajas que presentan este tipo de procesos tales como los bajos consumos de energía asociados a su operación, las condiciones de trabajo moderadas que requieren y el bajo consumo de disolventes. Inicialmente, en el **Capítulo 7** se evalúa la influencia de la membrana polimérica soporte empleada para inmovilizar el líquido iónico en la separación selectiva de los sustratos y productos de una reacción de transesterificación, con el fin de seleccionar la membrana soporte más adecuada para posteriores estudios. En el **Capítulo 8** se analiza el mecanismo de transporte de los compuestos a través de membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos. Posteriormente, el **Capítulo 9** se dedica al estudio del efecto del líquido iónico empleado como fase líquida inmovilizada en SLMs sobre el transporte selectivo de los sustratos y productos de una reacción de transesterificación. Finalmente, en el **Capítulo 10** se analiza a nivel macro- y microscópico la estabilidad operacional de las membranas líquidas soportadas obtenidas, con el fin de comprobar la potencial aplicación de éstas en procesos de separación durante largos tiempos de operación.

Por último, en el **Capítulo 11** se recogen las principales conclusiones extraídas de los capítulos anteriores y en el **Capítulo 12** se presenta una revisión de las perspectivas futuras de los líquidos iónicos.

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. EMPLEO DE DISOLVENTES ALTERNATIVOS A LOS DISOLVENTES ORGÁNICOS CONVENCIONALES

A pesar de los enormes beneficios que la química ha proporcionado y proporciona a las sociedades modernas, la percepción social de la misma es cada vez más negativa. En la actualidad existe una opinión bastante generalizada de que la producción y el uso de sustancias químicas no pueden mantenerse dentro de los parámetros actuales.

La Química Verde pretende dar respuesta a esta necesidad de cambio mediante un uso más racional de nuestros recursos y conocimientos, enmarcando esta nueva filosofía en los conocidos doce principios de la Química Verde [1]:

- 1) **Prevención:** es preferible evitar la producción de un residuo que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado.
- 2) **Economía atómica:** los métodos de síntesis deben diseñarse de manera que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos.
- 3) **Usar metodologías que generen productos con toxicidad reducida:** siempre que sea posible, los métodos de síntesis deben utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente.
- 4) **Generar productos eficaces pero no tóxicos:** los productos químicos deberán de mantener la eficacia, a la vez que reducir su toxicidad.
- 5) **Emplear disolventes y materiales auxiliares más seguros:** se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc.) y en el caso de que se utilicen, que sean lo más inocuos posible.
- 6) **Disminuir el consumo energético:** los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible. Se intentarán llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente.
- 7) **Utilizar materias primas renovables:** la materia prima ha de ser preferiblemente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.
- 8) **Evitar derivados innecesarios:** se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos).
- 9) **Potenciar la catálisis:** se emplearán catalizadores (lo más selectivos posible), preferentemente reutilizables, en lugar de reactivos estequiométricos.

- 10) **Generar productos biodegradables:** los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente sino que se transformen en productos de degradación inocuos.
- 11) **Desarrollar metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real de los procesos:** las metodologías analíticas serán desarrolladas posteriormente para permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.
- 12) **Minimizar el riesgo potencial de accidentes químicos:** se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios.

Un análisis cuidadoso de los principios anteriores muestra que el disolvente está presente, de un modo más o menos directo, en la mayoría de dichos principios. Su presencia en el quinto principio “Emplear disolventes y auxiliares más seguros” es evidente; sin embargo, también aparece en principios tales como el de la prevención de vertidos, síntesis menos peligrosas y con un menor coste energético, uso de fuentes renovables de materias primas y procesos químicos más seguros.

Hoy en día existe una conciencia generalizada de que el uso de disolventes conlleva graves afecciones medioambientales y para la salud. De hecho, los disolventes constituyen la mayor parte de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos a la atmósfera (aproximadamente un 27% del total) los cuales llevan asociados numerosos riesgos para el medioambiente y la salud (**Cuadro 3.1**).

Cuadro 3.1. Riesgos para el medioambiente y la salud de los COVs.

Riesgos para el medio ambiente	Riesgos para la salud
<p>Los COVs plantean varios problemas para el medio ambiente. Contaminan el agua y dañan los ecosistemas naturales. Además, algunos contribuyen al deterioro de la capa de ozono que protege a la tierra de los rayos ultravioleta mientras que otros, por el contrario, son los responsables de la existencia de ozono en niveles más bajos de la atmósfera, que resulta perjudicial para los seres vivos. El ozono es incluso perjudicial para los cultivos porque altera el proceso de fotosíntesis. Así, se calcula que las pérdidas de la agricultura debidas a los elevados niveles de ozono representan entre el 5 y el 10% de la producción de la Unión Europea.</p>	<p>Los COVs, además de ser volátiles, son solubles en grasas y tóxicos. Estas tres propiedades son, en el mejor de los casos, incómodas, y en el peor, mortales. Entre las principales afecciones producidas por los disolventes cabe destacar la irritación de la piel y la aparición de eczemas. Además, la elevada volatilidad de estos disolventes supone que se puedan inhalar fácilmente en gran dosis, lo que puede originar desde problemas respiratorios hasta daños cerebrales. Muchos disolventes son además cancerígenos y algunos de ellos pueden provocar infertilidad y otros problemas relacionados con la reproducción.</p> <p>Los daños causados por estos disolventes pueden sufrirse durante largos periodos debido a que una vez que entran en el organismo se acumulan en la grasa del mismo y no son fácilmente degradables.</p>

Ante esta situación cabe preguntarse cuáles son las ventajas de usar disolventes, o dicho de otro modo, ¿por qué necesitamos un disolvente? Son cinco las razones esenciales que justifican el empleo de disolventes: disuelven sustancias, permiten crear dispersiones homogéneas, permiten un transporte de materia eficaz, pueden modificar la reactividad química y permiten la sedimentación de sólidos.

En las últimas décadas la preocupación por el uso de disolventes y sus efectos medioambientales ha sido una constante, lo que ha llevado a la eliminación de éstos, cuando ha sido posible, y a la sustitución progresiva por disolventes más seguros.

3.1.1. Disolventes obtenidos a partir de materias primas renovables

La mayoría de los disolventes que se emplean en la actualidad provienen del petróleo. Una alternativa razonable es su sustitución por otros procedentes de la biomasa, que se pueden obtener por procesos de fermentación enzimáticos o químicos. Muchos de estos disolventes presentan baja o nula toxicidad, baja volatilidad, no son corrosivos ni carcinógenos. Además, muchos de ellos se obtienen de residuos vegetales, lo que los hace económicamente competitivos.

Las “biorefinerías” son capaces de producir este tipo de disolventes en grandes cantidades, lo que permite su comercialización a precios competitivos. Ejemplos destacados son los ésteres obtenidos a partir de aceite de soja y, sobre todo, el lactato de etilo. Este disolvente, que se obtiene por fermentación de carbohidratos y esterificación del ácido láctico resultante, se usa en diversas aplicaciones, tales como recubrimiento de superficies, limpieza y decapado de pinturas.

Los residuos de la fabricación del biodiésel también pueden resultar una materia prima adecuada para la preparación de nuevos disolventes, de hecho el Proyecto Integrado Europeo “Solvsafe” aborda, en uno de sus apartados, esta línea de desarrollo.

A pesar de las ventajas indicadas, estos disolventes no están completamente libres de inconvenientes: algunos de ellos pueden considerarse COVs, y además pueden ser inflamables.

3.1.2. Agua

El agua, junto con los disolventes procedentes de fuentes renovables y otros que veremos a continuación, se incluye en lo que se ha dado en llamar disolventes neotéricos (nuevos, recientes, modernos), entre los que se incluyen tanto nuevos fluidos con propiedades modulables como compuestos poco usados como disolventes en la actualidad, pero que poseen un notable potencial para futuras aplicaciones. El incluir al agua, el más antiguo de los disolventes, en este grupo es cuando menos paradójico. De hecho, el agua no sólo es el disolvente de la naturaleza, sino que hasta el siglo XIX era

el disolvente en el que se llevaban a cabo la mayor parte de las síntesis químicas. Sin embargo, el auge que la Química Orgánica experimentó durante el siglo XX, relegó al agua a un papel marginal como disolvente.

Desde un punto de vista medioambiental el agua es la mejor elección como disolvente, ya que ni es inflamable ni tóxico. Debido a ello, el interés por su empleo comenzó a incrementarse a finales del siglo pasado.

Las particulares propiedades del agua, en especial el elevado orden interno impuesto por la asociación de sus moléculas mediante enlaces de hidrógeno, son las responsables de sus ventajas y limitaciones como disolvente y medio de reacción. A causa de las interacciones hidrofóbicas, impuestas por dicho orden, algunas reacciones orgánicas son aceleradas en agua, llegando incluso a modificarse su selectividad.

El mayor inconveniente para utilizar agua como medio de reacción es la baja solubilidad en la misma de muchos compuestos orgánicos. Para solventar esta limitación se usan a menudo medios orgánico-acuosos, lo que reduce en buena medida las ventajas anteriormente comentadas. Una estrategia alternativa es el uso de agentes tensioactivos, compuestos químicos con una región polar y otra apolar, que ayudan a solubilizar los reactivos y/o catalizadores. Dichos compuestos pueden, a su vez, proceder de fuentes renovables.

Otra alternativa es llevar a cabo la modificación química de reactivos y, sobre todo, de los catalizadores, para aumentar su solubilidad en agua [3]. El desarrollo de fosfinas con grupos sulfonato para la preparación de catalizadores solubles en agua es uno de los ejemplos más conocidos. En muchas ocasiones se opta por usar sistemas bifásicos orgánico-acuosos, lo que mejora de modo notable la separación de los productos al final de la reacción. En estos casos es frecuente el empleo de catalizadores de transferencia de fase para mejorar la cinética del proceso. En este grupo de reacciones podemos incluir algunas de aplicación industrial, tales como la reacción de hidrodimerización del butadieno con Ru/TPPMS (TPPMS = $\text{PPh}_2(\text{m-C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{K})$). El proceso más destacable es la hidroformilación de alquenos catalizada por complejos de Rh con fosfinas solubles en agua, tal como Rh/TPPTS. Se trata en realidad de un proceso trifásico, fase gas/ fase orgánica / fase acuosa, que transcurre con mayores conversiones y selectividades al aldehído terminal que el proceso convencional. Además tiene menores costes, menor consumo de energía y produce una menor cantidad de aguas residuales.

A pesar de sus claras ventajas, el uso de agua como disolvente no está totalmente exento de problemas, aparte de los relacionados con la solubilidad ya comentados. Tanto el calentamiento como el enfriamiento del agua requieren una gran cantidad de energía, y además es preciso purificarla antes de devolverla al medio natural.

3.1.3. Disolventes fluorados

Se trata de disolventes orgánicos en los que los enlaces C–H se han sustituido, total o parcialmente, por enlaces C–F. La fortaleza de este enlace les confiere sus interesantes propiedades: son químicamente inertes, por lo que al usarlos se evitan reacciones laterales y se facilita la purificación, son térmicamente estables, no son inflamables ni tóxicos; de hecho esta falta de toxicidad los ha llevado a sustituir a los compuestos clorados como anestésicos por inhalación. En contra de la creencia general, son accesibles en un amplio rango de puntos de ebullición.

Los disolventes fluorados son inmiscibles con muchos disolventes orgánicos y con el agua, lo que permite su uso en sistemas bifásicos y facilita los procesos de separación. Esta estrategia se ha usado con una cierta frecuencia para procesos catalíticos, en los que el catalizador se disuelve en el medio fluorado y se separa y recupera con facilidad. La escasa capacidad disolvente de los líquidos fluorados hace necesario modificar las especies que queremos disolver en ellos. Así, los catalizadores se modifican mediante la introducción de cadenas fluoradas, en general hace falta al menos un 60% en peso de contenido en flúor para lograr una buena solubilidad, lo que a menudo resulta una limitación importante.

Una opción alternativa es el uso de líquidos expandidos mediante la introducción de un gas, por ejemplo dióxido de carbono, que permite alcanzar condiciones de reacción homogéneas y reducir la cantidad de disolvente usado. La eliminación del gas regenera al sistema bifásico y facilita la separación.

La elevada solubilidad del oxígeno en estos medios los hace particularmente adecuados para reacciones de oxidación. Esta solubilidad ha llevado a ensayar algunas aminas perfluoradas como componentes esenciales en sangre artificial. La presencia de las cadenas fluoradas tiene importantes consecuencias sobre las propiedades químicas de los compuestos funcionalizados. Así, las aminas con cadenas fluoradas ven reducida su basicidad de modo drástico, al igual que ocurre con la capacidad de éteres y alcoholes fluorados para aceptar enlaces de hidrógeno. Sin embargo, los alcoholes fluorados poseen una acidez mucho mayor que la de los alcoholes, lo que los hace útiles en algunas aplicaciones.

El principal inconveniente que presentan estos nuevos disolventes es que en muchos casos es necesario el diseño de ligandos específicos para disolver el catalizador en la fase perfluorada. Además, estos disolventes fluorados son gases de efecto invernadero y su descomposición térmica origina compuestos tóxicos tales como el ácido fluorhídrico [2,3].

3.1.4. Fluidos supercríticos

Por encima de su presión y temperatura críticas los compuestos se encuentran en una fase que no es líquida ni gaseosa, sino que comparte las propiedades de ambas (**Figura 3.1**): fluye como un gas y es capaz de disolver sustancias como un líquido.

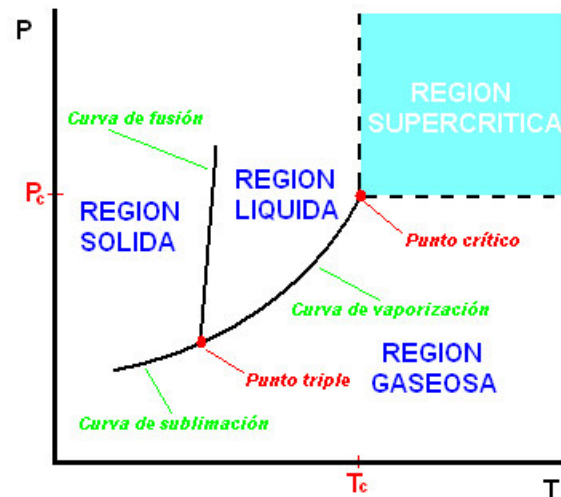


Figura 3.1. Diagrama de fases incluyendo el estado supercrítico.

En estas condiciones los fluidos poseen algunas propiedades muy interesantes, ya que carecen de tensión superficial y viscosidad, son totalmente miscibles con los gases y no presentan limitaciones de transporte de masas. Muchos de ellos son inertes y no tóxicos, lo que permite clasificarlos como disolventes verdes; además, son relativamente baratos y sus propiedades son ajustables mediante variaciones de presión [4].

Aunque son varios los fluidos supercríticos que se han empleado en la industria y el laboratorio, el dióxido de carbono es el que ha encontrado mayor número de aplicaciones a nivel industrial, debido a que es relativamente fácil de obtener en grandes cantidades. Las aplicaciones más conocidas del dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) se encuentran en procesos de extracción [5]. Así, se usa en la extracción de cafeína del café, en la extracción de aromas y fragancias de semillas y plantas, de grasas de las patatas fritas e incluso de aromas de los corchos del embotellado del vino. Una aplicación particular del dióxido de carbono supercrítico se da en la industria del lavado en seco, donde reemplaza al percloroetileno.

En cuanto a sus aplicaciones como medio de reacción, una de sus principales ventajas es la facilidad de separar los productos de reacción del disolvente por una sencilla reducción de la presión. La enorme solubilidad de los gases lo convierte en un medio ideal para reacciones con reactivos gaseosos. Así, se han descrito numerosas aplicaciones en reacciones de hidrogenación [6]. También se usa en la producción de polímeros, como PET o policarbonatos, siendo particularmente ventajoso en la producción de polímeros con cadenas perfluoradas, donde ha sustituido a los clorofluorocarburos (CFCs) en la producción de politetrafluoroetileno (PTFE).

Hay muchas evidencias en la bibliografía sobre la viabilidad del $scCO_2$ como medio para reacciones catalizadas por *lipasas*. Así, Goddard et al. [7] estudiaron la esterificación de ácido oleico con etanol en $scCO_2$ 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 $scCO_2$ frente a la utilización de acetonitrilo [8]. 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 $scCO_2$ que en hexano, alcanzando un 100% de conversión para la reacción catalizada por Novozym 435 cuando se utilizó el anhídrido acético como dador de acilo [9]. Celia et al. [10], han experimentado en este medio la acilación enantioselectiva de rac-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.

El dióxido de carbono supercrítico también ha encontrado aplicaciones industriales como medio de dispersión. Así, la técnica RESS (“Rapid Expansion of Supercritical Solution”) se emplea en procesos de cristalización, permitiendo obtener microcristales de un tamaño uniforme, y se usa, por ejemplo, en la preparación de microcristales de fármacos para su inyección.

En condiciones supercríticas el agua tiene unas propiedades muy diferentes ya que su polaridad es similar a la de la acetona, por lo que es capaz de disolver sustancias orgánicas, a la vez que sales, ocurriendo las reacciones en fase homogénea. El producto iónico disminuye, con lo cual cambian las propiedades ácido-base. De hecho, puede usarse como catalizador de reacciones ácido-base. En las condiciones de presión y temperatura necesarias para alcanzar el estado supercrítico los compuestos orgánicos no resisten, pero se pueden llevar a cabo síntesis de compuestos inorgánicos (síntesis hidrotérmicas). En esas condiciones el agua supercrítica se usa para la destrucción de compuestos orgánicos con alta eficacia, por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales.

En condiciones subcríticas, es posible usar el agua como disolvente de reacciones orgánicas. Las reacciones de hidrólisis funcionan con facilidad, y se usa, por ejemplo, en el reciclado del polietileno tereftalato (PET). También se usa para llevar a cabo reacciones de catálisis básica, como la Knoevenagel o la Dieckman, o de catálisis ácida, como la Friedel–Crafts, sin necesidad de usar un catalizador.

Como vemos, el uso de fluidos supercríticos presenta numerosas ventajas, pero tiene el inconveniente del coste de las instalaciones y del coste energético necesario para su generación.

3.1.5. Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos se pueden definir como sales cuya temperatura de fusión está por debajo de 100°C. 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. Realmente la mayoría de los líquidos iónicos que aparecen en la literatura son líquidos a temperatura ambiente. De hecho, 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.

Los líquidos iónicos han suscitado un gran interés en los últimos años debido principalmente a que estos materiales, usados primeramente en aplicaciones electroquímicas, presentan una gran utilidad como medios de reacción tanto en procesos químicos [11], bioquímicos [12] y como agentes de extracción [13].

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 [14]. Sin embargo, su repercusión en cuanto a su efecto en los vertidos no están claras, ya que los estudios sobre su toxicidad y biodegradabilidad son todavía escasos. De todos modos, este es un campo en el que existe un creciente interés y la información sobre estos aspectos se incrementa a un buen ritmo.

3.2. LÍQUIDOS IÓNICOS: OBTENCIÓN, PROPIEDADES Y APLICACIONES

3.2.1. Composición química

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 (**Figura 3.2**) y un anión poliatómico entre los que destacan el hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imida, trifluoroacetato y triflato (**Figura 3.3**).

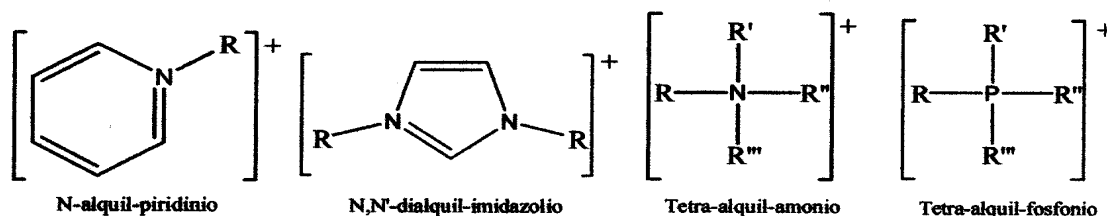


Figura 3.2. Principales cationes presentes en los líquidos iónicos.

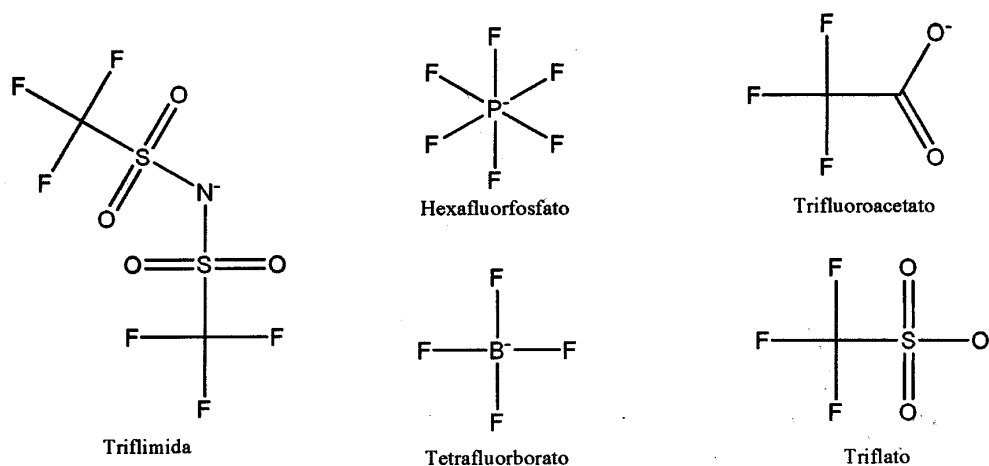


Figura 3.3. Aniones más comunes presentes en los líquidos iónicos.

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 físico-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.

3.2.2 Desarrollo histórico

A mediados del siglo XIX, en el transcurso de una reacción de Friedel-Crafts se obtuvo una fase líquida, a la que se denominó licor rojo. Posteriormente, por técnicas de RMN, se descubrió que este licor rojo era una sal, más concretamente, un líquido iónico.

A principios del siglo XX, se sintetizaron algunos nitratos de alquilamonio líquidos [15]. En los años 60, John Yoke, de la Universidad del Estado de Oregón comprobó que las mezclas de cloruro de cobre (I) y cloruros de alquilamonio eran a menudo líquidas [16]. En los años 70, Jerry Atwood de la Universidad de Alabama descubrió una clase inusual de sales líquidas que llamó “liquid clathrates” [17]. La formulación de estos compuestos era $M[Al_2(CH_3)_6X]$, donde M se refería a un catión orgánico o inorgánico y X era un haluro. Ninguno de los compuestos que acaban de describirse son los antecesores directos de la actual generación de líquidos iónicos.

La mayoría de los actuales líquidos iónicos derivan directamente de las sales fundidas a alta temperatura, en el intento de aprovechar las ventajas de las mismas eliminando las desventajas, especialmente las que derivan del alto punto de fusión de estas sales. En 1963 el Mayor (Dr) Lowel I A. King de la academia de las fuerzas aéreas de los Estados Unidos, iniciaba un proyecto de investigación dirigido a remplazar en las baterías térmicas las sales fundidas LiCl/KCl. Aunque la mezcla eutéctica LiCl/KCl tiene una temperatura de fusión baja (355°C) para ser una sal inorgánica, esta temperatura puede dañar las baterías. Los cloroaluminatos, que son sales fundidas mezcla de un haluro alcalino y cloruro de aluminio, surgieron como sustituyentes de las anteriores sales fundidas, ya que tiene una temperatura de fusión mucho más baja que casi todas las demás sales eutécticas inorgánicas. De hecho, la sal eutéctica NaCl/AlCl₃ tiene un punto de fusión de 107 °C [18]. Las investigaciones llevadas a cabo en este sentido culminaron con la consecución de una patente para baterías térmicas utilizando NaCl/AlCl₃ como electrolito, de las que se fabricaron pocas unidades. Desde entonces, el programa de investigación sobre sales fundidas/líquidos iónicos, fue continuado por tres investigadores principales: King, John Wilkes y Richard Carlin. Durante el transcurso de sus investigaciones en la búsqueda de nuevos electrolitos para baterías

encontraron una patente donde se describía la conductividad iónica de mezclas de AlCl_3 y haluros de 1-etilpiridinio, principalmente bromuros [19-21]. Seguidamente se encontró que la mezcla de cloruro de 1-butilpiridinio/ AlCl_3 tenía mejor comportamiento que la de haluros descubierta anteriormente [22]. Este punto es el comienzo de la era moderna para los líquidos iónicos, ya que a partir de ese momento surge por parte de los químicos un gran interés por estos nuevos disolventes totalmente iónicos.

Los cationes de alquilpiridinio son relativamente fáciles de reducir química y electroquímicamente. Charles Hussey en colaboración con John S. Wilkes inició un proyecto con el objetivo principal de predecir cuáles eran los cationes que tenían menos tendencia a reducirse, a fin de sintetizar líquidos iónicos basándose en estos modelos y caracterizarlos electroquímicamente para su uso como electrolitos en baterías. Las predicciones sobre el estado líquido o sólido de las nuevas sales sintetizadas no fueron buenas pero, por suerte, muchos de ellos fueron líquidos. Los cationes con más posibilidades de ser utilizados como electrolitos fueron las sales de dialquilimidazolio; el más utilizado en concreto fue el 1-etil-3-metil-imidazolio [emim]. El [emim]Cl mezclado con AlCl_3 daba lugar a líquidos iónicos con temperaturas de fusión por debajo de la temperatura ambiente en un amplio rango de composiciones [23]. Seguidamente a la síntesis y caracterización de estas nuevas sales, el grupo de investigación de las fuerzas aéreas de los Estados Unidos llevó a cabo algunas reacciones orgánicas en estos medios, tales como las del tipo Friedel-Crafts, encontrándose que estos líquidos tenían un excelente comportamiento tanto como disolventes como catalizadores [24]. Respecto a su utilización como disolventes, parecían actuar como el acetonitrilo, con la diferencia de que eran totalmente iónicos y no se volatilizaban. Sin embargo, los líquidos iónicos basados en cloroaluminato de piridinio o imidazolio presentaban la desventaja de reaccionar con el agua. En 1990, Mide Zaworotko, durante su estancia en la academia de las fuerzas aéreas, preparó y caracterizó nuevas sales basadas en cationes dialquilimidazolio y aniones del tipo tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, nitrato, sulfato y acetato que eran estables frente a la hidrólisis al menos a temperatura ambiente [25]. Así, estas nuevas sales se impusieron como las mejores candidatas para ser utilizadas como electrolitos en baterías. Cuando Zaworotko dejó la academia de las fuerzas aéreas, Joan Fuller continuó durante varios años extendiendo el catálogo de líquidos iónicos estables en agua, descubriendo mejores rutas para su preparación. Joan Fuller sintetizó un gran número de líquidos iónicos basados en el catión dialquilimidazolio, ampliando las series a los mono y trialquilimidazolio, combinando estos cationes con los aniones mencionados en el párrafo anterior más el bromuro, cianuro, bisulfato, yodato, trifluorometilsulfonato, tosilato, fenilfosfonato y tartrato. Como fruto de esta investigación se obtuvieron una gran serie de nuevos líquidos iónicos con aniones desde tamaño relativamente pequeños a muy grandes. Desde entonces, la síntesis de nuevos líquidos iónicos es continua al ser casi ilimitada la cantidad de aniones y cationes que pueden formar parte de su constitución.

3.2.3. Obtención de los líquidos iónicos.

Los primeros líquidos iónicos que se sintetizaron basados en nitratos de alquilamonio [15] 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 3.4**.

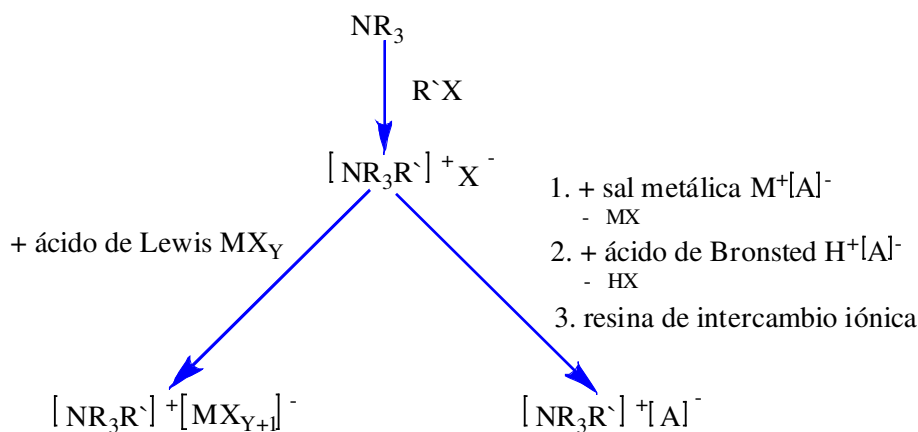


Figura 3.4. Síntesis general de líquidos iónicos.

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-alquilpiridinio 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, de 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 3.5**.

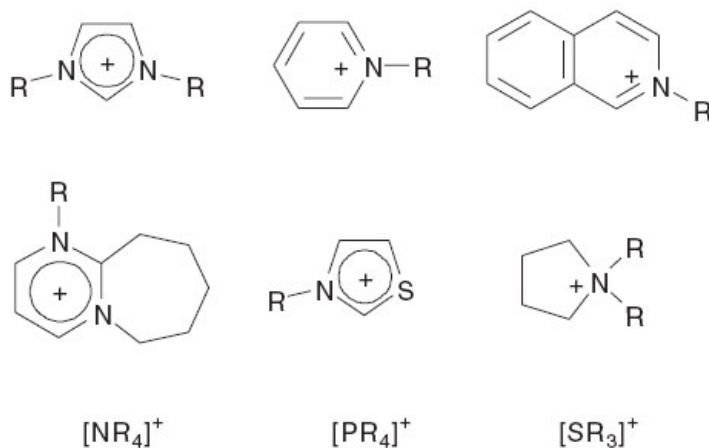


Figura 3.5. Ejemplos de cationes usados para la síntesis de líquidos iónicos.

3.2.3.1. 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 [26]. 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-alkylimidazolium con sustituyentes de larga longitud de cadena [27]. 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 3.6**, o la fosfina se mezclan con un determinado haloalcano y la mezcla de reacción se agita y calienta.

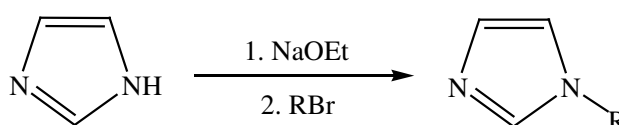


Figura 3.6. Síntesis de alquilimidazoles.

Las reacciones de cuaternización de 1-alquilimidazoles, que son los productos de partida más utilizados en la síntesis de los líquidos iónicos, similares a las de otras aminas tales como la piridina [28] la isoquinoleína [29], 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undeceno [30], 1-metilpirrolidina [31] y trialquilaminas [32], así como para fosfinas.

La temperatura de reacción y el tiempo son muy dependientes del haloalcano empleado, siendo los cloroalcanos los menos reactivos y los iodoalcanos los más. La reactividad de los haloalcanos decrece con el incremento de la longitud de la cadena. Para la reacción del 1-metilimidazol con cloroalcanos es necesario calentar a 80 °C durante dos o tres días para asegurarse de que la reacción se ha completado. La misma reacción con bromoalcanos se completa a las 24 horas a temperaturas más bajas, entre 50 y 60 °C. La reacción con iodoalcanos se puede realizar a temperatura ambiente, pero como las sales de iodo generadas son sensibles a la luz, es conveniente proteger el recipiente de reacción de la luz. Además, si es posible la reacción debería llevarse a cabo bajo atmósfera de nitrógeno o algún otro gas inerte con el fin de evitar trazas de agua y oxígeno durante la reacción de cuaternización. La eliminación del oxígeno es un factor importante si se desea que la sal del haluro obtenida no presente color.

La preparación de sales con sustituyentes alquílicos cortos, tales como $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$ es más compleja, debido a que el cloroetano tiene un punto de ebullición de 12 °C. Estas reacciones tienen generalmente que ser llevadas a cabo en un autoclave, adicionando el cloroetano enfriado por debajo de su punto de ebullición.

En general, el requerimiento más importante es que la mezcla de reacción se mantenga libre de humedad, ya que los productos de reacción son a menudo muy higroscópicos.

La reacción puede llevarse a cabo sin el uso de disolventes, ya que los reactivos son generalmente líquidos y miscibles entre ellos y el producto de reacción, la sal del haluro, es normalmente inmisible con los materiales de partida. Sin embargo, a menudo se utilizan disolventes tales como el propio haluro de alquilo, 1,1,1-tricloroetano [33], etanoato de etilo [34], o tolueno [35]. Estos disolventes presentan la particularidad de que son inmiscibles con la sal del haluro formada, separándose en una segunda fase. La sal de haluro se puede separar por decantación, eliminando los productos que puedan quedar en la misma por calentamiento a vacío. En el proceso de calentamiento no se deben sobrepasar los 80 °C ya que un calentamiento excesivo, puede conllevar una inversión de la reacción de cuaternización. Las sales de haluro sintetizadas son generalmente sólidas a temperatura ambiente, aunque algunos ejemplos tales como las sales de 1-metil-3-octilimidazolio, permanecen como aceites viscosos incluso a esta temperatura.

Si las reacciones se realizan a relativamente gran escala, se pueden aislar los productos con un rendimiento superior al 90%, incluso llevando a cabo una etapa de recristalización. El almacenamiento de los productos es conveniente que se realice en el interior de un desecador, ya que las sales formadas tienden a ser muy higroscópicas, especialmente cuando los sustituyentes alquílicos son de cadena corta.

Recientemente se ha publicado un procedimiento distinto al anteriormente descrito para las reacciones de cuaternización, que supone la utilización de radiación de microondas con el fin de acortar los tiempos de reacción (minutos en vez de horas), obteniéndose altos rendimientos [36].

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.

Pero no sólo las sales de haluro se pueden preparar mediante este procedimiento. Las reacciones de cuaternización entre 1-alquilimidazoles y metiltriflato [33], trialquilaminas y metiltosilatos [37], y trifenilfosfina y octil tosilato se han usado para la preparación directa de líquidos iónicos y, en principio, cualquier alquil compuesto que contenga un buen grupo saliente puede ser utilizado en esta vía de síntesis.

3.2.3.1. 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 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 Q^+X^- con ácidos de Lewis MX_n conduce a la formación de más de una especie aniónica, dependiendo de las proporciones relativas de Q^+X^- y 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 AlEtCl_2 [38,39], BCl_3 [40], CuCl [41], y SnCl_2 [42].

Reacciones de metátesis

La primera preparación de líquidos iónicos basados en cationes 1,3-dialquilmetilimidazolio relativamente estables al agua y al aire (a veces conocidos como segunda generación de líquidos iónicos) fue descrita por Wilkes y Zaworotko [25] en 1992. La preparación de estos nuevos líquidos iónicos era llevada a cabo mediante reacciones de metátesis entre $[\text{emim}]\text{I}$ y una serie de sales de plata (AgNO_3 , AgNO_2 , AgBF_4 , $\text{Ag}[\text{CO}_2\text{CH}_3]$, y Ag_2SO_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 HPF_6 en una disolución acuosa [43].

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 [25] o sales de plomo [44]. Cuando se utiliza como fuente del anión la forma ácido del mismo, la reacción se ve favorecida, liberándose al medio HCl, HBr, ó 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. Las sales basadas en el anión $[\text{PF}_6^-]$ tienen como problema particular la formación lenta de 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, por ejemplo mediante una valoración con nitrato de plata en el caso de que la reacción no se completase del todo. 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 CH_2Cl_2 o 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 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 $[\text{NTf}_2^-]$ [33,34].

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 ácida 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.* [45] 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 HBF_4 en una disolución acuosa. El producto de reacción es extraído en CH_2Cl_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 AgNO_3 . Posteriormente al tratamiento, el CH_2Cl_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 CH_2Cl_2 , como describen Cammarata *et al.* [46] o en acetona, como señalan Fuller *et al.* [47]. 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 CH_2Cl_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 CH_2Cl_2 , son mucho más solubles en mezclas líquido iónico/ CH_2Cl_2 . Así, cuando se emplea este método, es importante que los extractos de CH_2Cl_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 [48], se basa en el uso de resinas de intercambio iónico. En este sentido, Lall *et al.* [49], han realizado la síntesis de líquidos iónicos basados en aniones fosfato con cationes de poliamonio basándose en esta metodología.

3.2.4. Propiedades físicas y químicas de los líquidos iónicos

Una de las propiedades que hacen a los líquidos iónicos especialmente atractivos como sustitutos de los tradicionales disolventes orgánicos volátiles es su baja presión de vapor, pero también poseen otra serie de propiedades que los hacen muy interesantes. Así, desde el punto de vista 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 [50,51].

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 para procesos de pirólisis en líquidos iónicos que contienen cationes inorgánicos. 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⁺][BF₄⁻], que es estable hasta los 300°C, y del [emim⁺][NTf₂⁻], hasta los 400° C [33]. Para las sales basadas en cationes [Rmim⁺] la estabilidad para los diferentes aniones disminuye en la serie [NTf₂⁻] > [BF₄⁻] > [PF₆⁻] y [AsF₆⁻] > [I⁻], [Br⁻] y [Cl⁻]. Así, los líquidos iónicos que contienen aniones más débilmente coordinados son más estables a la descomposición a altas temperaturas [33,11,52-54].

- *Estabilidad química.* Los líquidos iónicos basados en el catión 1,3-dialquilimidazolio son compuestos no inflamables [55] y químicamente inertes [56], 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. Además, muchos complejos de metales de transición y sustratos orgánicos no son inertes a los cloro-aluminatos, pudiendo reaccionar con ellos. También estas sales reaccionan de manera muy exotérmica con el agua, produciendo HCl y un precipitado blanco, que se redissuelve por agitación [57].

- *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 °C. El punto de fusión depende de forma muy importante del tamaño de líquido iónico, 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. 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 el

caso de cationes imidazolio 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. 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 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 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 decrece cuando el tamaño del anión se incrementa [58,59].

- *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 [60] y se afecta por la presencia de impurezas que contenga el líquido iónico [61]. 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 [62].

- *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 [63].

- *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, de cuya observación se ha extraído la influencia con la variación del catión y del anión.

3. Antecedentes

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

Líquido Iónico	Punto fusión (°C)	Densidad (g/cm ³)	Viscosidad (20°C) (cP)	Conductividad (S/m)	pH	T _{descomposición} (>°C)
[bmim ⁺][Cl ⁻]	65 ^[63]	1.10 ^[63]	-	-	-	-
[bmim ⁺][CF ₃ COO ⁻]	-40 ^[63]	1.21 ^[63]	73 ^[63]	0.32 ^[63]	-	-
[bmim ⁺][CF ₃ SO ₃ ⁻]	16 ^[63]	1.29 ^[63]	90 ^[63]	0.37 ^[63]	-	200 ^[64]
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	15 ^[65]	1.279 ^[66] (25°C)	32 ^[66] (25°C)	1.4 ^[66] (25°C)	-	-
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-82 ^[63]	1.17 ^[63]	233 ^[63]	0.17 ^[63]	-	300 ^[64]
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-82 ^[64]	1.14 ^[64] (20 °C)				
[bdmim ⁺][BF ₄ ⁻]	38 ^[64]	1.20 ^[64]	-	-		200 ^[64]
[emim ⁺][PF ₆ ⁻]	62 ^[43]	-	-	0.52 ^[67] (26°C)	-	-
[bdmim ⁺][PF ₆ ⁻]		1.20 ^[7]			3 ^[64] (20 °C)	
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	15 ^[68]	1.3650 ^[68] (20 °C)	195.9 ^[68] (25 °C) - 385 ^[64]	0.134 ^[68]	5.77 ^[68]	300 ^[64]
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-80 ^[68]	1.2965 ^[68] (20 °C)	712 ^[64] (20 °C) - 3477 ^[68] (25°C)	-	5.91 ^[63]	-
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	-82 ^[68]	1.23 ^[68] (20°C)	3600 ^[68] (25°C) - 1007.9 ^[64] (20 °C)	0.0237 ^[68]	5.73 ^[68]	270 ^[64]
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-3 ^[33]	1.518 ^[69] (25°C)	31 ^[69] (25°C)	0.57 ^[69] (25°C)	-	-
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-4 ^[33]	1.43 ^[63]	52 ^[63]	0.39 ^[63]	-	-
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-50 ^[64]	1.38 ^[64] (20 °C)	89.1 ^[64] (20 °C)	-	6 ^[64] (20°C)	300 ^[64]
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-	1.33 ^[64] (20 °C)	120.8 ^[64] (20 °C)	-	-	-

- *Elevado poder de disolución.* Los líquidos iónicos son considerados como disolventes polares. Las medidas solvatócrómicas 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 [70,71,33,50,63,72].

- *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⁺][PF₆⁻].

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

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

- *Solubilidad de gases.* La solubilidad de gases, como por ejemplo H₂, CO y O₂, es generalmente buena en líquidos iónicos y los hace disolventes atractivos para llevar a cabo hidrogenaciones catalíticas, carbonilaciones, hidroformilaciones y oxidaciones aeróbicas [14].

- *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⁺][BF₄⁻], otros se saturan con agua, formando entonces un sistema bifásico [73]. En este grupo se encuentran [bmim⁺][PF₆⁻] y [bmim⁺][NTf₂⁻]. 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 [46]. Aun así, la lipofilicidad de las sales de dialquilimidazolio, se puede incrementar mediante el aumento en la longitud de cadena de los grupos alquílicos [74,52]. El logaritmo del coeficiente de reparto de un líquido iónico entre un disolvente orgánico, tal como 1-octanol, y el agua (log K_{ow}), 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. [75] pusieron de manifiesto la presencia de actividad enzimática en disolventes orgánicos con un log K_{ow} superior a 4. En la Tabla 3.3 se muestra el log K_{ow} 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 ^[75]
Acetonitrilo	-0.33 ^[75]
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.80 - 1.05 ^[76]
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.15 - 0.22 ^[76]
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-0.21 - -0.96 ^[76]
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-1.05 - -0.96 ^[76]
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-1.66±0.03 ^[76] - 2.39±0.27 ^[77]
[bmim ⁺][Cl ⁻]	-2.40±0.07 ^[76]
[bmim ⁺][NO ₃ ⁻]	-2.42±0.02 ^[76] -2.90±0.01 ^[78]
[bmim ⁺][Br ⁻]	-2.48 ±0.13 ^[76]
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.52±0.06 ^[76]
[bmim ⁺][CH ₃ COO ⁻]	-2.77±0.11 ^[77]

Según la propuesta de Laane et al. [75] 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.

- *Polaridad.* Las últimas discusiones sobre el efecto de los disolventes en la reactividad química apuntan a la polaridad del disolvente como una de las propiedades determinantes de la misma. La forma más común de medida de la polaridad es mediante la constante dieléctrica, sin embargo su medida requiere que el medio sea no conductor, que no es el caso de los líquidos iónicos. Las medidas de polaridad en los líquidos iónicos pueden realizarse mediante estudios solvatocrómicos empleando para ello los reactivos de Reichardt (1992) y de Nile Red [50].

El reactivo de Reichardt, 2,4,6-trifenilpiridinio-N-4-(2,6-difenilfenóxido)betaina, es un colorante solvatocrómico negativo que presenta un desplazamiento de 375 nm. Puede registrar efectos derivados de la dipolaridad del disolvente, puentes de hidrógeno y de acidez de Lewis, viniendo la contribución más importante del efecto dador de puente de hidrógeno del disolvente [79]. Las medidas de polaridad basadas en el reactivo de Reichardt [72] indican que la polaridad de estos líquidos iónicos es similar a la de alcoholes de cadena corta. El valor normalizado de la polaridad de Reichardt (E_T^N) viene determinado fundamentalmente por la naturaleza del catión.

Tal y como se puede observar en la **Tabla 3.4**, el valor de E_T^N para las sales de imidazolio sustituidas depende de forma importante de si la posición 2 del anillo está protonada o metilada, a la vez ésta decrece conforme aumenta la longitud de la cadena del catión. Este hecho es totalmente consistente con la importancia del efecto hidrógeno dador de estos cationes en los valores de E_T^N . El efecto del anión en los valores de polaridad es menor que el del catión. En este sentido, la diferencia en los valores de polaridad al cambiar el anión para un catión determinado es, en general, más pequeña que la existente al cambiar el catión manteniendo fijo el anión. Así, la diferencia en el valor de E_T^N entre $[\text{Et}_4\text{N}]\text{Cl}$ y $[\text{Et}_4\text{N}][\text{NO}_3]$ es de tan sólo 0.006, mientras la diferencia entre $[\text{EtNH}_3^+][\text{Cl}^-]$ y $[\text{EtNH}_3^+][\text{NO}_3^-]$ es de 0.318. Más pequeña es la diferencia entre $[\text{omim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{EtNH}_3^+][\text{NTf}_2^-]$, que es sólo de 0.018. Lo que sí está claro es que el efecto del cambio del anión depende de la naturaleza del catión. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, los valores de E_T^N vienen determinados fundamentalmente por la capacidad del líquido iónico de actuar como dador de puentes de hidrógeno a través del catión, moderado por la habilidad aceptora de puentes de hidrógeno que posee el anión. De esta manera, el equilibrio competitivo entre el catión y el anión o el reactivo de Reichardt determinará los valores finales de E_T^N .

Tabla 3.4. Valores de polaridad ordenados de mayor a menor obtenidos para diferentes líquidos iónicos obtenidos a partir del reactivo de Reichardt [80].

Disolvente	E_T^N (Reichardt)
Agua	1.000
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.673
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.667
Etanol	0.654
[bmim ⁺][NO ₃ ⁻]	0.650
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.642
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	0.633
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.630
[bmim ⁺][CF ₃ CO ₂ ⁻]	0.620
[bmim ⁺][CH ₃ CO ₂ ⁻]	0.570
[ommim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.543
[bmmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.525
[ommim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.525
Acetonitrilo	0.460
n-Hexano	0.009

Carmichael y Seddon [50] han estudiado la polaridad de líquidos iónicos basados en 1-alquil-3-metilimidazolio mediante el colorante solvatocrómico positivo de Nile Red. Para los líquidos iónicos cuyo catión es [bmim⁺], tal y como se puede observar en la **Tabla 3.5**, la polaridad decrece según la serie [NO₂⁻] > [NO₃⁻] > [BF₄⁻] > [PF₆⁻]. Esta disminución de la polaridad está relacionada con el incremento en el tamaño del anión y la consiguiente reducción de la densidad de carga efectiva. Esta correlación no se cumple para el [bmim⁺][NTf₂⁻] que, a pesar de que su tamaño es mayor que el de los anteriormente mencionados, tiene una polaridad intermedia entre [bmim⁺][BF₄⁻] y [bmim⁺][PF₆⁻]. Esto es debido a que la carga negativa del [bmim⁺][NTf₂⁻] está parcialmente deslocalizada en el enlace S-N-S. Según esta escala de polaridad, para los líquidos iónicos basados en tetrafluoroboratos y hexafluorofosfatos, la polaridad aumenta al aumentar la longitud del sustituyente alquílico de 4 a 6. Sin embargo, para los líquidos iónicos basados en los cationes [hmim⁺] y [omim⁺] no hay diferencias en la polaridad entre el [BF₄⁻] y [PF₆⁻]. Como conclusión general, para los líquidos iónicos

basados en el catión 1-alkil-3-metilimidazolio se puede decir que la polaridad está aparentemente determinada por el anión para aquellos que contienen grupos alquílicos de cadena corta, y por el catión para aquellos cuyos grupos alquílicos son de cadena larga. Por el contrario la serie de los nitratos no sigue la misma tendencia.

Tabla 3.5. Valores de polaridad ordenados de mayor a menor obtenidos para diferentes líquidos iónicos obtenidos a partir del reactivo de Nile Red [50].

Disolvente	E_{NR} (Nile Red)
Agua	201.7
[bmim ⁺][NO ₃ ⁻]	215.3
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	216.8
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	216.8
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	217.2
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	217.6
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	217.7
Etanol	218.2
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	218.0
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	218.5
Acetonitrilo	225.0
n-Hexano	247.0

Las escalas de polaridad presentadas anteriormente deben ser interpretadas teniendo en cuenta el significado físico-químico de los valores obtenidos. Como el reactivo solvatocrómico de Reichardt es negativo, sugiere la capacidad de interacción del catión, por tanto las conclusiones derivadas de la interpretación de los valores de polaridad dados por el mismo van a reflejar principalmente el comportamiento del catión. El reactivo solvatocrómico de Nile Red es positivo, por lo tanto, el análisis de los valores del mismo debe ser referido principalmente el comportamiento del anión.

- *Nucleofilicidad.* La nucleofilicidad de algunos líquidos iónicos ha sido medida a través de la variación de λ_{max} del reactivo solvatocrómico [Cu(acac)(tmem)][BPh₄] (acac=acetilacetona; tmen= N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina) [72]. De las medidas realizadas se deduce que el valor de λ_{max} es únicamente dependiente del anión. El orden de nucleofilicidad para algunos de los aniones de los líquidos iónicos es el

siguiente: $[\text{PF}_6^-] < [\text{NTf}_2^-] < [\text{TfO}^-]$. Así, mientras la carga en el anión $[\text{PF}_6^-]$ se encuentra más deslocalizada, la estructura cristalina de las sales de imidazolio basadas en el anión $[\text{NTf}_2^-]$ 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 [81], 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 $[\text{TfO}^-]$.

3.2.5. Los líquidos iónicos como disolventes “verdes”

Los líquidos iónicos han sido reconocidos como una alternativa limpia a los disolventes orgánicos convencionales principalmente debido a su prácticamente nula presión de vapor.

Para un uso seguro de estos nuevos disolventes 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 [82]. 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 [82,83]. También se ha observado que algunos líquidos iónicos son biodegradables, especialmente cuando presentan un grupo éster en la cadena alquílica lateral del catión [83-85]. Además, recientemente se ha obtenido un líquido iónico a partir de materias primas bio-renovables [86].

Así, aunque no se puede afirmar con rotundidad que los líquidos iónicos sean totalmente “verdes”, lo que sí 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.

3.2.6. Aplicaciones generales de los líquidos iónicos

Los primeros líquidos iónicos fueron sintetizados con fines electroquímicos, para ser utilizados como electrolitos a baja temperatura libres de agua [87]. Comparados con los electrolitos habitualmente usados, los líquidos iónicos poseen similares potenciales electroquímicos y conductividades iónicas, a la vez que son más seguros y menos tóxicos e inflamables. Además, los líquidos iónicos permiten que algunos metales convencionalmente obtenidos de sales fundidas a altas temperaturas se depositen a temperatura ambiente sin problemas de corrosión [88,89]. Los líquidos iónicos han sido utilizados en diferentes dispositivos electroquímicos tales como baterías [90,91], placas solares [92] y condensadores electroquímicos [67,93,94].

En la última década se ha constatado que estos nuevos disolventes presentaban una gran utilidad como medios de reacción tanto en procesos químicos como bioquímicos, lo que ha potenciado el desarrollo de nuevos líquidos iónicos. Así, se han utilizado como disolventes en reacciones nucleofílicas [95,96] y electrofílicas [96,97] catalizadas tanto por ácidos como por complejos de metales de transición. También se han revelado como excelentes medios de reacción en biosíntesis [98,99] presentando además en estos casos una gran capacidad para la estabilización enzimática en operaciones continuas [100]. 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 2.3.

Otro reciente campo de investigación en el que los líquidos iónicos han encontrado aplicación es en procesos de separación y purificación [101]. Los líquidos iónicos son capaces de extraer selectivamente un compuesto específico de una mezcla gaseosa o líquida [34,101-103]. Así, el empleo de líquidos iónicos ha permitido la eliminación de dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno de un gas natural [102] 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 [34,103]. Más recientemente los líquidos iónicos han sido utilizados en membranas líquidas soportadas con propósitos de separación [104,105]. Esta última aplicación también es objeto de interés en este trabajo y por tanto se abordará en profundidad posteriormente (apartado 2.4).

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⁺][BF₄⁻] ha demostrado ser un lubricante muy versátil aplicado a contactos acero/acero, acero/cerámica, acero/cobre, acero/aluminio, etc., [55].

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 dos

características son el amplio rango en el que se encuentran en estado líquido y las buenas propiedades de 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 $1-2 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$). 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 [101].

También se han empleado como fase estacionaria en cromatografía de gases [106].

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 [64], Solvent Innovation [68], Strem Chemicals [107], Sigma-Aldrich-Fluka [108], Degussa [109], Cytec Industries [110]). Gracias a ello el precio de los líquidos iónicos está disminuyendo notablemente (economía de escala) [64]. 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[®] a escala comercial. El Proceso BASIL[®] (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 [111]. Otra aplicación industrial es el almacenamiento de arsina, trifluoruro de boro y fosfina en líquidos iónicos (GASGUARD[®] Sub-Atmospheric Systems), desarrollado por la empresa Air Products [112]. El Instituto Francés del Petróleo (IFP) también ha patentado uno de sus procesos (DIFASOL[®]) con líquidos iónicos para la fabricación de PVC por dimerización de olefinas de cadena corta [113]. También se han sintetizado líquidos iónicos basándose en los principios químicos de Hurley y Weir [19-21] para su aplicación en procesos industriales como la reacción de Diels-Alder (Industria Petroquímica y Farmacéutica) o la reacción de Friedel-Crafts, y ya se está en condiciones de su incorporación a procesos a escala comercial.

3.3. APLICACIONES DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN REACCIONES QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

3.3.1. Aplicaciones de los líquidos iónicos en reacciones químicas

3.3.1.1. Como disolventes

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.* [114] 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 $[\text{Rh}(\text{nbd})(\text{Ph}_3\text{P})_2][\text{PF}_6^-]$ [(nbd)= norbonadieno], el cual, disuelto en $[\text{bmim}][\text{PF}_6^-]$ o $[\text{bmim}][\text{SbF}_6^-]$ resultó ser un catalizador efectivo para esta hidrogenación. La velocidad de reacción fue 5 veces más rápida que cuando se utilizó acetona como disolvente.

En estos medios también se han realizado hidrogenaciones estereoselectivas, como la catalizada por rutenio en un sistema bifásico $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]/\text{MTBE}$ para obtener el ácido *cis*-3-hexanoico con una selectividad del 90% [115].

Recientemente se ha empleado un sistema bifásico líquido iónico/ scCO_2 para llevar a cabo una hidrogenación, evitando así por completo el uso de disolventes orgánicos, con lo cual estos sistemas son totalmente benignos desde el punto de vista medioambiental. También se ha llevado a cabo con éxito la hidrogenación catalítica de olefinas en un sistema bifásico $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]-\text{scCO}_2$ [(116)].

- 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 comercializando industrialmente para la fabricación de butanal [117]. Desafortunadamente, el uso del agua como fase polar limita este proceso a las olefinas C_2-C_5 , 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 [37] han estudiado la hidroformilación de 1-octeno catalizada por platino en $[\text{bmim}^+][\text{SnCl}_3^-]$, 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.

- 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 O₂, 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 quirral de Jacobsen [Mn^{III}] como catalizador, en una mezcla de [bmim⁺][PF₆⁻]/CH₂Cl₂ (1:4). En este caso se consiguió una conversión del 86% en dos horas, gracias a la considerable activación del catalizador por el líquido iónico [118].

- Alcoxycarbonilaciones:

La realización de estas reacciones en líquidos iónicos ha atraído mucho menos interés. Un ejemplo de ellas es la alcoxycarbonilación bifásica de estireno, catalizada por paladio, en [bmim⁺][BF₄⁻]-ciclohexano [119]. Más recientemente, han sido descritas la alcoxycarbonilación y amidocarbonilación de yoduros y bromuros de arilo, catalizadas por paladio, en [bmim⁺][PF₆⁻] y [bmim⁺][BF₄⁻] [120].

3.3.1.2. 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 el catalizador [121]. Los líquidos iónicos basados en cloroaluminatos ([AlCl₄⁻], [AlCl₇⁻]) 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 AlCl₃ y a los ácidos de Brønsted tan peligrosos como el HF.

Una síntesis Friedel-Craft de gran interés en la industria farmacéutica es la de pravadolina. Esta síntesis se ha ensayado en [bmim⁺][PF₆⁻], 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 [122].

Varios autores han estudiado las reacciones de Diels-Alder en líquidos iónicos. El primer ejemplo publicado fue la cicloadición de ciclopentadieno con metacroleína,

como dienofilo, 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 [123].

3.3.1.3. 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 [bmim⁺][AlCl₄⁻]. El precursor del catalizador consistía en un complejo de níquel del tipo L₂NiCl₂ (L=Ph₃P o piridina) el cual, en combinación con el líquido iónico ternario (bmimCl-AlCl₃-EtAlCl₂ = 1:1.2:0.25), daba lugar a la forma activa del catalizador, que era un complejo de Ni(II), [LNiCH₂CH₃⁺][AlCl₄⁻]. A 5° 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) [41,114,124].

3.3.2. Aplicación de los líquidos iónicos como disolventes en reacciones biocatalíticas

3.3.2.1 Utilización de disolventes no acuosos en reacciones biocatalíticas

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 [125]. 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 10¹² veces. Por último, 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 [126], y en ella pueden tener lugar reacciones colaterales no deseadas (hidrólisis, racemizaciones, etc.). El equilibrio termodinámico de muchos procesos es desfavorable en agua [127], 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 [128]. 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 [129].

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, los fluidos supercríticos, los medios gaseosos y los líquidos iónicos. 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 [130].

Medio Orgánico

El interés por este tipo de medios 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 [126]. El trabajo de *Zaks y Klibanov* [131] puso de manifiesto la viabilidad de utilizar las enzimas en medios orgánicos hidrófobos, aunque ésto suponía una reducción drástica de la velocidad de reacción [132]. 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 [133]. 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 [129].

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 una disminución 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 [134].

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 interaccionan 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, interaccionan fuertemente con la enzima y las moléculas de agua asociadas a la misma, reduciendo o destruyendo totalmente su actividad catalítica, así 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 [129].

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 [75].

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 [130].

Cuando se realiza un proceso biocatalítico 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 térmica 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 [135]. 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 [136,137].

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 [138].

En la **Figura 3.7** se pueden ver esquematizadas las posibilidades descritas anteriormente. 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.

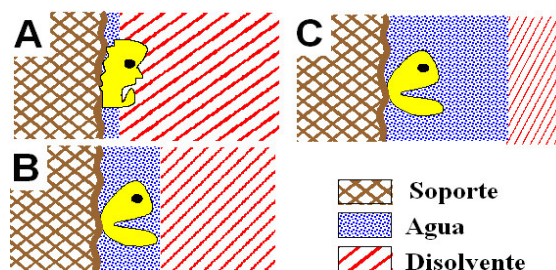


Figura 3.7. Situación esquemática de la enzima en un medio no convencional en función de la cantidad de agua.

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 [139]. Respecto a estos últimos, se ha comprobado que los disolventes apróticos miscibles con agua ejercen un efecto desactivador importante sobre la α -quimotripsina para concentraciones superiores al 30% [137]. 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.

Medio Supercrítico

Desde que en 1985 y 1986 se demostró que muchas enzimas son activas y estables en fluidos supercríticos, 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_2 supercrítico (scCO_2), ya que sus propiedades lo convierten en el medio más adecuado para estas reacciones [139].

Algunas de las enzimas cuya actividad ha sido probada en scCO_2 son: lipasa [140], polifenol oxidasa [141], fosfatasa alcalina [125] y colesterol oxidasa [142].

Numerosos estudios afirman que el scCO_2 no tiene un efecto desnaturante significativo sobre las enzimas y que, en cuanto a este aspecto, se comporta como lo haría cualquier disolvente orgánico [143]. 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 desnaturación

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 [144]. 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 [137].

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 CO₂. El CO₂ 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 [145].

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 CO₂.
- iv. Las enzimas son insolubles en el scCO₂, por lo que no hay pérdidas de enzima por solubilización y no se requiere inmovilización (por ejemplo en reactores de lecho fijo).

Sin embargo, el uso de sistemas a alta presión, aunque no tiene ningún efecto negativo sobre las enzimas, 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 CO₂ desde el agua de hidratación que las rodea [146].

Medio Gaseoso

Se ha demostrado que es posible llevar a cabo reacciones con un preparado biocatalítico sólido y unos sustratos gaseosos, sin que sea necesaria una fase líquida para que tenga lugar el fenómeno catalítico [147].

Dado que los sustratos deben estar en fase gaseosa, en estas aplicaciones se debe trabajar a temperaturas elevadas y usando enzimas termoestables [148]. Al igual que ocurría en los otros casos, en el medio gaseoso es muy importante el contenido en agua y su actividad en el preparado enzimático para la actividad y la estabilidad de la enzima. Al trabajar con estos sistemas, la actividad del agua (A_w) puede medirse fácilmente en la fase gaseosa con unos sensores especiales; y viene definida como la relación entre la presión parcial del agua y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura [149].

El requerimiento de las elevadas temperaturas limita mucho la aplicación de este tipo de medios para la síntesis orgánica, especialmente cuando las sustancias que participan se descomponen fácilmente. Esto hace que no sean casi utilizados y apenas se encuentre información sobre ellos en la bibliografía.

Líquidos iónicos

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.

Las *lipasas*, que poseen una importante tolerancia a los disolventes orgánicos, son las candidatas más idóneas a ser utilizadas en líquidos iónicos, por ello se dedicará el apartado siguiente a estas enzimas, que son las utilizadas en el presente trabajo.

3.3.2.2 Las lipasas como candidatas más idóneas a ser utilizadas en líquidos iónicos

Las lipasas pertenecen a la clase de enzimas hidrolasas (E.C. 3) 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 3.8**, por lo que también se las conoce como glicerol éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.3.).

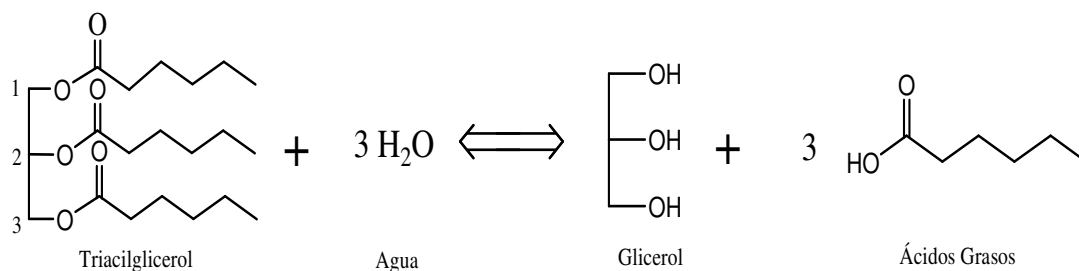


Figura 3.8. Esquema de la reacción catalizada por lipasa sobre triacilglicerol (Jeager and Reetz, 1998).

Las hidrolasas son las enzimas más utilizadas en biocatálisis y entre ellas destacan las lipasas. A continuación se comentan algunas de las aplicaciones biotecnológicas que encuentran 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 [150]. 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 [151]. 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 [150]. 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 los ácidos grasos poliinsaturados de 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 [152].

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.

Lipasa B de Candida antarctica

Entre todas las lipasas, la lipasa B de *Candida antarctica* es una de las más utilizadas y se han descrito numerosas aplicaciones [153].

La levadura de *Candida antarctica* fue originalmente aislada en la Antártida y se encontró que producía dos variantes de lipasa (CALA y CALB) [154].

La estructura de CALB fue resuelta en 1994 y se muestra en la **Figura 3.10** [155,156]. Todas las lipasas tienen una estructura básica común, compuesta por una lámina β central formada por más de 8 hebras β paralelas y unidas entre sí por más de 6 hélices α [157].

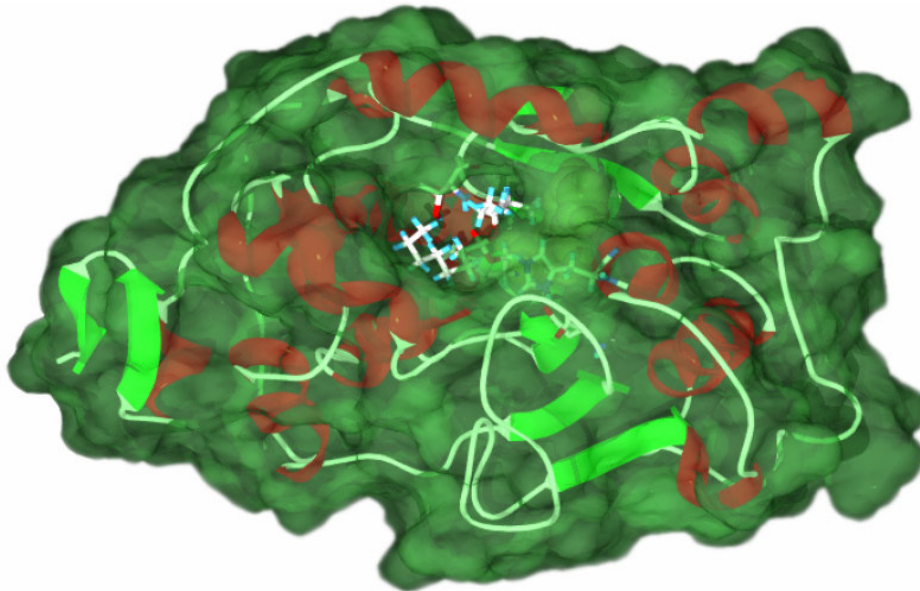


Figure 3.10. Estructura de la lipasa B de *Candida antarctica*. Las hélices α se muestran en rojo, las láminas β en verde claro y la superficie de la enzima en verde oscuro. Se puede apreciar como el final de las cadenas acilo y alcohol de los sustratos están en la estrecha entrada del centro activo.

CALB, que pertenece a la familia de las α/β hidrolasas-plegadas [158]. Se compone de 317 amino ácidos y tiene un peso molecular de 33kDa. El centro activo se muestra en la **Figura 3.11**.

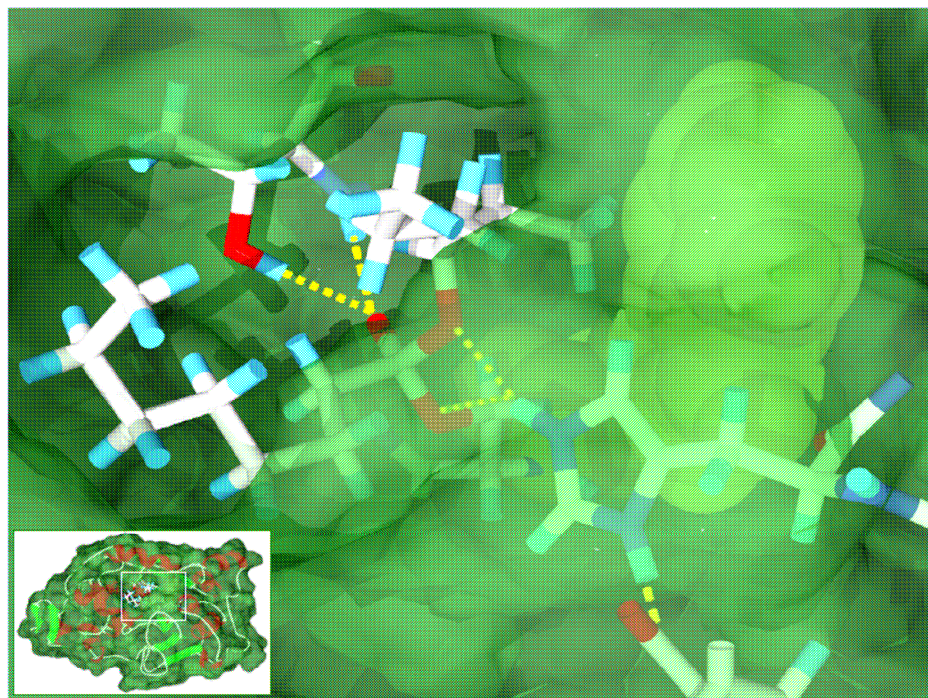


Figura 3.11. Centro activo de CALB.

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 β_5 en un pentapéptido GX SXG altamente protegido, formando un característico motivo tipo β -giro- α , llamado “codo nucleofílico”. 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 [159]. Las lipasas son las únicas enzimas que requieren esta activación interfacial para un pleno rendimiento catalítico [160]. 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 [155,159]. Esto hace que, por ejemplo, una lipasa B de *Candida 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 [161].

3. Antecedentes

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 3.12**.

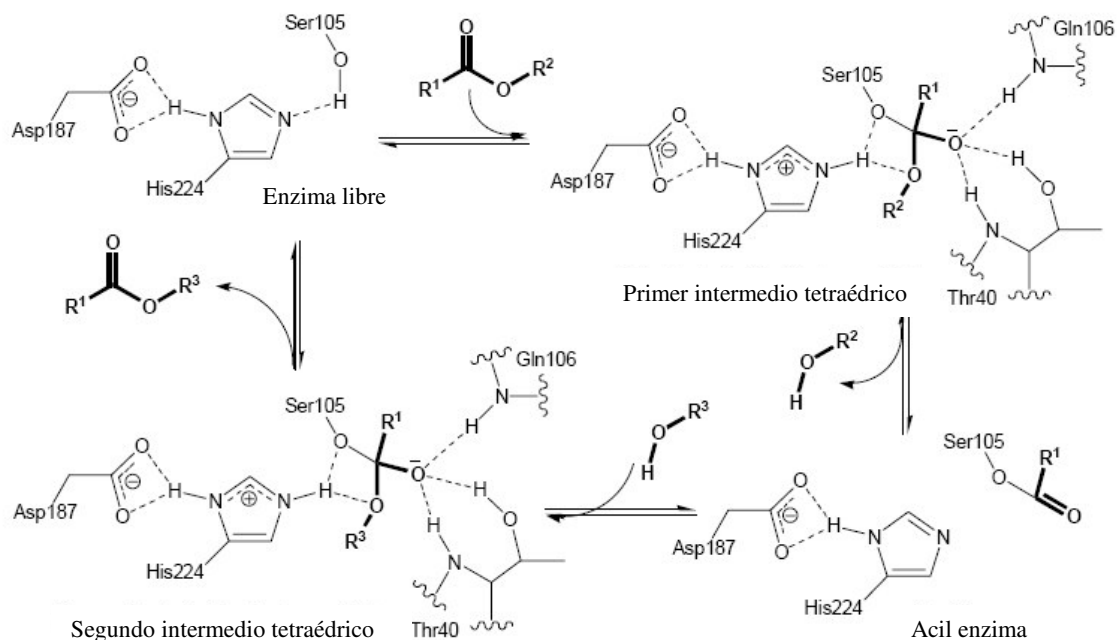


Figura 3.12. Reacciones catalizadas por CALB siguiendo un mecanismo ping-pong bi bi.

El mecanismo es el siguiente: el primer sustrato entra en el centro activo de la enzima y se forma el primer intermediario 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 intermediario 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 3.12**, 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 [162]. 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 secantes 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 3.13**).

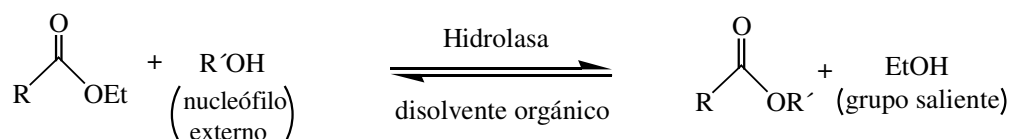


Figura 3.13. Transesterificación catalizada por CALB empleando un éster etílico como dador de acilo.

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 3.14** muestra los distintos tipos de dadores de acilo comúnmente empleados en laboratorio.

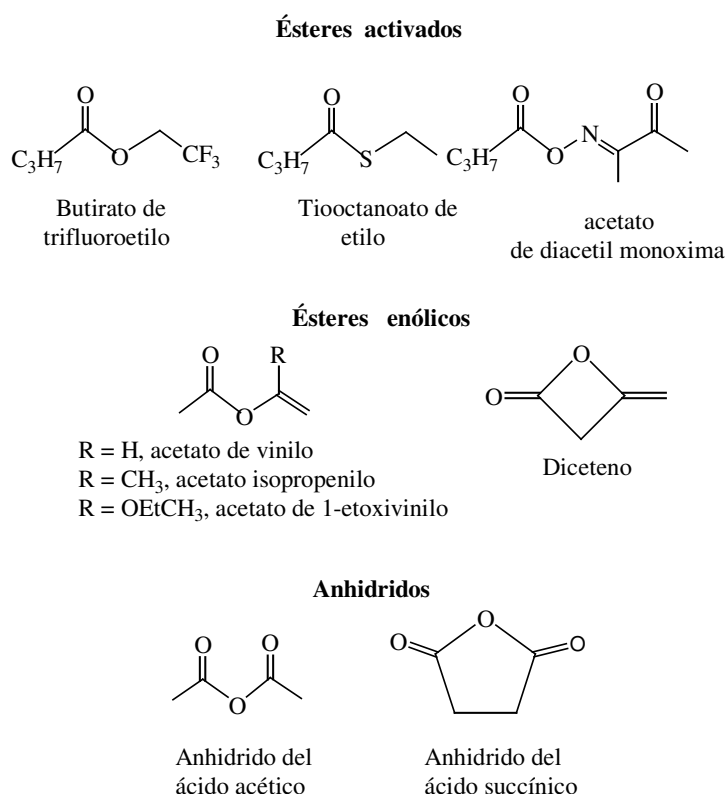


Figura 3.14. Ejemplo de dadores de acilo activados para la acilación irreversible de alcoholes.

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 anhidridos de ácido también se han empleado para acilar alcoholes [163]. La enzima no se modifica químicamente por el anhidrido 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 [162]. 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 3.15**). El grupo de Wong fue el primero en aplicar esta metodología para transesterificaciones catalizadas por lipasas [164]. En la presente memoria se han empleado ésteres vinílicos como agentes acilantes en reacciones de transesterificación de alcoholes catalizadas por CALB.

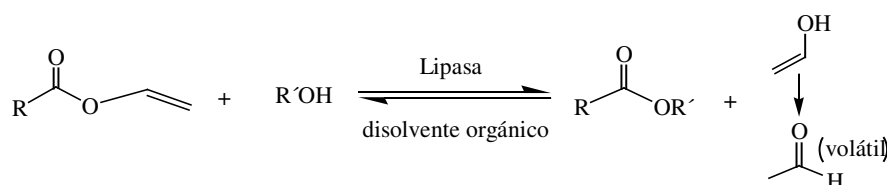


Figura 3.15. Transesterificación irreversible catalizada por CALB empleando un éster vinílico como dador de acilo.

Las 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 [165] debido fundamentalmente a la quimioselectividad, muy útil para casos como el de los aminoalcoholes, y sobre todo al alto nivel de regioselectividad alcanzable gracias a la biocatálisis, de gran valor para el caso de compuestos polihidroxilados. También, es ésta una reacción básica para la resolución cinética de mezclas racémicas de alcoholes secundarios [166,167]. Otras potenciales aplicaciones de CALB son la producción de polilactonas [168,169] y la producción de poliésteres[170].

CALB además es una enzima muy estable que ha sido utilizada hasta a 150°C [171], en disolventes orgánicos de alta polaridad como acetonitrilo y dimetilsulfóxido y en fluidos supercríticos [172,173]. Con estos precedentes, esta enzima es una candidata idónea para ser utilizada en medios líquido iónico.

3.3.2.3 Los líquidos iónicos como medios no convencionales en reacciones biocatalíticas

Magnusson *et al.* [174] 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 $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ con un 5% (v/v) de contenido en agua [175].

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) [176-179] y de *Pseudomonas cepacia* (PcL) [176,177,180] resultaron catalíticamente activas en líquidos iónicos basados en los cationes 1-alkil-3-metilimidazolio y 1-alkilpiridinio. Las reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas en líquidos iónicos transcurren con una eficacia comparable al *t*-butil alcohol [178], dioxano [181] o tolueno [180]. CALB se mostró 10 veces más activa en $[\text{bmpy}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$ que en diisopropil eter [179], 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 $[\text{mmim}^+][\text{MeSO}_4^-]$ [179], $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ $[\text{bmim}^+][\text{lactato}^-]$ ó $[\text{EtNH}_3^+][\text{NO}_3^-]$ [98], 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 $[\text{EtNH}_3^+][\text{NO}_3^-]$ [12].

También ha sido estudiada la actividad de la enzima α -*quimotripsina* en la reacción de transesterificación de ésteres de *N*-acetil-*L*-aminoácidos, utilizando como medios de reacción líquidos iónicos basados en catión 1-alkil-3-metilimidazolio con un contenido en agua del 0.5 % [182-184]. Cuando los líquidos iónicos utilizados como medio fueron el $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ o $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, las velocidades de transesterificación fueron similares a las obtenidas cuando el medio de reacción utilizado fue isooctano o acetonitrilo [183]. Sin embargo en $[\text{emim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$, (en unas condiciones de reacción

ligeramente diferentes) la velocidad de reacción fue cerca de un orden de magnitud superior [184].

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⁺][PF₆⁻] [176]. 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⁺][MeSO₄⁻] / tampón al 75% en el líquido iónico [185].

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⁺][PF₆⁻] que en acetato de etilo [175]. Del mismo modo, la vida media de α -quimotripsina en líquidos iónicos fue aproximadamente 10 veces mayor que en 1-propanol [184]. Lozano *et al.* [100] compararon la estabilidad de CALB, en presencia de un 2% de agua de una serie de líquidos iónicos con 1-butanol y 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⁺][PF₆⁻] a 80°C [98]. 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⁺][PF₆⁻] 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.

Líquidos iónicos y lipasas

Las lipasas, como se ha comentado anteriormente se aplican en un amplio rango de reacciones tales como esterificaciones, transesterificaciones, perhidrólisis y aminólisis [186]. La utilización de medios anhidros en las reacciones de transesterificación y aminólisis es de vital importancia, con el fin de evitar las reacciones laterales de hidrólisis. CALB, PsL y PcL, que fácilmente toleran estos medios, se utilizan generalmente como catalizadores en ellos. Así, se ha llevado a cabo la síntesis de poliéster en [bmim⁺][BF₄⁻] y [bmim⁺][PF₆⁻] a 60 °C [187]. A diferencia de la síntesis tradicional sin disolventes a 200 °C, los productos de reacción obtenidos cuando se

3. Antecedentes

emplean líquidos iónicos son de peso molecular más bajo, lo cual puede ser debido a la alta viscosidad de los líquidos iónicos [188].

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. 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 g l^{-1} , 10 veces más que en acetona [180].

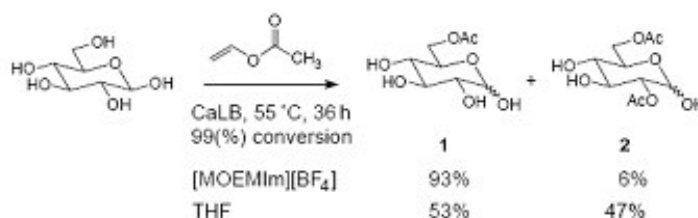


Figura 3.16. Acilación regioselectiva de glucosa en líquidos iónicos y THF.

La resolución de alcoholes quirales mediante acilación enantioselectiva es una de las mayores aplicaciones industriales de las lipasas [133]. 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 3.17**) [177,179,180,189]. 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) [190] de algunas de estas resoluciones mejora considerablemente cuando la reacción es llevada 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 $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$, obteniéndose valores considerablemente inferiores en TBME (tert-butilmetileter) [179]. Del mismo modo, Kim *et al.* [177] 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

[bmim⁺][PF₆⁻], comprobando que las lipasas eran 25 veces más enantioselectivas en los líquidos iónicos que en los disolventes orgánicos convencionales.

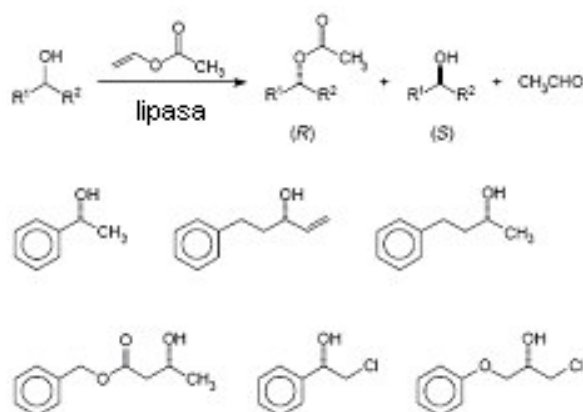


Figura 3.17. Resolución racémica de alcoholes quirales por la enzima lipasa.

La alta termoestabilidad de las lipasas en líquidos iónicos, ha incentivado la investigación en resoluciones racémicas a alta temperatura [191]. Así, se estudió la resolución racémica de rac-feniletanol por PsL en [bmim⁺][Tf₂N⁻] 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) [191].

La resolución de alcoholes primarios fósforo-sustituidos (**Figura 3.18**) catalizada por la lipasa *Pseudomonas fluorescens* (lipasa AK), se llevó a cabo con una alta enantioselectividad en [bmim⁺][PF₆⁻], mayor que en diisopropileter. Sin embargo, la enantioselectividad resultó ser insignificante en [bmim⁺][BF₄⁻] [192].

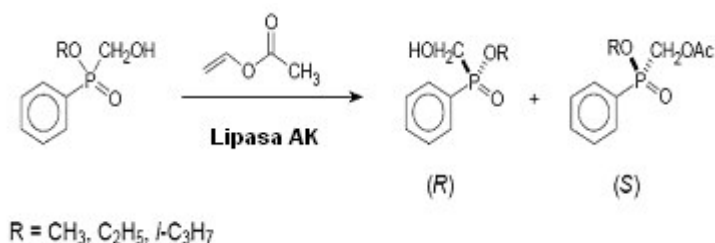


Figura 3.18. Acilación enantioselectiva de alcoholes primarios fósforo sustituidos.

También se ha llevado a cabo la resolución rracémica de rac-2-pentanol [193] y rac-glicidol [194] en líquidos iónicos basados en el catión imidazolio con excelente enantioselectividad. La actividad de CALB para la resolución de rac-2-pentanol en [bmim⁺][Tf₂N⁻] resultó ser 2.5 veces mayor que en hexano y transcurrió con una selectividad 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 catalizado por la lipasa *Candida rugosa* (CRL) en [bmim⁺][PF₆⁻] y [bmim⁺][BF₄⁻] [195]. La actividad enzimática y la enantioselectividad en [bmim⁺][PF₆⁻] fueron comparables a las obtenidas en 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 [81].

3.4. APLICACIONES DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN PROCESOS DE SEPARACIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANAS.

3.4.1. Tecnología de membranas

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). Y 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 [196].

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.

3.4.1.1. 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 y, 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).

Las membranas también presentan una gran variedad en lo referente a su textura (densas o porosas) y origen (natural y artificial); así se encuentran orgánicas, inorgánicas, mixtas, neutras, intercambiadoras de iones, homogéneas, de estructura asimétrica...

En la siguiente ilustración (**Figura 3.19**) se recogen algunos de los tipos de membranas:

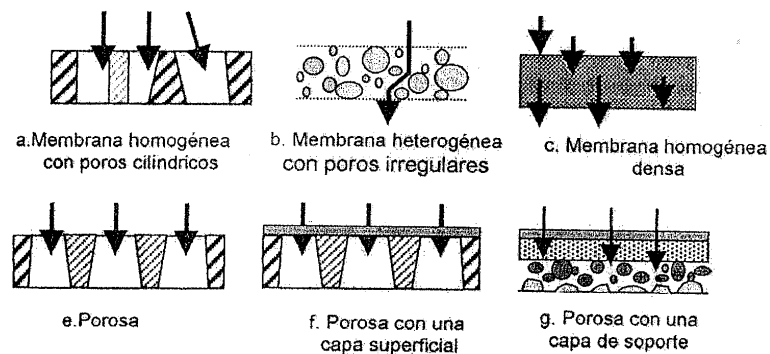


Figura 3.19. Tipos de membranas. (a), (b) y (c) son estructuras simétricas; (e), (f) y (g) son estructuras asimétricas.

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

Tabla 3.6. Clasificación de las membranas sólidas.

ATENDIENDO A	TIPO	
Espesor	Gruesas (>1 μm) Delgadas (<1 μm)	
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 de 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 μm), 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 μm , 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 y las partículas del disolvente. 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 3.4.2.
- 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 μm .

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 bastante sensibles a los 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 ZrO_2 o 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.

3.4.1.2. Procesos de membrana

Los principales procesos industriales producen 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 3.17 a**). 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 [197].
- **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 3.20 b**). 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 los 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 [198].

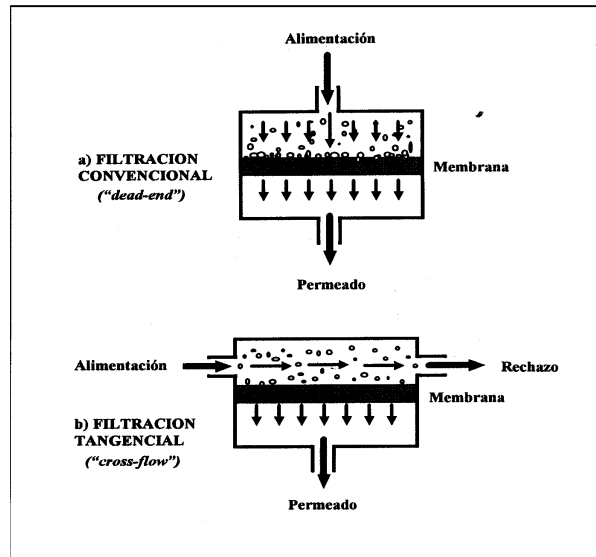


Figura 3.20. Esquema de la filtración convencional o frontal y tangencial.

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 [199].

Proceso	Tipo membrana	Fuerza impulsora	Aplicaciones
Microfiltración	Simétrica y asimétrica microporosa	Presión hidrostática	Clarificación, esterilización de aguas
Ultrafiltración	Asimétrica microporosa	Presión hidrostática	Separación de soluciones macromoleculares
Nanofiltración	Asimétrica	Presión hidrostática	Separación de pequeños compuestos orgánicos y sales desde disoluciones
Ósmosis inversa	Asimétrica, compuesta con piel homogénea	Presión hidrostática	Separación de micro-solutos y sales desde disoluciones
Permeación gas	Asimétrica o compuesta, polimérica homogénea o porosa	Presión hidrostática, gradiente de concentración	Separación de mezclas gaseosas
Diálisis	Simétrica microporosa	Gradiente de concentración	Separación de micro-solutos y sales desde soluciones macromoleculares
Pervaporación	Asimétrica, compuesta no porosa	Gradiente de concentración, presión de vapor	Separación de mezclas de líquidos volátiles
Permeación vapor	Compuesta no porosa	Gradiente de concentración	Separación de vapores volátiles de gases y vapores
Destilación con membrana	Microporosa	Temperatura	Separación de agua de solutos no volátiles
Electrodiálisis	Intercambiadora de iones, polimérica microporosa u homogénea	Potencial eléctrico	Separación de iones de agua y solutos no iónicos
Electrofiltración	Membrana cargada microporosa	Potencial eléctrico	Lavado y filtración de soluciones de sólidos suspendidos
Membranas líquidas	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 3.21** se indica el orden de los tamaños de las partículas a separar en los distintos procesos con membranas:

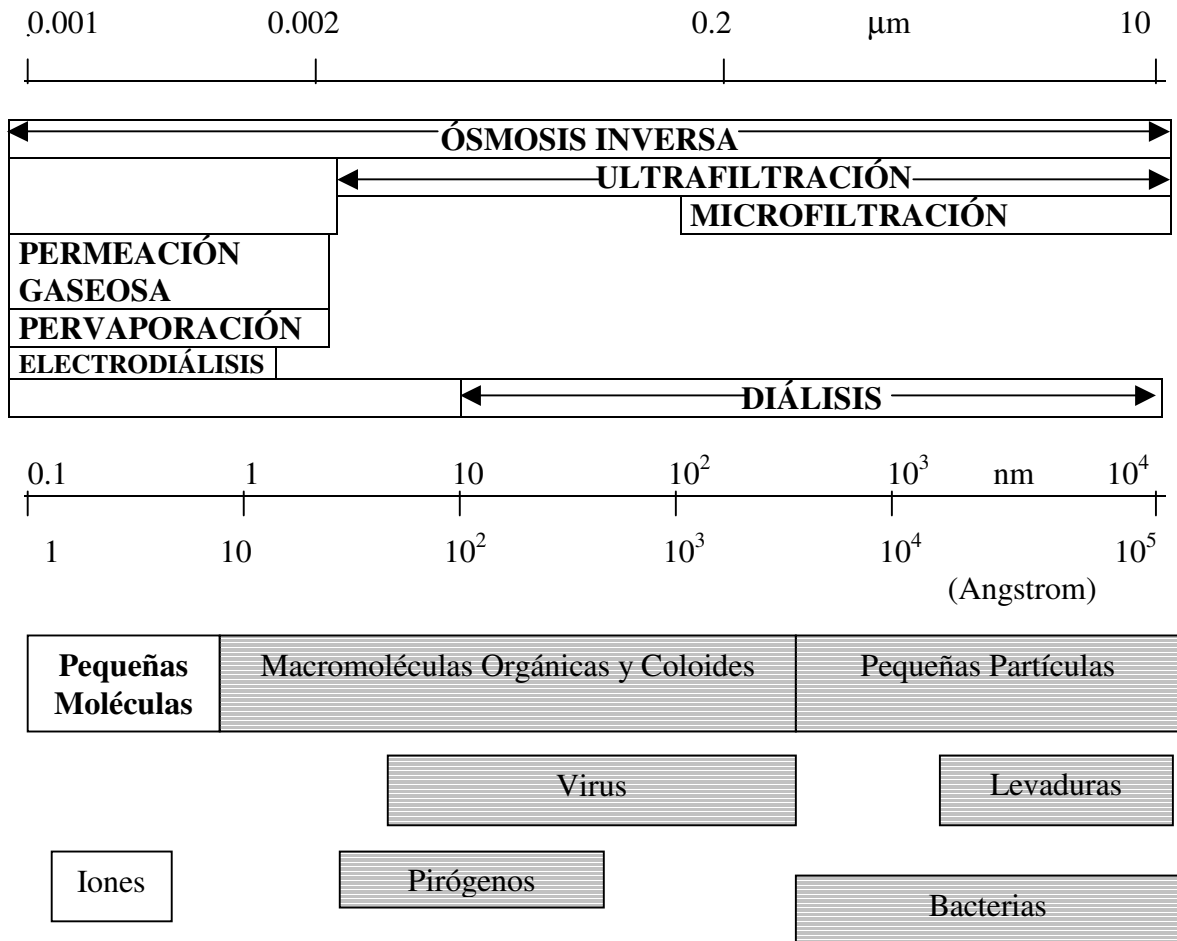


Figura 3.21. Tamaños de Impurezas y Rangos de Aplicación de las Tecnologías de Membranas [196].

3.4.2. 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 las transferencias 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 en el que 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 [200,201].

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.

3.4.2.1. 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.

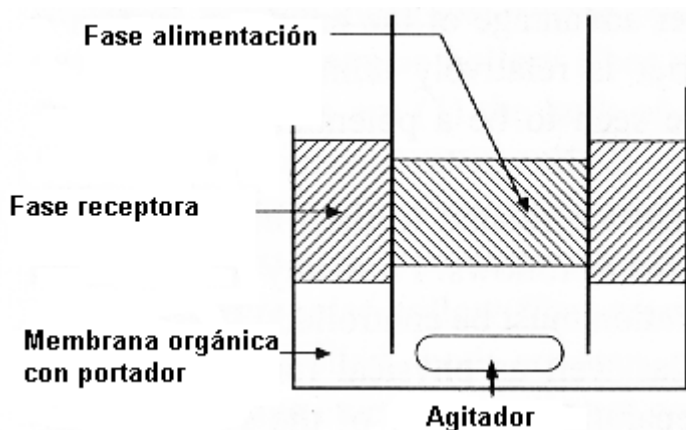


Figura 3.22. Membrana de volumen líquido.

3.4.2.2. Membrana líquida emulsionada

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 en 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 [202]. 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, serlo en exceso, de modo que se pueda romper la emulsión después del proceso de separación, permitiendo así la eliminación de las especies transportadas y la recuperación de la fase receptora. Por lo tanto, el proceso consta de varias unidades de operación y, tecnológicamente, no llega a ser muy atractivo.

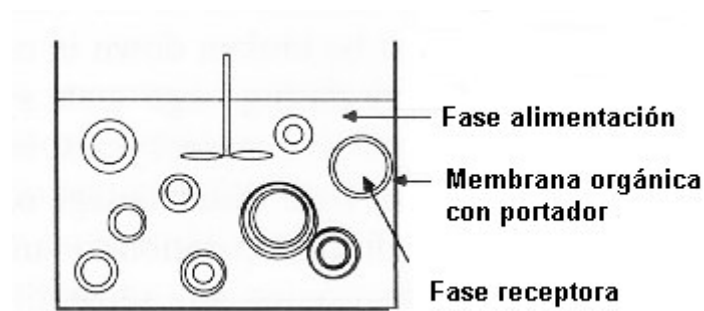


Figura 3.23. Membrana líquida emulsionada.

3.4.2.3. Membrana líquida inmovilizada o soportada

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 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 cm^3 con un espesor de $20 \mu\text{m}$ y una porosidad del 50% produce un área interfacial de 1 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 y el portador, dispuesta entre la fase de alimentación y la fase receptora, las cuales se encuentran agitadas.

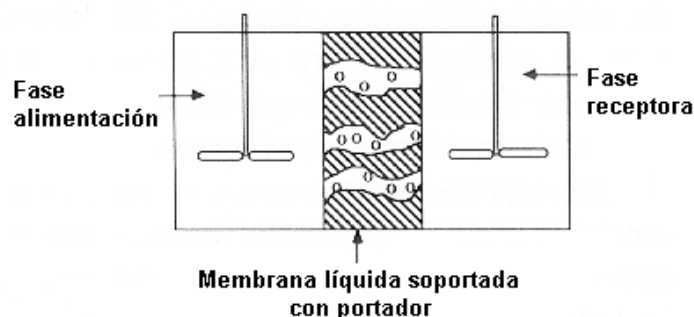


Figura 3.24. Membrana líquida soportada en lámina fina.

2) Membranas líquidas soportadas en un modulo 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 en 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.

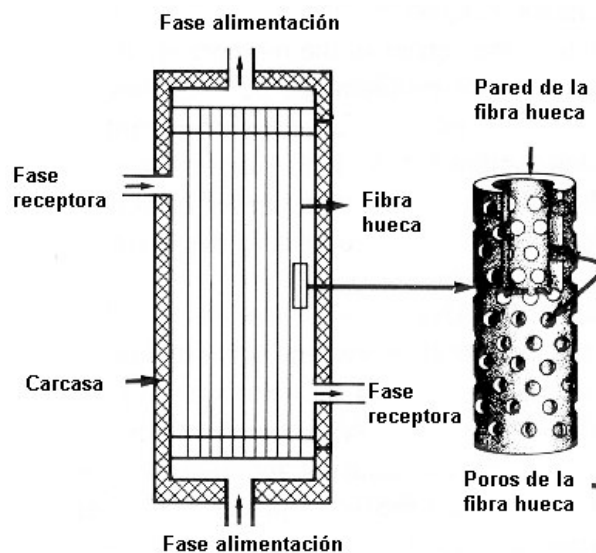


Figura 3.25. Membrana líquida soportada en un módulo de fibras huecas.

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 el disolvente orgánico contenido en los intersticios de ambos juegos de fibras huecas microporosas.

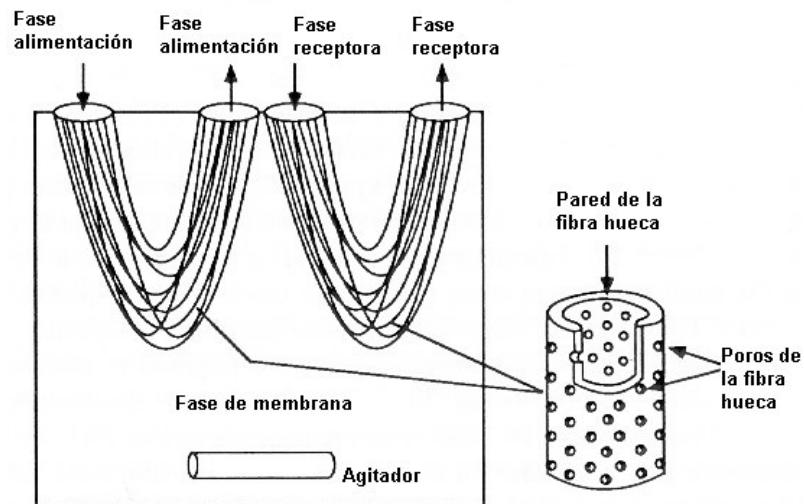


Figura 3.26. Membrana líquida soportada en dos módulos de fibras huecas.

- 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.

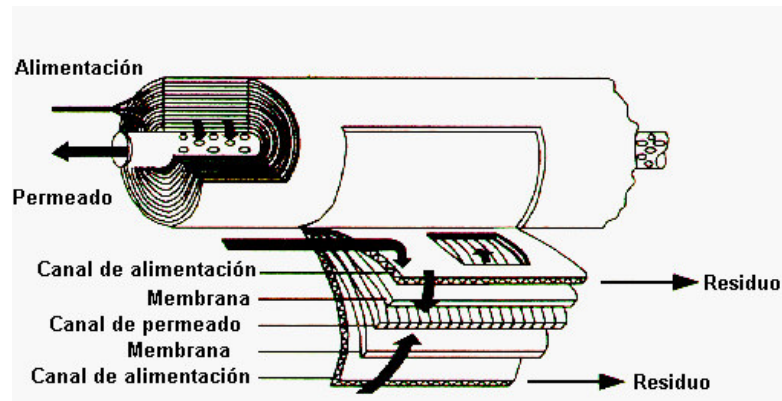


Figura 3.27. Membrana líquida soportada de módulo en espiral.

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.[203].

Recientemente, las membranas líquidas soportadas han sido aplicadas con éxito en una gran diversidad de procesos de separación, incluidas las bioseparaciones [204,205]. Así, Tbeur *et al.* [206] 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 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.* [207] 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 [208].

Happel *et al.* [209] 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 [210]. 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 [211] han estudiado la recuperación de fenoles de disoluciones acuosas usando membranas líquidas soportadas en aceites vegetales y Matsumoto *et al.* [212] han realizado la separación selectiva de hidrocarburos aromáticos, benceno, tolueno y p-xileno, utilizando líquidos iónicos, obteniendo unos resultados satisfactorios.

3.4.3. 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 [213,214]. 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 [215] 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 ninguna 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 [33], su alta conductividad iónica [33] y su nula inflamabilidad. Además, son capaces de disolver una amplia variedad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos [216,217] a la vez que son inmiscibles con numerosos compuestos orgánicos [34] e incluso en algunos casos 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.* [218-220], quienes han caracterizado, mediante espectroscopia de rayos X e impedancia eléctrica, membranas de polivinilideno (PVDF) basadas en [bmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻], [dmim⁺][BF₄⁻] 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.* [13] 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⁺][PF₆⁻]. Estos autores comprobaron que para conseguir altos porcentajes de transporte, el soluto no sólo tiene que interaccionar 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 en líquidos iónicos con el anión hexafluorofosfato PF_6^- [221]. Los líquidos iónicos conocidos hasta la fecha son higroscópicos, y permiten eliminar eficientemente el vapor de agua de mezclas gaseosas [73]. Además se ha comprobado que la solubilidad del CO_2 en este tipo de medios es notablemente elevada [73,222]. Así por ejemplo, a 40°C , y únicamente 50 bares de presión, la solubilidad del CO_2 en $[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ está en torno a 0,5 en fracción molar. Además, la solubilidad de un gas en un líquido iónico puede ser modulada eligiendo el catión, el anión y los sustituyentes del líquido iónico. De ese modo, y en base a las diferencias de solubilidad de diversos gases y vapores, se considera que los líquidos iónicos tienen un alto potencial para ser empleados en separaciones de gases [223]. 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 una mezcla específica de compuestos.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: Oxford, UK, 1998.
- [2] A. S. Matlack, *Introduction to Green Chemistry*; Marcel Dekker, Inc.: New York (NY), USA, 2001.
- [3] H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, Ionic liquids: Perspectives for organic and catalytic reactions, *J. Mol. Catal. A* 182-183 (2002) 419-437.
- [4] M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, M.T. Tena, *Extracción con Fluidos supercríticos en el proceso analítico*, Ed. Reverté, Barcelona, España, 1993.
- [5] M.A. McHugh, V.J. Krukonis, *Supercritical Fluid Extraction. Principles and Practice*. Second Ed., Butterworth-Heinemann, Boston, MA, EE.UU, 1994.
- [6] E.J. Beckman, Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing, *J. Supercrit. Fluids* 28 (2003) 121-191.
- [7] R. Goddard, J. Bosley, B. Al-Duri, Lipase-catalysed esterification of oleic acid and ethanol in a continuous packed bed reactor, using supercritical CO₂ as solvent: approximation of system kinetics, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75 (2000) 715-721.
- [8] S. Srivastava, G. Madras, J. Modak, Esterification of myristic acid by hog pancreas lipase in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 27 (2003) 55-64.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] J.D. Holbrey, K.R. Seddon, Ionic Liquids, Clean Products and Processes I, 1 (1999) 223-236.
- [12] F. van Rantwijk, R. Madeira Lau, R. A. Sheldon, Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends Biotechnol.* 21 (3) (2003) 131-138.

- [13] L.C. Branco, J.G. Crespo, and 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.
- [14] R.A. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.
- [15] P. Walden, *Bull. Acad. Imper. Sci. (St. Petersburg)* (1914) 1800.
- [16] J. T. Yoke, J. F. Weiss, G. Tollin, Reactions of triethylamine with copper (I) and copper (II) halides, *Inorg. Chem.* 2 (1963) 1210-1212.
- [17] J. L. Atwood, J. D. Atwood, *Advances in Chemistry Series No.150*, American Chemical Society: Washington DC, 1976, 112-127.
- [18] G. Mamantov, In *Materials for Advanced Batteries* (D.W. Murphy, J. Broadhead and B.C. H. Steele eds.), Plenum Press, New York, 1980, 111-122.
- [19] F. H. Hurley, U.S. Patent, 1948, 4, 446, 331.
- [20] T.P. Jr. Wier, US Patent, 1948, 4,446, 350.
- [21] T. P. Jr. Wier, F. H. Hurley, U.S. Patent, 1948, 4, 446, 349.
- [22] R. J. Gale, B. Gilbert, R.A. Osteryoung, Raman spectra of molten aluminum chloride: 1-butylpyridinium chloride systems at ambient temperatures, *Inorg. Chem.* 17(1978) 2728-2729.
- [23] J. S. Wilkes, J. A. Levisky, R.A. Wilson, C. L. Hussey, A new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy, and synthesis *Inorg. Chem.* 21 (1982) 1263-1264.
- [24] 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.
- [25] J.S. Wilkes, M.J. Zaworotko, Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquid, *Chem. Commun.* 13 (1992) 965- 967.
- [26] 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.

- [27] 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.
- [28] C.M. Gordon, J.D. Holbrey, A.R. Kennedy, K.R. Seddon, Ionic liquid crystals: hexafluorophosphate salts, *J. Mater. Chem.* 8 (1998) 2627-2636.
- [29] 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.
- [30] T. Kitazume, F. Zulfiqar, G. Tanaka, Molten salts as a reusable medium for the preparation of heterocyclic compounds, *Green Chem.* 2 (2000) 133-136.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] P. Bonhôte, A. P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient temperature molten-salts, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168 -1178.
- [34] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatlowksi, A.E. Visser, R.D. Rogers, Room temperature ionic liquids as novel media for clean liquid-liquid extraction, *Chem. Commun.* (1998) 1765-1766.
- [35] P. Lucas, N. El Mehdi, H.A. Ho, D. Bélanger, L. Breau, Expedient synthesis of symmetric aryl ketones and of ambient-temperature molten salts of imidazole, *Synthesis* 9 (2000) 1253- 1258.
- [36] R.S. Varma, V.V. Namboodiri, An expeditious solvent-free route to ionic liquids using microwaves, *Chem. Commun.* (2001) 643-644.
- [37] H. Waffenschmidt, P. Wassercheid, Ionic liquids into regioselective, platinumcatalysed hydroformylation, *J. Mol. Catal. A: Chemical* 164 (1-2) (2000) 61-67.
- [38] Y. Chauvin, S. Einloft, H. Olivier, Catalytic dimerization of propene by nickel-phosphine complexes in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride/AlEt_xCl_[3-x] (x = 0, 1) ionic liquids, *Ind. Eng. Chem. Res.* 34 (1995) 1149 -1155.

- [39] B. Gilbert, Y. Chauvin, H. Olivier, F. DiMarco-van Tiggelen, Disproportionation of polynuclear chloroethylaluminate anions in acidic 1-butyl-3-methylimidazolium chloride–AlEtCl₂ molten salts in the presence of a hydrocarbon phase, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1995) 3867-3871.
- [40] 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.
- [41] Y. Chauvin, H. Olivier-Bourbigou, Nonaqueous ionic liquids as reaction solvents, *CHEMTECH* 25 (1995) 26 -30.
- [42] G.W. Parshall, Catalysis in Molten Salt Media *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 8716 -8719.
- [43] 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.
- [44] B. Ellis, WO 9618459 (to BP Chemicals Limited, UK), Chem. Abstr. 1996, 125, 114635.
- [45] N. L. Lancaster, T. Welton, G.B. Young, 2.2 Quality aspects and other questions 21, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (2001) 2267- 2270.
- [46] 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.
- [47] J. Fuller, R.T. Carlin, Facile Preparation of Tetrafluoroborate and Trifluoromethanesulfonate Room-temperature Ionic Liquids, *Proc. Electrochem. Soc.* 98 (1999) 227-230.
- [48] P. Wasserscheid, W. Keim, Ionic Liquids - “New solutions” for transition metal catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39 (2000) 3772 -3789.
- [49] 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.
- [50] 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.

- [51] R. Hagiwara, Y. Ito, Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions, *J. Fluorine Chem.* 105 (2000) 221- 227.
- [52] J. G. Huddleston, A. E. Visser, W. M. Reichert, H. D. Willauer, G. A. Broker, R. D. Rogers, *Green Chem.* 3 (2001) 156 -164.
- [53] H. L. Ngo, K. LeCompte, L. Hargens, A. B. McEwan, Thermal properties of imidazolium ionic liquids, *Thermochim. Acta.* 357-358 (2000) 97-102.
- [54] 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.
- [55] Y. Chenfeng, L. Weimin, C. Yunxia, Y. Laigui, Room-temperature ionic liquids: a novel versatile lubricant. *Chem. Commun.* (2001) 2244-2245.
- [56] C. M. Gordon, New developments in catalysis using ionic liquids, *Appl. Catal. A. General* 222 (2001) 101-107.
- [57] T.A. Zawodzinski, R.A. Osteryoung, Oxide and hydroxide species formed on addition of water in ambient-temperature chloroaluminate melts: An ^{17}O NMR study, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 2842-2847.
- [58] 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.
- [59] A. J. Sun, M. Forsyth, D. R. MacFarlane, *Molten Salt Forum*, 585 (1998) 5-6.
- [60] 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.
- [61] K.R Seddon, A. Stark, M.-J. Torres, Ionic liquid for clean technology, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 2275 -2287.
- [62] 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

- [63] M. Koel, Physical and chemical properties of ionic liquids based on the dialkylimidazolium cation, *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* 49 (3) (2000) 145-155.
- [64] Ionic liquids database Merck, Ionic liquids: New materials for new applications, <http://ildb.merck.de/ionicliquids/en/startpage.htm>
- [65] 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.
- [66] A. Noda, K. Hayamizu, M. Watanabe, Pulsed-Gradient spin-echo ^1H and ^{19}F NMR ionic diffusion coefficient, viscosity, and ionic conductivity of non-chloroaluminate room-temperature ionic liquids, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 4603 -4610.
- [67] 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.
- [68] Ionic liquids database Solvent Innovation, http://www.solventinnovation.com/tech_properties.php
- [69] 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.
- [70] S.N.V.K. Aki, J.F. Brennecke, A. Samanta, How polar are room-temperature ionic liquids, *Chem. Commun.* (2001) 413-414.
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] 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.
- [74] S.V. Dzyuba, A. Bartsch, New room-temperature ionic liquids with C_2 -symmetrical imidazolium cations, *Chem. Commun.* 16 (2001) 1466-1467.

- [75] C. Laane, S. Boeren, V. Kees, C. Veeger, Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1986) 81-87.
- [76] 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.
- [77] 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.
- [78] 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.
- [79] R.W. Taft, M.J. Kamlet, The solvatochromic comparison method. 2. The α -scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 2886-2894.
- [80] C. Reichardt, Solvents and solvent effects in Organic Chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 21 (1992) 147-153.
- [81] 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.
- [82] K. M. Docherty, C. F. Jr. Kulpa, Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids, *Green Chem.* 7 (2005) 185-189.
- [83] N. Gathergood, M. T. Garcia, P. J. Scammells, Biodegradable ionic liquids. Part I. Concept, preliminary targets and evaluation, *Green Chem.* 6 (2004) 166-175.
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] S. T. Handy, M. Okello, G. Dickenson, Solvents from bio-renewable sources: Ionic liquids based on fructose, *Org. Lett.* 5 (2003) 2513-2515.

- [87] P. Wasserscheid, T. Welton, Eds. *Ionic Liquids in Synthesis*; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2003.
- [88] W. Freyland, C. A. Zell, S. Zein El Abedin, F. Endres, Nanoscale electrodeposition of metals and semiconductors from ionic liquids, *Electrochim. Acta* 48 (2003) 3053-3061.
- [89] Q. Liao, W. R. Pitner, G. Stewart, C. L. Hussey, G. R. Stafford, Electrodeposition of aluminum from the aluminum chloride – 1-methyl-3-ethylimidazolium chloride room temperature molten salt + benzene, *J. Electrochem. Soc.* 144 (1997) 936-943.
- [90] S. Y. Lee, H. H. Yong, Y. J. Lee, S. K. Kim, S. Ahn, Two-cation competition in ionic liquid-modified electrolytes for lithium ion batteries, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 13663-13667.
- [91] H. Sakaebe, H. Matsumoto, *N*-methyl-*N*-propylpiperidinium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide (PP13-TFSI) – Novel electrolyte base for Li battery, *Electrochem. Commun.* 5 (2003) 594-598.
- [92] D. Kuang, P. Wang, S. Ito, S. M. Zakeeruddin, M. Grätzel, Stable mesoscopic dye-sensitized solar cells based on tetracyanoborate ionic liquid electrolyte, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 7732-7733.
- [93] M. Ue, M. Takeda, A. Toriumi, A. Kominato, R. Hagiwara, Y. Ito, Application of low-viscosity ionic liquid to the electrolyte of double-layer capacitors, *J. Electrochem. Soc.* 150 (2003) A499-A502.
- [94] T. Sato, G. Masuda, K. Takagi, Electrochemical properties of novel ionic liquids for electric double layer capacitor applications, *Electrochim. Acta* 49 (2004) 3603-3611.
- [95] 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.
- [96] C. Chiappe, D. Pieraccini, Ionic liquids: Solvent properties and organic reactivity, *J. Phys. Org. Chem.* 18 (2005) 275-297.
- [97] J. Ross, J. Xiao, Friedel-Crafts acylation reactions using metal triflates in ionic liquid, *Green Chem.* 4 (2002) 129-133.

- [98] R. A. Sheldon, R. M. Lau, M. J. Sorgedrager, F. Van Rantwijk, K. R. Seddon, Biocatalysis in ionic liquids, *Green Chem.* 4 (2002) 147-151.
- [99] N. Jain, A. Kumar, S. Chauhan, S. M. S. Chauhan, Chemical and biochemical transformations in ionic liquids, *Tetrahedron* 61 (2005) 1015-1060.
- [100] 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.
- [101] J. F. Brennecke, E. J. Maginn, Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [102] 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.
- [103] H. Zhao, S. Xia, P. Ma, Use of ionic liquids as green solvents for extractions, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 1089-1096.
- [104] 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.
- [105] 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.
- [106] 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.
- [107] Strem Chemicals Inc., <http://www.strem.com/code/index.ghc>
- [108] Sigma-Aldrich-Fluka, <http://www.sigmaaldrich.com>
- [109] Degussa, Product information on Ionic Liquids, <http://productkaleidoscope.degussa.com/productkaleidoscope/en/productkaleidoscope.html>
- [110] Cytec Industries, Cytec's Phosphine and Phosphorus Specialties (Ionic Liquids), <http://www.cytec.com/business/Phosphine/Applications/IonicLiquids.shtm>

- [111] BASF, Proceso BASIL (Biphasic Acid Scavenging using Ionic Liquids), http://www.basf.com/corporate/051004_ionic.htm
- [112] Air Products, GASGUARD Sub-Atmospheric Systems (SAS), <http://www.airproducts.com/NR/rdonlyres/9D919AAD-DE4F-4614-B3C4-E923C6BF786E/0/GasguardSAS.pdf>
- [113] 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.
- [114] Y. Chauvin, L. Musmann, 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.
- [115] 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 (4) (2000) 348-354.
- [116] F.C. Liu, M.B. Abrams, R.T. Baker, W. Tumas, Phase-separable catalysis using room temperature ionic liquids and supercritical carbon dioxide, *Chem. Commun.* 5 (2001) 433-434.
- [117] E.G. Kuntz, Homogeneous catalysis in water, *CHEMTECH* 17 (9) (1987) 570-575.
- [118] 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.
- [119] 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 (39) (1998) 7071-7074.
- [120] 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.
- [121] T. Welton, Ionic liquids in catalysis, *Coord. Chem. Rev.* 248 (2004) 2459-2477.
- [122] M.J. Earle, P.B. McCormac, K.R. Seddon, Ruthenium-catalyzed olefin metathesis in ionic liquids, *Green Chem.* 2 (2000) 261-262.

- [123] 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.
- [124] Y. Chauvin, B. Gilbert, I. Guibard, Catalytic dimerization of alkenes by nickel complexes in organochloroaluminate molten salts, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 23 (1990) 1715-1716.
- [125] T.W. Randolph, H.W. Blanch, J.M. Prausnitz, C.R. Wilke, Enzymatic catalysis in a supercritical fluid *Biotechnol. Lett.* 5 (1985) 325-328.
- [126] J.S. Dordick, Enzymatic Catalysis in Monophasic Organic Solvents, *Enzyme Microb. Technol.* 11 (1989) 194-211.
- [127] 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.
- [128] F.H. Arnold, Engineering enzymes for non-aqueous solvents, *TIBTECH* 8 (1990) 244-249.
- [129] A. Zaks, A.M. Klibanov, Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 (1985) 3192-3196.
- [130] 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.
- [131] A. Zaks, A.M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1983) 3196-3392.
- [132] A.M. Klibanov, Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 97-101.
- [133] A. Schmidt, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* 409 (2001) 258-268.
- [134] 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.
- [135] 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.

- [136] 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.
- [137] P. Lozano, T. De Diego, J.L. Iborra, Influence of water-miscible aprotic solvents on α -chymotrypsin stability, *Biotechnol. Prog.* 12 (1996) 488-493.
- [138] 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.
- [139] 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.
- [140] K. Nakamura, Y.M. Chi, Y. Yamada, T. Yano, Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide. *Chem. Eng. Commun.* 45 (1986) 207-212.
- [141] D.A. Hammond, M. Karel, A.M. Klibanov, V.J. Krukonis, Enzymatic reactions in supercritical gases, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 11 (1985) 178-206.
- [142] J.C. Erickson, P. Schyns, C.L. Cooney, Effect of pressure on an enzymatic reaction in a supercritical fluid, *AIChE J.* 36 (2) (1990) 299-301.
- [143] M. Taniguchi, Y. Katto, S. Yokoya, S. Miake, Critical heat flux on a uniformly heated cylinder in a cross flow of saturated liquid over a very wide range of vapor-to-liquid density ratio, *Biochim. Biophys. Acta* 30 (9) (1987) 1971-1977.
- [144] 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.
- [145] 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(1) (1990) 11-16.
- [146] O. Aaltonen, M. Rantakylä, Biocatalysis in Supercritical CO₂, *CHEMTECH* (1991) 240-248.
- [147] E. Barzana, M. Karel, A.M. Klibanov, Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase, *Biotechnol. and Bioeng.* 34 (1989) 1178-1185.

- [148] H. Robert, S. Lamare, F. Parvaresh, B. Mattiasson, Biocatalysis in nonconventional media. Eds. Tramper J., Vermüe M., Beftink H.H. and von Stockar U. Amsterdam: Elsevier., 1992, 85-91.
- [149] J.M.S. Cabral, P. Best, L. Boross, J. Tramper, Applied Biocatalysis, Harwood academic-publishers, 1994, 279-298.
- [150] A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, Lipases and their industrial applications. An overview, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118 (2004) 155-170.
- [151] R. Sharma, Y.Chisti, U.C. Banerjee, Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Advanc.* 19 (2001) 627-662.
- [152] 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.
- [153] 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.
- [154] O. Kirk, M.W. Christensen, Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. Organic Process Research & Development, 6 (2002) 446-451.
- [155] 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.
- [156] J. Uppenberg, N. Öehrner, 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, *Biochemistry* 34 (1995) 16838-16851.
- [157] 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.
- [158] 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 α/β hydrolase fold, *Protein Engineering* 5 (1992) 197-211.
- [159] R. Verger, Interfacial activation of lipases: facts and artifacts, *TIBTECH* 15 (1997) 32-38.

- [160] V.M. Balção, A.L. Paiva, F.X. Malcata, Bioreactors with immobilized lipases: state of the art, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 392-416.
- [161] 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.
- [162] U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2005).
- [163] 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.
- [164] 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.
- [165] D. Kadereit, H. Waldmann, Enzymatic protecting group techniques, *Chem. Rev.* 101 (2001) 3367-3396.
- [166] 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.
- [167] D. Rotticci, J. Ottosson, T. Norin, K. Hult, *Candida antarctica* lipase B: A tool for the preparation of optically active alcohols. *Methods in Biotechnology* 15 (2001) 261-276.
- [168] A. Córdova, A. Hult, K. Hult, H. Ihre, T. Iversen, E. Malmström, Synthesis of a poly(ϵ -caprolactone) monosubstituted first generation dendrimer by lipase catalysis, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 13521-13522.
- [169] 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.
- [170] F. Binns, P. Harffey, S.M. Roberts, A. Taylor, Studies of lipase-catalyzed polyesterification of an unactivated diacid/diol system, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 36 (1998) 2069-2080.

- [171] 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.
- [172] 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.
- [173] 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.
- [174] 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.
- [175] M. Erbdinger, A.J. Mesiano, A.J. Russell, Enzymatic catalysis of formation of α -aspartame in ionic liquid - an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents *Biotechnol. Prog.* 16 (2000) 1129-1131.
- [176] 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.
- [177] K-W. Kim, B. Song, M. Y. Choi, in Ionic Liquids: Markedly Enhanced Enantioselectivity of Lipase, *Org. Lett.* 3 (2001) 1507-1509.
- [178] R.M. Lau, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, R.A. Sheldon, Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Org. Lett.* 2 (2000) 4189-4191.
- [179] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalyzed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 5 (2001) 425-426.
- [180] 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.
- [181] 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.

- [182] M. Eckstein, At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 867-872.
- [183] J.A. Laszlo, D.L. Compton, α - Chymotrypsin catalysis in imidazolium- based ionic liquids. *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 181-186.
- [184] P. Lozano, T. De Diego, J.P. Guegan, M. Vaultier, J.L. Iborra, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 563–569.
- [185] N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Use of Ionic Liquids to Increase the Yield and Enzyme Stability in the β -Galactosidase Catalysed Synthesis of *N*-Acetyllactosamine, *Org. Proc. Res. Dev.* 6 (2002) 553-557.
- [186] R.D. Schmidt, R. Verger, Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37 (1998) 1608-1633.
- [187] H. Uyama, M. Kuwabara, T. Tsujimoto, S. Kobayashi, High-performance immobilized lipase catalyst for polyester synthesis, *Polym. J.* 34 (2002) 970-972.
- [188] F. Binns, Paul Harffey, S.M. Roberts, A. Taylor, Studies leading to the large scale synthesis of polyesters using enzymes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1999) 2671-2676.
- [189] 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.
- [190] 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.
- [191] M. Eckstein, At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 867-872.
- [192] P. Kielbasinski, M. Albrycht, J. Luczak, M. Mikolajczyk, *Tetrahedron Asymmetry* 13 (2002) 735-738.
- [193] 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.

- [194] 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.
- [195] 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.
- [196] J.A. Ibáñez, L.M. Berná, R. Valerdi, Desalación por membranas, Secretariado de publicaciones, Universidad de Murcia, 1989.
- [197] B.J. Dutka, Membrane filtration: Applications, techniques and problems, Marcel Dekker, New York, 1981, 253-264.
- [198] 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.
- [199] K. Scott, Handbook of industrial membranes, 2^oEd. Elsevier Advanced Technology, 1998.
- [200] W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt, Handbook of chemical property estimation methods: environmental behaviour of organic compounds, McGraw-Hill, New York, 1982.
- [201] 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.
- [202] N.N. Li, Liquid surfactant membranes, U.S. Patent No. 3, 410, 794, 1968.
- [203] Commodore Separation Technologies Inc. http://www.business.com/directory/energy_and_environment/waste_management/commodore_separation_technologies,_inc/
- [204] R. Bloch. Hydrometallurgical separations by solvent membranes. In: J.E. Flynn, (Ed.), Membrane Science and Technology, Plenum Press, New York, 1970.
- [205] 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. Membrane Sci.* 248 (1-2) (2004) 1-14.

- [206] N. Tbeur, T. Rhlalou, 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, *Carbohydrate Research*. 329 (2000) 409-422.
- [207] 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. Mem. Sci.* 174 (2000) 277-286.
- [208] 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
- [209] 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.
- [210] 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.
- [211] 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.
- [212] M. Matsumoto, Y. Inomoto, K. Kondo, Selective separation of aromatic hydrocarbons through supported liquid membranes based on ionic liquids. *J. Membrane Sci.* 246 (2004) 77-81.
- [213] 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.
- [214] 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.
- [215] 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.
- [216] T. Welton, Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2083.

- [217] L.A. Blanchard and J.F. Brenneke, Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287-292.
- [218] 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.
- [219] 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.
- [220] 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.
- [221] P. Scovazzo, J. Kieft, D.A. Finan, C. Koval, D. DuBois, R. Noble, Gas Separations using non-hexafluorophosphate anion supported ionic liquid membranes, *J. Membrane Sci.* 238 (2004) 57-63.
- [222] L. A. Blanchard, Z. Gu, J. F. Brennecke, High-pressure phase behaviour of ionic liquid/CO₂ systems, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 2437-2444.
- [223] 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.

4

Determinación experimental de la influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación enzimáticas en medios líquido iónico

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

4. DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN EN REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICAS EN MEDIOS LÍQUIDO IÓNICO

4.1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas realizan su acción catalítica en la naturaleza en medios acuosos. Sin embargo, algunos procesos sintéticos requieren condiciones anhidras. El uso de disolventes orgánicos como medios no convencionales de reacción ofrece la posibilidad de llevar a cabo reacciones sintéticas catalizadas por enzimas hidrolíticas (p.e. lipasa) con la ventaja de aumentar la solubilidad de los sustratos orgánicos [1,2]. Sin embargo, los disolventes orgánicos son normalmente líquidos volátiles que se pueden evaporar a la atmósfera, con el consiguiente aumento en los costes del proceso y el importante impacto sobre el medio ambiente y la salud.

El uso de líquidos iónicos en procesos biocatalíticos como sustitutos de los disolventes orgánicos convencionales ha recibido un creciente interés en los últimos años [3] ya que se ha comprobado que son disolventes adecuados para una gran variedad de procesos bioquímicos [4]. Una enzima que presenta un enorme potencial para ser utilizada en estos nuevos medios de reacción es la lipasa, ya que ha mostrado un excelente comportamiento como biocatalizador en otros medios no convencionales de reacción tales como disolventes orgánicos y dióxido de carbono supercrítico [5-7].

En el presente capítulo se ha llevado a cabo la síntesis de ésteres mediante transesterificación catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) en un disolvente orgánico convencional, n-hexano, y en medios líquido iónico.

El esquema general de reacción es el siguiente:

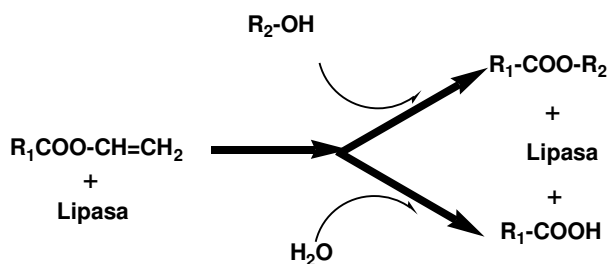


Figura 4.1. Esquema general de reacción.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

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 sustrato-enzima, 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 muchísimo mayor que la de síntesis y para que predomine la síntesis sobre la hidrólisis, la concentración del alcohol debe ser mucho mayor que la de agua para conseguir favorecer la cinética hacia la síntesis.

En primer lugar se ha estudiado el efecto del pH y la temperatura en la actividad y selectividad enzimática. Para ello se seleccionó como reacción modelo la síntesis de butirato de butilo mediante transesterificación a partir de butirato de vinilo ($R_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2-$) y 1-butanol ($R_2 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_3-$).

Posteriormente se ha analizado la influencia de diferentes ésteres vinílicos ($R_1 = \text{CH}_3-$, CH_3CH_2- , $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-$, $\text{CH}_2\text{CH}-$, $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)-$, $\text{Ph}-$) y alcoholes ($R_2 = \text{CH}_3-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-$) en la actividad y selectividad enzimática de CALB en dichas reacciones de transesterificación en medios líquido iónico.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

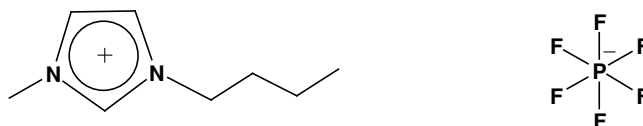
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Enzima y materiales

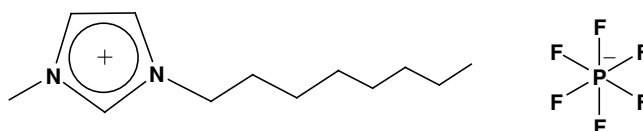
Se utilizó como biocatalizador un preparado comercial de lipasa B de *Candida antarctica* (EC 3.1.1.3) suministrado por Novo España S.A. (Madrid, España). Este preparado, de denominación comercial Lipozym® CALB L, consiste en una disolución acuosa de la enzima libre. Para su utilización, la disolución 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 [8].

Los líquidos iónicos utilizados fueron los siguientes:

- **[bmim⁺][PF₆⁻]**: 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato. Suministrado con una pureza del 99% por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania).



- **[omim⁺][PF₆⁻]**: 1-metil-3-octilimidazolio hexafluorofosfato. Suministrado con una pureza del 99% por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania).



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.

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. Ensayos de actividad enzimática

En un vial de rosca de 1.5 ml se adicionan 150 μmol de cada uno de los sustratos, éster vinílico y alcohol, y se completa el volumen de reacción hasta 500 μL con el líquido iónico correspondiente o n-hexano. El vial de reacción se sumerge entonces en un baño termostático a la temperatura de ensayo.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

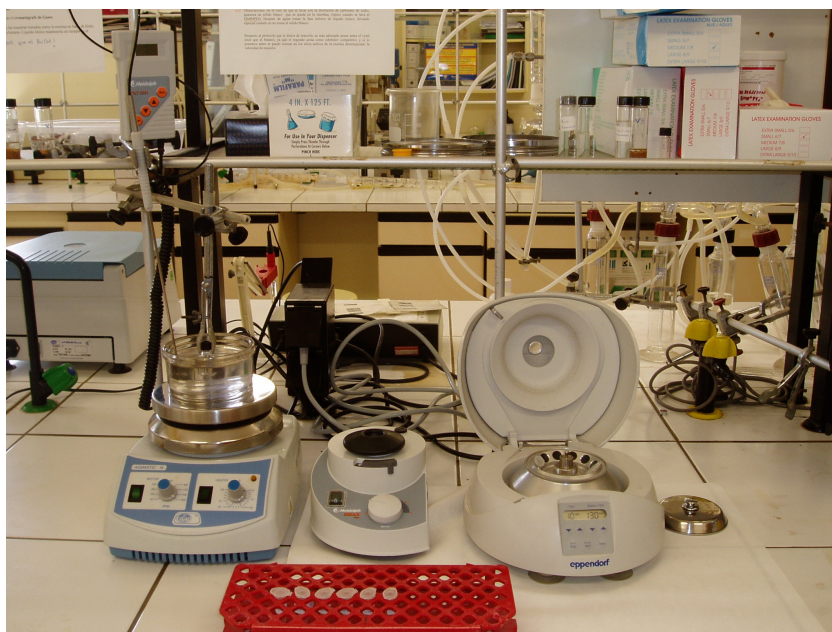


Figura 4.2. Dispositivo experimental.

La reacción comienza adicionando 10 μL de lipasa B *Candida antarctica* (8.5 mg mL^{-1} en tampón fosfato 20 mM a pH 7). La mezcla de reacción permanece agitada durante las 2 horas de ensayo y periódicamente se toman muestras de 15 μL , que se adicionan sobre 485 μL de n-hexano. La mezcla bifásica resultante se agita vigorosamente en un vórtex durante 2 minutos 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 (n-hexano y IL). Posteriormente a 400 μL de la fase extracto se le adiciona una disolución del estándar interno utilizado para el análisis en n-hexano (100 μL , 30 mM), y 5 μL de la disolución resultante se analizan por cromatografía de gases, tal y como se describe en el apartado 4.2.3.

4.2.3. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras se lleva 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™ de Supelco, cuyas especificaciones se recogen en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1 Características de la columna capilar.

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

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

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 lineal) 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 de concentración de cada compuesto y 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).

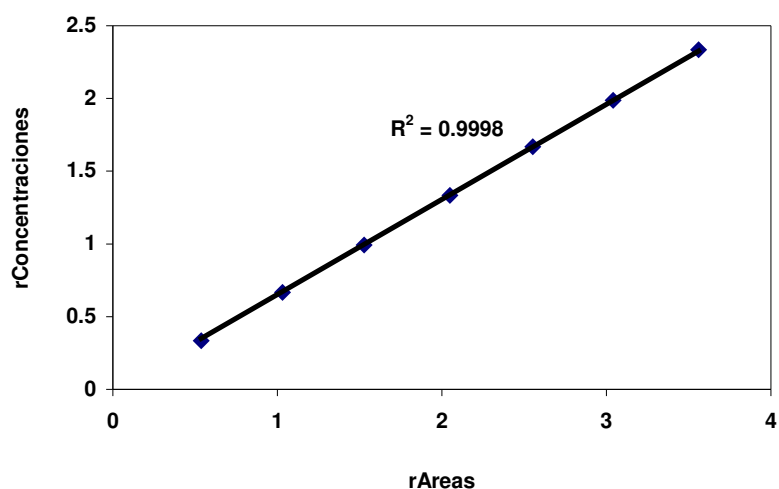


Figura 4.3. Recta de calibrado obtenida para el butirato de butilo.

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.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

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 : *Acetato de vinilo, 1-butanol, acetato de butilo y ácido acético*

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 de reacción.

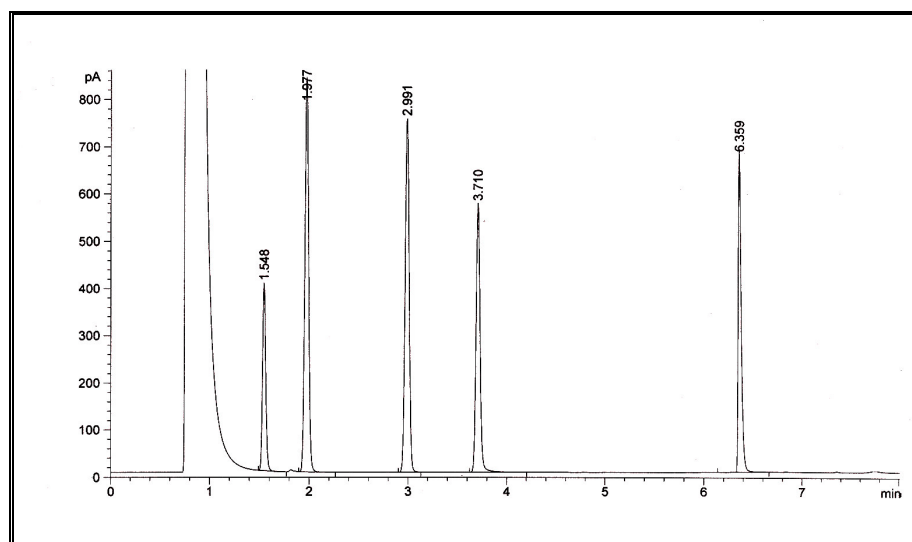


Figura 4.4. Cromatograma del sistema: acetato de vinilo, 1-butanol, acetato de butilo y ácido acético.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: acetato de vinilo, 1.548 min.; propionato de etilo (estándar interno), 1.977 min.; acetato de butilo, 2.991 min.; 1-butanol, 3.710 min.; ácido acético, 6.359 min.

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

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Tabla 4.2. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: Acetato de vinilo, 1-butanol, acetato de butilo y ácido acético.

Compuesto	m = pendiente	r ²
ACETATO VINILO <chem>CH3COOCH=CH2</chem>	2.3827	0.9942
1-BUTANOL <chem>CH3(CH2)3OH</chem>	0.9265	0.9924
ACETATO BUTILO <chem>CH3COO(CH2)3CH3</chem>	0.7205	0.9994
ÁCIDO ACÉTICO <chem>CH3COOH</chem>	1.0529	0.9924

Sistema de reacción 2: *Propionato de vinilo, 1-butanol, propionato de butilo y ácido propiónico*

El perfil de temperatura es el siguiente: 30 °C, 2 min; 30 °C/min, 40 °C; 5.5 min, 40 °C; 60°C/min, 170 °C; 2 min, 170 °C.

En la **Figura 4.5** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

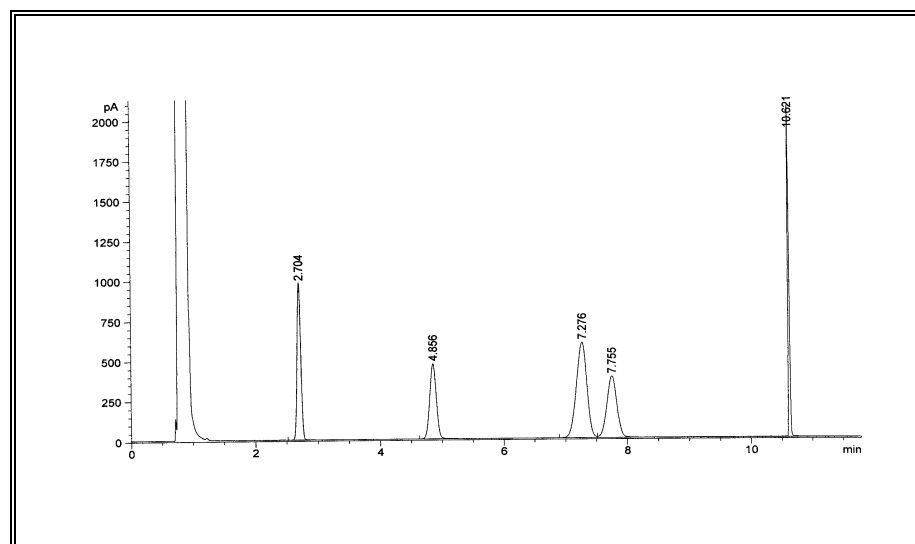


Figura 4.5. Cromatograma del sistema: propionato de vinilo, 1-butanol, propionato de butilo y ácido propiónico

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: propionato de vinilo, 2.704 min.; acetato de butilo (estándar interno), 4.856 min.; propionato de butilo, 7.276 min.; 1-butanol, 7.755 min.; ácido propiónico, 10.621 min.

En la **Tabla 4.3** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.

Tabla 4.3. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: propionato de vinilo, 1-butanol, propionato de butilo y ácido propiónico

Compuesto	m = pendiente	r ²
PROPIONATO VINILO <chem>CH3CH2COOCH=CH2</chem>	1.4370	0.9977
1-BUTANOL <chem>CH3(CH2)3OH</chem>	1.3349	0.9984
PROPIONATO BUTILO <chem>CH3CH2COO(CH2)3CH3</chem>	0.8287	0.9996
ÁCIDO PROPIÓNICO <chem>CH3CH2COOH</chem>	1.8770	0.9970

Sistema de reacción 3 : *Butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico*

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 4.6** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

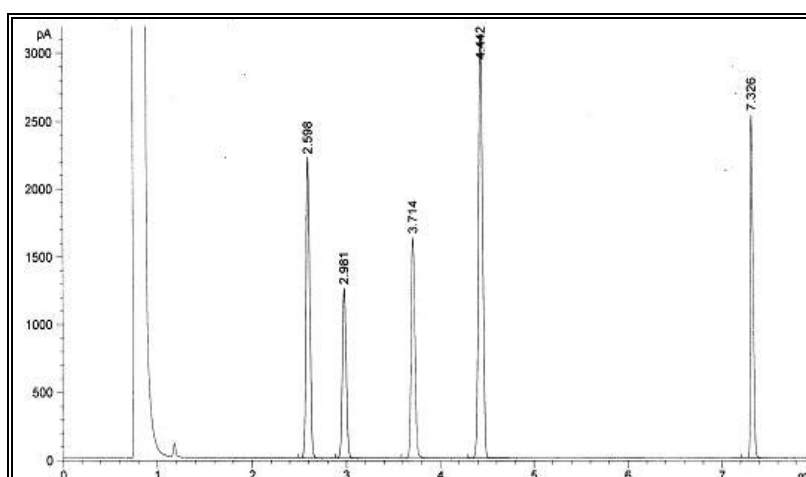


Figura 4.6. Cromatograma del sistema: butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: butirato de vinilo, 2.596 min.; acetato de butilo (estándar interno), 2.981 min.; 1-butanol, 3.712 min.; butirato de butilo, 4.430 min.; ácido butírico, 7.339 min.

En la **Tabla 4.4** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.

Tabla 4.4. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico.

Compuesto	m = pendiente	r ²
BUTIRATO VINILO <chem>CH3(CH2)2COOCH=CH2</chem>	1.0913	0.9995
1-BUTANOL <chem>CH3(CH2)3OH</chem>	1.4962	0.9984
BUTIRATO BUTILO <chem>CH3(CH2)2COO(CH2)3CH3</chem>	0.6533	0.9998
ÁCIDO BUTÍRICO <chem>CH3(CH2)2COOH</chem>	1.4404	0.9998

Sistema de reacción 4: *Decanoato de vinilo, 1-butanol, decanoato de butilo y ácido decanoico*

El perfil de temperatura es el siguiente: 40 °C, 7 min; 15 °C/min, 190 °C; 5 min, 190 °C.

En la **Figura 4.7** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

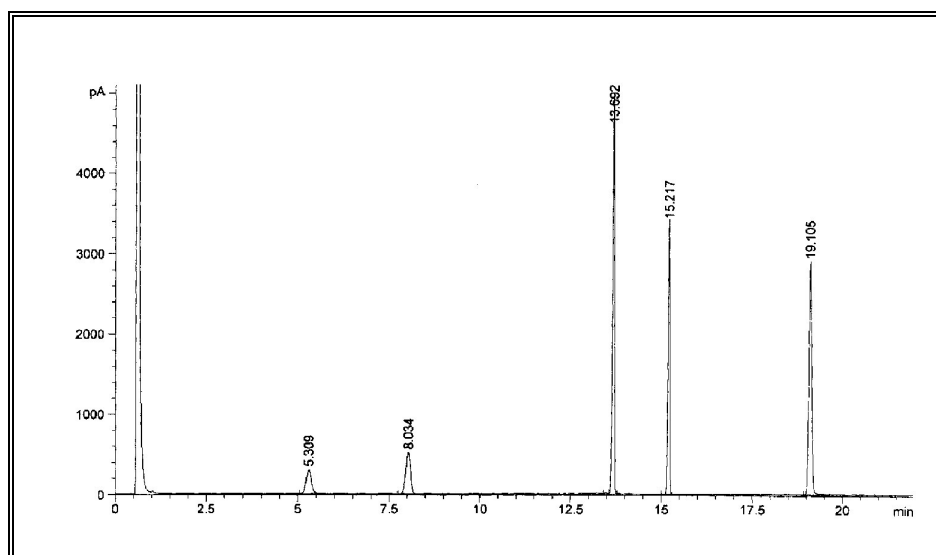


Figura 4.7. Cromatograma del sistema: decanoato de vinilo, 1-butanol, decanoato de butilo y ácido decanoico.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: 1-butanol, 5.309 min.; butirato de butilo (estándar interno), 8.034 min.; decanoato de vinilo, 13.692 min.; decanoato de butilo, 15.217 min.; ácido decanoico, 19.105 min.

En la **Tabla 4.5** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas para cada compuesto.

Tabla 4.5. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema de reacción: decanoato de vinilo, 1-butanol, decanoato de butilo y ácido decanoico.

Compuesto	m = pendiente	r ²
DECANOATO VINILO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOCH}=\text{CH}_2$	0.4707	0.9941
1-BUTANOL $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	0.9797	0.9935
DECANOATO BUTILO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COO CH}_3(\text{CH}_2)_3$	0.7323	0.9918
ÁCIDO DECANOICO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	1.0044	0.9996

Sistema de reacción 5: Laurato de vinilo, 1-butanol, laurato de butilo y ácido láurico

El perfil de temperatura es el siguiente: 40°C, 0 min; 20 °C/min, 190°C; 9 min, 190 °C.

En la **Figura 4.8** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

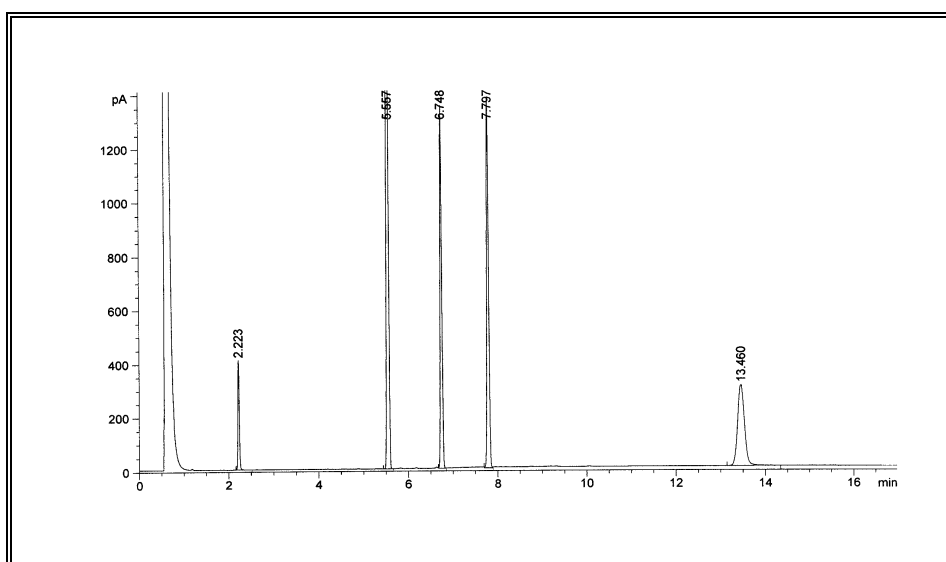


Figura 4.8. Cromatograma del sistema: laurato de vinilo, 1-butanol, laurato de butilo y ácido láurico.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: 1-butanol, 2.223 min.; decanoato de etilo (estándar interno), 5.557 min.; laurato de vinilo, 6.748 min.; laurato de butilo, 7.797 min.; ácido laúrico, 13,460 min.

En la **Tabla 4.6** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para cada compuesto.

Tabla 4.6. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema de reacción: laurato de vinilo, 1-butanol, laurato de butilo y ácido laúrico.

Compuesto	m = pendiente	r ²
LURATO VNILO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOCH}=\text{CH}_2$	0.8373	0.9999
1-BUTANOL $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	3.6413	0.9989
LURATO BUTILO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	0.7164	0.9991
ÁCIDO LAÚRICO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	0.9368	0.9963

Sistema de reacción 6: *Benzoato de vinilo, 1-butanol, benzoato de butilo y ácido benzoico*

El perfil de temperatura es el siguiente: 40°C, 0 min; 20 °C/min, 190°C; 9 min, 190 °C.

En la **Figura 4.9** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

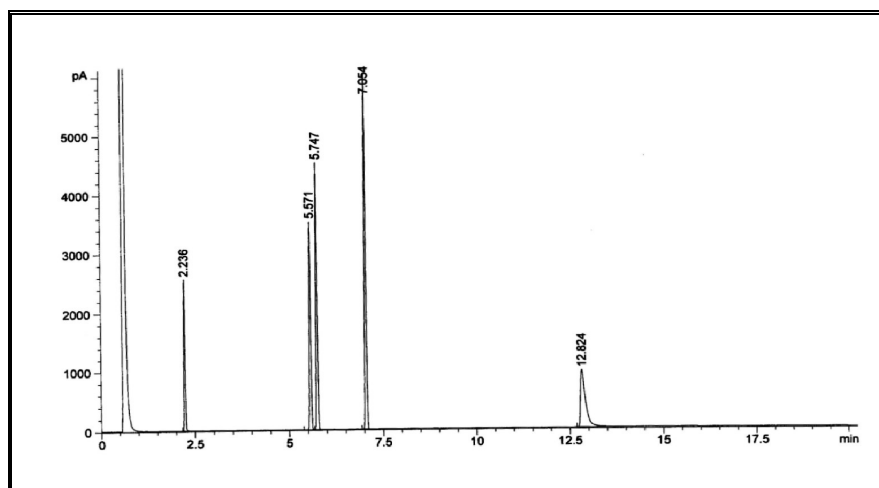


Figura 4.9. Cromatograma del sistema: benzoato de vinilo, 1-butanol, benzoato de butilo y ácido benzoico

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: 1-butanol, 2.236 min.; decanoato de etilo (estándar interno), 5.571 min.; benzoato de vinilo, 5.747 min.; benzoato de butilo, 7.054 min.; ácido benzoico, 12.824 min.

En la **Tabla 4.7** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para cada compuesto.

Tabla 4.7. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: benzoato de vinilo, 1-butanol, benzoato de butilo y ácido benzoico.

Compuesto	m = pendiente	r ²
BENZOATO VINILO PhCOOCHCH ₂	1.7159	0.9987
1-BUTANOL CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	3.6413	0.9983
BENZOATO DE BUTILO PhCOO(CH ₂) ₃ CH ₃	1.4979	0.9965
ÁCIDO BENZOICO PhCOOH	1.9945	0.9948

Sistema de reacción 7: Acrilato de vinilo, 1-butanol, acrilato de butilo y ácido acrílico

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 4.10** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

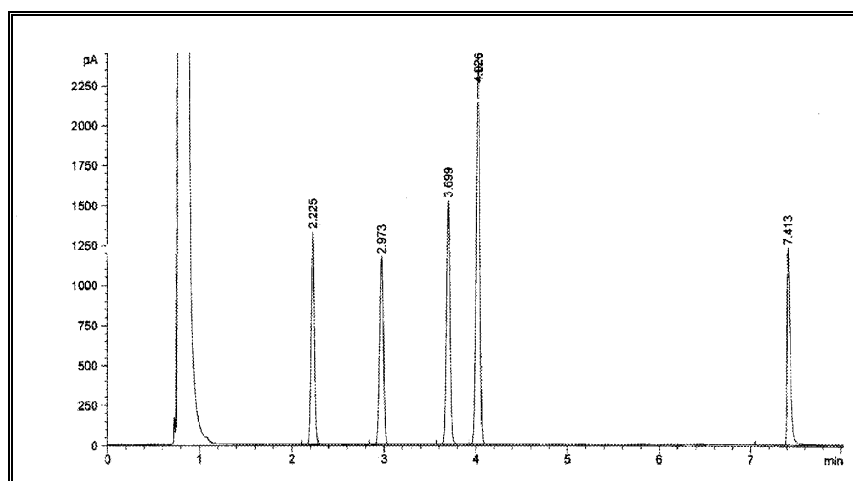


Figura 4.10. Cromatograma del sistema: acrilato de vinilo, 1-butanol, acrilato de butilo y ácido acrílico.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: acrilato de vinilo, 2.225 min.; acetato de butilo (estándar interno), 2.973 min.; 1-butanol, 3.699 min.; acrilato de butilo, 4.026 min.; ácido acrílico, 7.413 min.

En la **Tabla 4.8** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para compuesto.

Tabla 4.8. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: acrilato de vinilo, 1-butanol, acrilato de butilo y ácido acrílico.

Compuesto	m = pendiente	r ²
ACRILATO VINILO $\text{CH}_2=\text{CHCOOCH}=\text{CH}_2$	1.4637	0.9784
1-BUTANOL $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	1.3408	0.9988
ACRILATO BUTILO $\text{CH}_2=\text{CHCOO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	0.7972	0.9992
ÁCIDO ACRILICO $\text{CH}_2=\text{CHCOOH}$	1.8328	0.9988

Sistema de reacción 8: *Metacrilato de vinilo, 1-butanol, metacrilato de butilo y ácido metacrílico*

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 4.11** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

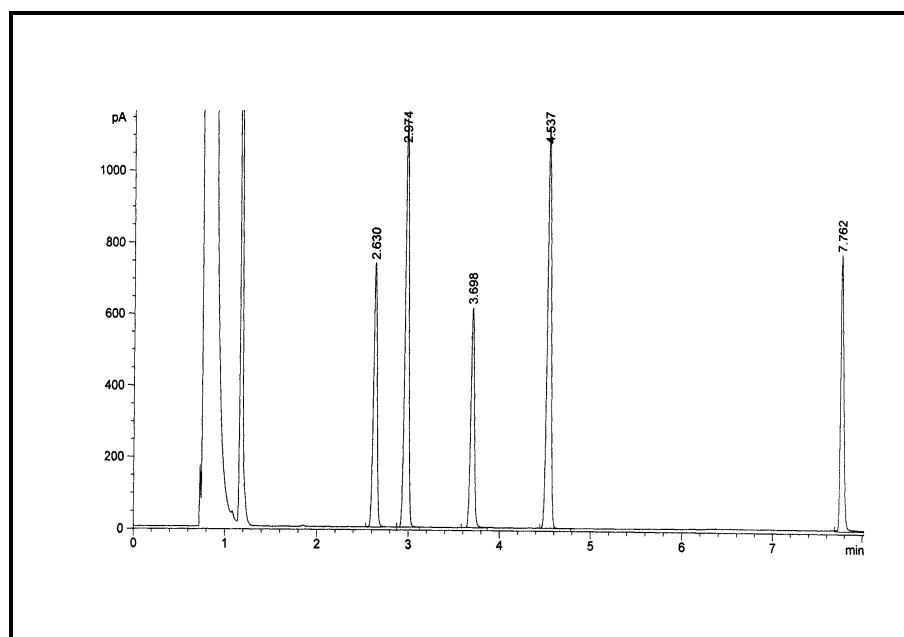


Figura 4.11. Cromatograma del sistema: metacrilato de vinilo, 1-butanol, metacrilato de butilo y ácido metacrílico.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: metacrilato de vinilo, 2.630 min.; acetato de butilo (estándar interno), 2.974 min.; 1-butanol, 3.698 min.; metacrilato de butilo, 4.537 min.; ácido metacrílico, 7.762 min.

En la **Tabla 4.9** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para cada compuesto.

Tabla 4.9. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: metacrilato de vinilo, 1-butanol, metacrilato de butilo y ácido metacrílico.

Compuesto	m = pendiente	r ²
METACRILATO VINILO $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}=\text{CH}_2$	1.0972	0.9986
1-BUTANOL $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	1.3372	0.9984
METACRILATO BUTILO $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	0.6531	0.9998
ÁCIDO METACRILICO $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$	1.1778	0.9980

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Sistema de reacción 9: *Butirato de vinilo, metanol, butirato de metilo y ácido butírico*

El perfil de temperatura es el siguiente: 24 °C, 3 min; 20 °C/min, 190 °C; 1 min, 190 °C.

En la **Figura 4.12** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

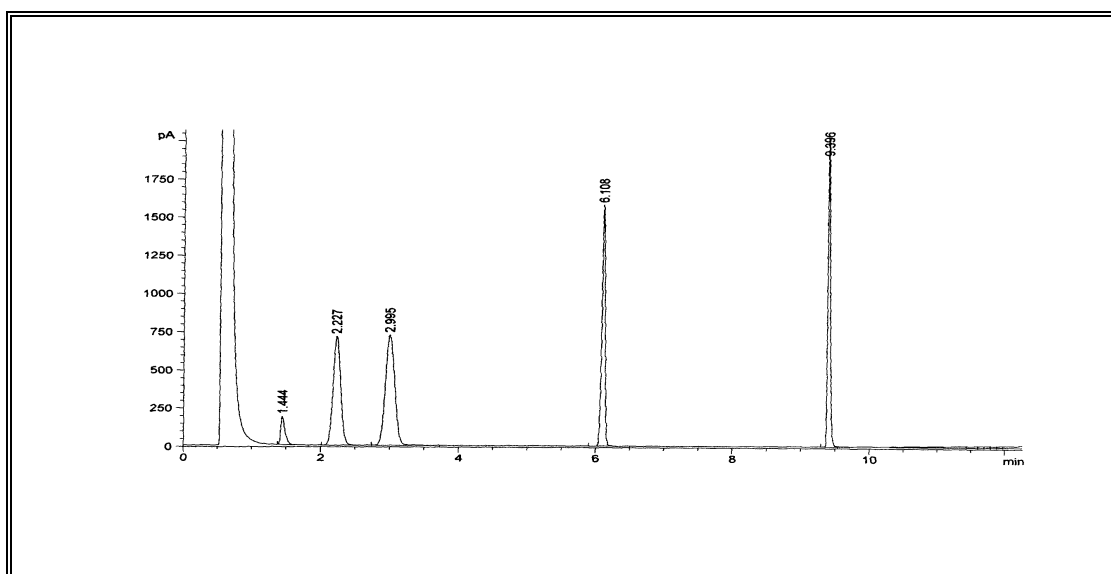


Figura 4.12. Cromatograma del sistema: butirato de vinilo, metanol, butirato de metilo y ácido butírico.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: metanol, 1.444 min.; butirato de metilo, 2.227 min.; butirato de vinilo, 2.995 min.; butirato de butilo (estándar interno), 6.108 min.; ácido butírico, 9.396 min.

En la **Tabla 4.10** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para cada compuesto.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Tabla 4.10. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: butirato de vinilo, metanol, butirato de metilo y ácido butírico.

Compuesto	m = pendiente	r ²
BUTIRATO VINILO <chem>CH3(CH2)2COOCH=CH2</chem>	1.6056	0.9963
METANOL <chem>CH3OH</chem>	14.769	0.9993
BUTIRATO METILO <chem>CH3(CH2)2COO CH3</chem>	1.9115	0.9962
ÁCIDO BUTÍRICO <chem>CH3(CH2)2COOH</chem>	1.9719	0.9989

Sistema de reacción 10: *Butirato de vinilo, 1-hexanol, butirato de hexilo y ácido butírico*

El perfil de temperatura es el siguiente: 40 °C, 0 min; 7 °C/min, 130 °C.

En la **Figura 4.13** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

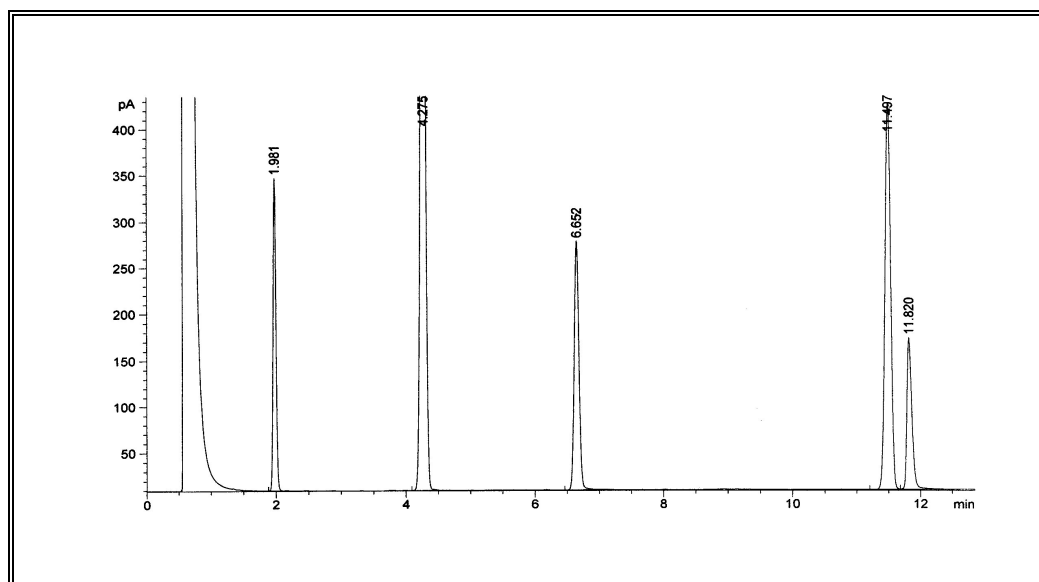


Figura 4.13. Cromatograma del sistema: butirato de vinilo, 1-hexanol, butirato de hexilo y ácido butírico.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: butirato de vinilo, 1.981 min.; butirato de butilo (estándar interno), 4.275 min.; 1-hexanol, 6.652 min.; butirato de hexilo, 11.497 min.; ácido butírico, 11.820 min.

En la **Tabla 4.11** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para cada compuesto.

Tabla 4.11. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: butirato de vinilo, 1-hexanol, butirato de hexilo y ácido butírico.

Compuesto	m = pendiente	r ²
BUTIRATO VINILO CH ₃ (CH ₂) ₂ COOCH=CH ₂	1.7353	0.9986
1-HEXANOL CH ₃ (CH ₂) ₅ OH	1.2488	0.9987
BUTIRATO HEXILO CH ₃ (CH ₂) ₂ COO (CH ₂) ₅ CH ₃	0.6691	0.9953
ÁCIDO BUTÍRICO CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	1.9828	0.9972

Sistema de reacción 11: *Butirato de vinilo, 1-octanol, butirato de octilo y ácido butírico*

El perfil de temperatura es el siguiente: 40 °C, 0 min; 5 °C/min, 130 °C.

En la **Figura 4.14** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

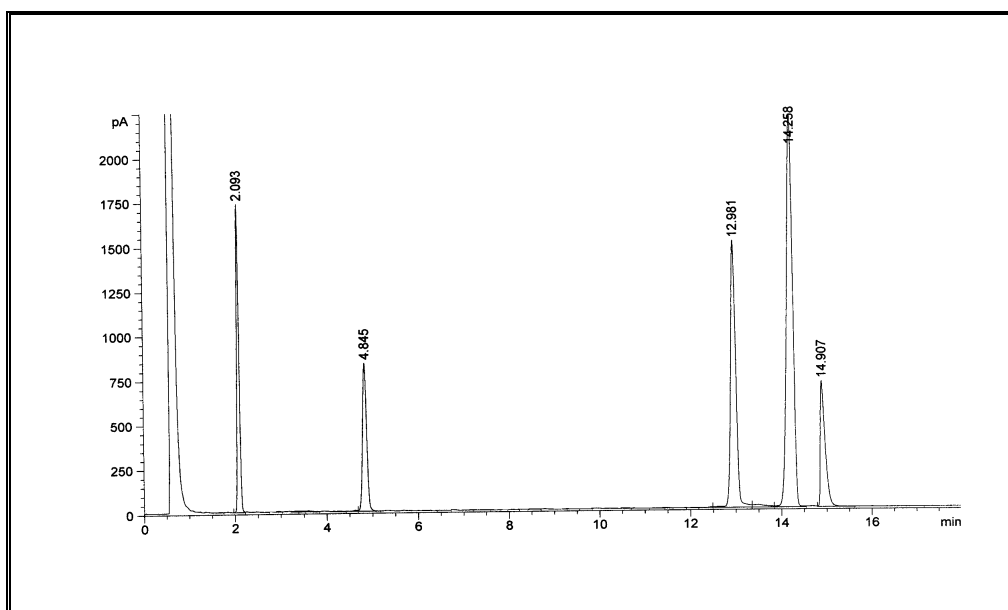


Figura 4.14. Cromatograma del sistema: butirato de vinilo, 1-octanol, butirato de octilo y ácido butírico.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: butirato de vinilo, 2.093 min.; butirato de butilo (estándar interno), 4.845 min.; 1-octanol, 12.981 min.; butirato de octilo, 14.258 min.; ácido butírico, 14.907 min.

En la **Tabla 4.12** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para cada compuesto.

Tabla 4.12. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: butirato de vinilo, 1-octanol, butirato de octilo y ácido butírico.

Compuesto	m = pendiente	r ²
BUTIRATO VNILO CH ₃ (CH ₂) ₂ COOCH=CH ₂	1.7159	0.9982
1-OCTANOL CH ₃ (CH ₂) ₇ OH	0.8731	0.9983
BUTIRATO OCTILO CH ₃ (CH ₂) ₂ COO (CH ₂) ₇ CH ₃	0.4979	0.9966
ÁCIDO BUTÍRICO CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	1.9945	0.9987

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

4.2.4. 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 enzimática 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:

$m_{éster}$ alquílico = factor de respuesta o pendiente inicial de la curva de síntesis de éster alquílico ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (**Figura 4.15**)

C_{CALB} = Concentración de proteína en el preparado enzimático ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

V_{CALB} = Volumen de disolución de enzima utilizada (μL).

$V_{Reacción}$ = 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:

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

donde:

$m_{éster}$ = pendiente inicial del perfil de concentración del éster alquílico ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (**Figura 4.15**).

$m_{ácido}$ = pendiente inicial del perfil de concentración del ácido ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (**Figura 4.15**).

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

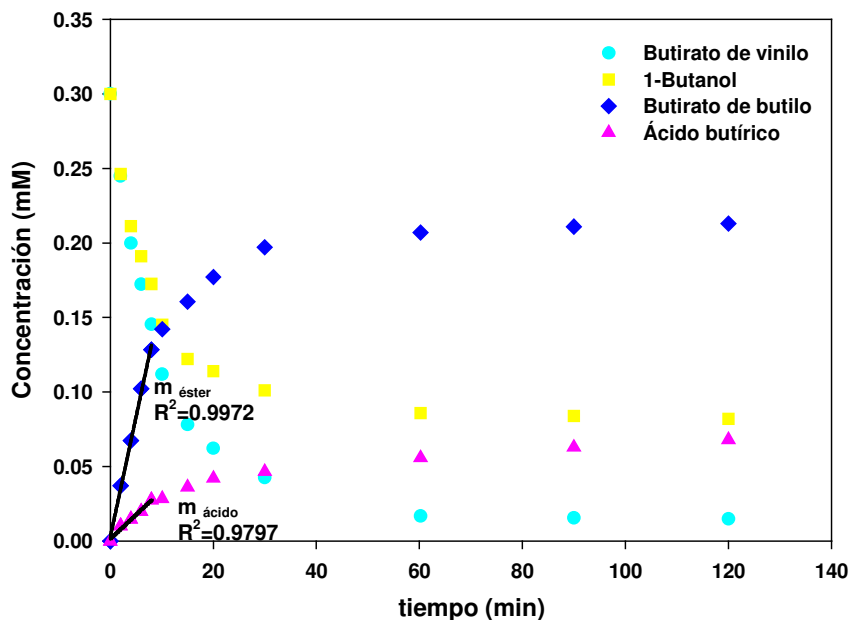


Figura 4.15. Perfiles de reacción para el producto de síntesis y el producto de hidrólisis en la reacción de transesterificación de 1-butanol con butirato de vinilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 60°C y 2%(v/v) de contenido en agua.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Efecto del medio de reacción en la actividad y selectividad de lipasa B de *Candida antarctica*

En los últimos años, los líquidos iónicos han sido reconocidos por diversos autores [2,3,9-15] como disolventes alternativos a los disolventes orgánicos convencionales en algunas reacciones enzimáticas. Nuestro primer objetivo fue, por tanto, estudiar la viabilidad de estos nuevos medios en la síntesis de ésteres mediante reacciones de transesterificación catalizadas por lipasa B de *Candida antarctica*. Con este fin, se llevó a cabo la transesterificación de butirato de vinilo a butirato de butilo en dos líquidos iónicos de naturaleza físico-química diferente, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, y en un disolvente orgánico convencionalmente usado en este tipo de reacciones, n-hexano, realizándose todo ello a 30°C y con un contenido en agua en el medio del 2% (v/v). El resto se recogen en el Anexo I (Figuras 13.1 a 13.3).

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

La **Figura 4.16** muestra los valores obtenidos de actividad sintética (barras) y de selectividad (puntos) en los distintos medios estudiados.

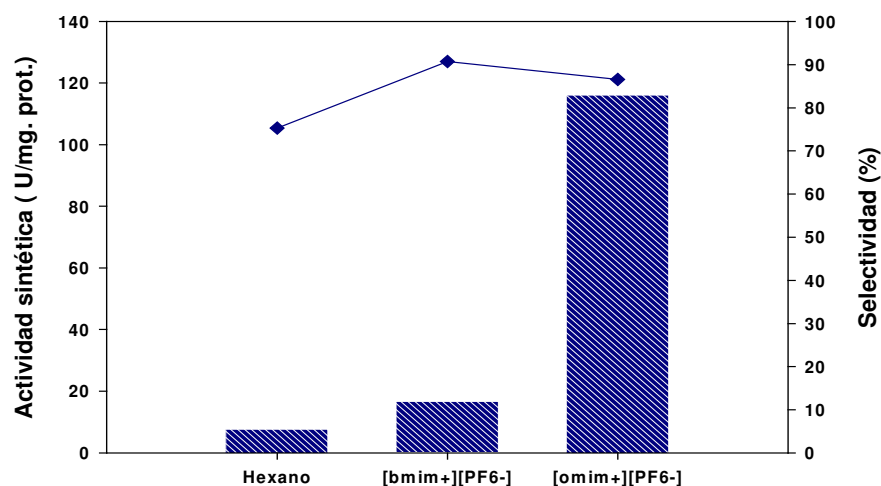


Figura 4.16. Actividad y selectividad de CALB en la síntesis de butirato de butilo en [bmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻] y n-hexano a 30°C y 2%(v/v) de contenido en agua.

Como se puede observar en la figura, tanto la actividad sintética como la selectividad de la reacción se vieron ampliamente mejoradas cuando se utilizaron líquidos iónicos como medios de reacción en lugar de n-hexano, con lo que se demuestra que estos líquidos iónicos son alternativas adecuadas al disolvente orgánico convencional para llevar a cabo la reacción en estudio.

4.3.2. Influencia del pH en la actividad y selectividad de CALB en líquidos iónicos

Una vez conocida la viabilidad de los líquidos iónicos estudiados como medios de reacción para la síntesis de butirato de butilo catalizada por la enzima CALB, se procedió al estudio del efecto del pH de la disolución acuosa de enzima en la actividad y selectividad enzimática. Para ello, varias fracciones del preparado enzimático comercial se diluyeron 4 veces con tampones fosfato de diferentes pHs, en el rango de 6.2 a 8.2. Se determinó entonces la actividad y selectividad de las disoluciones enzimáticas resultantes en la síntesis de butirato de butilo en [bmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y con un porcentaje en agua del 2%(v/v) (Perfiles de reacción en Anexo I: Figuras 13.2, 13.4 a 13.7). En la **Figura 4.17** se representan los valores de actividad y selectividad de CALB a los diferentes pHs estudiados.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

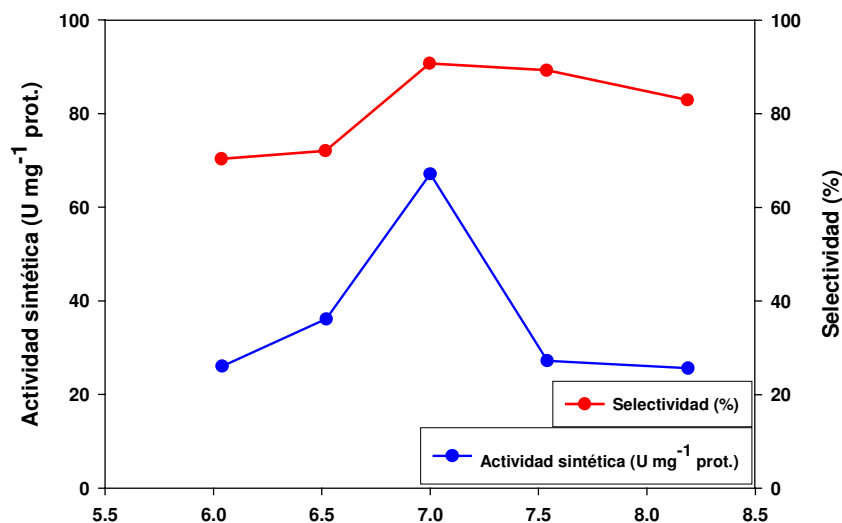


Figura 4.17. Actividad y selectividad de CALB en la síntesis de butirato de butilo en [bmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y 2%(v/v) de contenido en agua a diferentes pHs.

Tal y como se aprecia en la figura, hay una fuerte influencia del pH en los valores de actividad y selectividad mostrada por CALB. Así, tras un elevado aumento de la actividad y selectividad al aumentar el pH se produce un descenso en los valores de estos parámetros, alcanzándose un máximo en los mismos a pH=7. Un comportamiento similar fue observado por Noël *et al.* [15] en la resolución cinética de rac-2-pentanol catalizada por CALB en el líquido iónico 1-butil-3-metilimidazolio bis[(trifluorometil)sulfonil]imida al 2% (v/v) en agua, obteniendo también un máximo de actividad y selectividad a este pH. En vista de los resultados obtenidos los siguientes estudios se llevarán a cabo a este pH.

4.3.3. Influencia de la temperatura sobre la actividad y selectividad de CALB en líquidos iónicos.

Las lipasas son proteínas y por tanto su conformación, así como la velocidad de los procesos que catalizan, están afectados por la temperatura [16]. Con el fin de analizar la influencia de esta variable sobre la actividad y selectividad de CALB en [bmim⁺][PF₆⁻] para la reacción modelo propuesta, se realizaron ensayos a las temperaturas de 30, 40, 50, 60 y 70°C (Perfiles de reacción en Anexo I: Figuras 13.2, 13.8 a 13.12). La influencia de la temperatura sobre dichas variables se expresa de forma gráfica en la **Figura 4.18.**

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

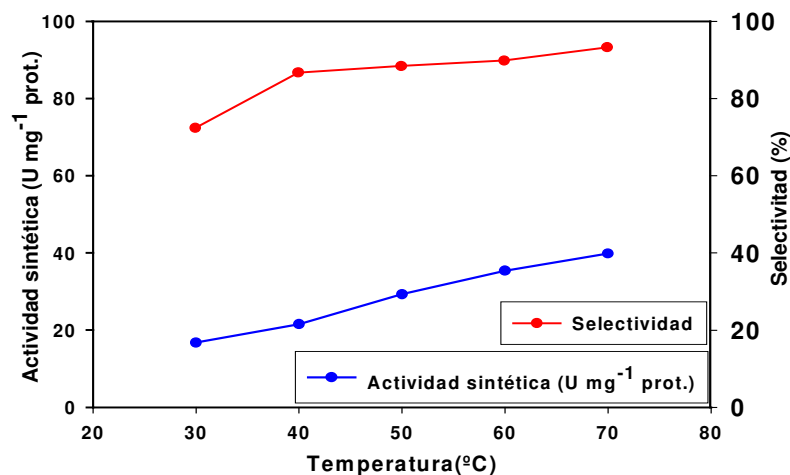


Figura 4.18. Efecto de la temperatura sobre la actividad sintética y la selectividad de CALB en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ para la síntesis de butirato de butilo a 30°C, con un 2% (v/v) de contenido en agua.

En la **Figura 4.18** puede observarse un aumento de la actividad sintética con la temperatura en todo el intervalo estudiado. Aunque un aumento de la temperatura lleva consigo un incremento en la constante de Arrhenius, por tanto de la velocidad, también puede suponer una disminución de la misma en el caso de las reacciones enzimáticas por procesos de desactivación térmica de la enzima. El incremento de velocidad en el intervalo de temperaturas estudiado, demuestra que la enzima no sufre problemas de desactivación térmica importantes. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Balçao *et al.* [16], quienes observaron que tras la inmovilización de CALB se producía un desplazamiento de la temperatura óptima de reacción hacia valores mayores. Así, puede decirse que el líquido iónico, al igual que el proceso de inmovilización enzimática, estabiliza la enzima frente a procesos de desactivación térmica al establecer interacciones multipuntuales por puente de hidrógeno que ayudan a la enzima a mantener su estructura. Otros autores como Noël *et al.* [15] han destacado el efecto protector de líquidos iónicos frente a procesos de desactivación térmica.

De la **Figura 4.18** se desprende también que la selectividad enzimática también aumentó al aumentar la temperatura en el intervalo estudiado. Este hecho puede atribuirse a una disminución en la cantidad de moléculas de agua en el medio por procesos de evaporación. De este modo habría menos probabilidad de que estas moléculas actuaran como dadores nucleófilos rindiendo el producto de hidrólisis.

Aunque tal y como se ha expuesto, tanto la actividad como la selectividad aumentaron en el intervalo estudiado, los restantes ensayos se realizarán a una temperatura de 30 °C,

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

ya que en ellos se pretende comparar la influencia de diferentes sustratos, algunos de ellos con puntos de ebullición relativamente bajos, sobre la actividad y selectividad enzimática y por tanto, una temperatura demasiado alta podría conllevar un riesgo de evaporación de los mismos.

4.3.4. Efecto del dador de acilo en reacciones de transesterificación catalizadas por CALB en líquidos iónicos

En la actualidad se conocen numerosas metodologías para mejorar la actividad y selectividad enzimática en reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas. Entre ellas cabe destacar el cambio de disolvente [17], la variación de la temperatura [18], el uso de aditivos [19], la inmovilización de la enzima en soportes [20], la mutagénesis dirigida [21] y la modificación del dador de acilo [22]. En este apartado se ha centrado la atención en este último aspecto. Así, se ha estudiado la influencia de diferentes ésteres vinílicos como sustratos en la reacción de transesterificación con 1-butanol sobre la actividad y selectividad de lipasa B de *Candida antarctica* en dos líquidos iónicos de naturaleza fisico-química diferente, [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻], a 30°C y 2%(v/v) de contenido en agua.

Para este estudio se han seleccionado ésteres vinílicos (RCOOCHCH₂) alifáticos de diferente longitud de cadena: acetato de vinilo (R= CH₃-), propionato de vinilo (R= CH₃CH₂-), butirato de vinilo (R= CH₃(CH₂)₂-), decanoato de vinilo (R= CH₃(CH₂)₈-) y laurato de vinilo (R= CH₃(CH₂)₁₀-). También se han seleccionado ésteres vinílicos α,β -insaturados tales como acrilato de vinilo (R= CH₂CH-) y metacrilato de vinilo (R= CH₂C(CH₃)-) y aromáticos, como el benzoato de vinilo (R= Ph-) (Perfiles de reacción en Anexo I: Figuras 13.2, 13.3, 13.13 a 13.22).

En la **Tabla 4.13** se recogen los valores de actividad y selectividad obtenidos para cada sistema de reacción.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Tabla 4.13. Actividad sintética y selectividad de CALB para los distintos sistemas de reacción en [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻] a 30°C y 2%(v/v) de contenido en agua.

Sistema de Reacción		[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]		[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	
Alcohol	Éster vinílico	Actividad sintética (U · mg. prot. ⁻¹)	Selectividad (%)	Actividad sintética (U · mg. prot. ⁻¹)	Selectividad (%)
1-Butanol	Acetato de vinilo	6.6	98.3	11.4	96.2
1-Butanol	Propionato de vinilo	12.7	92.2	40.1	86.0
1-Butanol	Butirato de vinilo	16.7	90.7	116.1	86.6
1-Butanol	Decanoato de vinilo	2.5	97.4	28.3	88.5
1-Butanol	Laurato de vinilo	3.7	97.4	30.2	94.6
1-Butanol	Benzoato de vinilo	0	-	0	-
1-Butanol	Acrilato de vinilo	2.1	> 99.9	10.6	99.0
1-Butanol	Metacrilato de vinilo	0	-	0	-

Como puede observarse en la **Tabla 4.13**, la actividad y la selectividad de CALB están fuertemente influenciadas por la naturaleza del dador de acilo y del líquido iónico. Así, los ésteres vinílicos α,β -insaturados y aromáticos mostraron escasa o nula actividad, mientras que los alifáticos resultaron más activos. Por otra parte, los valores de actividad resultaron ser generalmente mayores en [omim⁺][PF₆⁻], mientras que la selectividad fue menor en este líquido iónico. Estas observaciones pueden explicarse teniendo en cuenta que el líquido iónico [omim⁺][PF₆⁻] es más hidrofóbico que el [bmim⁺][PF₆⁻]. La mayor hidrofobicidad del [omim⁺][PF₆⁻] implica por una parte una mejor preservación de la capa de agua esencial para que la enzima mantenga su actividad catalítica, reduciendo la interacción directa del líquido iónico con la enzima y provocando un aumento en el número de moléculas libres de agua que podrían actuar como dadores nucleófilos en las reacciones de transesterificación, lo que originaría una pérdida de selectividad.

Además, en la **Figura 4.19** puede observarse también como al aumentar la longitud de cadena del éster vinílico la actividad sintética de CALB muestra un máximo para el

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

producto de 8 átomos de carbono en ambos líquidos iónicos, siendo este máximo más acusado en $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$. Este comportamiento ha sido también descrito para otras reacciones de síntesis de ésteres catalizadas por lipasas de *R. miehei* [23] en disolventes orgánicos, lo cual se explicó en base a una afinidad intrínseca de la enzima hacia este tipo de sustratos.

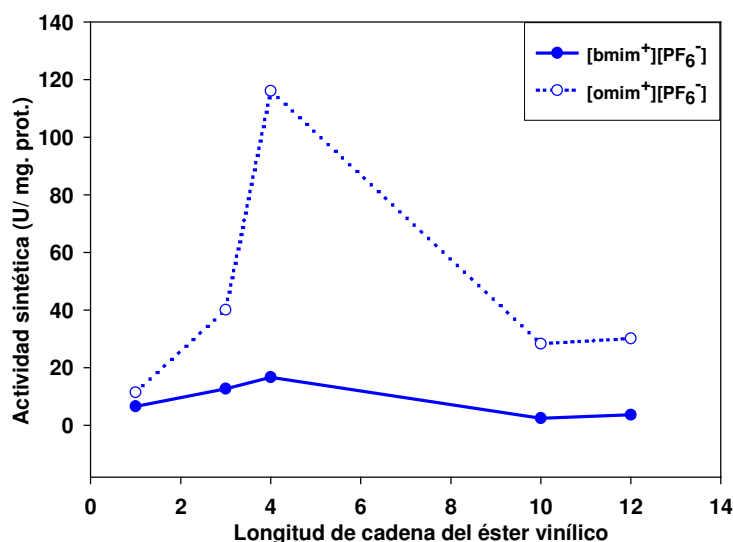


Figura 4.19. Efecto de la longitud de cadena del éster vinílico en la actividad sintética de CALB en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y 2%(v/v) de contenido en agua.

4.3.5. Efecto del alcohol en reacciones de transesterificación catalizadas por CALB en líquidos iónicos

Finalmente, se han llevado a cabo diferentes reacciones de transesterificación variando el alcohol y utilizando como dador de acilo el éster vinílico con el que se obtuvieron mayores valores de actividad (butirato de vinilo). Los alcoholes seleccionados para este estudio han sido alcoholes primarios de diferente longitud de cadena: metanol (CH_3OH), 1-butanol ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$), 1-hexanol ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{OH}$) y 1-octanol ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7\text{OH}$) (Perfiles de reacción en Anexo I: Figuras 13.2, 13.3, 13.23 a 13.28).

En la **Tabla 4.14** se recogen los valores de actividad y selectividad obtenidos para cada sistema de reacción.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

Tabla 4.14. Actividad sintética y selectividad de CALB para los distintos sistemas de reacción en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y 2%(v/v) de contenido en agua.

Sistema de Reacción		$[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$		$[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$	
Éster vinílico	Alcohol	Actividad sintética (U/ mg. prot.)	Selectividad (%)	Actividad sintética (U/ mg. prot.)	Selectividad (%)
Butirato de vinilo	1-Metanol	14.8	67.9	16.6	68.2
Butirato de vinilo	1-Butanol	16.7	90.7	116.1	86.6
Butirato de vinilo	1-Hexanol	5.1	99.9	29.1	94.5
Butirato de vinilo	1-Octanol	5.6	97.3	29.9	89.3

De nuevo los valores de actividad resultaron ser generalmente mayores en $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, mientras que la selectividad fue menor en este líquido iónico, lo cual, tal y como se explicó en el apartado anterior, podría explicarse por la mayor hidrofobicidad de este líquido iónico.

En la **Figura 4.20** se puede observar cómo, al aumentar la longitud de cadena del alcohol la actividad sintética de CALB muestra nuevamente un máximo para el producto de 8 átomos de carbono en ambos líquidos iónicos, siendo este más acusado en $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$.

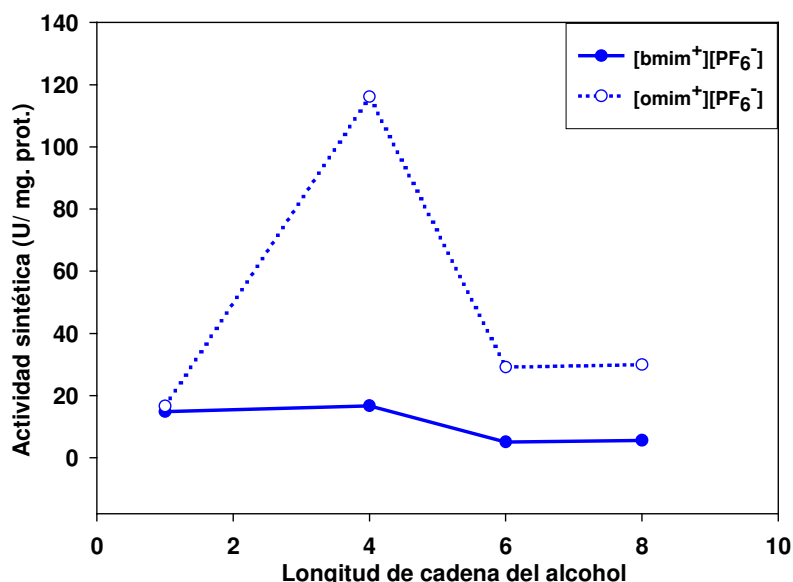


Figura 4.20. Efecto de la longitud de cadena del alcohol en la actividad sintética de CALB en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y 2%(v/v) de contenido en agua.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

4.4. CONCLUSIONES

Los líquidos iónicos estudiados, [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻], han resultado medios de reacción adecuados para llevar a cabo la síntesis de ésteres catalizada por CALB proporcionando una alternativa a disolventes orgánicos convencionales tales como el n-hexano. Por tanto, ofrecen unas perspectivas muy esperanzadoras para su aplicación al diseño de procesos más respetuosos con el medioambiente y con menores consumos de disolventes orgánicos.

Se ha estudiado la influencia del pH y de la temperatura sobre la actividad y la selectividad enzimática, estableciéndose un valor óptimo de pH de 7 y poniéndose de manifiesto una tendencia creciente de la actividad y selectividad en el intervalo estudiado (30-70°C), demostrándose mediante este hecho el efecto protector del líquido iónico frente a la desactivación térmica de la enzima.

El análisis de la influencia de la naturaleza del dador de acilo y del alcohol permite concluir que, entre los sustratos estudiados, el butirato de vinilo y el 1-butanol son los que conducen a mayores valores de actividad enzimática.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. Halling, Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, test and recommendations for experimental design and analysis, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 178-206.
- [2] A.M. Klivanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature* 409 (2001) 241-246.
- [3] S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, Expanding the polarity range of ionic liquids, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.
- [4] F. van Rantwijk, R. Madeira Lau, R.A. Sheldon, Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 131-138.
- [5] F. J. Hernández, A. P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Vllora, A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B: Environmental* 67 (2006) 121-126.
- [6] A.V. Paiva, D.V. Rossum, F.X. Malcata, Kinetics of lipase-mediated synthesis of butyl butyrate in n-hexane, *Biocatal. Biotransform.* 20 (2002) 43-51.
- [7] S. Srivastava, G. Madras, J. Modak, Esterification of myristic acid in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 27 (2003) 55-64.
- [8] 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.
- [9] J. Dupont, R.F. de Souza, P.A.Z. Suarez, Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems, *Chem. Rev.* 102 (2002) 3667- 3692.
- [10] J.D. Holbrey, K.R. Seddon, Ionic liquids, *Clean Products and Processes I*, 1 (1999) 223-236.
- [11] M. Persson, U. T. Bornscheuer, Increased stability of an esterase from *Bacillus subtilis* in ionic liquids as compared to organic solvents, *J. Mol. Catal B: Enzymatic*, 22 (2003) 21-27.
- [12] M. J. Kim, M. Y. Choi, J. K. Lee, Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 26 (2003) 115-118.

4. Influencia de las condiciones de operación en reacciones de transesterificación

- [13] P. Wasserscheid, W. Keim, Ionic Liquids - "New solutions" for transition metal catalysis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39 (2000) 3772-3789.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] V.M. Balçao, A.L. Paiva, F.X. Malcata, Bioreactors with immobilized lipases: State of the art, *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 392-416.
- [17] C.R. Wescott, A.M. Klivanov, The solvent dependence of enzyme specificity, *Biochim. Biophys. Acta* 1206 (1994) 1-9.
- [18] T. Sakai, T. Kishimoto, Y. Tanaka, T. Ema, M. Utaka, Low-temperature method for enhancement of enantioselectivity in the lipase-catalyzed kinetic resolutions of solketal and some chiral alcohols, *Tetrahedron Lett.* 39 (1998) 7881- 7884.
- [19] W.Z. Guo, C. J. J. Sih, Enantioselective inhibition: Strategy for improving the enantioselectivity of biocatalytic systems, *Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 6836- 6841.
- [20] B. Berger, K. J. Faber, "Immunization" of lipase against acetal-dehyde emerging in acyl transfer reactions from vinyl acetate, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1991) 1198-1200.
- [21] Y. Hirose, K. Kariya, Y. Nakanishi, Y. Kurona and K. Achiwa, Inversion of enantioselectivity in hydrolysis of 1,4-dihydroxypyridines by point mutation of lipase PS, *Tetrahedron Lett.* 36 (1995) 1063-1066.
- [22] P. Berglund, M. Holmquist, K. Hult, H. E. Hogberg, Alcohols as enantioselective inhibitors in a lipase-catalyzed esterification of a chiral acyl donor, *Biotechnol Lett.* 17 (1995) 55-60.
- [23] J. Arsan, K. L. Parkin, Selectivity of *Rhizomucor miehei* lipase as affected by choice of co-substrate system in ester modification reactions in organic media, *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000) 222-226.

5

Efecto del medio líquido iónico sobre la actividad, selectividad y estabilidad de la lipasa B de *Candida antarctica* en reacciones de transesterificación

5. EFECTO DEL MEDIO LÍQUIDO IÓNICO SOBRE LA ACTIVIDAD, SELECTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LA LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* EN REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN

5.1. INTRODUCCIÓN

Los líquidos iónicos son sales orgánicas que se presentan en estado líquido a temperatura ambiente o próxima a ella. Normalmente están constituidos por un catión orgánico, siendo los más comunes los dialquilimidazolio y los tetraalquilamonio, y un anión inorgánico poliatómico, como el hexafluorofosfato y el tetrafluoroborato [1]. Además de las ventajas medioambientales derivadas de su utilización, que se atribuyen a su prácticamente nula presión de vapor y a su elevada estabilidad química y térmica [2]. Son disolventes muy versátiles que pueden ser aplicados en un amplio número de campos debido a la posibilidad de modular sus propiedades fisico-químicas (hidrofobicidad, densidad, viscosidad, punto de fusión, polaridad, capacidad solvente) mediante la variación de los iones constituyentes de los mismos [3,4]. Por este motivo, se les viene denominando “disolventes de diseño” [5].

En este capítulo se ha estudiado la actividad, selectividad y estabilidad de la lipasa B de *Candida antarctica* en una amplia variedad de líquidos iónicos, con el fin de determinar qué combinaciones de cationes y aniones resultan más adecuados para llevar a cabo reacciones de transesterificación catalizadas por esta enzima. Las condiciones de operación utilizadas han sido las determinadas en el capítulo anterior (pH=7 y 30°C).

Los líquidos iónicos empleados son combinaciones de cationes dialquilimidazolio con una amplia variedad de aniones como hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis(trifluorometilsulfonil)imida, dicianamida, nitrato, acetato, octilsulfato y etilenglicolmonometilétersulfato (**Figura 5.1**).

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

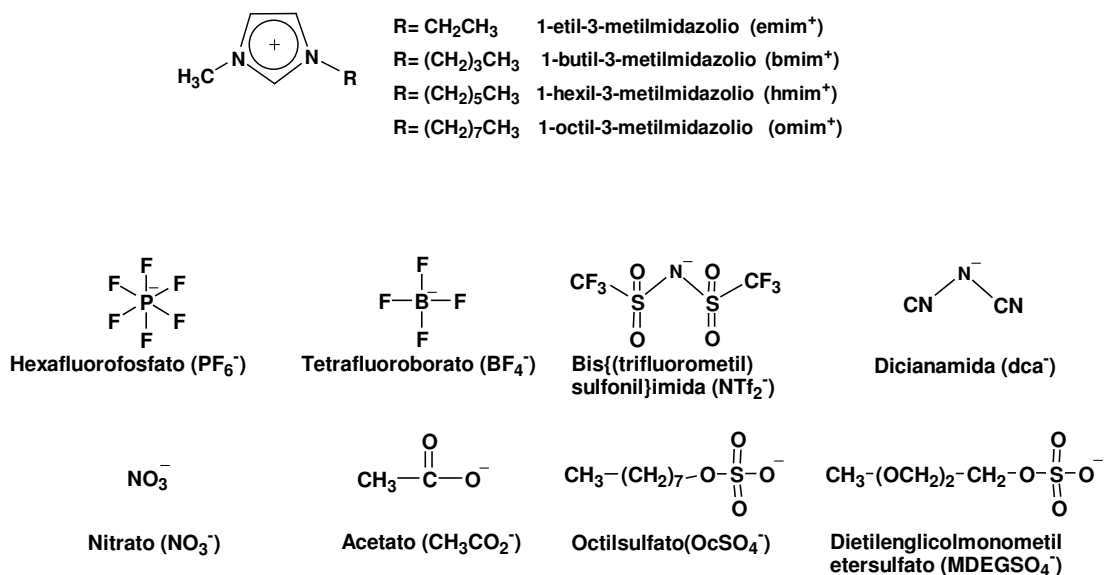


Figura 5.1. Iones constituyentes de los líquidos iónicos estudiados.

Se ha utilizado la síntesis de butirato de butilo mediante transesterificación de butirato de vinilo con 1-butanol (Figura 5.2) como reacción modelo para este estudio.

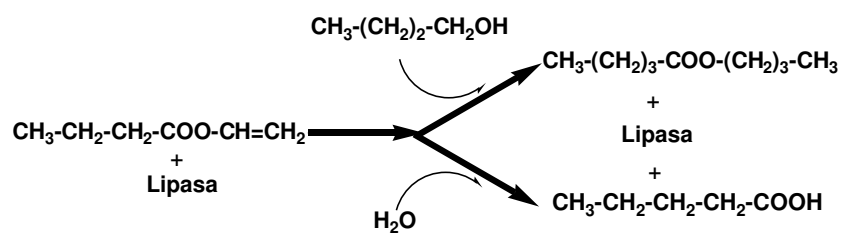


Figura 5.2. Reacción modelo utilizada para el estudio.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. 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[®] 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 [6].

Los líquidos iónicos [emim⁺][Cl⁻], [omim⁺][Cl⁻], [bmim⁺][PF₆⁻], [bdmim⁺][PF₆⁻], [hmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻], [emim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][BF₄⁻], [bdmim⁺][BF₄⁻], [hmim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][OcSO₄⁻] y [bmim⁺][MDEGSO₄⁻] fueron suministrados con una pureza > 99% por Solvent Innovation (Colonia, Alemania). [emim⁺][NTf₂⁻] (pureza >99%) y [bmim⁺][NTf₂⁻] (purity >99%) fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chemical Co. (Madrid, España) y Strem Chemicals Inc. (Bischheim, Francia), respectivamente y [hmim⁺][NTf₂⁻] (pureza >99%) y [omim⁺][NTf₂⁻] (pureza >99%) por Merck KgaA (Darmstadt, Alemania).

N-metilimidazolio, 1-butanol, 1-clorobutano, y la resina de intercambio aniónico Dowex 1X8-200 fue suministrada por Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España).

El resto de reactivos químicos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A. (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).

5.2.2. Síntesis de líquidos iónicos

1-Butil-3-metilimidazolio cloruro, [bmim⁺][Cl⁻]: se hizo reaccionar 1-metilimidazol (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%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, 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). ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ 13.47, 19.38, 32.15, 36.68, 49.72, 122.43, 123.91, 136.93.

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación



Figura 5.3. Dispositivo experimental utilizado en la síntesis de $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$

1-Etil-3-metilimidazolio dicianamida, $[\text{emim}^+][\text{dca}^-]$: $[\text{emim}^+][\text{Cl}^-]$ (43.9 g, 0.3 mol) se disolvió en acetona (50 mL) y se añadió dicianamida de sodio (28.6 g, 0.32 mol). La mezcla se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente, después de mantuvo a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 día y se filtró. El filtrado fue evaporado en el rotavapor, rindiendo el líquido iónico (49.4 g, 93%), el cual fue purificado mediante cromatografía en columna sobre alúmina activa. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 1.3 (t, 3H), 3.71 (s, 3H), 4.01 (m, 2H), 7.23 (m, 2H), 8.76 (s, 1H).

1-Butil-3-metilimidazolio dicianamida, $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$: $[\text{bmim}^+][\text{Cl}^-]$ (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 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 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%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , 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). (Espectro de ^1H RMN en Anexo II- Figura 13.48). 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.

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

1-Octil-3-metilimidazolio dicianamida, [omim⁺][dca⁻]: [omim⁺][Cl⁻] (60.7 g, 0.3 mol) se disolvió en acetona (50 mL) y se añadió dicianamida de sodio (28.6 g, 0.32 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 (60.81 g, 87%). Después, el producto fue purificado mediante cromatografía en columna sobre alúmina activa. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, TMS): δ 0.77 (t, 3H), 1.21 (m, 10H), 1.81 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 4.14 (t, 2H), 7.38 (m, 2H), 9.26 (s, 1H). Este producto contenía 1650 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 750 ppm.

1-Butil-3-metilimidazolio nitrato, [bmim⁺][NO₃⁻]: 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 nitrato sódico (0.5 L) y después con agua Milli-Q. Posteriormente se disolvió [bmim⁺][Cl⁻] (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⁺][NO₃⁻] 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. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, 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).

1-Butil-3-metilimidazolio acetato, [bmim⁺][CH₃CO₂⁻] se preparó por intercambio iónico del mismo modo que el [bmim⁺][NO₃⁻] 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. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, 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). (Espectro de ¹H RMN en Anexo II- Figura 13.51)

5.2.3. Ensayos de actividad enzimática

En un vial de rosca de 1.5 ml se adicionan 19.2 μL (150 μmol) de butirato de vinilo y 13.8 μL (150 μmol) de 1-butanol, y se completa el volumen de reacción hasta 500 μL con un líquido iónico (457 μL). El vial de reacción se sumerge entonces en un baño de termostático a 30°C.

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

La reacción comienza adicionando 10 μL de lipasa B *Candida antarctica* (8.5 mg mL^{-1} en tampón fosfato 20 mM a pH 7). La mezcla de reacción permanece agitada durante las 2 horas de ensayo y periódicamente se toman muestras de 15 μL del medio de reacción, que se adicionan sobre 485 μL de n-hexano. La mezcla bifásica resultante se agita vigorosamente en un vórtex durante 2 minutos 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 (líquido iónico y hexano). Posteriormente a 400 μL de este extracto se le adiciona una disolución en n-hexano del estándar interno utilizado para el análisis (100 μL , 30 mM), y 5 μL de la disolución resultante se analizan por cromatografía de gases, tal y como se describe en el apartado 5.2.5.3.

La eficacia de la acción catalítica se midió a través de dos parámetros, la actividad sintética y la selectividad (apartado 2.4.2). Se define una unidad de *actividad sintética* como la cantidad de enzima que es capaz de realizar la síntesis de 1 μmol de butirato de butilo por minuto. La *selectividad* de la reacción se puede definir como el porcentaje de sustrato consumido que se transforma en el producto de síntesis. La selectividad tiene así en cuenta la reacción de hidrólisis del dador de acilo, que es competitiva en paralelo con la de síntesis (Figura 5.2).

5.2.4. Ensayos de estabilidad enzimática

Los ensayos de estabilidad se han llevado a cabo incubando mezclas de 457 μl de líquido iónico y 10 μl de CALB (8.5 mg/mL de proteína en tampón fosfato 20 mM a pH 7) a 30 °C en distintos viales de rosca de 1.5 mL de capacidad. A diferentes tiempos de incubación se añaden los reactivos, 19.2 μL (150 μmol) de butirato de vinilo y 13.8 μL (150 μmol) de 1-butanol, y se determina la actividad y selectividad enzimática como se describió en el apartado anterior.

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 específica a un tiempo dado (*Actividad_t*) y la actividad específica a $t = 0$ (*Actividad₀*) (Ecuación 5.1)

$$A_R(\%) = \frac{\text{Actividad}_t}{\text{Actividad}_{t_0}} \times 100 \quad (5.1)$$

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

5.2.5. Métodos analíticos

5.2.5.1. Análisis de resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C de los líquidos iónicos sintetizados se realizaron en los espectrómetros VARIAN modelo Unity 300 y VARIAN modelo Inova 400, utilizando cloroformo- 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. 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 Cl^- .

5.2.5.3. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras se lleva 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 NukolTM (15m \times 0.53mm \times 0.5 μm) de Supelco, utilizando acetato de butilo como estándar interno.

La temperatura en el inyector se fijó en 190 $^\circ\text{C}$, se trabajó con presión constante de 1.89 psi (51 mL /min flujo lineal) en la cabeza de la columna y la relación de split de 7:9. En el detector, la temperatura fue de 220 $^\circ\text{C}$ y los caudal de gases en el mismo de 400 ml/min de aire sintético, 30 ml/min de hidrógeno y 20 ml/min de nitrógeno. El perfil de temperatura es el siguiente: 40 $^\circ\text{C}$, 1 min; 15 $^\circ\text{C}/\text{min}$, 95 $^\circ\text{C}$; 35 $^\circ\text{C}/\text{min}$, 160 $^\circ\text{C}$; 2 min, 160 $^\circ\text{C}$.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: butirato de vinilo, 2.596 min.; acetato de butilo (estándar interno), 2.981min.; 1-butanol, 3.712 min.; butirato de butilo, 4.430 min.; ácido butírico, 7.339 min.

Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos, las cuales se mostraron en la **Tabla 4.4**.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Efecto del medio líquido iónico en la actividad y selectividad de CALB

Las reacciones catalizadas por lipasas están fuertemente influenciadas por el medio de reacción utilizado. Para estudiar la influencia de los cationes y aniones constituyentes de los líquidos iónicos en la actividad y selectividad de la lipasa B de *Candida antarctica*, se han utilizado diecinueve líquidos iónicos, miscibles e inmiscibles con agua, como medios de reacción para llevar a cabo la síntesis de butirato de butilo mediante transesterificación de butirato de vinilo con 1-butanol (**Figura 5.2**) con un 2%(v/v) de contenido en agua y 30°C.

Los líquidos iónicos inmiscibles con agua seleccionados para este estudio han sido:

- (i) 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, [bmim⁺][PF₆⁻],
- (ii) 1-butil-2,3-dimetilimidazolio hexafluorofosfato, [bdmim⁺][PF₆⁻],
- (iii) 1-hexil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, [hmim⁺][PF₆⁻],
- (iv) 1-metil-3-octilimidazolio hexafluorofosfato, [omim⁺][PF₆⁻],
- (v) 1-etil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida, [emim⁺][NTf₂⁻],
- (vi) 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida, [bmim⁺][NTf₂⁻],
- (vii) 1-hexil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida, [hmim⁺][NTf₂⁻] y
- (viii) 1-metil-3-octilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida, [omim⁺][NTf₂⁻]

y los líquidos iónicos miscibles con agua:

- (i) 1-etil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato, [emim⁺][BF₄⁻],
- (ii) 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato, [bmim⁺][BF₄⁻],
- (iii) 1-butil-2,3-metilimidazolio tetrafluoroborato, [bdmim⁺][BF₄⁻],
- (iv) 1-hexil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato, [hmim⁺][BF₄⁻],
- (v) 1-etil-3-metilimidazolium dicianamida, [emim⁺][dca⁻],
- (vi) 1-butil-3-metilimidazolio dicianamida, [bmim⁺][dca⁻],
- (vii) 1-metil-3-octilimidazolio dicianamida, [omim⁺][dca⁻],
- (viii) 1-butil-3-metilimidazolio nitrato, [bmim⁺][NO₃⁻],
- (ix) 1-butil-3-metilimidazolio acetato, [bmim⁺][CH₃COO⁻],
- (x) 1-butil-3-metilimidazolio octilsulfato, [bmim⁺][OcSO₄⁻] y
- (xi) 1-butil-3-metilimidazolio etilenglicolmonometiletersulfato, [bmim⁺][MDEGSO₄⁻].

La reacción se llevó también a cabo en n-hexano, un disolvente orgánico clásico en síntesis de ésteres catalizadas por lipasas en medios no acuosos [7], en las mismas

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

condiciones de reacción con el fin de comparar la eficacia de los líquidos iónicos como medios de reacción. En el Anexo I (Figuras 13.1 a 13.3, y 13.29 a 13.44) se recogen los perfiles de reacción en los líquidos iónicos y en n-hexano.

Los valores de actividad y selectividad exhibidos por la enzima CALB para la reacción de transesterificación modelo en n-hexano y en los *líquidos iónicos inmiscibles con agua* se encuentran recogidos en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Actividad y selectividad de CALB en líquidos iónicos inmiscibles con agua en la síntesis de butirato de butilo con 2%(v/v) de contenido en agua y 30 °C.

Medio	Actividad Sintética (U/mg.prot.)	Selectividad (%)
n-Hexano	7.61	75.3
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	16.75	90.7
[bdmim ⁺][PF ₆ ⁻]	28.06	93.9
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	60.44	85.8
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	116.10	86.6
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	11.89	85.9
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	34.739	79.2
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	51.40	82.7
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	73.53	83.0

Como primera observación cabe destacar que todos los líquidos iónicos inmiscibles con agua ensayados son medios adecuados para llevar a cabo la reacción modelo estudiada, ya que la actividad sintética y la selectividad de la enzima CALB en todos ellos fue siempre mayor que en n-hexano.

A fin de analizar el comportamiento de la enzima CALB en estos líquidos iónicos se consideraron dos propiedades de estos nuevos disolventes, la hidrofobicidad del catión y la nucleofilicidad del anión.

Respecto a la *hidrofobicidad*, en general, es importante considerar que para los líquidos iónicos que contienen el mismo anión, esta propiedad aumenta conforme lo hace la longitud de la cadena del sustituyente alquílico del catión imidazolio [8]. A la vista de lo anteriormente expuesto y tal como se observa en la **Tabla 5.1**, la actividad sintética

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

que mostró la enzima en los líquidos iónicos inmiscibles con agua aumentó conforme lo hizo la hidrofobicidad de éstos. Este hecho puede ser explicado teniendo en cuenta que un incremento en la hidrofobicidad del medio permite la preservación de la capa de moléculas de agua alrededor de la enzima necesaria para que ésta mantenga su conformación activa.

Con respecto a la *nucleofilicidad*, se ha observado (**Tabla 5.1**) que la actividad de la enzima CALB es menor en los líquidos iónicos que contienen el anión $[\text{NTf}_2^-]$, de mayor nucleofilicidad que el anión $[\text{PF}_6^-]$ [9], lo cual era de esperar debido a la elevada tendencia de los aniones más nucleofílicos a alterar la conformación activa de la enzima por interacción con los centros de la estructura enzimática cargados positivamente [10,11]. Contrariamente a esta tendencia, las velocidades de reacción obtenidas cuando se utilizó como medio de reacción $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ fueron mayores que cuando el medio fue $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$. Este hecho puede ser explicado, teniendo en cuenta la alta viscosidad del líquido iónico $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ (207cP) [12] comparada con la viscosidad de $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ (52 cP) [13] que podría originar mayores limitaciones difusionales y por tanto menor velocidad de reacción. Respecto a esta cuestión, varios autores [7,14] han observado el mismo comportamiento, obteniendo una mayor actividad cuando la enzima catalizaba la reacción en $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ que en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$.

Los datos de selectividad obtenidos para los diferentes líquidos iónicos inmiscibles en agua se encuentran también incluidos en la **Tabla 5.1**. Las diferencias en los valores de selectividad entre los diferentes líquidos iónicos inmiscibles con agua para la reacción de transesterificación modelo pueden atribuirse a la capacidad de cada uno de ellos de reducir la actividad del agua (a_w) en el microambiente de la enzima. En este sentido, un incremento en la hidrofobicidad de los líquidos iónicos inmiscibles con agua, supone un incremento en las moléculas de agua libres en el medio, las cuales pueden actuar como nucleófilos en la reacción de transesterificación, generando el producto de hidrólisis y disminuyendo de este modo la selectividad de la reacción.

Los valores de actividad y selectividad exhibidos por la enzima CALB para la reacción de transesterificación modelo en n-hexano y en los *líquidos iónicos miscibles con agua* se encuentran recogidos la **Tabla 5.2**.

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

Tabla 5.2. Actividad y selectividad de CALB en líquidos iónicos miscibles en agua en la síntesis de butirato de butilo a 2%(v/v) de contenido en agua y 30 °C.

Medio	Actividad Sintética (U/mg.prot.)	Selectividad (%)
n-Hexano	7.61	75.3
[emim ⁺] [BF ₄ ⁻]	0.14	> 99.9
[bmim ⁺] [BF ₄ ⁻]	0.82	> 99.9
[bdmim ⁺] [BF ₄ ⁻]	3.48	> 99.9
[hmim ⁺] [BF ₄ ⁻]	3.58	> 99.9
[emim ⁺] [dca ⁻]	0.63	> 99.9
[bmim ⁺] [dca ⁻]	12.34	> 99.9
[omim ⁺] [dca ⁻]	0.82	> 99.9
[bmim ⁺] [NO ₃ ⁻]	0	-
[bmim ⁺] [acetato ⁻]	0.33	> 99.9
[bmim ⁺] [OcSO ₄ ⁻]	0.08	> 99.9
[bmim ⁺] [MDEGSO ₄ ⁻]	0.11	> 99.9

Al contrario de lo que ocurre con los líquidos iónicos inmiscibles con agua, la *actividad sintética* mostrada por la enzima CALB en los líquidos iónicos miscibles con agua fue mucho menor que en n-hexano en casi todos los casos. Únicamente en [bmim⁺][dca⁻] la enzima CALB fue más activa que en n-hexano, y en [bdmim⁺][BF₄⁻] y [hmim⁺][BF₄⁻] la actividad enzimática fue aproximadamente la mitad que en n-hexano. Por tanto, solamente estos tres líquidos iónicos miscibles con agua podrían ser utilizados como medios de reacción alternativos al n-hexano en la síntesis de butirato de butilo. La enzima CALB no mostró actividad alguna en el líquido iónico [bmim⁺][NO₃⁻], lo cual puede ser explicado en base a la alta nucleofilidad del anión [NO₃⁻]. El efecto negativo de los líquidos iónicos miscibles con agua sobre la actividad enzimática puede atribuirse a la interacción directa de éstos con las moléculas de enzima, lo que origina la desnaturalización de las proteínas constituyentes de las enzimas por deshidratación [15,16]. El caso extremo lo encontramos para [bmim⁺][NO₃⁻] cuyo anión, que posee una alta nucleofilidad, podría coordinarse fuertemente con los grupos cargados positivamente de la superficie de la enzima modificando la conformación activa de la misma. Al igual que ocurría con los líquidos iónicos inmiscibles con agua, para un

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

mismo anión, la actividad sintética de la enzima aumentó conforme lo hizo la hidrofobicidad del catión constituyente.

En lo que respecta a la *selectividad*, en ninguna de las reacciones efectuadas en líquidos iónicos miscibles con agua se detectó el producto de hidrólisis, obteniendo así para este parámetro un valor $> 99.9\%$. La mayor hidrofobicidad de los líquidos iónicos miscibles con agua permite una baja actividad de agua en el microentorno de la enzima de forma que los procesos de hidrólisis se ven prácticamente anulados.

5.3.2. Análisis de la estabilidad de CALB en líquidos iónicos

Uno de los criterios clave para seleccionar un sistema enzima-líquido iónico es la estabilidad del catalizador en el medio de reacción. La influencia de estos nuevos disolventes en la estabilidad de lipasa B de *Candida antarctica* fue estudiada mediante incubación de la enzima en distintos líquidos iónicos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 2% (v/v) de contenido en agua. Los líquidos iónicos seleccionados para este estudio fueron una muestra representativa de aquellos en los que la enzima mostró mayor actividad: $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{hmim}^+][\text{NTf}_2^-]$, $[\text{hmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$, con objeto de estudiar la influencia del anión y del catión que conforman el líquido iónico en la estabilidad enzimática.

Las curvas de desactivación de la enzima en los distintos medios, se han obtenido a partir del cálculo de las actividades residuales de la enzima a intervalos dados de tiempo a lo largo de un periodo de 7 días. Los perfiles de desactivación de CALB en distintos líquidos iónicos se muestran en las **Figuras 5.4. a 5.10.**

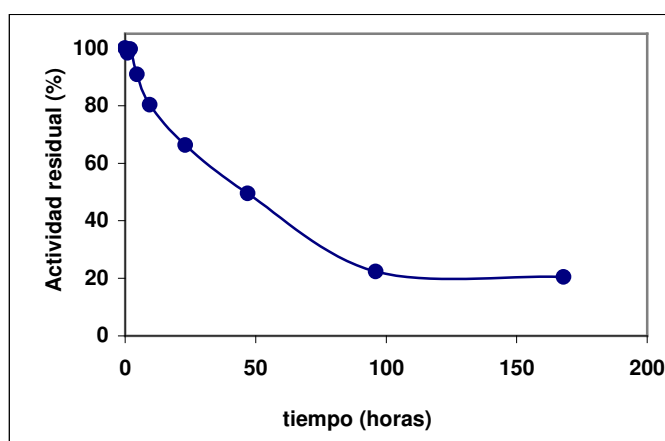


Figura 5.4. Curva de desactivación de CALB a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 2% (v/v) en agua en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$.

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

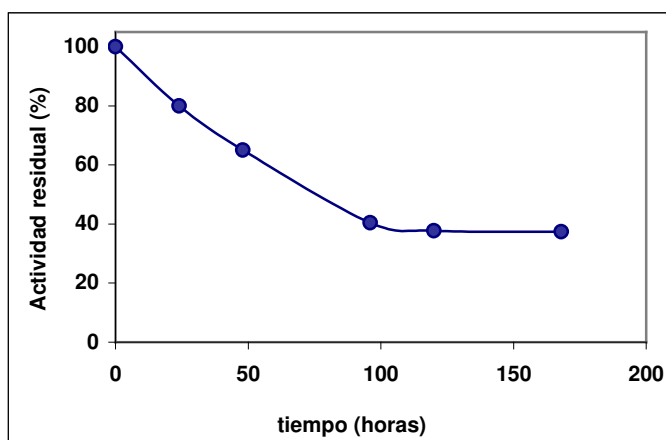


Figura 5.5. Curva de desactivación de CALB a 30 °C y 2% (v/v) en agua en [hmim⁺][PF₆⁻].

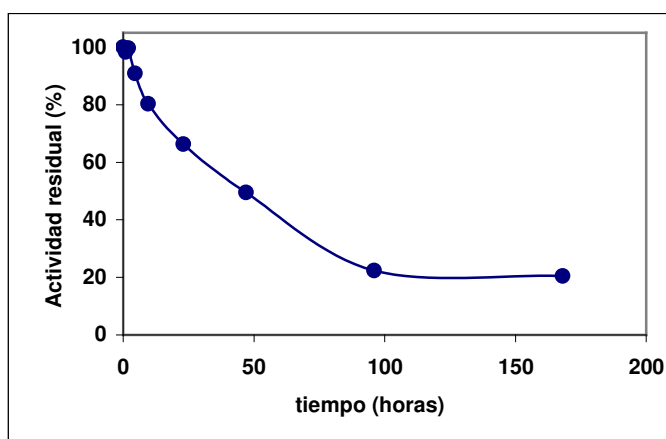


Figura 5.6. Curva de desactivación de CALB a 30 °C y 2% (v/v) en agua en [omim⁺][PF₆⁻].

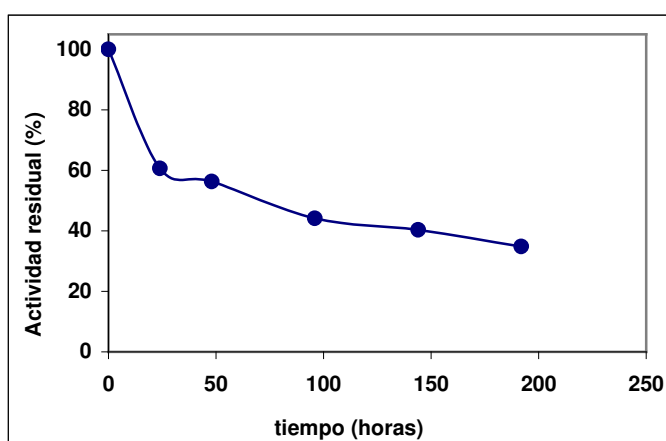


Figura 5.7. Curva de desactivación de CALB a 30 °C y 2% (v/v) en agua en [hmim⁺][NTf₂⁻].

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

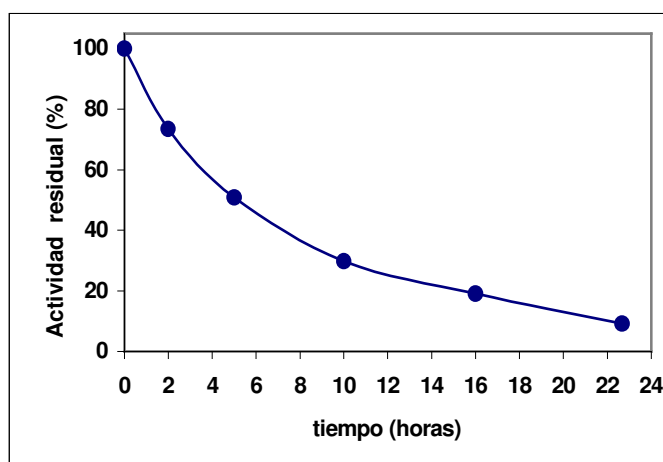


Figura 5.8. Curva de desactivación de CALB a 30 °C y 2% (v/v) en agua en [hmim⁺][BF₄⁻].

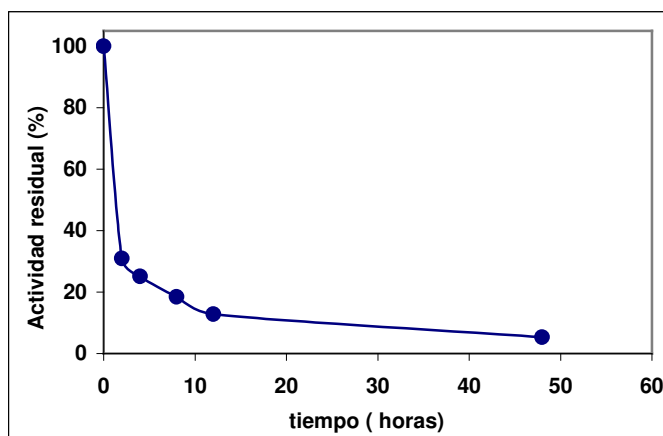
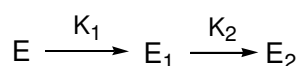


Figura 5.9. Curva de desactivación de CALB a 30 °C y 2% (v/v) en agua en [bmim⁺][dca].

La forma de las curvas de desactivación permite discriminar entre los mecanismos de desactivación. Así, podemos constatar que estas cinéticas son de segundo orden (dos zonas lineales de pendiente diferente). Este tipo de cinética también ha sido observada para esta enzima por otros autores [17]. Se fundamenta en la presencia de dos poblaciones de enzima de estabilidad diferente dentro de la solución bruta y se traduce en un mecanismo en dos etapas:



A partir de las gráficas de desactivación pueden determinarse los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) como el tiempo al cual la enzima mantiene la mitad de su actividad inicial. Éste es un parámetro que permite apreciar fácilmente el grado de estabilización de la enzima en

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

los distintos medios. Los valores obtenidos del $t_{1/2}$ para los distintos líquidos iónicos se recogen en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.3. Tiempos de vida media de CALB en los distintos ILs a 30 °C y 2% (v/v) en agua.

Medio	Tiempo de vida media ($t_{1/2}$)
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	7
[bmim ⁺][dca ⁻]	1.5
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	48
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	78
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	84
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	72

La **Figura 5.10** muestra el perfil de desactivación de CALB en 3 líquidos iónicos diferentes basados en el anión hexafluorofosfato.

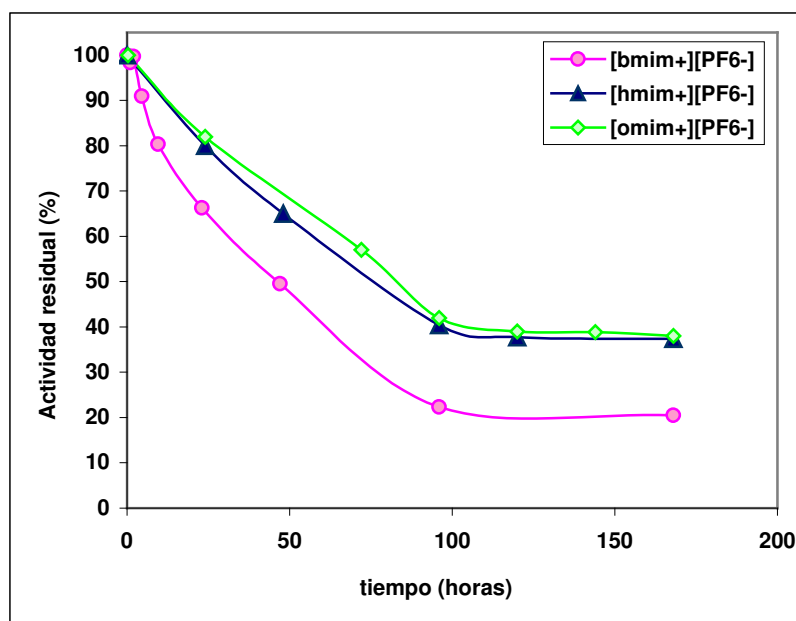


Figura 5.10. Perfiles de desactivación de CALB en [bmim⁺][PF₆⁻], [hmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻] a 30 °C y 2% (v/v) en agua.

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

Como puede observarse en la **Figura 5.10**, la estabilidad de CALB aumenta al aumentar la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión imidazolío, lo cual está de acuerdo con el aumento de la hidrofobicidad del líquido iónico, aunque no se observan diferencias significativas en la estabilidad entre $[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Lozano *et al.* [17], quienes encontraron que la enzima era muy sensible a la desactivación conforme disminuía la hidrofobicidad del líquido iónico, con un contenido en agua del 2% (v/v).

El efecto más importante sobre la actividad enzimática se observó variando la naturaleza del anión constituyente del líquido iónico, tal y como puede verse en la **Tabla 5.3**, comparando los tiempos de vida media de CALB en líquidos iónicos que poseen el mismo catión. Así, los tiempos de vida media para los líquidos iónicos basados en el catión $[\text{bmim}^+]$ aumentan en la serie: $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-] < [\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y para aquellos basados en el catión $[\text{hmim}^+]$ la secuencia es la siguiente: $[\text{hmim}^+][\text{BF}_4^-] < [\text{hmim}^+][\text{NTf}_2^-] < [\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$. Teniendo en cuenta que el orden de nucleofilicidad de los aniones es: $[\text{dca}^-], [\text{BF}_4^-] > [\text{NTf}_2^-] > [\text{PF}_6^-]$ [9,18], el aumento de los tiempos de vida media parece estar de acuerdo con la disminución de este parámetro. Esta observación puede ser explicada por el hecho de que los aniones más nucleofílicos podrían interaccionar más fuertemente con la enzima, causando cambios en la estructura activa de ésta.

Así, el líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, que contiene el catión más hidrofóbico y el anión menos nucleofílico, ha resultado ser el que más estabiliza a la enzima, mostrando un tiempo de vida media de 84 horas. Por el contrario, el líquido iónico $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$, el cuál contiene el catión más hidrofílico y el anión más nucleofílico, produce una fuerte disminución de la estabilidad de CALB, mostrando un tiempo de vida media de tan sólo 1.5 h. La misma tendencia fue observada por Kaar *et al.* [19] con *Novozym 435*, la cual resultó más estable en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ que en $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$, y por Persson and Bornscheuer [7] con una *esterasa de B. Stearothermophilus*, la cual mostró más estabilidad en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ que en $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$.

5.4. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo la síntesis de butirato de butilo catalizada por lipasa B de *Candida antarctica* en una amplia variedad de líquidos iónicos. Los líquidos iónicos inmiscibles con agua han resultado medios adecuados para llevar a cabo la reacción propuesta, obteniéndose mayores valores de actividad y selectividad enzimática que en n-hexano, como disolvente orgánico convencional.

El uso de líquidos iónicos miscibles con agua da lugar a menores valores de actividad y selectividad enzimática que en n-hexano, sin embargo la selectividad en estos medios es mucho mayor (> 99.9%).

Los estudios de estabilidad indican que CALB es más estable en líquidos iónicos inmiscibles con agua que en líquidos iónicos miscibles con agua.

Se ha observado que un aumento de la hidrofobicidad del catión constituyente del líquido iónico da lugar a un aumento en la actividad y estabilidad de CALB y a una disminución de la selectividad. En lo referente al anión, un aumento en la nucleofilicidad de éste da lugar a una disminución de la actividad y estabilidad de CALB y a un aumento de la selectividad enzimática.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.F. Brennecke, E.J. Maginn Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing, *AIChE Journal* 47 (2001) 2384-2389.
- [2] R. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids. *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.
- [3] S. Dzyuba, A. Bartsch, Recent advances in applications of room-temperature ionic liquid-supercritical carbon dioxide systems. *Angew. Chem. Int. Edit.* 42 (2003) 148-150.
- [4] 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.
- [5] M. Freemantle, Designer solvents. Ionic liquids may boost clean technology development, *Chemical Engineering News* 76 (1998) 32-37.
- [6] 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.
- [7] M. Persson, U. T. Bornscheuer, Increased stability of an esterase from *Bacillus subtilis* in ionic liquids as compared to organic solvents, *J. Mol. Catal B: Enzymatic*, 22 (2003) 21-27.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.

5. Efecto del medio líquido iónico sobre CALB en reacciones de transesterificación

- [12] S.N. Baker, G.A. Baker, M.A. Kane, F.V. Bright, The cybotactic region surrounding fluorescent probes dissolved in 1-n-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate: effect of temperature and added carbon dioxide, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 9663-9668.
- [13] P. Bonhôte, A.P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient temperature molten-salts, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168 -1178.
- [14] S.H. Schöfer, N. Kaftzik, P. Wasserscheid, U. Kragl, Biphasic ethylene polymerization with a diiminonickel catalyst, *Chem. Commun.* (2001) 425-426.
- [15] P. Lozano, T. De Diego, J.P. Guegan, M. Vaultier, J.L. Iborra, Stabilization of α -Chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions, *Biotechnol. Bioengin.* 75 (2001) 563-569.
- [16] S.J. Nara, J.R. Harjani, M.M. Salunkhe, Enzymatic catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 2979-2982.
- [17] P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouth, M. Vaultier, J.R. Iborra, Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 661-669.
- [18] R. Irimescu, K. Kato, Investigation of ionic liquid as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 30 (2004) 189-194.
- [19] J.L. Kaar, A.M. Jesionowski, J.A. Berberich, R. Moulton, A.J. Russell, Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability, *J. Amer. Chem. Soc.* 125 (2003) 4125-4131.

6

**Desarrollo de nuevos derivados
enzimáticos de lipasa B de *Candida
antarctica* activos en líquidos iónicos
desnaturalizantes**

6. DESARROLLO DE NUEVOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS DE LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA* ACTIVOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS DESNATURALIZANTES

6.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se comprobó que la enzima lipasa B de *Candida antarctica* exhibía una actividad y selectividad superior en reacciones de transesterificación cuando se empleaban como medios de reacción líquidos iónicos inmiscibles con agua en lugar de n-hexano. Sin embargo, la actividad catalítica de la enzima se veía notablemente disminuida con el empleo de líquidos iónicos miscibles con agua que originaban la desnaturalización de la misma. 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 [1,2]. 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 [3,4].

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 en forma de cristales de las enzimas entrecruzados covalentemente (cross-linked enzyme crystals, CLECs) [5-7], la inmovilización como enzimas en disolución entrecruzadas covalentemente (cross-linked dissolved enzymes, CLEs) [8,9] y la inmovilización como

6. Desarrollo de derivados enzimáticos de CALB activos en ILs desnaturalizantes

agregados enzimáticos entrecruzados covalentemente (cross-linked enzyme aggregates CLEAs) [10].

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

- Poseen una alta concentración de la actividad enzimática en el catalizador. 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%) [11].
- Poseen una elevada estabilidad.
- Los costes de producción son menores al eliminar el coste adicional del soporte.

En este capítulo se han desarrollado varios derivados enzimáticos entrecruzados 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 6.1**).

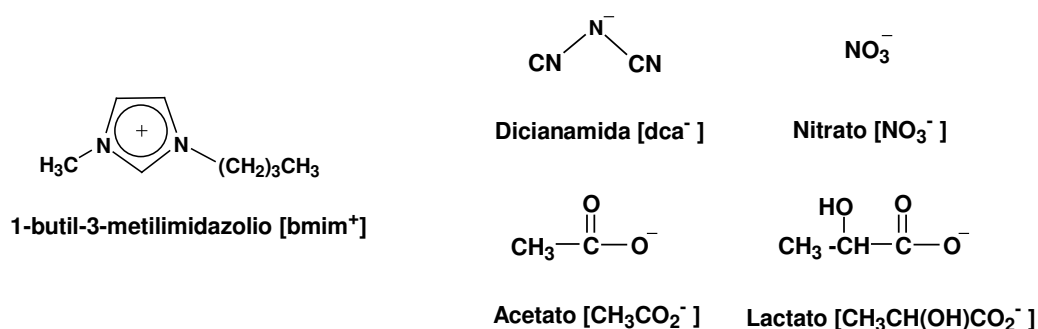


Figura 6.1. Iones constituyentes de los líquidos iónicos estudiados.

6. Desarrollo de derivados enzimáticos de CALB activos en ILs desnaturalizantes

Se ha utilizado la síntesis de butirato de butilo mediante transesterificación de butirato de etilo con 1-butanol (**Figura 6.2**) como reacción modelo para este estudio.

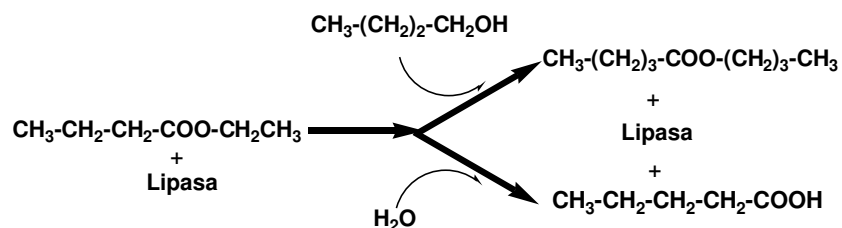


Figura 6.2. Reacción modelo utilizada para el estudio.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Enzima y materiales

La enzima lipasa B de *Candida antarctica* (Lipozym[®] CaLB L) fue suministrada por Novozymes (Bagsværd, Dinamarca).

1-Butanol, butirato de etilo, 1,2-dimetoxibenceno y la resina de intercambio aniónico Dowex 1X8-200 fue suministrada 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.

6. Desarrollo de derivados enzimáticos de CALB activos en ILs desnaturalizantes

6.2.2. Preparación de derivados enzimáticos entrecruzados de lipasa B de *Candida antarctica* [12]

6.2.2.1. Agregado enzimático entrecruzado covalentemente de lipasa B de *Candida antarctica*

Sobre 150 mL de Lipozym CaLB L a temperatura ambiente se adicionó hidrógenofosfato dipotásico (0.45 g, 2.5 mmol, 20 mM concentración final). El pH fue ajustado a 7.3 con ácido fosfórico (1 M). Seguidamente, se adicionaron 450 mL de 2-propanol y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se adicionó una disolución de glutaraldehído (25%, 22.6 mL, 100 mM concentración final) y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó una disolución de cianoborohidrido sódico (60 mL, 100 mM). Después de 30 minutos, el agregado enzimático entrecruzado covalentemente (CLEA) fue aislada por centrifugación. Las partículas fueron lavadas con agua y seguidamente secadas con acetona y éter dietílico. Del sólido pulverulento resultante se eliminaron los residuos de disolventes orgánicos haciendo pasar una corriente de aire a través de una placa de vidrio poroso que contenía el sólido. Rendimiento: 8 g, actividad 24 kU/g, definida la unidad de actividad (U) como la cantidad de enzima que produce un μmol de ácido butírico por minuto a partir de tributirina a pH 7.5 y 40 °C.

6.2.2.2. Derivado enzimático de lipasa B de *Candida antarctica* entrecruzado covalentemente sobre un soporte de polipropileno

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; 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 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.

6.2.3. Síntesis de líquidos iónicos

Los líquidos iónicos [bmim⁺][Cl⁻], [bmim⁺][dca⁻], [bmim⁺][NO₃⁻] y [bmim⁺][CH₃CO₂⁻] se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento experimental descrito en el apartado 5.2.2.

6. Desarrollo de derivados enzimáticos de CALB activos en ILs desnaturalizantes

1-Butil-3-metilimidazolio lactato, $[bmim^+][CH_3CH(OH)CO_2^-]$ 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 $[bmim^+][Cl^-]$ (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 $[bmim^+][CH_3CH(OH)CO_2^-]$ se obtuvo con un rendimiento casi cuantitativo y contenía <10 ppm de cloruros de acuerdo con el test del cromato de plata que se describió en el apartado 5.2.5.2. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, 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).

6.2.4. Ensayos de actividad enzimática

En un vial de rosca de 2 ml se adicionan 8 μ L (60 μ mol) de butirato de etilo, 15 μ L (300 μ mol) de 1-butanol y 8 μ L de 1,2-dimetoxibenceno (estándar interno) que se disuelven en el medio de reacción (1475 μ L). Se adicionan a la mezcla de reacción 75 mg de zeolita KA activada (polvo).

La reacción comienza adicionando 36 U de CALB. La mezcla de reacción permanece a 40°C con agitación durante 2 horas y periódicamente se toman muestras de 15 μ L del medio de reacción, que se adicionan sobre 600 μ 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 μ L del sobrenadante se analizan por cromatografía de gases, tal y como se describe en el apartado 6.2.5.3.

La eficacia de la acción catalítica se midió a través de dos parámetros, la actividad sintética y la selectividad. Se define una unidad de *actividad sintética* como la cantidad de enzima que es capaz de realizar la síntesis de 1 μ mol de butirato de butilo por minuto. 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 (**Figura 6.2**).

6.2.5. Métodos analíticos

6.2.5.1. **Análisis de resonancia magnética nuclear**

Los espectros de resonancia magnética nuclear de 1H y ^{13}C de los líquidos iónicos sintetizados se realizaron en los espectrómetros VARIAN modelo Unity 300 y VARIAN modelo Inova 400, utilizando cloroformo- d_1 como disolvente y tetrametilsilano ($(CH_3)_4Si$) como patrón interno de referencia de protón y carbono.

6. Desarrollo de derivados enzimáticos de CALB activos en ILs desnaturalizantes

6.2.5.2. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras de reacción se lleva a cabo por cromatografía de gases en un cromatógrafo Varian Star 3600 GC equipado con un detector de ionización en llama (FID), un inyector automático de muestras y una columna capilar CP-Sil SCB (50 m × 0.53 mm) de Varian Inc. El perfil de temperatura es el siguiente: 8 min a 40 °C, después 15 °C/min hasta 235 °C.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: 1-butanol, 8.8 min.; butirato de etilo, 12.9 min.; butirato de butilo, 17.0 min.; 1,2-dimetoxibenceno, 19.5 min; ácido butírico, 20.3 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 6.1**.

Tabla 6.1. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema de reacción: butirato de etilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico.

Compuesto	m = pendiente
BUTIRATO DE ETILO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	1.3786
1-BUTANOL $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	1.9796
BUTIRATO BUTILO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	0.957
ÁCIDO BUTÍRICO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	10.621

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dos derivados enzimáticos entrecruzados de CALB fueron utilizados para llevar a cabo la síntesis de reacción de butirato de butilo (**Figura 6.2**). En uno de ellos la enzima se inmovilizó en forma de agregado enzimático entrecruzado covalentemente (CLEA), preparada mediante agregación enzimática directa y entrecruzamiento (CALB-CL). En el segundo derivado inmovilizado, la enzima fue entrecruzada sobre un soporte de polipropileno (CALB-PP).

La actividad catalítica de los dos derivados enzimáticos entrecruzados fue ensayada en dos medios de reacción: alcohol tert-butílico, el cual se ha utilizado como referencia al ser un medio de reacción convencionalmente usado en este tipo de reacciones y en [bmim⁺][dca⁻], un líquido iónico que se ha comprobado su capacidad para disolver a la enzima CALB, sufriendo ésta una pérdida de actividad irreversible [13].

6. Desarrollo de derivados enzimáticos de CALB activos en ILs desnaturalizantes

En alcohol tert-butílico, el derivado enzimático CALB-CL catalizó la reacción de transesterificación con una actividad específica de $220 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g proteín})^{-1}$, la cual fue dos órdenes de magnitud inferior a su actividad hidrolítica en fase acuosa. El biocatalizador CALB-PP fue significativamente más activo (actividad específica de $374 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g proteína})^{-1}$), teniendo en cuenta su contenido proteínico (41%). Este hecho puede ser explicado considerando que el camino de difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima en el biocatalizador soportado en polipropileno es más corto.

En $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$, CALB-PP mantuvo su actividad, y llevó a cabo la reacción de transesterificación con aproximadamente un 60 % de la actividad específica conseguida en alcohol tert-butílico. Por el contrario, el derivado CaLB-CL perdió prácticamente toda su actividad en $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$ (**Figura 6.3**).

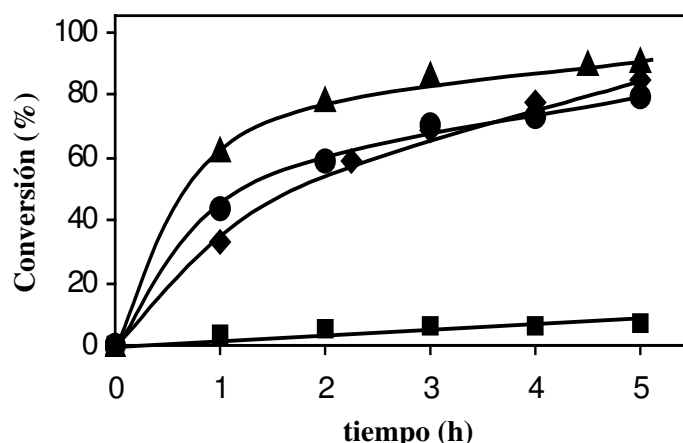


Figure 6.3. Efecto del medio y del procedimiento de inmovilización; CaLB-CL en t-BuOH (◆) y $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$ (■); CaLB-PP en t-BuOH (▲) y $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$ (●).

La baja actividad de CALB-CL en $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$ puede ser causada por la ruptura de los enlaces por puentes de hidrógeno intramoleculares por el anión $[\text{dca}^-]$ que es fuertemente coordinante [14]. En este sentido, la adición de una pequeña cantidad de agua sobre líquidos iónicos altamente hidrofílicos como el $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$, podría tener un efecto beneficioso ya que tendería a hidratarse hasta la formación del hemihidrato disminuyendo así su poder de coordinación a la enzima [15]. De hecho, se ensayó la reacción en $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-] \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (4.5 wt% H_2O) observándose que CALB-CL permanecía activa. Sin embargo, en este último caso la hidrólisis prevaleció sobre la síntesis y la formación del butirato de butilo sólo alcanzó un rendimiento del 15%. La actividad mostrada por CALB-CL en $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-] \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ puede ser explicada

6. Desarrollo de derivados enzimáticos de CALB activos en ILs desnaturalizantes

considerando que el agua presente rompe la interacción que se establece entre el líquido iónico y la enzima restableciéndose entonces la actividad enzimática. Por la importante actividad hidrolítica que muestra CALB-CL cabe entender que la actividad de agua en el hemihidrato es aún considerable, de modo que añadir agua no resulta una solución adecuada para evitar la desactivación cuando se pretende realizar biosíntesis. La hidrólisis del butirato de etilo se dio, aunque en pequeña proporción, incluso cuando los líquidos iónicos fueron secados de forma rigurosa. Por ello se consideró pertinente añadir zeolita KA a la mezcla de reacción para adsorber las moléculas de agua presentes en el medio, con el fin de obtener los resultados sintéticos esperados.

Por todo lo expuesto, se puede concluir que el procedimiento para preparar el catalizador es crucial para la preservación de la actividad enzimática en líquidos iónicos. En los casos estudiados, podría entenderse que la delgada película del agregado enzimático formado sobre la superficie del soporte de polipropileno en CALB-PP está más entrecruzada, y por lo tanto más estabilizada, que en los agregados sin soporte del tipo CALB-CL.

El estudio se extendió posteriormente a otros líquidos iónicos miscibles con agua tales como $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{CH}_3\text{CO}_2^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2^-]$, utilizando el derivado enzimático CALB-PP, que había mostrado mejor comportamiento, y añadiendo zeolita KA a la mezcla de reacción para disminuir la hidrólisis. Los valores de actividad y los perfiles de reacción obtenidos para CALB-PP en los distintos líquidos iónicos se encuentran recogidos en la **Tabla 6.2** y la **Figura 6.6**.

Tabla 6.2. Efectos del medio de reacción y el biocatalizador en la reacción de transesterificación.

<i>Medio</i>	Tipo de CLEA, actividad específica ($\mu\text{mol min}^{-1} (\text{g protein})^{-1}$)	
	CALB-CL	CALB-PP
Alcohol tert-butílico	220	374
$[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$	6.6	228
$[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$	2.5	151
$[\text{bmim}^+][\text{CH}_3\text{CO}_2^-]$	0	62
$[\text{bmim}^+][\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2^-]$	0	58

Condiciones de reacción: butirato de etilo (0.04 M), 1-butanol (0.2 M), zeolita KA (50 mg mL⁻¹), lipasa 24 U mL⁻¹, 40 °C.

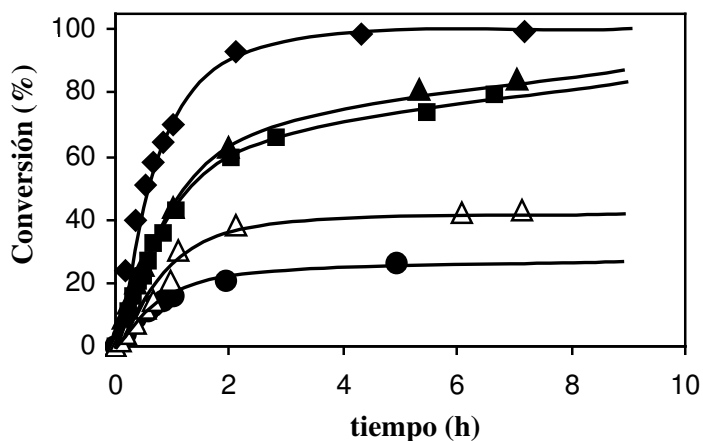


Figura 6.6. Perfiles de reacción para la síntesis de butirato de butilo catalizada por CALB-PP en t-BuOH (◆), [bmim⁺][dca⁻] (▲), [bmim⁺][NO₃⁻] (■), [bmim⁺][CH₃CH(OH)CO₂⁻] (Δ) y [bmim⁺][CH₃CO₂⁻] (●).

CALB-CL mostró una actividad muy baja en [bmim⁺][NO₃⁻], mientras que en [bmim⁺][CH₃CH(OH)CO₂⁻] y [bmim⁺][CH₃CO₂⁻] resultó inactiva.

Por su parte, CALB-PP presentó una alta actividad catalítica en [bmim⁺][NO₃⁻], un disolvente potencialmente atractivo debido a su alta polaridad. Sin embargo, cuando se utilizó [bmim⁺][CH₃CH(OH)CO₂⁻] y [bmim⁺][CH₃CO₂⁻] como medios de reacción, la actividad específica fue notablemente menor, no alcanzándose en ambos casos la conversión total del butirato de etilo.

6.4. 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 mantiene su actividad catalítica en los líquidos iónicos [bmim⁺][dca⁻] y [bmim⁺][NO₃⁻], los cuales desactivan la enzima libre.

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

6.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Illanes, Stability of biocatalysts, *Electronic. J. Biotechnol.* 2 (1) (1999) 7-15.
- [2] J.M.S. Cabral, J.F. Kennedy, Immobilisation techniques for altering thermal stability of enzymes, *Thermostability of enzymes*, Berlin: Springer Verlag, 1993, 163-179.
- [3] K. Mosbach, *Immobilised enzymes and cells (Part B)*, *Methods of enzymology*, Academic Press, New York, 1987, 135.
- [4] W. Hartmeier, *Immobilised biocatalysts*, Berlin: Springer-Verlag, 1988.
- [5] F.A. Quijcho, F.M. Richards, Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase, *A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52 (1964) 833-839.
- [6] 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.
- [7] N.L. St Clair, M.A. Navia, Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 7314-7316.
- [8] A.F.S.A. Habeeb, Preparation of enzymically active, water insoluble derivatives of trypsin, *Arch. Biochem. Biophys.* 119 (1967) 264-268.
- [9] E.F. Jansen, A.C. Olson, Properties and enzymatic activities of papain insolubilized with glutaraldehyde, *Arch. Biochem. Biophys.* 129 (1969) 221-228.
- [10] 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.
- [11] W. Tischer, V. Kasche, Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.* 17 (1999) 326-335.
- [12] R. Schoevaart, L.M. van Langen (CLEA Technologies), Neth. Appl. NL 1027360.
- [13] M.H.A. Janssen, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, artículo en preparación.
- [14] R. Madeira Lau, M.J. Sorgedragger, G. Carrea, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, 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.
- [15] L. Cammarata, S.G. Kazarian, P.A. Salter, T. Welton, Molecular state of water in room temperature ionic liquids, *Phys. Chem. Phys.* 3 (2001) 5192-5200.

7

**Aplicación de membranas líquidas
soportadas basadas en líquidos
iónicos a la separación selectiva de
sustratos y productos de reacciones de
transesterificación**

7. APLICACIÓN DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS A LA SEPARACIÓN SELECTIVA DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN

7.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos tradicionalmente empleados en la industria química para la separación selectiva de compuestos orgánicos han sido la cristalización, la destilación fraccionada y la extracción con disolventes. La mayor parte de estos métodos requieren altos consumos de energía y/o dan lugar a grandes cantidades de residuos de disolventes. En este contexto, los procesos de separación basados en la tecnología de membranas han sido reconocidos como una alternativa prometedora [1] para conseguir una más gestión eficiente de los recursos, ya que no requieren altos consumos de energía para su operación, pueden ser llevados a cabo bajo condiciones de operación moderadas y el consumo de disolventes es menor que en los métodos tradicionales.

Dentro de los procesos basados en la tecnología de membranas, el uso de membranas líquidas soportadas (SLMs) ha recibido un interés creciente en los últimos años [2-4]. Las SLMs consisten en soportes porosos en cuyos poros se ocluye un líquido. Entre las numerosas ventajas de este tipo de membranas cabe destacar que la cantidad de disolvente necesario es mínima y que los procesos de extracción y recuperación tienen lugar en una única etapa [5]. Sin embargo, su uso industrial es todavía limitado, principalmente debido a aspectos relacionados con la estabilidad de las mismas y el rendimiento a largo plazo [6,7]. 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 del líquido 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 membranas líquidas soportadas 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 [8] y a la alta fuerza capilar asociada a su elevada 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 ninguna 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 SLMs son su elevada estabilidad térmica [9], su alta conductividad iónica [9] y su nula inflamabilidad. Además, son capaces de disolver una amplia variedad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos [10,11] a la vez que son immiscibles con numerosos compuestos orgánicos [12] e incluso en algunos casos con agua.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

Recientemente algunos investigadores han descrito procesos de separación a través de SLM basadas en líquidos iónicos [8,13-15] en los que se consigue un transporte selectivo de compuestos orgánicos tales como alcoholes, cetonas y aminas [14,15].

En este capítulo se ha estudiado el transporte de sustratos y productos de reacciones de transesterificación a través de membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos, con el fin de evaluar la selectividad de la separación obtenida. En concreto, se ha analizado el transporte de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de diferentes membranas poliméricas en las que se han inmovilizado líquidos iónicos basados en cationes 1-alkil-3-metilimidazolio (alkil = butil, octil) y en el anión hexafluorofosfato, evaluándose la influencia tanto del soporte polimérico como de la naturaleza del líquido iónico en el comportamiento de la SLM resultante. Finalmente se ha analizado la estabilidad operacional de las mismas.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Membranas y materiales

En este estudio se han utilizado cinco tipos de membranas poliméricas suministradas por la empresa Millipore Ibérica S.A. (Madrid, España):

- DURAPORE® HVHP 02500

Composición: Fluoruro de polivinilideno.

Superficie: plana.

Diámetro: 25 mm.

Tamaño medio de poro: 0.45µm.

Espesor: 125µm.

Porosidad media: 70%.

Carácter hidrofílico/hidrofóbico: Hidrofóbico.

- MITEX® LCWP 02500

Composición: Politetrafluoroetileno.

Superficie: plana.

Diámetro: 25 mm.

Tamaño medio de poro: 10µm .

Espesor: 130µm.

Porosidad media: 65%.

Carácter hidrofílico/hidrofóbico: Hidrofóbico.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

- **FLUOROPORE**[®] FHLP 02500

Composición: Politetrafluoroetileno sobre un soporte de polietileno.

Superficie: plana.

Diámetro: 25 mm.

Tamaño medio de poro: 0.5 μ m.

Espesor: 150 μ m.

Porosidad media: 85%.

Carácter hidrofílico/hidrofóbico: Hidrofóbico.

- **ISOPORE**[®] HTTP 02500

Composición: Policarbonato.

Superficie: plana.

Diámetro: 25 mm.

Tamaño medio de poro: 0.4 μ m.

Espesor: 20 μ m.

Porosidad media: 5-20%.

Carácter hidrofílico/hidrofóbico: Hidrofílico.

- **NYLON**[®] HNWP 02500

Composición: Poliamida.

Superficie: plana.

Diámetro: 25 mm.

Tamaño medio de poro: 0.45 μ m.

Espesor: 170 μ m.

Carácter hidrofílico/hidrofóbico: Hidrofílico.

Todas ellas son membranas orgánicas poliméricas microporosas, que atendiendo al tamaño de sus poros, se pueden clasificar como de poro ancho (diámetro entre 10 nm y 50 μ m).

En la **Tabla 7.1** se muestra la resistencia química de cada una de las membranas a n-hexano, el disolvente empleado en el presente estudio.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

Tabla 7.1. Resistencia química de las membranas al disolvente orgánicos utilizado [16].

MEMBRANA	n-HEXANO
DURAPORE®	■
ISOPORE®	▲
MITEX®	■
FLUOROPORE®	■
NYLON®	■

■ = Recomendada ; ▲ = aplicaciones limitadas, se recomienda testarla antes de su uso;
● = No recomendada

Los líquidos iónicos [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻] fueron suministrado con una pureza > 99% por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania). Los reactivos químicos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A. (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).

7.2.2. Preparación de membranas líquidas soportadas

La inmovilización del líquido iónico se llevó a cabo haciendo uso de una célula de ultrafiltración AmiconTH de 10 mL. Se coloca la membrana en el interior de ésta y se añaden 3 mL de líquido iónico (**Figura 7.1**). La célula se cierra y se presuriza con nitrógeno gas a la presión de aprox. 1.5-2 bar para provocar que el líquido iónico fluya a través de los poros de la membrana. Cuando sólo se observa una fina capa de líquido iónico sobre la membrana se despresuriza el sistema y se repite el mismo proceso dos veces más, reutilizando el líquido iónico, para asegurar que todos los poros están ocupados por líquido ya que los líquidos iónicos usados son bastante viscosos. Finalmente se extrae la membrana y se deja que gotee durante doce horas para eliminar el exceso de líquido iónico no inmovilizado presente en la superficie de la misma.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

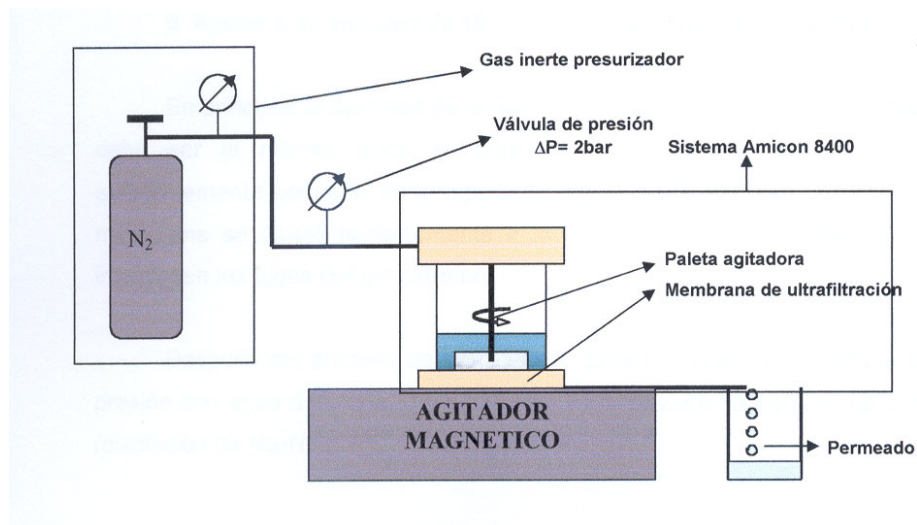


Figura 7.1. Esquema del equipo para el soporte del líquido iónico en las membranas a presión.

7.2.3. Estudios de transporte

Los estudios de transporte se llevaron a cabo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 7.2** se muestra una ilustración esquemática de la célula de difusión.

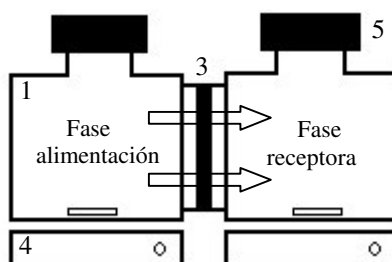


Figura 7.2. Ilustración esquemática de la célula de difusión usada en los ensayos: 1) fase alimentación que contiene los compuestos; 2) fase receptora que contiene n-hexano; 3) membrana líquida soportada; 4) agitador magnético; 5) septum.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

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 7.3).



Figura 7.3. 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 7.4).

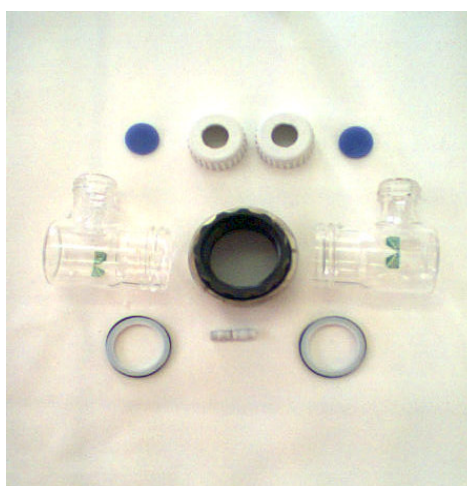


Figura 7.4. Piezas de la célula de difusión.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

En todos 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 comienza con la adición de 30 mL de cada una de estas disoluciones en sus respectivos compartimentos. Ambos compartimentos son agitados mecánicamente para evitar condiciones de polarización por concentración en las interfases de la membrana. El dispositivo experimental se muestra en la **Figura 7.4**.

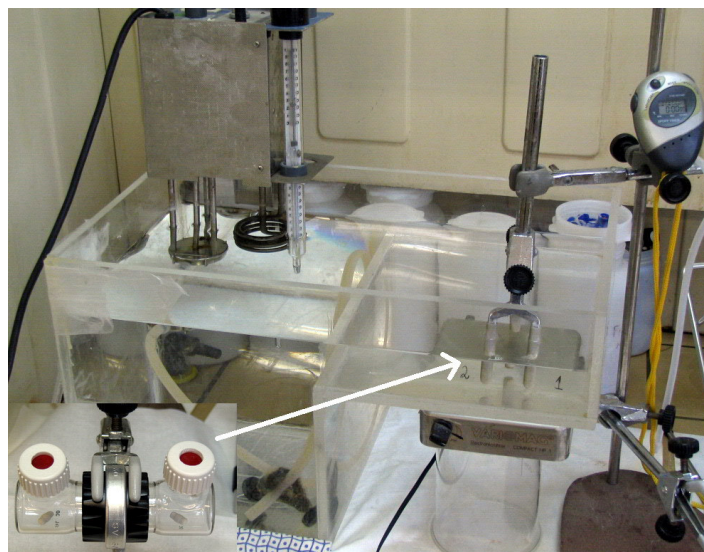


Figura 7.4. Dispositivo experimental.

Periódicamente se toman 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 añaden una disolución en n-hexano de acetato de butilo (estándar interno) (100 μL , 60 mM) y n-hexano (800 μL) y 5 μL de la disolución resultante se analiza por cromatografía de gases, como se describe en el apartado 7.2.5.

7.2.4. Determinación de los coeficientes de reparto de los compuestos entre líquido iónico y n-hexano

Los coeficientes de reparto de los compuestos entre los líquidos iónicos y n-hexano se determinaron mediante el método de agitación rápida (*shake-flask method*). Para ello en distintos viales se ponen en contacto volúmenes iguales (1 mL) de líquido iónico y de una disolución de cada uno de los compuestos en n-hexano, se agitan vigorosamente con un vórtex y se introducen en un baño termostataado a 30° C donde se mantiene hasta alcanzar el equilibrio (30 minutos). La composición de la fase orgánica antes y después

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

de ponerse en contacto con la fase líquido iónico se analiza por cromatografía de gases como se describe en el apartado 7.2.5. Para calcular los coeficientes de reparto de los distintos compuestos entre el líquido iónico y n-hexano se utiliza la siguiente expresión:

$$K = \left(\frac{C_{H(0)} - C_{H(t)}}{C_{H(t)}} \right) \quad (7.1)$$

donde $C_{H(0)}$ y $C_{H(t)}$ son las concentraciones medidas de soluto en la fase hexano antes y después del proceso de extracción, respectivamente.

7.2.5. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras se lleva 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 NukolTM (15m × 0.53mm × 0.5µm) de Supelco, utilizando acetato de butilo como estándar interno. En todos los casos, la temperatura en el inyector se fijó en 190 °C, se trabajó con presión constante de 1.89 psi (51 cm /s flujo lineal) en la cabeza de la columna y la relación de split de 7:9. En el detector, la temperatura fue de 220 °C y los caudal de gases en el mismo de 400 ml/min de aire sintético, 30 ml/min de hidrógeno y 20 ml/min de nitrógeno. 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.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: butirato de vinilo, 2.596 min.; acetato de butilo (estándar interno), 2.981min.; 1-butanol, 3.712 min.; butirato de butilo, 4.430 min.; ácido butírico, 7.339 min.

Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos, las cuales se mostraron en la **Tabla 4.4**.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

7.2.6. Cálculo de la permeabilidad de los compuestos a través de membranas líquidas soportadas

El transporte de compuestos se analizó a través del parámetro de permeabilidad. La **Figura 7.5** muestra el perfil de concentración de un compuesto que es transportado 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.

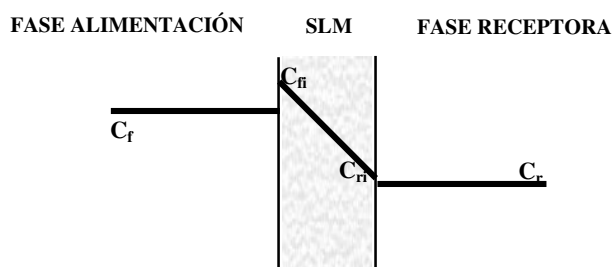


Figura 7.5. Ilustración esquemática del perfil de concentración de un soluto en un proceso basado en membranas líquidas soportadas.

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:

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

$$J = -\bar{P} (C_r - C_f) \quad (7.2)$$

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 (7.2) puede reescribirse como:

$$\frac{dN_r}{dt} = -\bar{P} A (C_r - C_f) \quad (7.3)$$

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:

$$N_r = C_r \cdot V_r \quad (7.4)$$

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 (3.7) puede ser expresada como:

$$\frac{dC_r}{dt} = -\frac{\bar{P} A (C_r - C_f)}{V} \quad (7.5)$$

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 (7.6) donde C_0 es la concentración inicial de soluto en la fase alimentación:

$$C_f = C_0 - C_r \quad \text{y} \quad (C_r - C_f) = 2C_r - C_0 \quad (7.6)$$

Combinando las ecuaciones (7.5) y (7.6) obtenemos la ecuación (7.7):

$$\frac{dC_r}{(2C_r - C_0)} = -\frac{\bar{P} A}{V} dt \quad (7.7)$$

La ecuación (7.7) puede ser analíticamente resuelta con la siguiente condición inicial:

$$t = 0, C_r = 0$$

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

y de contorno:

$$t = t, C_r = C_r$$

La integración de ambos términos de la ecuación (7.7) da lugar a la ecuación (7.8):

$$\ln \left[\frac{(C_0 - 2C_r)}{C_0} \right] = \frac{-2 \bar{P} A}{V} t \quad (7.8)$$

que muestra que $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$ es una función lineal de t . El valor de la permeabilidad para un soluto dado se calcula mediante la ecuación (7.9), de la pendiente m de la representación de $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$ frente a t :

$$\bar{P} = - \frac{mV}{2A} \quad (7.9)$$

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Selección de la membrana polimérica

En primer lugar se estudió la permeabilidad de cuatro compuestos implicados en una reacción de transesterificación (butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico) a través de membranas líquidas soportadas basadas en el líquido iónico 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato ($[bmim^+][PF_6^-]$) inmovilizado en cinco membranas orgánicas poliméricas diferentes: Fluoropore, Mitex, Durapore, Isopore y Nylon. El objetivo fue evaluar el efecto de la naturaleza de la membrana polimérica soporte en la permeabilidad y selectividad de las SLMs basadas en $[bmim^+][PF_6^-]$. Se realizaron también ensayos de transporte con las membranas poliméricas sin líquido iónico inmovilizado.

Se siguió la evolución de las concentraciones experimentales de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico en las fases 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}). En la **Figura 7.6** se muestra el perfil de concentraciones en los compartimentos alimentación y receptor cuando se utilizó la membrana de Nylon con $[bmim^+][PF_6^-]$ soportado.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

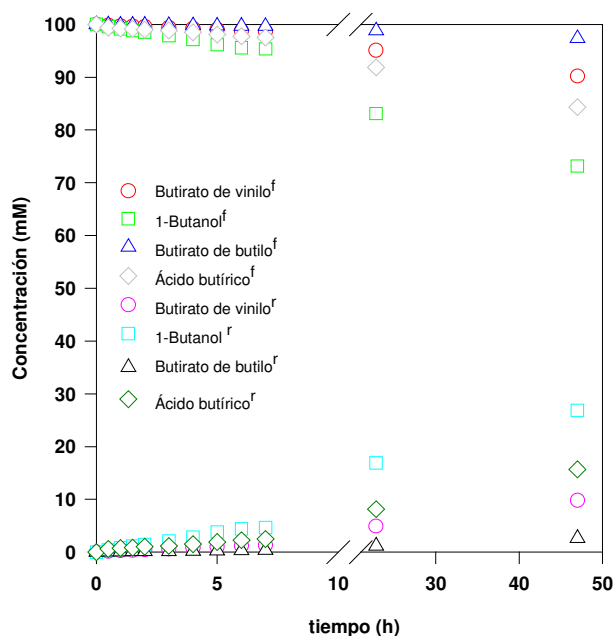


Figura 7.6. Perfiles de concentración de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de la membrana de Nylon con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado en la fase alimentación (superíndice *f*) y receptora (superíndice *r*)

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 (7.9). A título de ejemplo, en la **Figura 7.7** se muestran las representaciones gráficas usadas para el cálculo de las permeabilidades de los compuestos a través de la membrana de Nylon con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado. El resto de perfiles se encuentran recogidos en el Anexo III (Figuras 13.45 a 13.84).

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

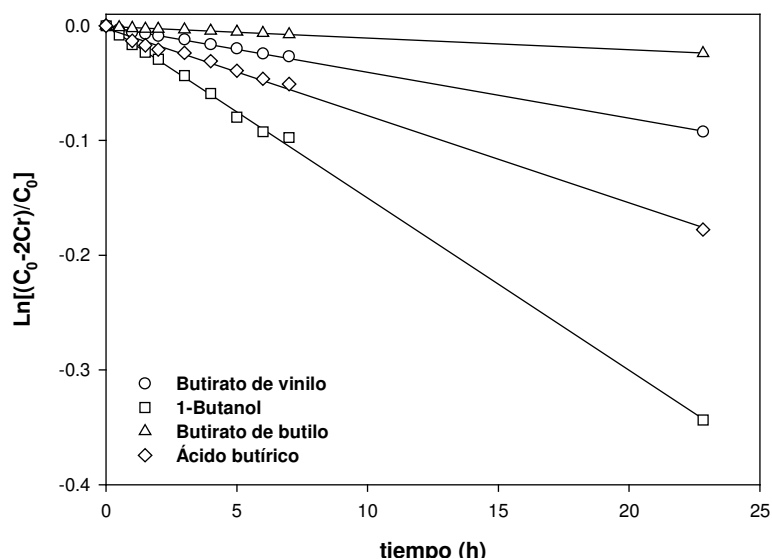


Figura 7.7. Representación gráfica de $\ln[(C_0 - 2C_r)/C_0]$ frente a t para el transporte de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de la membrana de Nylon con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado.

Los valores de permeabilidad para cada compuesto a través de las diferentes membranas con y sin líquido iónico inmovilizado se recogen en la **Tabla 7.3**.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

Tabla 7.3. Permeabilidades de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de las membranas poliméricas objeto de estudio, con y sin [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

Membrana	Permeabilidad × 10 ⁶ (cm/s)			
	Butirato de vinilo	1-Butanol	Butirato de butilo	Ácido butírico
Fluoropore	466.2	516.2	486.3	377.3
Fluoropore con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	190.7	159.0	200.8	200.8
Mitex	261.3	237.1	228.3	225.2
Mitex con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	246.0	206.3	200.8	156.7
Durapore	335.3	325.5	420.8	461.8
Durapore con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	25.5	64.2	20.3	30.5
Isopore	436.7	598.5	472.0	703.3
Isopore con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	92.3	88.8	24.3	122.2
Nylon	294.5	275.2	323.2	296.8
Nylon con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	3.75	14.7	0.9	6.6

Los valores de permeabilidad obtenidos en membranas sin líquido iónico inmovilizado fueron significativamente mayores que los obtenidos con membranas líquidas soportadas. Esto puede ser explicado por el hecho de que las membranas líquidas introducen una resistencia adicional a la transferencia de materia en el transporte de los compuestos.

Además, como puede ser observado en la **Tabla 7.3**, en las membranas poliméricas sin líquido iónico soportado no se encontraron diferencias apreciables entre las permeabilidades de los diferentes compuestos, por lo que estas membranas no son adecuadas para ser utilizadas en la separación selectiva de los compuestos de interés. La situación cambia drásticamente cuando se inmoviliza [bmim⁺][PF₆⁻] en las membranas poliméricas, en cuyo caso los compuestos mostraron diferencias notables de permeabilidad debido a que el líquido iónico ofrece una resistencia a la transferencia de materia diferente para cada compuesto.

Con el fin de establecer un criterio numérico para comparar la capacidad de las diferentes membranas de separar los compuestos de interés se ha introducido un nuevo

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

parámetro al que denominamos *permeoselectividad media de la membrana* ($r\bar{P}$), definido como:

$$r\bar{P} = \frac{\sum_i^n rP_i}{n} \quad \text{con } rP_i > 1 \quad (7.10)$$

siendo rP_i la permeoselectividad que muestra la membrana al transporte de dos compuestos (p.e. 1-butanol y butirato de butilo) y n el número de parejas posibles entre los diferentes compuestos. rP_i se expresa como el cociente de las permeabilidades individuales de dos compuestos:

$$rP_i = \frac{\bar{P}_A}{\bar{P}_B} \quad (7.11)$$

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 selectiva. En la **Tabla 7.4** se recogen los valores de $r\bar{P}$ para las diferentes membranas líquidas soportadas.

Tabla 7.4. Permeoselectividades medias de la membranas líquidas soportadas estudiadas basadas en [bmim⁺][PF₆⁻]

SLM	$r\bar{P}$
Fluoropore	1.02
Mitex	1.01
Durapore	1.03
Isopore	1.05
Nylon	1.04
Fluoropore con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	1.14
Mitex con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	1.27
Durapore con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	1.95
Isopore con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	2.70
Nylon con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	6.07

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

Como se puede observar en esta **Tabla 7.4**, ninguna de las membranas orgánicas poliméricas sin líquido iónico inmovilizado podría utilizarse para la separación selectiva de los compuestos de interés. Sin embargo, la inmovilización del líquido iónico resultó en un aumento de la selectividad de la separación, especialmente notable cuando se utilizaron las membranas de Nylon e Isopore como membranas orgánicas soporte. Para las membranas de Fluoropore y Mitex, la eficacia de la separación obtenida fue baja, mientras que Durapore mostró una eficacia de separación ligeramente superior a las dos membranas anteriores. Teniendo en cuenta el carácter hidrofóbico/hidrofílico de las membranas poliméricas estudiadas, se puede concluir que los mejores resultados se obtuvieron cuando se inmovilizó $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ en membranas de naturaleza hidrofílica (Nylon e Isopore). Esto puede ser explicado por el hecho de que las interacciones entre los iones constituyentes del líquido iónico y las membranas orgánicas hidrofílicas podrían ser mayores que cuando se utilizan membranas hidrofóbicas, lo cual haría posible una inmovilización del líquido iónico más eficiente en las primeras.

Dado que se observó que la membrana de Nylon era la membrana polimérica más adecuada, fue ésta la membrana seleccionada para posteriores estudios.

7.3.2. Efecto de la fase líquida soportada

En segundo lugar se estudió la permeabilidad de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de membranas líquidas soportadas basadas en los líquidos iónicos $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, utilizando como membrana polimérica soporte la membrana de Nylon, con el fin de investigar la influencia de la membrana iónica líquida en el transporte de los compuestos.

Las representaciones gráficas para el cálculo de permeabilidades de los compuestos a través de la membrana de Nylon con $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado se encuentran recogidas en el Anexo III (Figuras 13.85 a 13.88). La **Figura 7.8** ilustra el perfil de concentraciones para butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico en el compartimento receptor cuando se utilizó la membrana de Nylon sin líquido iónico (A), con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado (B) y con $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado (C).

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

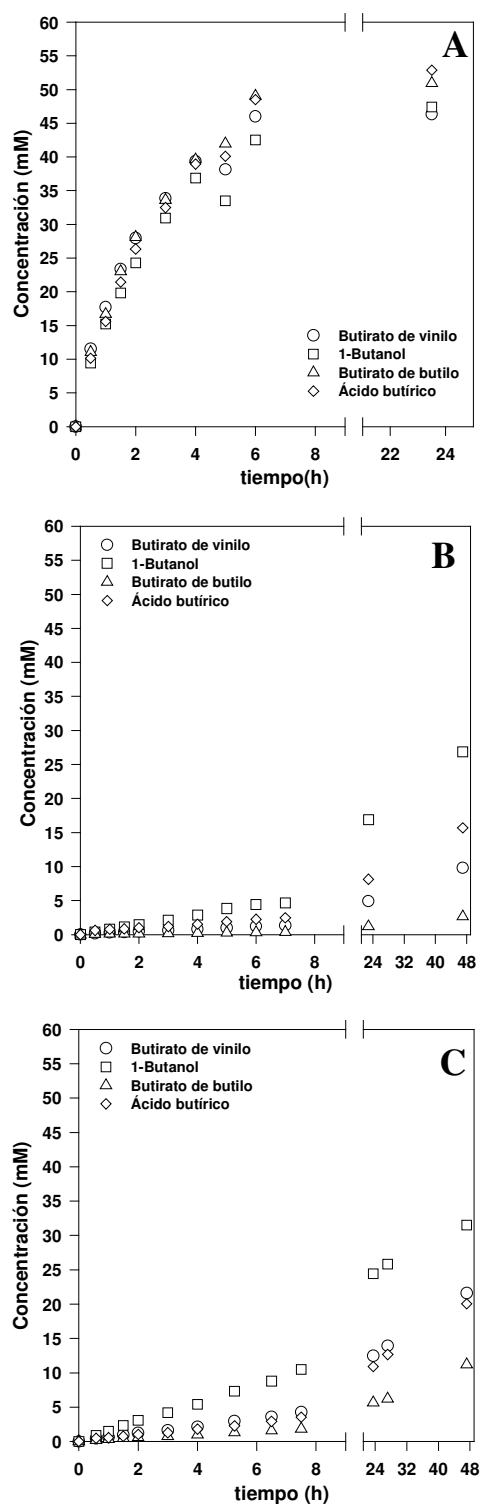


Figura 7.8 Perfil de concentraciones de los compuestos en el compartimento receptor: Nylon sin líquido iónico (A), con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado (B) y con $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado (C).

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

Como queda reflejado en las representaciones gráficas anteriores, se observan diferencias significativas de permeabilidad entre los distintos compuestos (butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico) cuando se utilizan los líquidos iónicos como fases líquidas soportadas.

Se determinaron las permeosselectividades medias de ambas membranas líquidas soportadas obteniéndose un valor más elevado para la membrana de Nylon con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ (6.07) en relación a la membrana de Nylon con $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ (2.78), lo que confirma el mejor comportamiento de la SLM basada en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ para la separación selectiva de los compuestos objeto de estudio.

Para entender el mecanismo molecular implicado en el fenómeno de transporte a través de SLM se determinaron los coeficientes de reparto de los diferentes compuestos entre los líquidos iónicos y n-hexano (**Tabla 7.5**).

Tabla 7.5. Coeficientes de reparto de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico entre los líquidos iónicos, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, y n-hexano

IL	K			
	Butirato de vinilo	1-Butanol	Butirato de butilo	Ácido butírico
$[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$	0.47	2.46	0.17	1.12
$[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$	0.68	3.63	0.35	1.57

Los compuestos con un elevado valor de K se absorbieron más fuertemente en los líquidos iónicos.

Como se puede observar en la **Figura 7.9**, los valores de permeabilidad fueron mayores cuando se utilizó la membrana de Nylon con $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado. Esto podría ser explicado por el hecho de que los coeficientes de reparto IL/hexano (K) de los diferentes compuestos fueron mayores para este líquido iónico.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

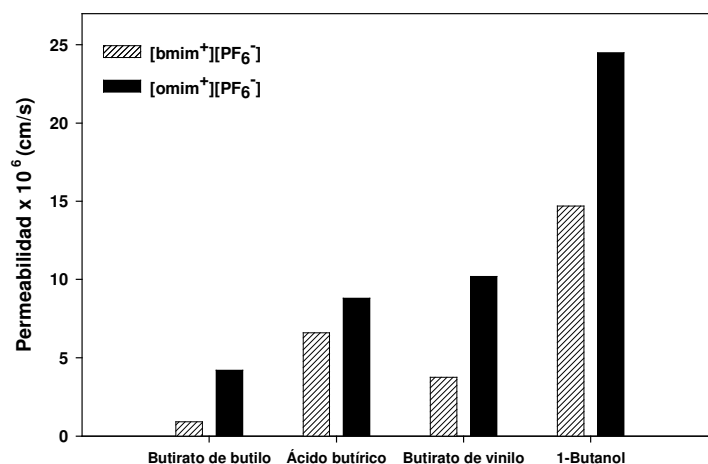


Figura 7.9. Comparación de las permeabilidades de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de SLMs basadas en la membrana de Nylon con [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻] soportado, respectivamente.

Comparando los valores de K y \bar{P} para la misma SLM, se puede observar que el aumento de los valores de K de los distintos compuestos coincide con el aumento observado de los valores de \bar{P} de los mismos. Se puede por tanto concluir que el transporte está principalmente regulado por la afinidad del líquido iónico por cada compuesto. Otros autores también han observado un comportamiento similar. Así, Branco *et al.*[14] sugirieron que la alta selectividad en el transporte de una mezcla de aminas isoméricas orgánicas obtenida usando SLMs basadas en un líquidos iónicos podía ser explicada por la afinidad de cada amina hacia el líquido iónico.

La relación establecida entre \bar{P} y K sugiere que la capacidad de una membrana dada para separar los compuestos de interés podría ser estimada de manera simple evaluando los coeficientes de reparto de cada compuesto entre la fase alimentación/receptora y la fase líquida soportada en la membrana.

7.3.3. Estabilidad operacional de las membranas líquidas soportadas

La estabilidad operacional de las membranas líquidas soportadas es una de las mayores limitaciones de esta técnica de separación [17]. Por lo tanto, es fundamental analizar la estabilidad operacional de la membrana de Nylon con [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻] soportado. Para ello, se realizaron ocho ciclos de operación consecutivos de 48 horas cada uno con la misma SLM, usando en cada ciclo disoluciones de n-hexano nuevas en los dos compartimentos.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

La **Figura 7.10** muestra la evolución de los valores de permeoselectividad media de ambas membranas con el número de ciclos de operación. Se observa claramente en la figura que los valores de permeoselectividad media de ambas membranas permanecen prácticamente constantes (dentro del error experimental) durante el transcurso de los ocho ciclos de operación.

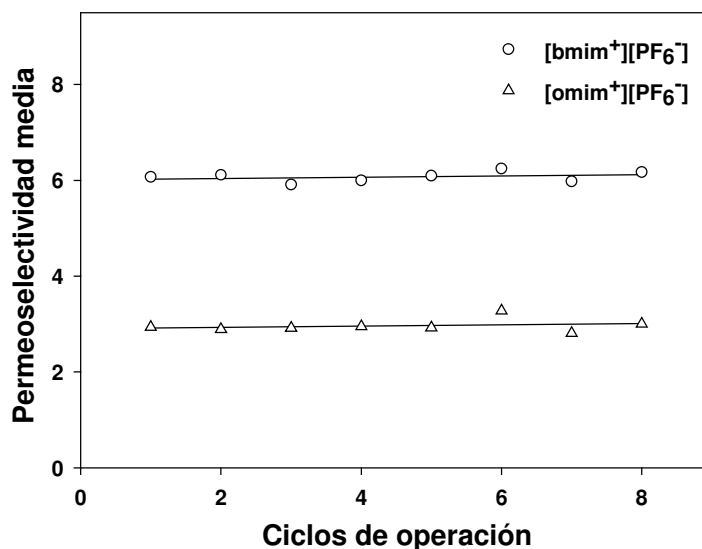


Figura 7.10. Estabilidad operacional de SLMs basadas en la membrana de Nylon con [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻] soportado durante ocho ciclos consecutivos de operación de 48 horas cada uno.

Esta observación nos permite concluir que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, la pérdida de líquido iónico de la SLM es insignificante, demostrando así la alta estabilidad operacional de las SLMs en estudio, las cuales permitirían llevar a cabo procesos de separación selectiva de sustratos y productos de reacciones de transesterificación con rendimientos altos a largo plazo. Otros autores han observado también una alta estabilidad operacional en SLMs basadas en líquidos iónicos utilizando agua como fase alimentación y receptora [17-19].

7.4. CONCLUSIONES

Se ha analizado el transporte de los sustratos y productos de una reacción de transesterificación, en concreto de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico, a través de SLMs basadas en líquidos iónicos. En primer lugar se estudió la permeabilidad de los compuestos de interés a través de SLMs basadas en el líquido iónico [bmim⁺][PF₆⁻] inmovilizado en cinco membranas poliméricas, observándose que las membranas de naturaleza hidrofílica llevaban a cabo la separación de estos compuestos de forma más selectiva. La membrana de Nylon resultó la más adecuada para llevar a cabo esta separación. Se analizó entonces el transporte de los compuestos de interés utilizando [omim⁺][PF₆⁻] como fase soportada en la membrana de Nylon, resultando esta membrana más permeable pero menos selectiva que su análoga con [bmim⁺][PF₆⁻] inmovilizado.

Se ha comprobado que el aumento de los valores de permeabilidad de los compuestos a través de las SLMs está asociado al aumento de los coeficientes de reparto de los mismos entre el líquido iónico y n-hexano, lo que permite concluir que el transporte a través de SLMs basadas en líquidos iónicos está principalmente regulado por la afinidad del líquido iónico hacia cada compuesto. Las membranas convencionales utilizadas en la industria farmacéutica separan los compuestos por tamaño molecular, no siendo capaces de hacerlo por grupo funcional. La gran ventaja de las SLMs obtenidas en este trabajo es que permiten la separación selectiva de los compuestos en base a su grupo funcional, como está actualmente demandando la industria de química fina.

Finalmente, se ha analizado la estabilidad operacional de las SLMs obtenidas, observándose un excelente comportamiento operacional de las mismas.

Por todo lo anterior, los resultados de este estudio sugieren la posibilidad de incorporar las SLMs obtenidas en futuros procesos de reacción/separación.

7.5. NOMENCLATURA

K	Coefficiente de reparto IL/hexano (adimensional).
V_H	volumen de la fase hexano (mL).
V_{IL}	volumen de la fase líquido iónico (mL).
$C_{H(0)}$	concentración de soluto en la fase hexano antes del proceso de extracción ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).
$C_{H(t)}$	concentración de soluto en la fase hexano después del proceso de extracción ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).
J	flujo másico de soluto ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).
\bar{P}	permeabilidad de la membrana a un compuesto ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$).
\bar{P}_A	permeabilidad de la membrana al compuesto A ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$).
\bar{P}_B	permeabilidad de la membrana al compuesto B ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$).
C_f	concentración de soluto en la fase alimentación ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).
C_r	concentración de soluto en la fase receptora ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).
N_r	moles de soluto en la fase receptora (mol).
A	área de la membrana (cm^2).
t	tiempo (s).
V_f	volumen de la fase alimentación (mL).
V_r	volumen de la fase receptora (mL).
V	volumen de los compartimentos (mL).
C_0	concentración inicial de soluto en la fase alimentación ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).
rP_i	permeoselectividad de la membrana al transporte de dos compuestos (adimensional).
$r\bar{P}$	permeoselectividad media de la membrana (adimensional).

7.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.G. Crespo, I.M. Coelho, R.M.C. Viegas, *Encyclopedia of Separation Processes*, Academic Press, San Diego (2000) 3303-3311.
- [2] A. Poliwoda, N. Ilczuk, P.P. Wiczorek, Transport of peptides through supported liquid membranes, *Sep. Purif. Technol. En prensa*.
- [3] G. Muthuramam, K. Palanivelu, Transport of textile dye in vegetable oils based supported liquid membrane, *Dyes Pigments* 70 (2006) 99-104.
- [4] S. Happel, R. Streng, P. Vater, W. Ensinger, Sr/Y separation by supported liquid membranes based on nuclear track micro filters, *Radiat. Measurement* 36 (2003) 761-766.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] P. Bonhôte, A.-P. Dias, N. Papageorgio, K. Kalayanasundaram, M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts, *Inorg. Chem.* 35 (5) (1996) 1168-1178.
- [10] T. Welton, Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2083.
- [11] 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.

7. SLMs en la separación selectiva de compuestos de reacciones de transesterificación

- [12] 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.
- [13] 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, R.D. Rogers, K. R. Seddon (Eds.), *Ionic Liquids: Industrial applications to Green Chemistry*, ACS Symposium Series 818, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 2002, 68.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] K. Scott, *Handbook of industrial membranes*, Elsevier Advanced Technology, Oxford, UK, 1998.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.

8

**Estudio del mecanismo de transporte
de sustratos y productos de reacciones
de transesterificación a través de
membranas líquidas soportadas
basadas en líquidos iónicos**

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

8. ESTUDIO DEL MECANISMO DE TRANSPORTE DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS

8.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se mostró el enorme potencial que las membranas líquidas soportadas (SLMs) basadas en líquidos iónicos (ILs) presentan en la separación selectiva de los sustratos y productos de una reacción de transesterificación (butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico). Además, se observó una relación entre los valores de permeabilidad de los diferentes compuestos a través de las SLMs y los coeficientes de reparto de éstos entre las fases alimentación/receptora y los líquidos iónicos inmovilizados en la membrana polimérica. Esta observación constituyó la base para profundizar en el estudio del mecanismo molecular implicado en el fenómeno de transporte a través de SLMs basadas en ILs.

Con este fin, se ha analizado la permeabilidad de dieciséis compuestos orgánicos implicados en reacciones de transesterificación (ésteres vinílicos, alcoholes, ésteres alquílicos y ácidos carboxílicos) a través de membranas de poliamida (Nylon) con los líquidos iónicos [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻] inmovilizados, prestando especial atención a la influencia de la longitud de cadena y del grupo funcional de estos compuestos en sus valores de permeabilidad. Además, se han determinado los coeficientes de reparto de los compuestos entre los líquidos iónicos y la fase alimentación/receptora (n-hexano) y se ha establecido una relación matemática entre este parámetro y la permeabilidad de los mismos.

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

8.2.1. Membranas y materiales

En este estudio se ha utilizado como membrana polimérica soporte una membrana hidrofílica plana de poliamida (NYLON[®] 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 µm y el espesor de la membrana de 170 µm.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILS

Los líquidos iónicos [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻] fueron suministrado con una pureza > 99% por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania). Los reactivos químicos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España) y fueron de la mayor pureza disponible.

Los reactivos químicos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A. (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).

8.2.2. Preparación de membranas líquidas soportadas

La inmovilización del líquido iónico se llevó a cabo haciendo uso de una célula de ultrafiltración AmiconTH de 10 mL, describiéndose en detalle el procedimiento de preparación en el apartado 7.2.2.

8.2.3. Estudios de transporte

Los estudios de transporte se llevaron a cabo a 30 °C 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 procedimiento experimental se encuentran recogidos en el apartado 7.2.3

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 7.2.6).

$$\ln \left[\frac{(C_0 - 2C_r)}{C_0} \right] = \frac{-2 \bar{P} A}{V} t \quad (8.1)$$

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 (cm^2) y V es el volumen de los compartimentos (mL).

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILS

8.2.4. Determinación de los coeficientes de reparto de los compuestos entre líquido iónico y n-hexano

Los coeficientes de reparto de los compuestos entre los líquidos iónicos y n-hexano se determinaron mediante el método de agitación rápida (*shake-flask method*), describiéndose en detalle el procedimiento experimental en el apartado 7.2.4.

Para calcular los coeficientes de reparto de los distintos compuestos entre el líquido iónico y n-hexano se utiliza la siguiente expresión:

$$K = \left(\frac{C_{H(0)} - C_{H(t)}}{C_{H(t)}} \right) \quad (8.2)$$

donde $C_{H(0)}$ y $C_{H(t)}$ son las concentraciones medidas de soluto en la fase hexano antes y después del proceso de extracción, respectivamente.

8.2.5. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras se lleva 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 NukolTM (15m × 0.53mm × 0.5µm) de Supelco.

Se trabaja a presión constante y con relación de split de 7.9:1. En el detector, la temperatura es de 220° C y los caudales de gases en fueron de 400 mL/min de aire sintético, 30 mL/min de hidrógeno y 20mL/min de nitrógeno. Estas condiciones se han mantenido constantes para todos los análisis realizados. La presión en la cabeza de la columna y la temperatura de la columna se programaron 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. Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos.

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.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILS

Sistema 1: *Acetato de vinilo, metanol, acetato de metilo y ácido acético*

Se trabaja con presión constante de 1 psi en la cabeza de la columna. La velocidad lineal en la columna fue de 23 cm/s.

El perfil de temperatura es el siguiente: 25 °C, 4 min; 20 °C/min, 190 °C.

En la **Figura 8.2** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

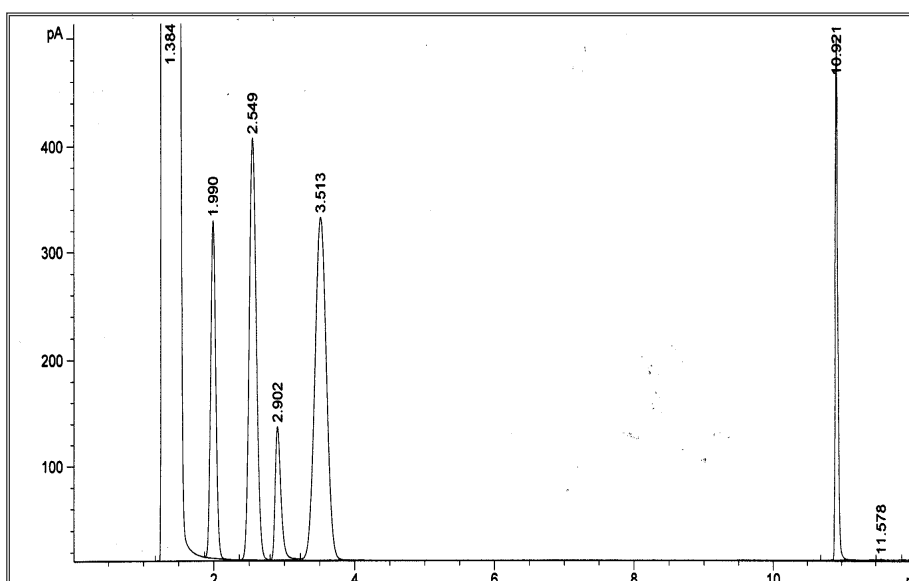


Figura 8.2. Cromatograma del sistema: acetato de vinilo, metanol, acetato de metilo y ácido acético.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: acetato de metilo, 2.990 min.; acetato de vinilo, 2.549 min.; metanol, 2.902 min.; propionato de etilo (estándar interno), 3.513 min.; ácido acético, 10.921 min.

En la **Tabla 8.1** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para este sistema.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

Tabla 8.1. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: acetato de vinilo, metanol, acetato de metilo y ácido acético.

Compuesto	m = pendiente
ACETATO VINILO $\text{CH}_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$	1.849
METANOL CH_3OH	6.5901
ACETATO METILO $\text{CH}_3\text{COOCH}_3$	3.0723
ÁCIDO ACÉTICO CH_3COOH	3.761

Sistema 2: *Propionato de vinilo, 1-propanol, propionato de metilo y ácido propiónico*

Se trabaja con presión constante de 1.50 psi en la cabeza de la columna. La velocidad lineal en la columna fue de 33 cm/s.

El perfil de temperatura es el siguiente: 30 °C, 4 min; 7 °C/min, 135 °C.

En la **Figura 8.3** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

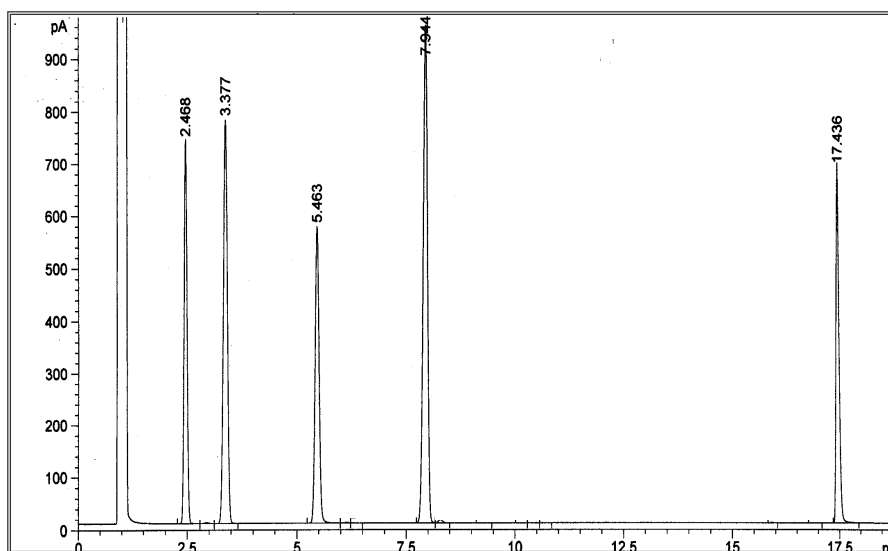


Figura 8.3. Cromatograma del sistema: propionato de vinilo, 1-propanol, propionato de metilo, ácido propiónico.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILS

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: propionato de metilo, 2.468 min.; propionato de vinilo, 3.377 min.; 1-propanol, 5.463 min.; propionato de butilo(estándar interno), 7.944 min.; ácido propiónico, 17.436 min.

En la **Tabla 8.2** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para este sistema.

Tabla 8.2. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: propionato de vinilo, 1-propanol, propionato de metilo y ácido propiónico.

Compuesto	m = pendiente
PROPIONATO VINILO $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}=\text{CH}_2$	1.8361
1-PROPANOL $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	2.3212
PROPIONATO METILO $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	2.5577
ÁCIDO PROPIONICO $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	2.6221

Sistema 3: *Butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico*

Se trabajó con presión constante de 1.89 psi en la cabeza de la columna. La velocidad lineal en la columna fue de 51 cm/s.

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

Los tiempos de retención de los compuestos fueron los siguientes: butirato de vinilo, 2.596 min.; acetato de butilo (estándar interno), 2.981min.; 1-butanol, 3.712 min.; butirato de butilo, 4.430 min.; ácido butírico, 7.339 min.

Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos, las cuales se mostraron en la **Tabla 4.4**.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

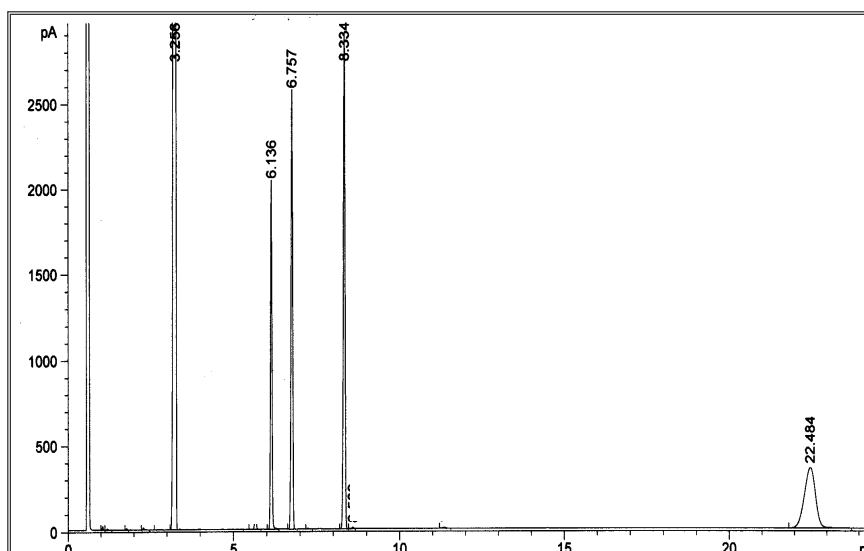
Sistema 4: Laurato de vinilo, 1-octanol, decanoato de etilo y ácido láurico

Se trabaja con presión constante de 2.50 psi en la cabeza de la columna. La velocidad lineal en la columna fue de 54 cm/s.

El perfil de temperatura fue el siguiente: 40 °C, 0 min; 15 °C/min, 170°C; 170 °C, 9 min.

En la **Figura 8.4** se recoge un cromatograma típico obtenido para este sistema.

Figura 8.4. Cromatograma del sistema: laurato de vinilo, 1-octanol, decanoato de etilo y ácido láurico.



Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: hexanoato de etilo (estándar interno), 3.266 min.; 1-octanol, 6.136 min.; decanoato de etilo, 6.757 min.; laurato de vinilo, 8.334 min.; ácido láurico, 22.484 min.

En la **Tabla 8.4** se muestran los valores de las pendientes de las rectas de calibrado para este sistema.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

Tabla 8.4. Pendientes de las rectas de calibrado del sistema: laurato de vinilo, 1-octanol, decanoato de etilo y ácido láurico.

Compuesto	m = pendiente
LAURATO VINILO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOCH}=\text{CH}_2$	0.4911
OCTANOL $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$	0.8348
ETIL DECANOATO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	0.5791
ÁCIDO LAÚRICO $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	0.5562

8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1. Estudios de transporte

Se estudió la permeabilidad de dieciséis compuestos implicados en reacciones de transesterificación (ésteres vinílicos, alcoholes, ésteres alquílicos y ácidos carboxílicos) a través de membranas líquidas soportadas basadas en la membrana de Nylon con los líquidos iónicos 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, y 1-octil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, inmovilizados. Se seleccionó la membrana de Nylon como membrana soporte ya que, como se mostró en el capítulo anterior, esta membrana fue la más adecuada entre las estudiadas. También se llevaron a cabo ensayos de transporte de los compuestos a través de la membrana de Nylon sin líquido iónico soportado.

Se siguió la evolución de las concentraciones experimentales de los compuestos en las fases alimentación y receptora a lo largo de 48 horas, y se utilizaron las concentraciones de la fase receptora para calcular las permeabilidades individuales de los compuestos (\bar{P}). Así, 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 (8.1). A título de ejemplo, en la **Figura 8.5** se muestran las representaciones gráficas usadas para el cálculo de las permeabilidades de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de la membrana de Nylon con $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado. El resto de perfiles se encuentran recogidos en el Anexo III (Figuras 13.61 a 13.64, 13.81 a 13.124).

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

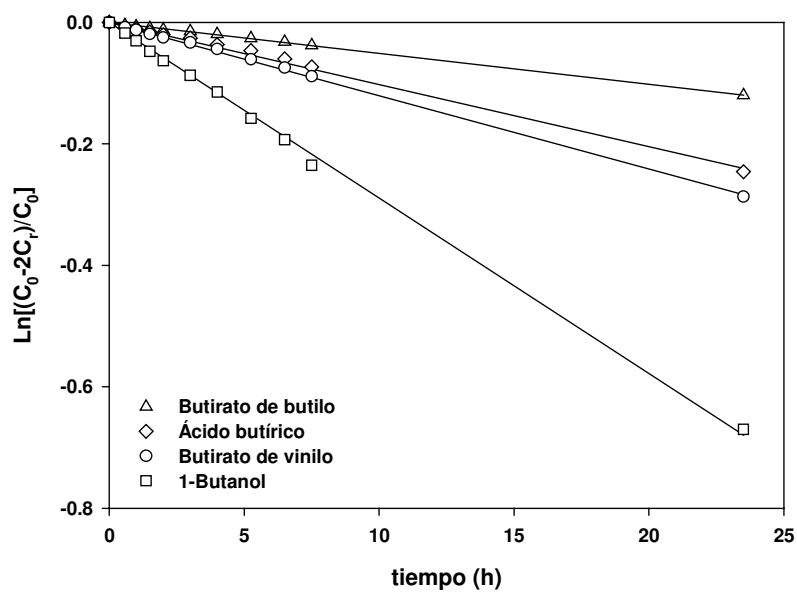


Figura 8.5. Representación gráfica de $\ln[(C_0 - 2C_t)/C_0]$ frente a t para el transporte de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de la membrana de Nylon con $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado.

Los valores de permeabilidad para cada compuesto a través de las diferentes membranas con y sin líquido iónico inmovilizado se recogen en la **Tabla 8.5**.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

Tabla 8.5. Permeabilidad de dieciséis compuestos orgánicos (ésteres vinílicos, alcoholes, ésteres alquílicos y ácidos carboxílicos) a través de la membrana de Nylon sin líquido iónico inmovilizado y con los líquidos iónicos [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻] inmovilizados.

Compuestos	Permeabilidad de los compuestos × 10 ⁶ (cm/s)		
	Nylon sin líquido iónico	Nylon con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	Nylon con [omim ⁺][PF ₆ ⁻]
Acetato de vinilo (C ₄ H ₆ O ₂)	592.5	39.9	49.8
Propionato de vinilo (C ₅ H ₈ O ₂)	504.2	7.9	16.9
Butirato de vinilo (C ₆ H ₁₀ O ₂)	294.5	3.8	10.2
Laurato de vinilo (C ₁₄ H ₂₆ O ₂)	293.0	1.9	0.5
Acetato de metilo (C ₃ H ₆ O ₂)	756.5	57.5	72.0
Propionato de metilo (C ₄ H ₈ O ₂)	582.4	12.8	25.7
Butirato de butilo (C ₈ H ₁₆ O ₂)	323.2	0.9	4.2
Decanoato de etilo (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	289.0	1.8	0.8
Metanol (C ₁ H ₄ O)	376.1	251.8	178.5
1-Propanol (C ₃ H ₈ O)	444.2	29.3	37.3
1-Butanol (C ₄ H ₁₀ O)	275.3	14.7	24.5
1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	226.6	3.8	3.8
Ácido acético (C ₂ H ₄ O ₂)	546.1	96.3	72.1
Ácido propiónico (C ₃ H ₆ O ₂)	392.0	11.5	14.9
Ácido butírico (C ₄ H ₈ O ₂)	296.9	6.6	8.7
Ácido laúrico (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	197.4	3.3	1.9

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILS

Los valores de permeabilidad obtenidos en membranas sin líquido iónico inmovilizado fueron significativamente mayores que los obtenidos con membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos. Esto puede explicarse por el hecho de que las membranas líquidas introducen una resistencia adicional a la transferencia de materia en el transporte de los compuestos.

Sin embargo, como puede observarse en la **Tabla 8.5**, en las membranas poliméricas sin líquido iónico soportado no se encontraron diferencias apreciables entre las permeabilidades de los diferentes compuestos, por lo que estas membranas no son adecuadas para ser utilizadas en la separación selectiva de los compuestos de interés. La situación cambia drásticamente cuando se inmoviliza $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ en las membranas poliméricas, en cuyo caso los compuestos muestran diferencias notables de permeabilidad debido a que los líquidos iónicos ofrecen diferente resistencia a la transferencia de materia para cada compuesto.

La influencia del líquido iónico en los valores de permeabilidad puede ser apreciada comparando los valores de permeabilidad de un mismo compuesto orgánico en distintas membranas líquidas soportadas. Así, como puede observarse en la **Tabla 8.5**, los valores de permeabilidad obtenidos para membranas líquidas soportadas basadas en $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ fueron, en la mayor parte de los compuestos objeto de estudio, mayores que los obtenidos cuando se inmovilizó $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ en la membrana de Nylon, lo que implica que un aumento en la longitud de cadena del sustituyente alquílico del catión constituyente del líquido iónico tiene, en muchos casos, como consecuencia un aumento de los valores de permeabilidad.

En la **Figura 8.6**, se recogen los valores de permeabilidad de los compuestos orgánicos que poseen el mismo grupo funcional para evaluar el efecto de la longitud de cadena (número de átomos de carbono) de los mismos en su transporte a través de las SLMs basadas en los líquidos iónicos.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

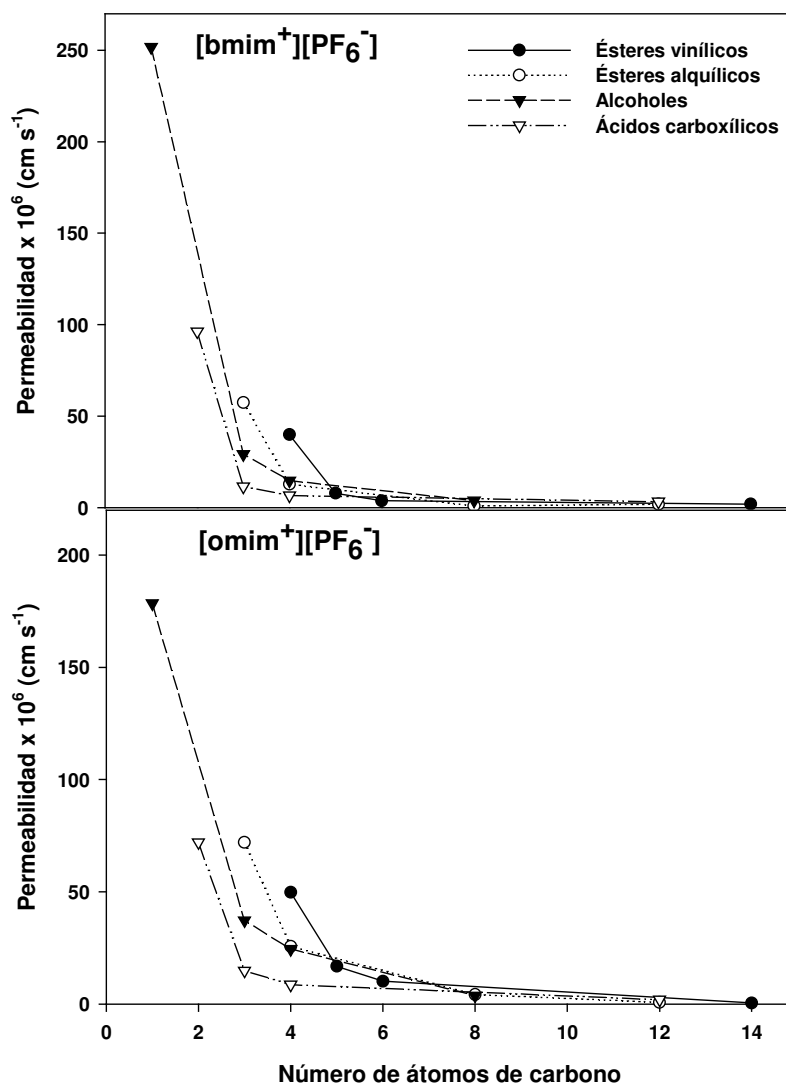


Figura 8.6. Efecto de la longitud de cadena de los compuestos orgánicos estudiados sobre sus valores de permeabilidad a través de las SLMs basadas en [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻].

Como puede observarse en la **Figura 8.6.**, para compuestos con un mismo grupo funcional, los valores de permeabilidad de éstos a través de las SLMs basadas en [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻] aumentaron conforme disminuyó la longitud de cadena de los mismos.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

De la **Figura 8.6** se desprende también que los valores de permeabilidad de los compuestos con el mismo número de átomos de carbono y diferente grupo funcional disminuyen en la serie: ésteres > alcoholes > ácidos. Además, las diferencias de permeabilidad encontradas entre los diferentes grupos funcionales aumentaron conforme disminuyó el número de átomos de carbono de los mismos.

8.3.2. Estimación de los valores de permeabilidad de sustratos y productos de reacciones de transesterificación a través de membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos

En el capítulo 7 se observó una relación entre los valores de permeabilidad de diversos compuestos (\bar{P}) y los coeficientes de reparto de éstos entre la fase líquida inmovilizada en la membrana (i.e. líquido iónico) y la fase alimentación/receptora (K), encontrando que un aumento en los valores de K de éstos se reflejaba en un aumento en los valores de \bar{P} de los mismos [1]. Esta misma tendencia fue observada por Branco *et al.* [2] para otro tipo de compuestos.

Para entender esta relación entre los valores de \bar{P} y K se han determinado los coeficientes de reparto de los compuestos orgánicos objeto de estudio entre los líquidos iónicos ([bmim⁺][PF₆⁻] u [omim⁺][PF₆⁻]) y n-hexano (fase alimentación/receptora) (**Tabla 8.6**).

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

Tabla 8.6. Coeficientes de reparto de dieciséis compuestos orgánicos (ésteres vinílicos, alcoholes, ésteres alquílicos y ácidos carboxílicos) entre los líquidos iónicos, [bmim⁺][PF₆⁻] u [omim⁺][PF₆⁻], y n-hexano.

Compuestos	K	
	[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]/n-hexano	[omim ⁺][PF ₆ ⁻]/n-hexano
Acetato de vinilo (C ₄ H ₆ O ₂)	1.57	1.42
Propionato de vinilo (C ₅ H ₈ O ₂)	0.73	1.15
Butirato de vinilo (C ₆ H ₁₀ O ₂)	0.47	0.68
Laurato de vinilo (C ₁₄ H ₂₆ O ₂)	0.03	0.10
Acetato de metilo (C ₃ H ₆ O ₂)	2.82	2.33
Propionato de metilo (C ₄ H ₈ O ₂)	1.28	1.77
Butirato de butilo (C ₈ H ₁₆ O ₂)	0.17	0.35
Decanoato de etilo (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	0.03	0.17
Metanol (C ₁ H ₄ O)	30.51	19.09
1-Propanol (C ₃ H ₈ O)	5.10	6.39
1-Butanol (C ₄ H ₁₀ O)	2.46	3.63
1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	0.18	1.36
Ácido acético (C ₂ H ₄ O ₂)	12.17	5.81
Ácido propiónico (C ₃ H ₆ O ₂)	2.66	2.43
Ácido butírico (C ₄ H ₈ O ₂)	1.12	1.57
Ácido láurico (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	0.04	0.28

Por definición, los compuestos con un coeficiente de reparto IL/hexano (*K*) más alto se absorben más fuertemente en el líquido iónico.

En primer lugar se evaluó la influencia de la longitud de cadena de los compuestos en estudio sobre los valores de *K* (**Figura 8.7**)

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

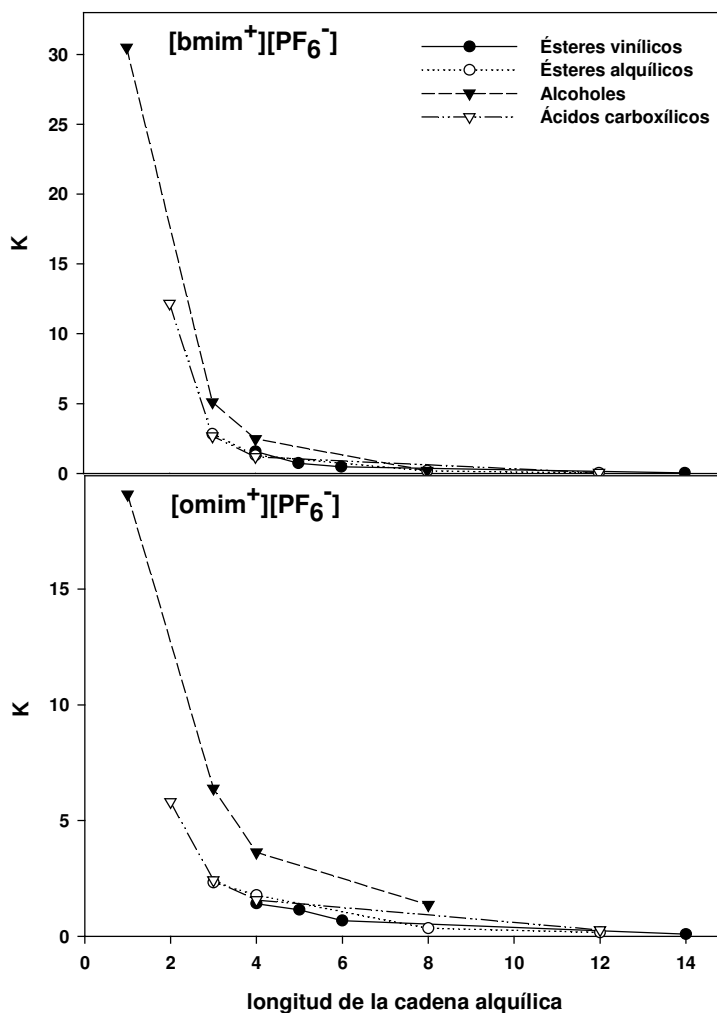


Figura 8.7. Efecto de la longitud de cadena de los compuestos orgánicos estudiados sobre los valores de sus coeficientes de reparto IL/hexano (K).

Como puede observarse en la **Figura 8.7**, los coeficientes de reparto IL/hexano de los compuestos con un mismo grupo funcional disminuyen al aumentar la longitud de la cadena alquílica de los mismos, obteniéndose además valores de K mayores cuando se utilizó [omim⁺][PF₆⁻]. Este mismo comportamiento fue observado para los valores de \bar{P} (**Figura 8.6**). Además, comparando los valores de K y \bar{P} para un mismo líquido iónico, se observa que el aumento de los valores de K para un compuesto dado coincide con el aumento de los valores de \bar{P} observados para este mismo compuesto. Estos resultados indican que existe una clara relación entre \bar{P} y K .

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILS

Con el fin de dilucidar la relación matemática entre \bar{P} y K se analizó el mecanismo de transporte de solutos a través de las SLMs. El transporte de soluto se produce por el gradiente de concentración existente entre las fases alimentación y receptora, por lo que el flujo de los compuestos orgánicos vendrá dado por la primera ley de Fick. Bajo la hipótesis de que no existe polarización por concentración en las interfases de la membrana, ya que ambos compartimentos están rigurosamente agitados, el proceso de transporte de solutos desde la fase alimentación a la fase receptora implica cinco etapas consecutivas (**Figura 8.8**):

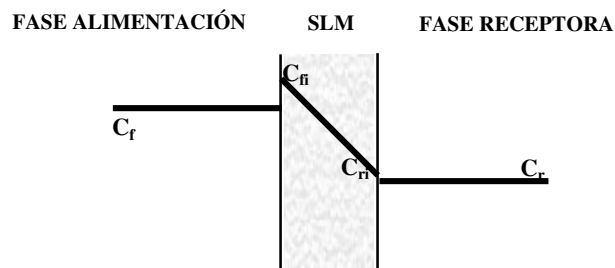


Figura 8.8. Ilustración esquemática del perfil de concentración de un soluto en un proceso basado en membranas líquidas soportadas.

- 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 la membrana ni en las fases líquidas, la ecuación que describe el proceso completo de permeación es la siguiente:

$$J = \bar{P} (C_f - C_r) \quad (8.3)$$

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILS

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.

La concentración del soluto en las fases alimentación (C_f) y receptora (C_r) y la concentración de éste en las interfases líquido iónico (C_{fi} y C_{ri}) están relacionadas a través del coeficiente de reparto del mismo entre el líquido iónico y n-hexano como se indica en la ecuación (8.4)

$$K = \frac{C_{fi}}{C_f} = \frac{C_{ri}}{C_r} \quad (8.4)$$

Así, combinando las ecuaciones (8.3) y (8.4) obtenemos la ecuación (8.5):

$$J = \frac{\bar{P} (C_{fi} - C_{ri})}{K} \quad (8.5)$$

De acuerdo con la primera ley de Fick, la ecuación (8.6) representa el flujo local de materia (J_m) en el interior de la membrana líquida:

$$J_m = \bar{D} \frac{(C_{fi} - C_{ri})}{l} \quad (8.6)$$

siendo \bar{D} el coeficiente de difusión del compuesto en cuestión en el interior de la fase líquida soportada, l la longitud del camino difusional a través de la membrana líquida y C_{fi} y C_{ri} la concentración del compuesto en las interfases membrana-fase alimentación y membrana-fase receptora, respectivamente.

De acuerdo con el balance de materia:

$$J_m = J \quad (8.7)$$

Sustituyendo las ecuaciones (8.5) y (8.6) en la ecuación (8.7) y reordenando la ecuación resultante se llega a la siguiente expresión:

$$\bar{P} = \frac{K \bar{D}}{l} \quad (8.8)$$

Como se puede observar en la ecuación (8.8), la permeabilidad de un compuesto dado se puede expresar en términos del coeficiente de reparto de este compuesto entre la fase líquida de la membrana (líquido iónico) y la fase receptora/alimentación (n-hexano), del coeficiente de difusión y del espesor de la membrana. La ecuación (8.8) muestra

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILS

matemáticamente la relación experimental encontrada entre los valores de permeabilidad y los coeficientes de reparto de un compuesto dado.

Por otra parte, el coeficiente de difusión de un compuesto dentro de la fase líquida (líquido iónico) puede ser calculado por medio de la ecuación empírica de Wilke-Chang (Ecuación 8.9).

$$\bar{D} = 7.4 \cdot 10^{-8} \frac{\chi^{0.5} M^{0.5} T}{\eta V_m^{0.6}} \quad (8.9)$$

donde M , χ y η son el peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), el parámetro de asociación y la viscosidad (cP) de la fase líquida (líquido iónico), respectivamente. V_m es el volumen molar del soluto que difunde a su temperatura de ebullición ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$) y T es la temperatura (K).

La ecuación de Wilke-Chang se puede sustituir en la ecuación (8.8), dando lugar a la ecuación (8.10):

$$\bar{P} = C \frac{K}{V_m^{0.6}} \quad (8.10)$$

donde C viene expresada por la ecuación (8.11) y es un término constante a una temperatura determinada para una SLM dada.

$$C = 7.4 \cdot 10^{-8} \frac{\chi^{0.5} M^{0.5} T}{\eta l} \quad (8.11)$$

Así, como se deduce de la ecuación (8.10), la permeabilidad de un compuesto a través de una SLM dada puede expresarse en función del coeficiente de reparto de éste entre la fase líquida inmovilizada y las fases alimentación/receptora (K) así como del volumen molar del mismo a su temperatura de ebullición (V_m).

Con el objetivo de verificar la ecuación (8.10) se representaron los valores de permeabilidad de los compuestos objeto de estudio para cada membrana líquida soportada frente al valor de $\frac{K}{V_m^{0.6}}$ obtenido para cada uno de ellos.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

Los volúmenes molares (V_m) de los distintos compuestos se obtuvieron del software de simulación HYSYS y aparecen recogidos en la **Tabla 8.7**.

Tabla 8.7. Volumen molar de cada uno de los compuestos objeto de estudio a sus temperaturas de ebullición (V_m) obtenidos del software de simulación HYSYS.

Compuesto	V_m (cm ³ ·mol ⁻¹)
Acetato de vinilo (C ₄ H ₆ O ₂)	99.6
Propionato de vinilo (C ₅ H ₈ O ₂)	134.7
Butirato de vinilo (C ₆ H ₁₀ O ₂)	173.1
Laurato de vinilo (C ₁₄ H ₂₆ O ₂)	353.7
Acetato de metilo (C ₃ H ₆ O ₂)	84.2
Propionato de metilo (C ₄ H ₈ O ₂)	104.8
Butirato de butilo (C ₈ H ₁₆ O ₂)	218.66
Decanoato de etilo (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	307.2
Metanol (C ₁ H ₄ O)	43.1
1-Propanol (C ₃ H ₈ O)	84.6
1-Butanol (C ₄ H ₁₀ O)	102.9
1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	194.3
Ácido acético (C ₂ H ₄ O ₂)	63.6
Ácido propiónico (C ₃ H ₆ O ₂)	86.6
Ácido butírico (C ₄ H ₈ O ₂)	110.4
Ácido láurico (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	314.6

En la **Figura 8.9** se representan los valores de permeabilidad de los diferentes compuestos orgánicos en cada una de las SLMs (Nylon-[bmim⁺][PF₆⁻] y Nylon-[omim⁺][PF₆⁻]) frente a los valores obtenidos de $\frac{K}{V_m^{0.6}}$ para los mismos compuestos. Tal y como podemos observar en la **Figura 8.9**, del ajuste mediante regresión lineal de los datos se obtienen líneas rectas (de pendiente C) que pasan a

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

través del origen, con coeficientes de regresión próximos a la unidad, lo cual demuestra que la relación entre \bar{P} , K y V_m ha sido establecida adecuadamente.

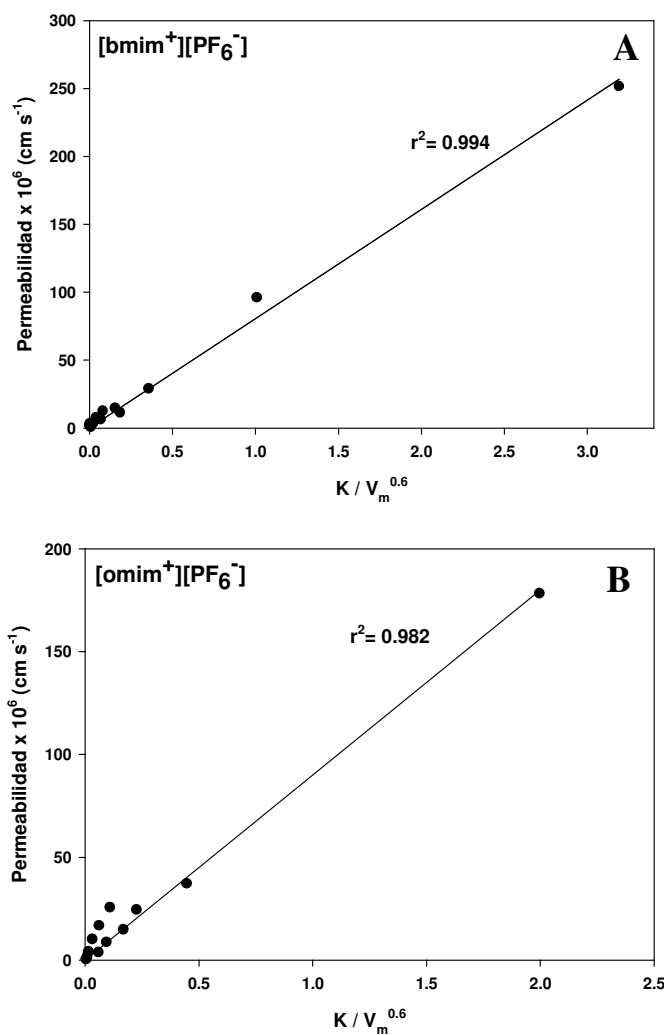


Figura 8.9. Representación gráfica de los valores de permeabilidad de los compuestos en estudio a través de SLMs basadas en [bmim⁺][PF₆⁻] (A) y [omim⁺][PF₆⁻] (B) frente a los valores de $\frac{K}{V_m^{0.6}}$ para los mismos.

La relación matemática establecida entre los tres parámetros permite predecir fácilmente la capacidad de una membrana líquida dada para separar dos compuestos mediante la determinación del coeficiente de reparto de éstos entre la fase líquida soportada en la membrana (líquido iónico) y la fase alimentación/receptora (n-hexano) y el volumen molar de cada uno de ellos a su temperatura de ebullición. Así, la selectividad en el

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

transporte de dos compuestos a través de membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos se podría estimar a través de la expresión 8.12:

$$rP = \frac{\frac{K_1}{V_{m1}^{0.6}}}{\frac{K_2}{V_{m2}^{0.6}}} \quad (8.12)$$

siendo K_1 y K_2 los coeficientes de reparto de los compuestos 1 y 2 entre el líquido iónico y n-hexano, respectivamente, y V_{m1} y V_{m2} los volúmenes molares de los compuestos 1 y 2 a sus temperaturas de ebullición.

8.4. CONCLUSIONES

Se ha estudiado la permeabilidad de dieciséis compuestos orgánicos implicados en reacciones de transesterificación (ésteres vinílicos, alcoholes, ésteres alquílicos y ácidos carboxílicos) a través de SLMs basadas en los líquidos iónicos [bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][PF₆⁻]. En todos los casos, se observaron diferencias de permeabilidad notables entre los compuestos objeto de estudio cuando se inmovilizaron ILs en la membrana soporte.

Respecto al comportamiento de los líquidos iónicos como fase soportada, se observó que la permeabilidad obtenida para un compuesto orgánico dado era mayor cuando se utilizó el líquido iónico [omim⁺][PF₆⁻] como fase líquida soportada.

Además, para compuestos orgánicos con el mismo grupo funcional se observó una fuerte influencia de la longitud de la cadena alquílica de los mismos en sus valores de permeabilidad, observándose una fuerte disminución de la misma al aumentar la longitud de la cadena alquílica de los compuestos.

Para entender mejor el mecanismo molecular implicado en el fenómeno de transporte de los compuestos orgánicos en estudio a través de SLMs se ha determinado el coeficiente de reparto de éstos entre la fase líquida inmovilizada en la membrana (líquido iónico) y la fase alimentación/receptora (n-hexano) y se ha establecido una expresión matemática basada en la ecuación de Wilke-Chang que relaciona ambos parámetros. La expresión obtenida permite predecir de forma simple la capacidad de una SLM dada para separar dos compuestos mediante la evaluación del coeficiente de reparto de éstos entre la fase líquida soportada en la membrana (líquido iónico) y la fase alimentación/receptora (n-hexano) y el volumen molar de cada uno ellos a su temperatura de ebullición.

8. Estudio del mecanismo de transporte de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

8.5. NOMENCLATURA

K	coeficiente de reparto IL/hexano (adimensional)
$C_{H(0)}$	concentración de soluto en la fase hexano antes del proceso de extracción ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
$C_{H(t)}$	concentración de soluto en la fase hexano después del proceso de extracción ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
\bar{P}	permeabilidad de la membrana ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
C_0	concentración inicial de soluto en la fase alimentación ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_f	concentración de soluto en la fase alimentación ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_r	concentración de soluto en la fase receptora ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_{fi}	concentración de soluto en la interfase membrana-fase alimentación ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_{ri}	concentración de soluto en la interfase membrana-fase receptora ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
A	área de la membrana (cm^2)
t	tiempo (s)
V	volumen de los compartimentos (mL)
J	flujo másico de soluto ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
J_m	flujo másico de soluto en el interior de la membrana líquida ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
\bar{D}	Coefficiente de difusión del soluto en el interior de la fase líquida soportada ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
l	longitud del camino difusional de las moléculas a través de membrana líquida (cm)
M	peso molecular del líquido iónico ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
χ	parámetro de asociación del líquido iónico (adimensional)
η	viscosidad del líquido iónico (cP)
V_m	volúmen molar del soluto a su temperatura de ebullición ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$).
T	temperatura (K)
rP	permeoselectividad de la membrana (adimensional).

8.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] 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.

- [2] F. J. Hernández-Fernández, A. P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez, G. VÍllora. 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.

9

**Efecto del medio líquido iónico en la
separación selectiva de sustratos y
productos de reacciones de
transesterificación a través de
membranas líquidas soportadas
basadas en líquidos iónicos**

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

9. EFECTO DEL MEDIO LÍQUIDO IÓNICO EN LA SEPARACIÓN SELECTIVA DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DE REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS

9.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 7 se analizó el transporte de sustratos y productos de una reacción de transesterificación (butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico) a través de membranas líquidas soportadas (SLMs) basadas en los líquidos iónicos (ILs) 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, [bmim⁺][PF₆⁻], y 1-metil-3-octilimidazolio hexafluorofosfato, [omim⁺][PF₆⁻], observándose diferencias significativas en los valores de permeabilidad y selectividad, atribuidos a la naturaleza del líquido iónico inmovilizado en la membrana. Este hecho ha llevado a profundizar más en el análisis de la influencia de la naturaleza del líquido iónico como fase líquida soportada en SLM en la separación selectiva de los compuestos de interés.

Así, en el presente capítulo se ha analizado el transporte de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de membranas líquidas soportadas basadas en seis líquidos iónicos de diferente composición catiónica y aniónica (**Figura 9.1**). La diferente naturaleza de los mismos (composición catiónica y aniónica) se refleja en sus diferentes caracteres hidrofóbico/hidrofílico, por lo tanto, este parámetro ha sido también determinado, a través del coeficiente de reparto octanol/agua (K_{ow}), con el fin de relacionarlo con los valores de permeoselectividad obtenidos para las SLMs.

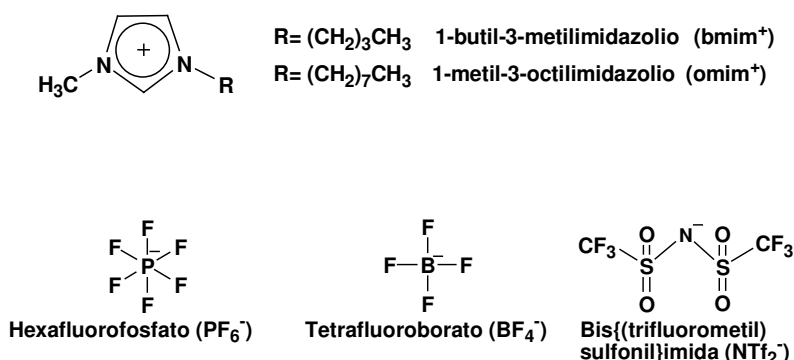


Figura 9.1. Iones constituyentes de los líquidos iónicos objeto de estudio.

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

9.2. MATERIALES Y MÉTODOS

9.2.1. Membranas y materiales

En este estudio se ha utilizado como membrana polimérica soporte una membrana hidrofílica plana de poliamida (NYLON[®] 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 μm y el espesor de la membrana de 170 μm .

Los líquidos iónicos 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, [bmim⁺][PF₆⁻] (pureza >99%), 1-metil-3-octilimidazolio hexafluorofosfato, [omim⁺][PF₆⁻] (pureza >99%), 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato, [bmim⁺][BF₄⁻] (pureza >99%), 1-metil-3-octilimidazolio tetrafluoroborato, [omim⁺][BF₄⁻] (pureza >99%) fueron suministrados por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania). 1-Butil-3-metilimidazolio bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida, [bmim⁺][TfN₂⁻] (pureza >99%) fue suministrado por Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España) y 1-metil-3-octilimidazolio bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida, [omim⁺][TfN₂⁻] (pureza >99%) por Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

Los reactivos químicos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A. (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).

9.2.2. Preparación de membranas líquidas soportadas

La inmovilización del líquido iónico se llevó a cabo haciendo uso de una célula de ultrafiltración AmiconTH de 10 mL, describiéndose en detalle el procedimiento de preparación en el apartado 7.2.2.

9.2.3. Estudios de transporte

Los estudios de transporte se llevaron a cabo a 30 °C 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 procedimiento experimental se encuentran recogidos en el apartado 7.2.3

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

El transporte de los compuestos se analizó a través del parámetro *permeabilidad* (\bar{P}), el cual se calculó mediante la ecuación (9.1), de la pendiente de la representación gráfica del $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$ frente a t (deducción en el apartado 7.2.6).

$$\ln \left[\frac{(C_0 - 2C_r)}{C_0} \right] = \frac{-2 \bar{P} A}{V} t \quad (9.1)$$

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 (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 9.2).

$$r\bar{P} = \frac{\sum_i^n rP_i}{n} \quad \text{con } rP_i > 1 \quad (9.2)$$

donde rP_i es la permeoselectividad que muestra la membrana hacia dos compuestos (i.e. 1-butanol y butirato de butilo) 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:

$$rP_i = \frac{\bar{P}_A}{\bar{P}_B} \quad (9.3)$$

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.

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

9.2.4. Determinación de los coeficientes de reparto octanol/agua de los líquidos iónicos

Se han evaluado los coeficientes de reparto octanol/agua de los líquidos iónicos objeto de estudio. Hasta el momento se han descrito dos metodologías para la determinación de los coeficientes de reparto octanol/agua de los líquidos iónicos: el método de agitación rápida “shake-flask” y el método de agitación lenta “slow-stirring” [1]. El primero presenta la desventaja de que no garantiza la consecución del equilibrio, mientras que el método de agitación lenta puede no ser apropiado para líquidos iónicos ya que algunos de éstos, tras un contacto continuado con agua durante un largo periodo de tiempo, pueden descomponerse. Consecuentemente, se ha desarrollado un nuevo método que es combinación de ambos, tratando de aprovechar las ventajas de cada uno de ellos y solventar los inconvenientes en relación a estos sistemas.

El dispositivo experimental consiste en un vial de 22 ml con un tapón de rosca provisto de una abertura central la cual se sella mediante un septum de silicona/Teflon (**Figura 9.3**).

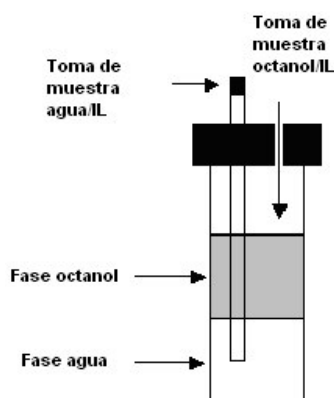


Figura 9.3. Dispositivo experimental empleado para la determinación de los coeficientes de reparto octanol/agua de los líquidos iónicos.

A este vial se le adicionan 10 ml de agua destilada y desionizada, previamente presaturada con 1-octanol. Se introduce un tubo de teflón dentro del vial y se coloca de manera que quede justo por debajo de las superficies del agua. Se añaden entonces 10 ml de una disolución 1mM de líquido iónico en 1-octanol (previamente presaturado con agua destilada). El vial se agita entonces vigorosamente durante 5 minutos y se mantiene en un baño termostataado a 30°C sin agitación. Las muestras de la fase 1-octanol se tomaron con una jeringa de cristal penetrando el septum de silicona/teflón con una aguja de acero inoxidable. Las muestras de la fase agua fueron extraídas

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

insertando la aguja de acero a través del tubo de Teflón directamente a la fase acuosa, con el fin de prevenir la contaminación por 1-octanol. De cada fase se tomaron como mínimo tres muestras entre 3 y 13 días. El muestreo finalizó cuando se estabilizó la concentración del líquido iónico en ambas fases. La concentración de líquido iónico en cada fase se analizó por espectrofotometría UV-VIS, tal y como se describe en la sección 9.5.2.2. Los ensayos se realizaron por triplicado, con el fin de asegurar la reproducibilidad de los valores encontrados, recogiendo en la memoria los valores medios de los ensayos.

El coeficiente de reparto octanol/agua se ha calculado mediante la ley de distribución de Nernst, ecuación (9.4), suponiendo condiciones de dilución infinita del líquido iónico en ambas fases:

$$K_{ow} = \frac{C_i^o}{C_i^w} \quad (9.4)$$

siendo C_i^o la concentración molar del líquido iónico disuelto en la fase 1-octanol y C_i^w la concentración molar del líquido iónico disuelto en la fase agua.

9.2.5. Métodos analíticos

9.2.5.1. Análisis cromatográfico

El análisis de las muestras se lleva 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™ (15m × 0.53mm × 0.5µm) de Supelco, utilizando acetato de butilo como estándar interno.

La temperatura en el inyector se fijó en 190 °C, se trabajó con presión constante de 1.89 psi (51 mL /min flujo lineal) en la cabeza de la columna y la relación de split de 7:9. En el detector, la temperatura fue de 220 °C y los caudal de gases en el mismo de 400 ml/min de aire sintético, 30 ml/min de hidrógeno y 20 ml/min de nitrógeno. 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.

Los tiempos de retención de los compuestos son los siguientes: butirato de vinilo, 2.596 min.; acetato de butilo (estándar interno), 2.981min.; 1-butanol, 3.712 min.; butirato de butilo, 4.430 min.; ácido butírico, 7.339 min.

Las concentraciones de los compuestos se calcularon a partir de las pendientes de rectas de calibrado obtenidas para los mismos, las cuales se mostraron en la **Tabla 4.4**.

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

9.2.5.2. Análisis UV-VIS

La concentración de líquido iónico en las fases octanol y agua se midió mediante espectrofotometría UV-VIS usando un espectrofotómetro ThermoSpectronic UV-VIS (He λ ios α), con una sensibilidad de ± 0.001 .

Se realizaron curvas de calibración para cada uno de los líquidos iónicos utilizados en 1-octanol y en agua, efectuándose las medidas de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción de éstos (212 nm), que corresponde a la absorbancia del anillo imidazolio común a todos los líquidos iónicos utilizados en este estudio. Las curvas de calibrado se realizaron por duplicado, mostrando en la memoria los valores medios de los coeficientes de extinción. A título de ejemplo se muestran en las **Figuras 9.4 y 9.5** las curvas de calibrado del líquido iónico [omim⁺][PF₆⁻] en agua y en 1-octanol, respectivamente.

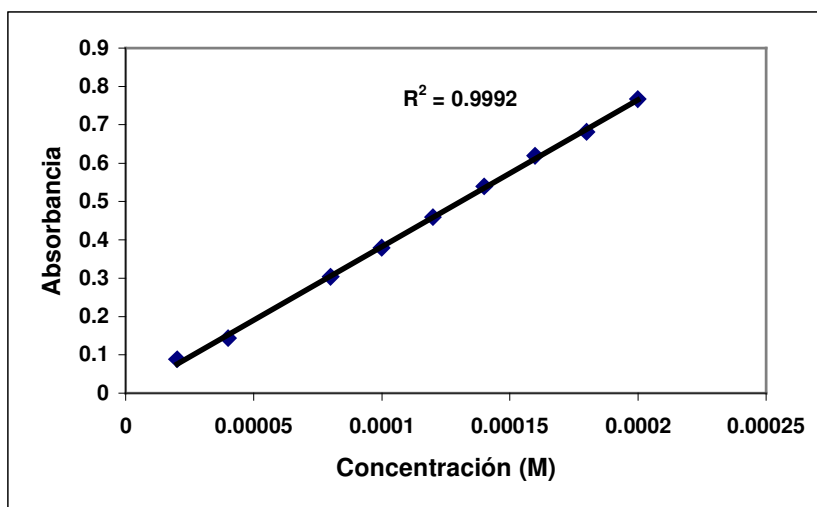


Figura 9.4. Curvas de calibrado del líquido iónico [omim⁺][PF₆⁻] en agua a 212 nm.

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

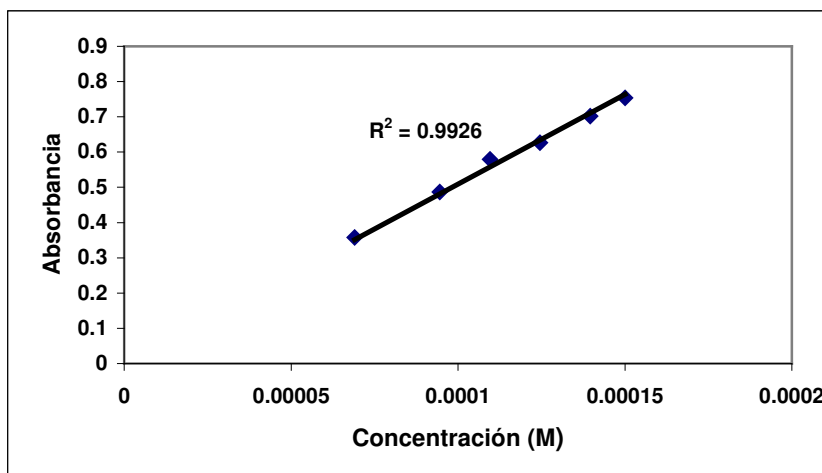


Figura 9.5. Curvas de calibrado del líquido iónico [omim⁺][PF₆⁻] en 1-octanol a 212 nm.

9.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.3.1. Coefficientes de reparto octanol-agua

En primer lugar se determinaron los coeficientes de reparto octanol/agua de los líquidos iónicos objeto de estudio: [bmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻], [omim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][NTf₂⁻] y [omim⁺][NTf₂⁻]. Previamente a la determinación de los coeficientes de reparto de los ILs fue necesario validar el nuevo método analítico desarrollado para la determinación de los mismos. Para ello se utilizó un compuesto cuyo coeficiente de reparto está perfectamente descrito en la bibliografía, el benzaldehído, cuyo logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua es de $\log(K_{ow}) = 1.48$ [2]. El espectro de absorción del benzaldehído presenta dos picos característicos, a 250 y a 200 nm en agua y a 245 y 207 nm en 1-octanol. Los picos de longitud de onda de 250 nm y 245 nm fueron seleccionados para hacer las medidas de absorbancia en agua y 1-octanol, respectivamente. Los coeficientes de extinción obtenidos en agua y en 1-octanol, así como el coeficiente de reparto octanol/agua obtenido para el benzaldehído se presentan en las **Tablas 9.2 y 9.3**, respectivamente. Como se deduce de la **Tabla 9.3**, el valor obtenido experimentalmente para el $\log(K_{ow})$ del benzaldehído fue de 1.43, muy cercano al encontrado en la bibliografía para este compuesto (1.48), lo que confirma la validez de la metodología propuesta para la determinación del coeficiente de reparto octanol/agua.

Una vez validada la nueva metodología de determinación de K_{ow} , se midieron los coeficientes de extinción (ϵ) de los líquidos iónicos en 1-octanol y en agua, ya que son necesarios para la determinación de las concentraciones de IL en cada una de las fases,

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

y después se determinaron los valores de K_{ow} de los líquidos iónicos objeto de estudio. En la **Tabla 9.2** se muestran los coeficientes de extinción para cada líquido iónico en agua y en 1-octanol, determinados a la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{max}= 212$ nm).

Tabla 9.2. Coeficientes de extinción de benzaldehído y de los líquidos iónicos objeto de estudio en agua y en 1-octanol.

Compuestos	ϵ en agua/IL ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	ϵ en octanol/IL ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Benzaldehído ^a	1363.7	1303.6
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻] ^b	4472.5	3455.7
[omim ⁺][PF ₆ ⁻] ^b	3828.4	5100
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻] ^b	4212.3	4639.6
[omim ⁺][BF ₄ ⁻] ^b	4207.1	4787
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻] ^b	3367.6	4904.1
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻] ^b	3103.3	4483.1

^a $\lambda_{max}= 250$ nm en agua y $\lambda_{max}= 245$ nm en 1-octanol

^b $\lambda_{max}= 212$ nm en agua y 1-octanol

En la **Tabla 9.3** se muestran los valores del $\log (K_{ow})$ obtenidos para cada líquido iónico.

Tabla 9.3. Logaritmos de los coeficientes de reparto octanol/agua ($\log K_{ow}$) obtenidos para benzaldehído y para los líquidos iónicos objeto de estudio.

Compuestos	Log (K_{ow})
Benzaldehído	1.43
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.27
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-1.49
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	-1.27
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-0.97
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	-0.62
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.56

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

Basándonos en los valores de $\log(K_{ow})$ obtenidos para los distintos líquidos iónicos y teniendo en cuenta que una disminución en los valores de K_{ow} está relacionada con un incremento del carácter hidrofílico de los mismos, se estableció la siguiente secuencia de hidrofiliidad para los líquidos iónicos: $[omim^+][NTf_2^-] < [omim^+][PF_6^-] < [bmim^+][NTf_2^-] < [omim^+][BF_4^-] < [bmim^+][PF_6^-] < [bmim^+][BF_4^-]$.

Examinando los valores de $\log(K_{ow})$ de todos los líquidos iónicos que poseen el mismo catión ($[bmim^+]$ u $[omim^+]$), se puede analizar el efecto del anión sobre la hidrofiliidad. Así, se puede observar que, para un catión dado, la hidrofiliidad aumenta en el siguiente orden: $[NTf_2^-] < [PF_6^-] < [BF_4^-]$. Este hecho puede ser explicado por la mayor simetría del anión $[PF_6^-]$ en relación al anión $[BF_4^-]$, lo que contribuye al mayor carácter hidrófobo del primero. Por su parte, la mayor hidrofobicidad del anión $[NTf_2^-]$ con respecto al anión $[PF_6^-]$ puede entenderse por la inclusión de dos átomos de carbono en el anión $[NTf_2^-]$.

El efecto del catión se puede analizar manteniendo constante el anión. Así, se observó que el carácter hidrofóbico del líquido iónico aumentaba con el incremento en la longitud de la cadena alquílica del sustituyente del anillo imidazolio del catión. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ropel et al. [1].

9.3.2. Estudios de transporte

Se ha analizado la permeabilidad de cuatro compuestos implicados en una reacción de transesterificación (butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico) a través de membranas líquidas soportadas basadas en seis líquidos iónicos ($[bmim^+][PF_6^-]$, $[omim^+][PF_6^-]$, $[bmim^+][BF_4^-]$, $[omim^+][BF_4^-]$, $[bmim^+][NTf_2^-]$ y $[omim^+][NTf_2^-]$), con el fin de estudiar la influencia de la naturaleza del líquido iónico (composición catiónica y aniónica) inmovilizado en la SLM sobre las propiedades de transporte de la misma. Se utilizó la membrana de Nylon como membrana polimérica soporte ya que en estudios anteriores se observó que ésta era la más adecuada entre las estudiadas [3]. Se llevaron a cabo ensayos de referencia con la membrana de Nylon sin líquido iónico soportado.

Se siguió la evolución de las concentraciones experimentales de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico en las fases alimentación y receptora a lo largo de 48 horas, y se utilizaron las concentraciones de la fase receptora para calcular las permeabilidades individuales de los compuestos (\bar{P}). Así, los valores de permeabilidad se obtuvieron de las pendientes de las representaciones del $\ln [(C_0 - 2 C_r) / C_0]$ para cada compuesto frente a t usando la ecuación (9.1). A título de ejemplo, en la **Figura 9.6** se muestran las representaciones gráficas usadas para el cálculo de las permeabilidades de los compuestos a través de la membrana de Nylon con $[bmim^+][BF_4^-]$ soportado. El resto de perfiles se encuentran recogidos en el Anexo III (Figuras 13.61 a 13.64, 13.81 a 13.88 y 13.125 a 13.140).

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

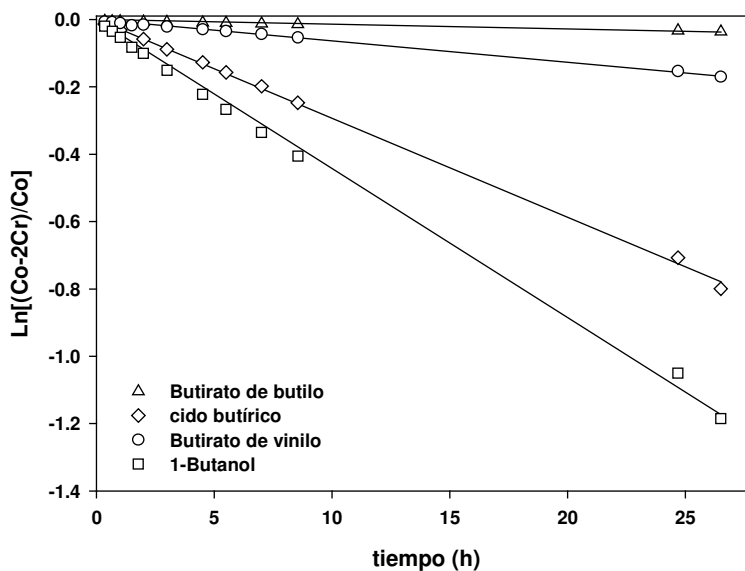


Figura 9.6. Representación gráfica de $\ln[(C_o-2C_r)/C_o]$ frente a t para el transporte de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de la membrana de Nylon con $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ soportado.

Los valores de permeabilidad obtenidos para los cuatro compuestos estudiados a través de la membrana de Nylon sin líquido iónico soportado y a través de SLMs basados en ILs se muestran en la **Tabla 9.4**.

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

Tabla 9.4. Permeabilidad de butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico a través de la membrana de Nylon sin líquido iónico y a través de las SLMs basadas en los seis ILs en estudio.

Membrana	Permeabilidad $\times 10^6$ (cm/s)			
	Butirato de vinilo	1-Butanol	Butirato de butilo	Ácido butírico
Nylon	294.5	275.2	323.2	296.8
Nylon con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	3.7	14.7	0.9	6.6
Nylon con [omim ⁺][PF ₆ ⁻]	10.2	24.5	4.2	8.7
Nylon con [bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	5.5	40.9	0.9	24.3
Nylon con [omim ⁺][BF ₄ ⁻]	25.4	119.9	12	102.4
Nylon con [bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	18.7	67.5	7.3	25.7
Nylon con [omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	41.4	96.4	22.1	30.8

En relación a los valores de permeabilidad, se aprecia que éstos fueron significativamente mayores cuando se utilizó la membrana de Nylon sin líquido iónico inmovilizado. Sin embargo, en este caso no se observaron diferencias apreciables de permeabilidad entre los diferentes compuestos orgánicos, lo cual sugiere que la membrana orgánica de Nylon sin líquido iónico inmovilizado no puede ser utilizada para la separación selectiva de los compuestos de interés, como ya se ha apuntado en los capítulos anteriores. Estos valores se modificaron drásticamente cuando en la membrana de Nylon se inmovilizaron líquidos iónicos, observándose entonces importantes diferencias de permeabilidad entre los distintos compuestos. Este cambio de comportamiento puede ser explicado teniendo en cuenta que el líquido iónico ofrece diferente resistencia a la transferencia de materia para cada compuesto.

La influencia del líquido en los valores de permeabilidad se analizó comparando los valores de permeabilidad obtenidos para un mismo compuesto en SLMs basadas en diferentes líquidos iónicos. Tal y como se puede observar en la **Tabla 9.4**, los valores de permeabilidad de los compuestos a través de la SLM con [omim⁺][BF₄⁻] soportado fueron mayores que los obtenidos cuando se inmovilizó [bmim⁺][BF₄⁻] en la membrana de Nylon, lo que significa que un incremento en la longitud de la cadena alquílica del catión supone un incremento en los valores de permeabilidad de los compuestos a través de la SLM. El mismo comportamiento se puede observar si comparamos las parejas de líquidos iónicos [omim⁺][PF₆⁻]/[bmim⁺][PF₆⁻] y [omim⁺][NTf₂⁻]/[bmim⁺][NTf₂⁻].

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

Los valores de $r\bar{P}$ obtenidos para las distintas membranas líquidas soportadas se presentan en la **Tabla 9.5**.

Tabla 9.5. Permeoselectividad media de las SLMs basadas en los seis líquidos iónicos.

Membrana	$r\bar{P}$
Nylon con [bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	15.59
Nylon con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	6.07
Nylon con [omim ⁺][BF ₄ ⁻]	5.11
Nylon con [bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3.83
Nylon con [omim ⁺][PF ₆ ⁻]	2.78
Nylon con [omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	2.41

Como se desprende de esta Tabla, los mayores valores de $r\bar{P}$ se obtuvieron en SLMs basadas en los líquidos iónicos más hidrofílicos. La membrana líquida soportada más adecuada para la separación de los compuestos orgánicos seleccionados fue la basada en el líquido iónico [bmim⁺][BF₄⁻], con una permeoselectividad media de 15.59. Tal y como se observa en la **Tabla 9.5**, el orden en la permeoselectividad media es el siguiente: [omim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][BF₄⁻] < [bmim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][BF₄⁻]. Comparando este orden con el obtenido para la hidrofiliidad de los líquidos iónicos: [omim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][BF₄⁻] < [bmim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][BF₄⁻], puede concluirse que un incremento en el carácter hidrofílico de los líquidos iónicos supone un incremento en los valores de la permeoselectividad media de la SLM en la separación de los compuestos de interés.

Los resultados obtenidos subrayan la clara relación existente entre la naturaleza del líquido iónico y la permeoselectividad de las membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos.

9.4. CONCLUSIONES

Se ha analizado el transporte de los compuestos orgánicos implicados en una reacción de transesterificación (butirato de vinilo, butirato de butilo, 1-butanol y ácido butírico) a través de SLM basadas en seis líquidos iónicos: [bmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻], [omim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][NTf₂⁻] y [omim⁺][NTf₂⁻], estableciéndose el siguiente orden de permeoselectividad media: [omim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][BF₄⁻] < [bmim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][BF₄⁻].

Además se ha desarrollado una nueva metodología para la determinación experimental del carácter hidrofílico/hidrofóbico de los líquidos iónicos a través de los coeficientes de reparto octanol/agua (K_{ow}) y se ha establecido el siguiente orden de hidrofiliidad: [omim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][BF₄⁻] < [bmim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][BF₄⁻]. Esta secuencia permite explicar las diferencias de selectividad observadas en la separación de los compuestos de interés en las diferentes SLM, ya que al aumentar el carácter hidrofílico del líquido iónico inmovilizado en una membrana se observó un aumento del valor de permeoselectividad media de la SLM resultante, o lo que es lo mismo, un aumento de la eficacia de separación. La clara relación observada entre estos dos parámetros permite predecir fácilmente cuál es el líquido iónico más adecuado para su uso como fase líquida en una SLM para llevar a cabo la separación selectiva de compuestos implicados en reacciones de transesterificación, mediante la evaluación del carácter hidrofílico/hidrofóbico de los líquidos iónicos, determinado experimentalmente a través de sus coeficientes de reparto octanol/agua.

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

9.5. NOMENCLATURA

K_{ow}	Coefficiente de reparto octanol-agua (adimensional)
C_i^o	concentración del líquido iónico disuelto en la fase rica en octanol ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_i^w	concentración del líquido iónico disuelto en la fase rica en agua ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
\bar{P}	permeabilidad de la membrana ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
C_0	concentración inicial 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	área de la membrana (cm^2)
V	volumen de los compartimentos (mL)
t	tiempo (s)
$r\bar{P}$	permeoselectividad media de la membrana (adimensional)
\bar{P}_A	permeabilidad de la membrana al compuesto A ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
\bar{P}_B	permeabilidad de la membrana al compuesto B ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

9. Efecto del IL en la separación selectiva de compuestos a través de SLMs basadas en ILs

9.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr and J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green. Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [2] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 71 (1971) 525- 616.
- [3] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez, G. VÍllora, A novel application of supported liquid membranes based on ionic liquids to selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction, *J. Membrane Sci.* 293 (2007) 73-80.

10

**Estudio de la estabilidad operacional
de membranas líquidas soportadas
basadas en líquidos iónicos**

10. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD OPERACIONAL DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS

10.1. INTRODUCCIÓN

El uso de membranas líquidas soportadas (SLMs) ha sido objeto de una atención creciente en los últimos años [1-3]. Sin embargo, sus aplicaciones industriales son aún escasas, principalmente a causa del problema de la estabilidad de las membranas y su comportamiento a largo plazo [4,5]. Por tanto, el principal desafío en lo relativo al diseño de membranas líquidas soportadas radica en el modo de aumentar su estabilidad. Entre las numerosas ventajas que los líquidos iónicos pueden aportar a la estabilidad de las membranas destacan su despreciable presión de vapor y la alta fuerza capilar asociada a su alta viscosidad, que permite reducir el desplazamiento del líquido iónico de los poros bajo presión. Otra cualidad importante de los líquidos iónicos es la posibilidad de modular sus propiedades físico-químicas mediante la selección de los iones que los constituyen [6]. De este modo, el diseño adecuado de un líquido iónico permitiría disminuir su solubilidad en las fases circundantes, aumentando así la estabilidad de la membrana. Otras propiedades interesantes son la elevada estabilidad química y térmica [7], la alta conductividad iónica [7] y que no son inflamables. Además, son capaces de disolver a un amplio abanico de compuestos orgánicos e inorgánicos [8,9] siendo en cambio inmiscibles con muchos disolventes orgánicos [10] e incluso, en algunos casos, con el agua. Todas estas propiedades han permitido considerar a los líquidos iónicos como “*disolventes verdes de diseño*”, y utilizarlos con éxito en numerosas aplicaciones [11-13].

En los capítulos anteriores (7, 8, 9) se utilizaron con éxito las SLMs basadas en líquidos iónicos para la separación selectiva de los sustratos y productos involucrados en reacciones de transesterificación. Además, en el capítulo 7 se comprobó que las SLMs ensayadas presentaban una excelente estabilidad operacional tras 8 ciclos continuos de operación de 48 horas cada uno. Sobre la base de estos resultados, se planteó como objetivo de este capítulo el estudio de la estabilidad operacional de seis SLMs basadas en líquidos iónicos, mediante la caracterización microscópica de las mismas. Como membranas poliméricas soporte se usaron membranas de Nylon (hidrofílica) y Mitex (hidrofóbica), en las que se inmovilizaron tres líquidos iónicos: [bmim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][PF₆⁻] y [bmim⁺][Tf₂N⁻]. Como fase alimentación y receptora se utilizó n-hexano, ya que éste es uno de los disolventes convencionalmente usados en reacciones de transesterificación. La caracterización morfológica de la superficie de las membranas, así como el análisis de la composición química global y la distribución del líquido iónico en el interior de los poros se llevó a cabo con la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), combinada con el análisis por energía dispersiva de rayos X (EDX). Los resultados de la caracterización microscópica efectuada mediante SEM-EDX se compararon con los datos operacionales macroscópicos obtenidos en el capítulo 7.

10.2. MATERIALES Y MÉTODOS

10.2.1. Membranas y materiales

En este estudio se han utilizado dos tipos de membranas poliméricas suministradas por la empresa Millipore Ibérica S.A. (Madrid, España):

- **NYLON®** HNWP 02500

Composición: Poliamida.

Superficie: plana.

Diámetro: 25 mm.

Tamaño medio de poro: 0.45 μm .

Espesor: 170 μm .

Carácter hidrofílico/hidrofóbico: Hidrofílico.

- **MITEX®** LCWP 02500

Composición: Politetrafluoroetileno.

Superficie: plana.

Diámetro: 25 mm.

Tamaño medio de poro: 10 μm .

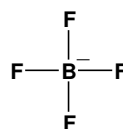
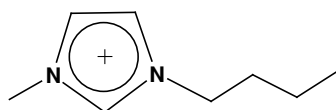
Espesor: 130 μm .

Porosidad media: 65%.

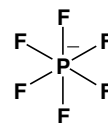
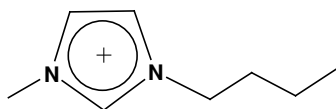
Carácter hidrofílico/hidrofóbico: Hidrofóbico.

Los líquidos iónicos utilizados fueron los siguientes:

- **[bmim⁺][BF₄⁻]**: 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato. Suministrado con una pureza del 99% por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania).

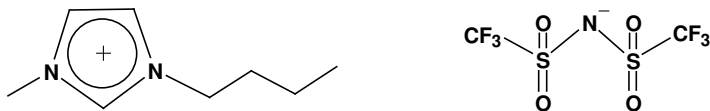


- **[bmim⁺][PF₆⁻]**: 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato. Suministrado con una pureza del 99% por Solvent Innovation GmbH (Colonia, Alemania).



10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

- **[bmim⁺][NTf₂⁻]** 1-butil-3-metilimidazolio bis{(trifluorometil)sulfonyl}imida. Suministrado con una pureza del 99% por Sigma-Aldrich Chemical Co. (Madrid, España).



Los reactivos químicos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich Química S.A. (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).

10.2.2. Preparación de membranas líquidas soportadas

La inmovilización del líquido iónico se llevó a cabo haciendo uso de una célula de ultrafiltración AmiconTH de 10 mL, describiéndose en detalle el procedimiento de preparación en el apartado 7.2.2.

10.2.3. Estudios de estabilidad operacional de membranas

Los estudios de estabilidad se llevaron a cabo a 30°C en una célula de difusión de vidrio con dos compartimentos independientes, cada uno de 30 mL, separados por la SLM. Los compartimentos se unen entre sí a través de una tuerca, en cuyo interior se coloca la membrana, quedando sujeta entre dichos compartimentos mediante unas juntas, que impiden que haya fuga alguna o que pase disolución de un compartimento al otro. Las fases de alimentación y receptora estuvieron integradas por n-hexano, estando provistas ambas de agitación mecánica. Las SLMs fueron caracterizadas mediante SEM-EDX inmediatamente después de la preparación y tras siete días de inmersión en la célula de difusión mencionada anteriormente. El procedimiento seguido se describe a continuación.

10.2.4. Caracterización de las membranas por SEM-EDX

El estudio de la morfología, composición química y distribución de los elementos químicos de interés en las membranas líquidas soportadas se llevó a cabo con un microscopio electrónico de barrido (SEM) ISI DS-130 acoplado a un detector de Si/Li KeveX y a una Sun SparcStation 5 para el análisis por energía dispersiva de rayos X (EDX).

10.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.3.1. Caracterización de las membranas comerciales

Antes de la preparación de las membranas líquidas soportadas, se analizaron por SEM las respectivas morfologías de las membranas de Nylon y Mitex. La micrografía SEM de la membrana de Nylon (**Figura 10.1**) evidenció un material muy poroso integrado por macroporos de aproximadamente 1 μm de tamaño promedio de poro.

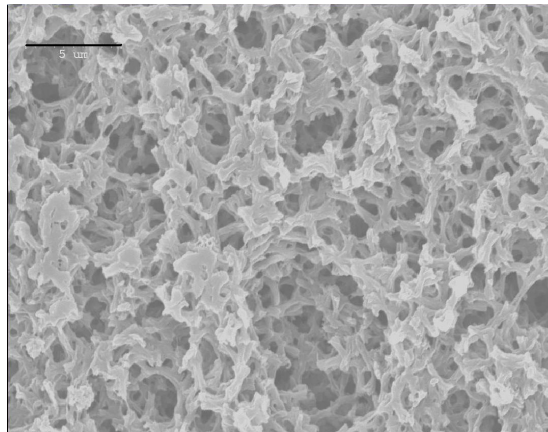


Figura 10.1. Micrografía electrónica de barrido de la membrana de Nylon (3040x) (línea de la escala = 5 μm)

La membrana de Mitex (**Figura 10.2**), sin embargo, presentó fibras muy delgadas, conteniendo probablemente poros pequeños no detectados por SEM, junto con grandes macroporos y grietas con un tamaño de varias micras.

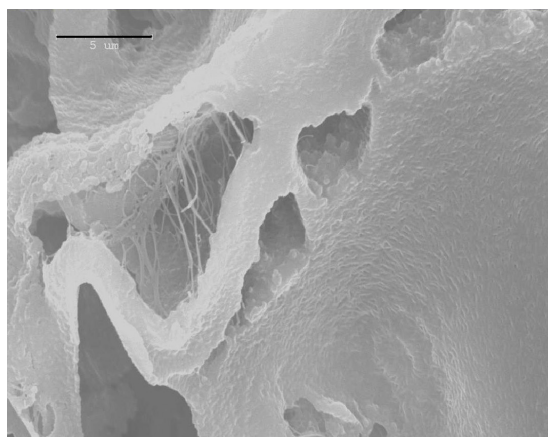


Figura 10.2. Micrografía electrónica de barrido de la membrana de Mitex (3040x) (línea de la escala = 5 μm)

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

El espectro EDX de la membrana de Nylon (**Figura 10.3**) reflejó los picos característicos asignados a las líneas $K\alpha$ del C, O y N, las dos últimas en forma de un ancho pico único sin desdoblarse debido a su proximidad y baja concentración. La presencia de estos elementos químicos se asocia a la fórmula química de la poliamida. El espectro EDX de la membrana de Mitex (**Figura 10.3**) mostró un pico F $K\alpha$ muy intenso y otro menos intenso C $K\alpha$ asociados a la fórmula del politetrafluoroetileno.

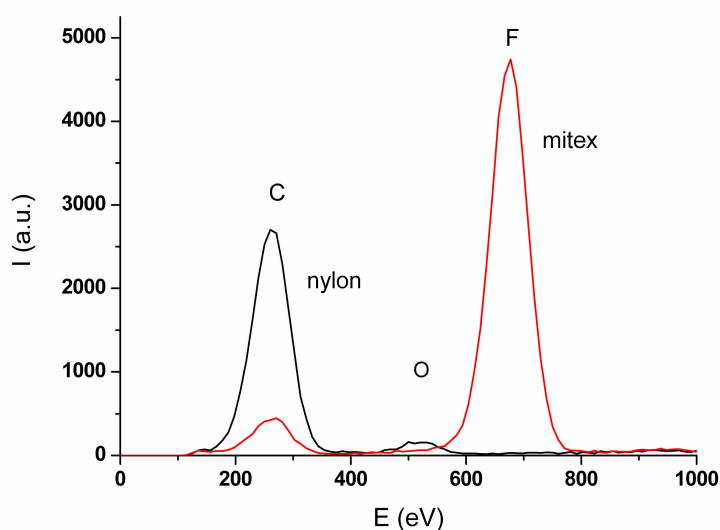


Figura 10.3. Perfiles de línea $K\alpha$ de las membranas de Nylon y Mitex.

10.3.2. Caracterización de las membranas líquidas soportadas

Las membranas líquidas soportadas impregnadas con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$, respectivamente, fueron analizadas después de la inmovilización con objeto de asegurar el llenado completo de los poros por los líquidos iónicos y de comprobar la homogeneidad de su distribución.

La **Figura 10.4** (A)-(C) muestra las micrografías SEM de la membrana de Nylon impregnada con los tres ILs.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

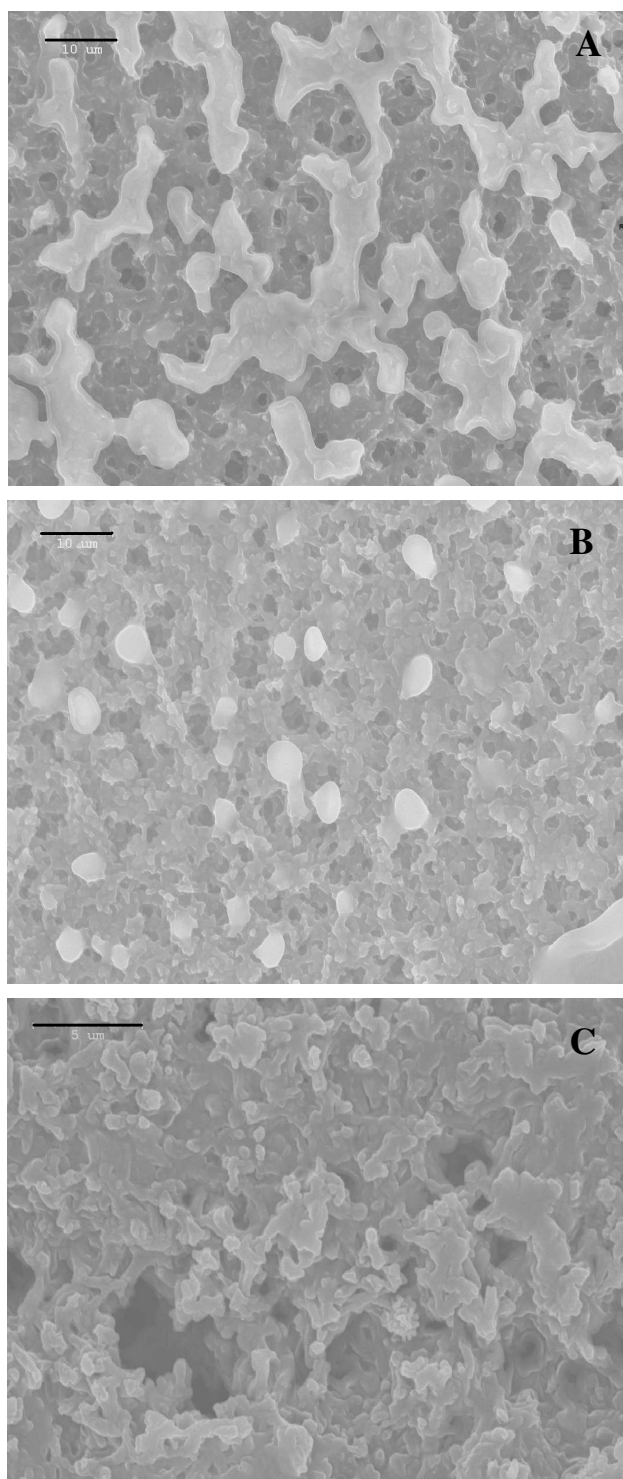


Figura 10.4. Micrografías electrónicas de barrido de la membrana de Nylon impregnada con (A) $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ (1010x) (línea de la escala = 10 μm), (B) $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ (1010x) (línea de escala = 10 μm) y (C) $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ (3040x) (línea de la escala = 5 μm).

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

El estudio morfológico mostró que, en general, los poros más pequeños de las membranas llegaron a ocluirse con el líquido iónico, quedando parcialmente llenos sólo los más grandes. En las figuras se observa también un exceso de líquido iónico presente en la superficie externa de las membranas, en gran cantidad para $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, moderada para $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ e inapreciable para $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$. Teniendo en cuenta que las condiciones de preparación fueron idénticas para todos los ILs analizados, es posible correlacionar estas características diferenciales con la viscosidad de los mismos, que sigue la siguiente secuencia: $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-] > [\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ [14]. Consecuentemente, la acumulación de líquido iónico sobre la superficie de la membrana parece ser un efecto cinético de la fluidez del mismo: a mayor viscosidad del líquido iónico, mayor cantidad permanece sobre la superficie exterior de la membrana.

La homogeneidad de las membranas líquidas soportadas se analizó mediante EDX sobre la base de la selección de los elementos de interés característicos de cada líquido iónico: F y P para $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, F y B (no detectado por EDX) para $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, y F y S para $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$, como se muestra en la **Figura 10.5**. Las alturas relativas de los picos de los mismos elementos en compuestos diferentes puede relacionarse con las concentraciones respectivas.

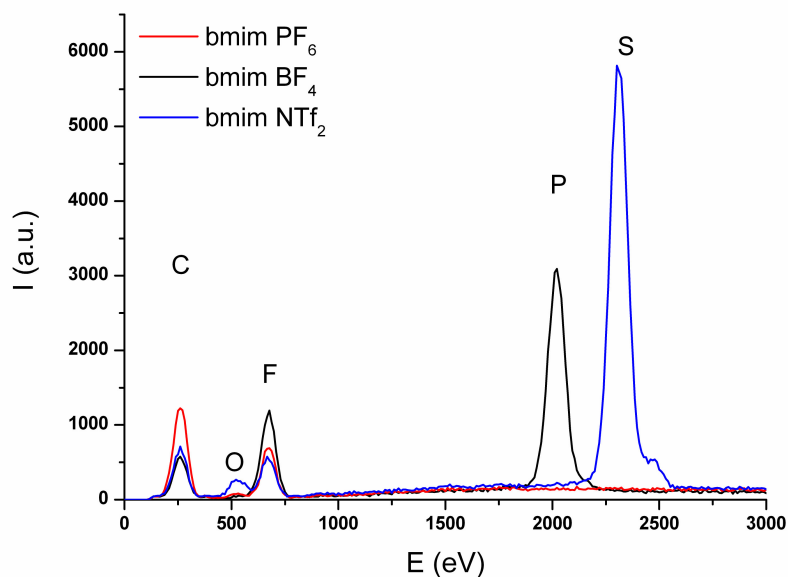


Figura 10.5. Espectros EDX de la membrana de Nylon impregnada con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

Como el flúor es un elemento común a los tres líquidos iónicos estudiados, puede por lo tanto utilizarse para evaluar la homogeneidad relativa de cada uno ellos en la correspondiente membrana de Nylon.

Los “line profiles” (perfiles de línea) F K α de las tres membranas líquidas soportadas se muestran en la **Figura 10.6**. Estos perfiles muestran la intensidad de la línea K α del fluor a lo largo de la superficie de la membrana. Se observa claramente que la homogeneidad del recubrimiento por el líquido iónico aumenta en el orden siguiente: [bmim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][BF₄⁻] < [bmim⁺][Tf₂N⁻], que es el mismo observado en el estudio morfológico (**Figura 10.4**). Por lo tanto, las irregularidades observadas por en el análisis espectroscópico en las muestras con [bmim⁺][PF₆⁻] y [bmim⁺][BF₄⁻] se deben fundamentalmente al líquido iónico depositado sobre la superficie externa de la membrana.

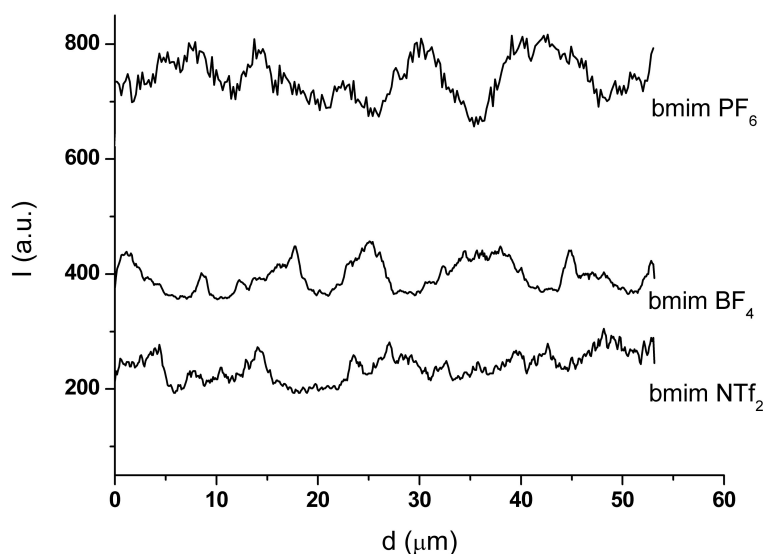


Figura 10.6. “Line profiles” F K α en las membranas de Nylon impregnadas con [bmim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻] y [bmim⁺][Tf₂N⁻].

Del mismo modo, las micrográficas de la membrana de Mitex impregnada con los tres ILs estudiados (**Figura 10.7**) revelaron la morfología típica de las membranas de PTFE, incluyendo los macroporos y rugosidades con ausencia casi completa de líquido iónico en la superficie exterior.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

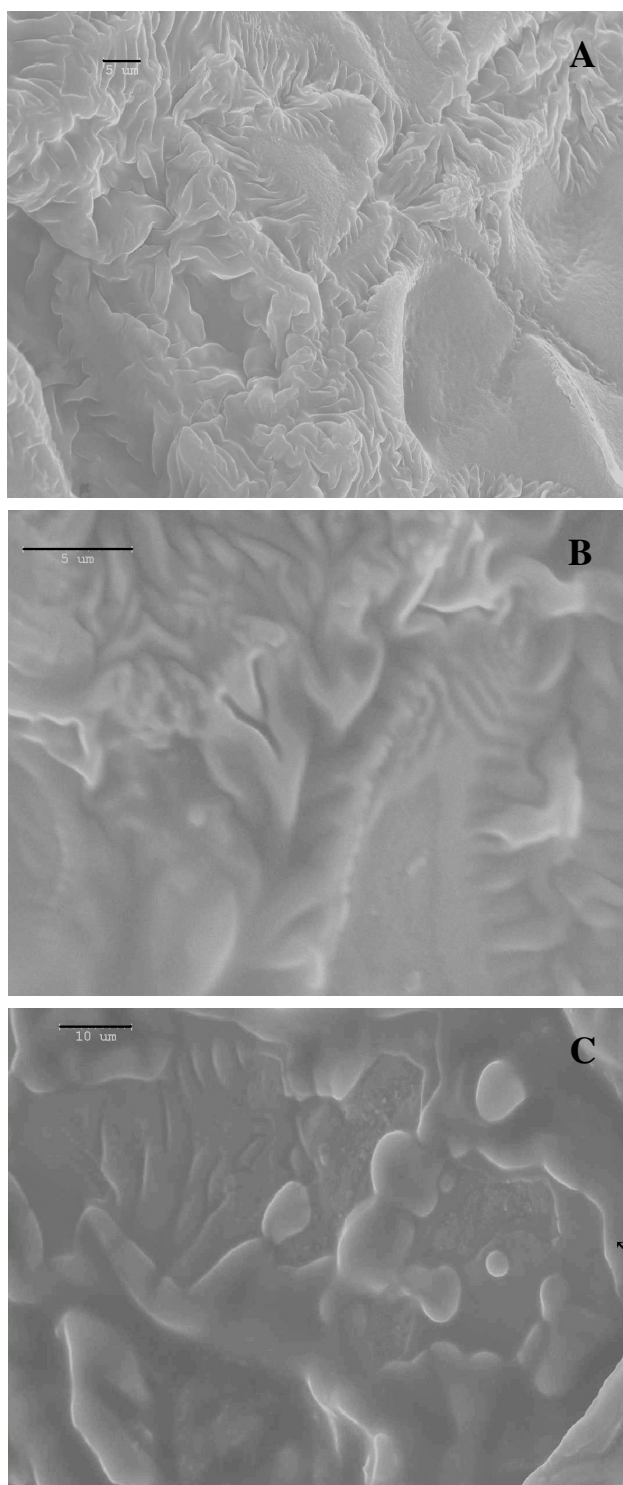


Figura 10.7. Micrografías electrónicas de barrido de la membrana de Mitex impregnada con (A) $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ (1010x) (línea de la escala = 5 μm), (B) $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ (3040x) (línea de la escala = 5 μm) y (C) $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ (1010x) (línea de la escala = 10 μm).

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

La **Figura 10.8** refleja los espectros EDX de la membrana de Mitex con los tres ILs inmovilizados.

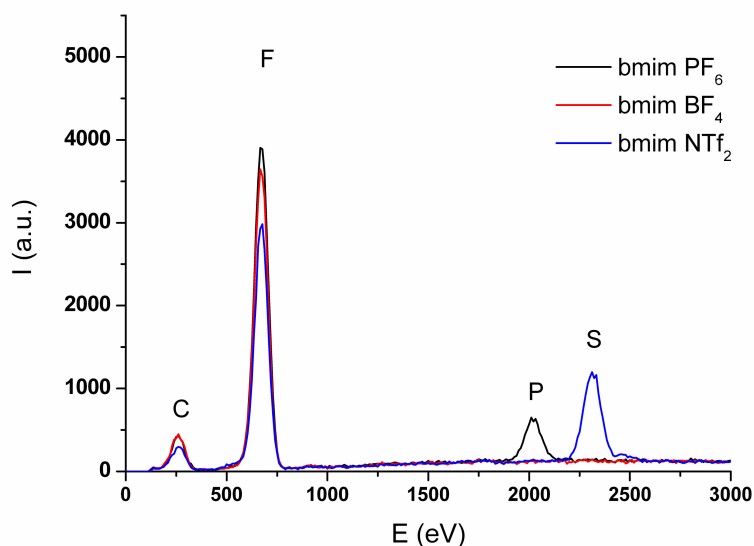


Figura 10.8. Espectros EDX de la membrana de Mitex membrana impregnada con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$.

En este caso, la altura menor de los picos de P y S encontrados en la membrana de Mitex (**Figura 10.8**) comparada con los picos obtenidos para la membrana de Nylon (**Figura 10.5**) es un reflejo cualitativo de la menor cantidad de líquido iónico absorbido en las muestras de Mitex. Este hecho podría explicarse por las diferentes propiedades texturales y el elevado carácter hidrofóbico de la membrana de Mitex, que probablemente restringe la interacción con los líquidos iónicos hidrofílicos [14] utilizados. Esta observación concuerda por completo con las pérdidas de líquido determinadas mediante un balance de materia (**Tabla 10.1**) y con los resultados mostrados en el capítulo 7, donde se observó que la separación de los compuestos de interés fue mucho menos eficaz con las membranas de Mitex (hidrofóbicas) que con las de Nylon (hidrofílicas). Estas observaciones subrayan el importante papel que juegan las propiedades texturales y el carácter hidrofóbico/hidrofílico de la membrana soporte en el diseño de las SLMs basadas en líquidos iónicos.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

Tabla 10.1. Cantidad de líquido iónico inmovilizado en las membranas líquidas soportadas.

Membrana	Cantidad de IL inmovilizado (mg)
Nylon con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	85.5
Nylon con [bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	77.6
Nylon con [bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	82
Mitex con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	18.7
Mitex con [bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	12.2
Mitex con [bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	25.9

En este caso, el F no pudo seleccionarse como elemento característico para los estudios de homogeneidad de los líquidos iónicos porque forma parte de la composición de la membrana de Mitex. Se efectuaron los “line profiles” de las líneas características P y S K α de las membranas de Nylon con [bmim⁺][PF₆⁻] y [bmim⁺][Tf₂N⁻] (**Figura 10.9**), respectivamente. Desafortunadamente, el B es el único elemento característico en el líquido iónico [bmim⁺][BF₄⁻], y como no es posible su detección por EDX, no es posible la realización de su “line profile”.

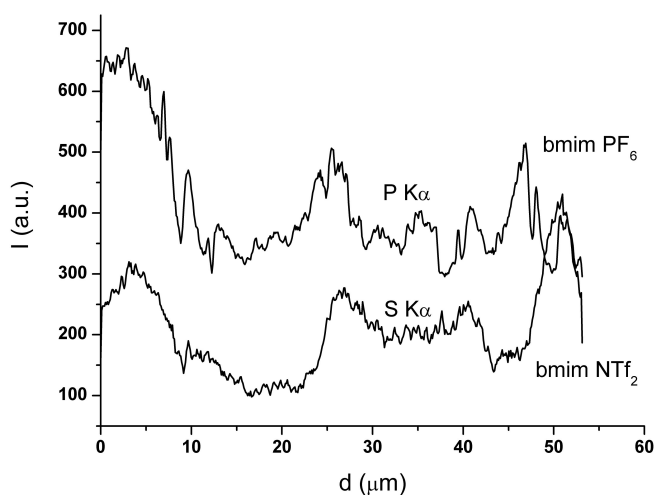


Figura 10.9. “Perfiles de línea” P K α y S K α en las membranas de Mitex impregnadas con [bmim⁺][PF₆⁻] y [bmim⁺][Tf₂N⁻].

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

De los “line profiles” reflejados en la Figura 10.9 puede deducirse que el grado de dispersión de ambos líquidos iónicos fue muy similar, estando completamente determinado por las propiedades texturales de la membrana de Mitex. En este tipo de membrana no se encontró exceso de líquido iónico en la superficie externa, de modo que los picos en los “line profiles” se asocian a los grandes macroporos y fisuras característicos de la membrana de Mitex.

10.3.3. Estabilidad operacional de las membranas líquidas soportadas

Los estudios de estabilidad se llevaron a cabo con el fin de comprobar el posible desplazamiento del líquido iónico desde el interior de los poros hacia las fases circundantes durante la operación en la célula de difusión. Los experimentos se efectuaron manteniendo las membranas con los ILs soportados sumergidas durante una semana en dicha célula de difusión con dos compartimentos independientes, como se describió en el apartado 10.2.3.

10.3.3.1. Caracterización de las membranas de Nylon con líquidos iónicos inmovilizados después de siete días de operación

La **Figura 10.10** muestra el aspecto morfológico de la membrana de Nylon impregnada con los tres ILs, analizada después de siete días de operación en la célula de difusión con hexano/hexano en las fases alimentación y receptora.

La **Figura 10.10 (A)** muestra la microestructura de la membrana de Nylon impregnada con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ después de la operación en la célula, cuyo aspecto puede compararse con el de la membrana de Nylon fresca impregnada con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ de la **Figura 10.4 (A)**.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

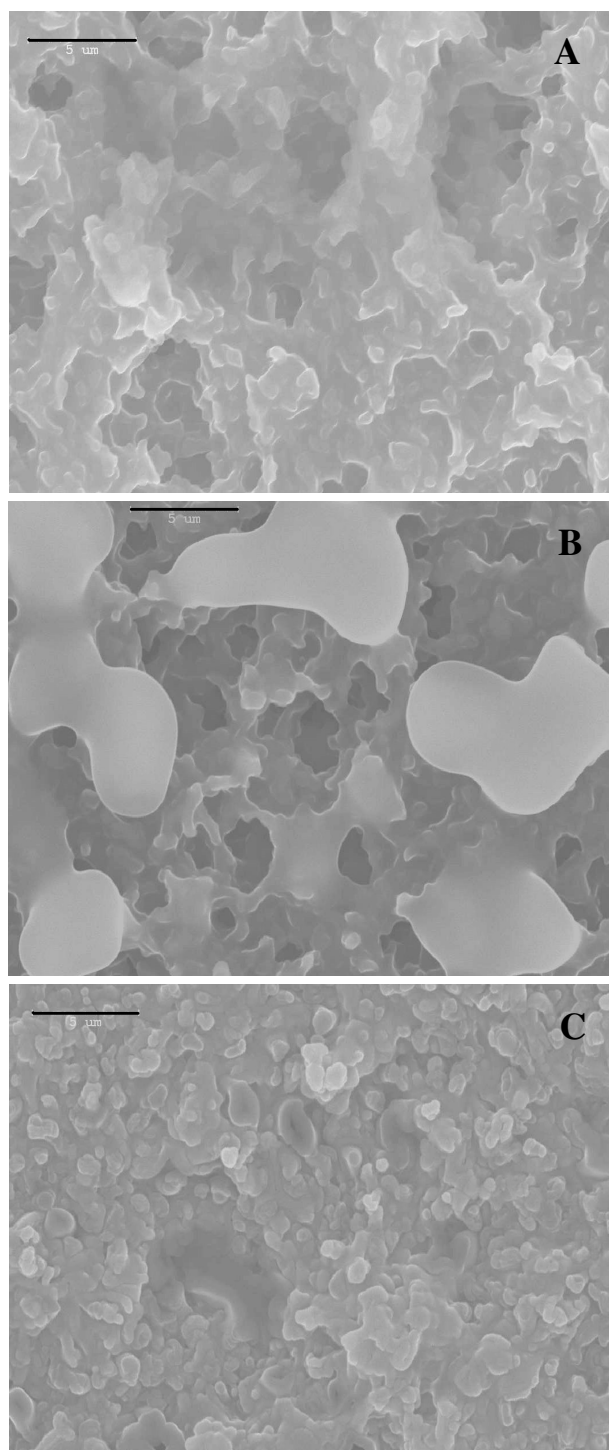


Figura 10.10. Micrografías electrónicas de barrido de la membrana de Nylon impregnada con (A) [bmim⁺][PF₆⁻], (B) [bmim⁺][BF₄⁻] y (C) [bmim⁺][Tf₂N⁻] después de siete días de operación en hexano/hexano (3040x) (línea de la escala = 5 μm).

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

De dicha comparación puede concluirse que la mayor parte del líquido iónico de la superficie externa de la membrana desapareció durante la operación en la célula. Sin embargo, la comparación de los espectros EDX de las membranas antes (**Figura 10.5**) y después (**Figura 10.11**) de operación en hexano/hexano mostró una gran similitud entre ellos. Dichos espectros se adquirieron a partir de muestras de unas pocas micras de grosor y muestran que la cantidad de líquido iónico concentrada en el interior de los poros de la membrana es muy superior a la acumulada en su superficie externa. Por lo tanto, los estudios SEM permiten deducir que únicamente el líquido iónico depositado sobre la superficie externa de la membrana ha sido eliminado durante la operación. La cantidad de dicho líquido retenida en los poros se mantiene en apariencia constante y, subsiguientemente, la membrana resulta estable después de 7 días de operación en n-hexano.

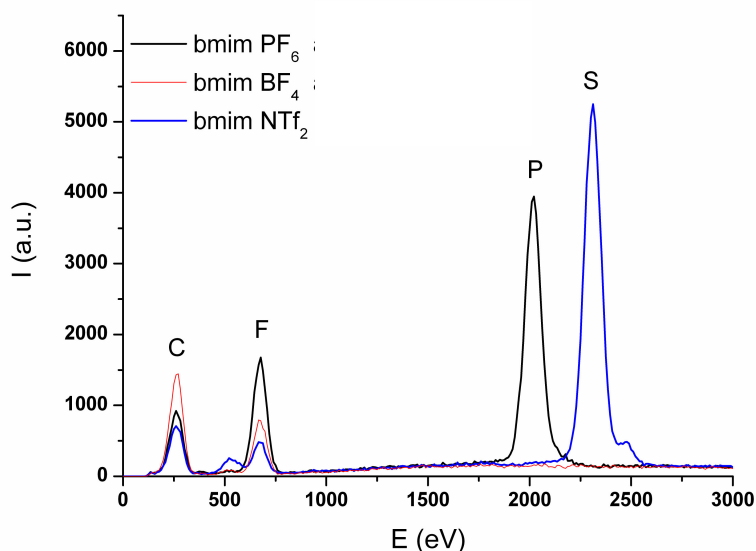


Figura 10.11. Espectros EDX de la membrana de Nylon impregnada con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$ después de siete días de operación en hexano/hexano.

En el caso de la membrana de Nylon impregnada con $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, se constató la permanencia después de la operación en la célula de difusión de ciertas acumulaciones de líquido iónico (áreas brillantes) sobre la superficie externa de la membrana (**Figura 10.10 (B)**).

El aspecto morfológico del $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$ fue el mismo antes (**Figura 10.4 (C)**) y después (**Figura 10.10 (C)**) de la operación en hexano/hexano, con la completa desaparición del líquido iónico de la superficie externa de la membrana.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

Una vez más, los picos obtenidos con EDX se superpusieron prácticamente en la membrana líquida soportada antes (**Figura 10.5**) y después (**Figura 10.11**) de la operación, demostrando que el líquido iónico permaneció ocluido en el interior de los poros.

Así pues, de los estudios realizados mediante SEM-EDX puede concluirse que, en los tres casos estudiados de ILs soportados sobre membranas de Nylon, no tuvieron lugar pérdidas apreciables de líquido iónico después de una semana de operación en una célula de difusión con hexano/hexano en las fases alimentación y receptora. Sólo se detectaron pérdidas mínimas del líquido iónico acumulado en la superficie externa de las membranas líquidas soportadas, detectadas cualitativamente en las micrografías de barrido. La migración diferencial de los líquidos iónicos desde la superficie externa de las SLMs hacia el n-hexano hidrofóbico circundante podría explicarse teniendo en cuenta la diferente hidrofiliidad de los tres líquidos iónicos estudiados, que sigue la secuencia $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-] > [\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ [14]. Teniendo en cuenta el carácter hidrofóbico de las fases en contacto (n-hexano), la permanencia del líquido iónico sobre la superficie externa de las membranas sería mayor cuando se usa el líquido más hidrofílico ($[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$), como se evidencia en las micrografías (**Figura 10.10(C)**).

Los “line profiles” F K α de las membranas de Nylon impregnadas con los tres líquidos iónicos después de la operación se muestran en la **Figura 10.12**.

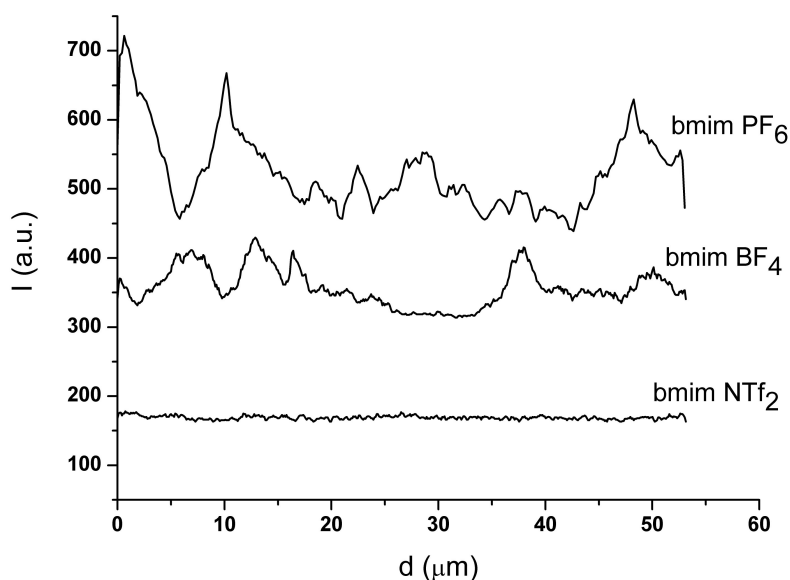


Figura 10.12. “Line profiles” F K α en las membranas de Nylon impregnadas con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$ después de siete días de operación en hexano/hexano.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

Comparando los “line profiles” anteriores con los obtenidos para las SLMs antes de operación reflejados en la **Figura 10.6**, puede observarse que después de la operación en la célula de difusión con hexano/hexano la distribución obtenida para los líquidos iónicos es más homogénea.

Los resultados cuantitativos obtenidos por diferencia de peso de las SLMs antes y después de siete días de operación en la célula de difusión con hexano/hexano confirmaron los resultados morfológicos y espectrales obtenidos para las membranas de Nylon, como puede observarse en la **Tabla 10.2**.

Tabla 10.2. Fase membrana líquida remanente en las SLMs después de siete días de operación en hexano/hexano determinada por balance de materia.

Membrana	IL que permanece en la SLM (%)
Nylon con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	99.3
Nylon con [bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	99.5
Nylon con [bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	99.9

10.3.3.2. Caracterización de las membranas de Mitex con líquidos iónicos inmovilizados después de siete días de operación

El estudio morfológico realizado por SEM de la membrana de Mitex impregnada con [bmim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻] y [bmim⁺][Tf₂N⁻] (**Figura 10.13**) se efectuó tras siete días de operación usando hexano/hexano en una célula de difusión como fases de contacto. No se evidenciaron cambios en la morfología de dichas membranas usada con respecto a las membranas con IL inmovilizado antes de operación (**Figura 10.7**).

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

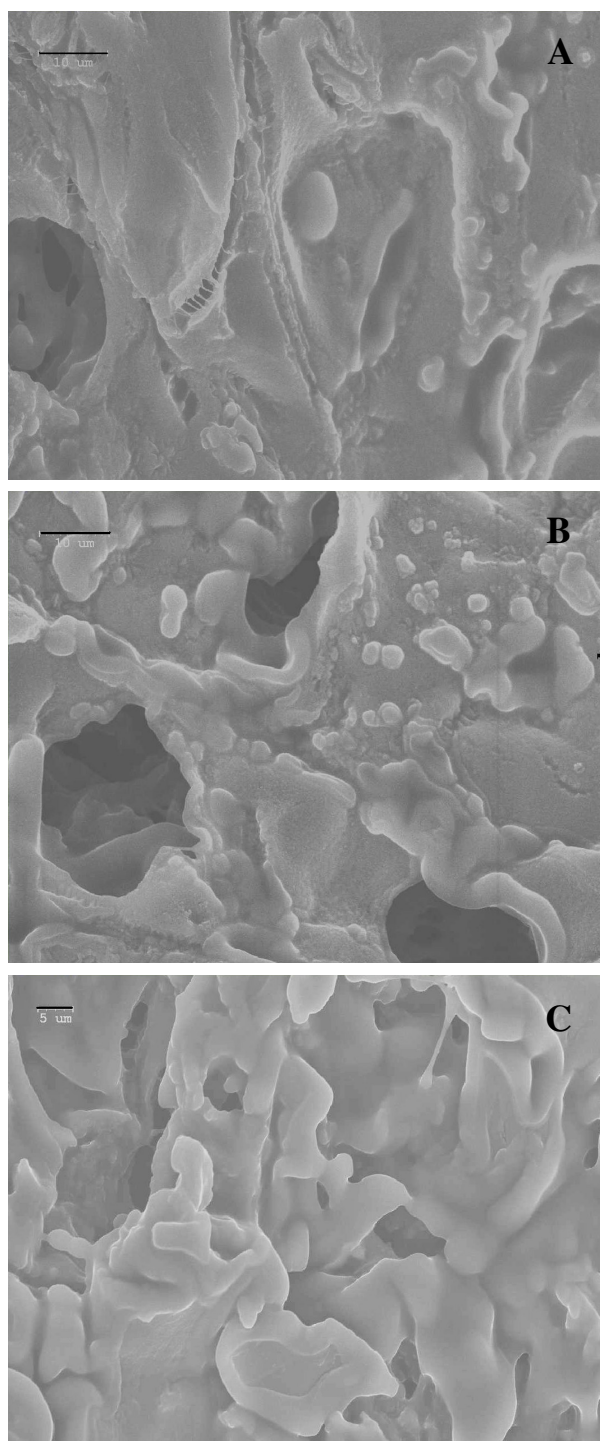


Figura 10.13. Micrografías electrónicas de barrido de la membrana de Mitex impregnada con (A) $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ (1010x) (línea de la escala = 10 μm), (B) $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ (1010x) (línea de la escala = 10 μm) y (C) $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$ (1010x) (línea de la escala = 5 μm) después de siete días de operación en hexano/hexano.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

Por otro lado, de la comparación de los espectros EDX de las muestras anteriores (**Figura 10.14**) con los obtenidos de las membranas líquidas soportadas antes de operación (**Figura 10.8**) puede concluirse, una vez más, que no se detectaron pérdidas sustanciales de líquido iónico en la membrana de Mítex después de siete días de operación en la célula con hexano/hexano.

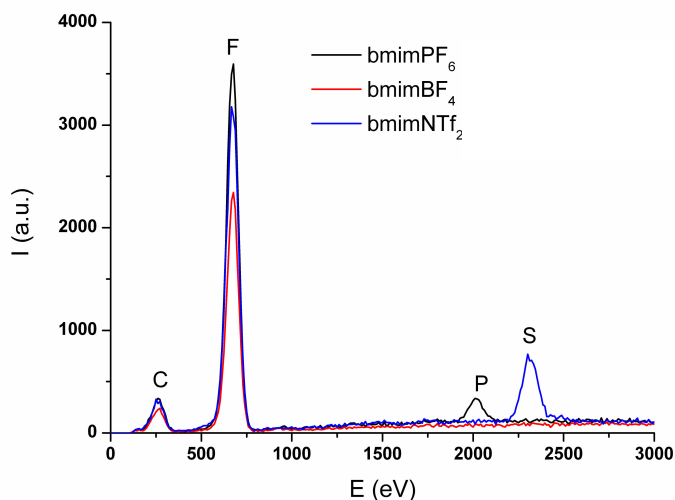


Figura 10.14. Espectros EDX de las membranas de Mítex impregnadas con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$ después de siete días de operación en hexano/hexano.

Adicionalmente, se muestran en la **Figura 10.15** los “line profiles” de las membranas de Mítex impregnadas con dos de los líquidos iónicos estudiados.

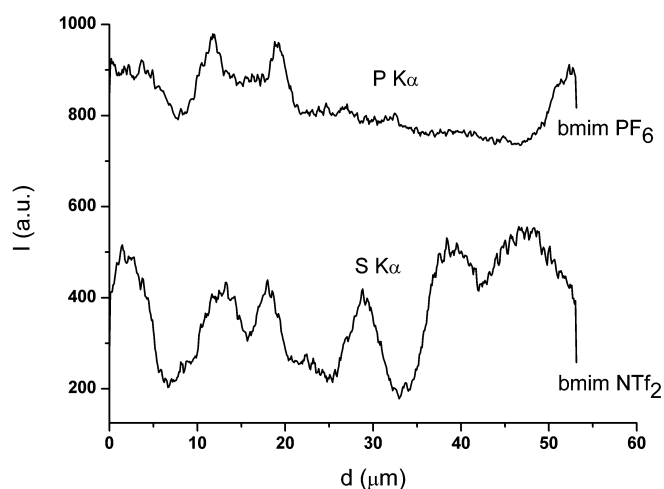


Figura 10.15. “Line profiles” $\text{P K}\alpha$ y $\text{S K}\alpha$ en las membranas de Mítex impregnadas con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{Tf}_2\text{N}^-]$, después de siete días de operación en hexano/hexano.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

Comparando estos “line profiles” con los mostrados en la **Figura 10.9** (tomados de las SLMs antes de operación) puede deducirse que la distribución de los líquidos iónicos es más homogénea después de la inmersión en n-hexano.

Al igual que en el caso de las membranas de Nylon, las diferencias de peso entre las membranas de Mitex con líquido iónico inmovilizado antes y después de siete días de operación (**Tabla 10.3**) son pequeñas. Este hecho confirma que los líquidos iónicos estudiados se retienen mayoritariamente en los poros de la membrana y que cualquier migración hacia el disolvente circundante no es significativa.

Tabla 10.3. Fase membrana líquida remanente en las SLMs después de siete días de operación en hexano/hexano determinada por balance de materia.

Membrana	IL que permanece en la SLM (%)
Mitex con [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	82.1
Mitex con [bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	85.1
Mitex con [bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	87.1

Por tanto, nuestros hallazgos confirman la elevada estabilidad operacional de estas SLMs, que posibilitaría su utilización en procesos de separación durante largos tiempos de operación. Otros autores han observado también una alta estabilidad operacional en SLMs basadas en líquidos iónicos utilizando agua como fase alimentación/receptora [15-17].

10.4. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo la caracterización microscópica mediante SEM-EDX de seis membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos. Como soporte se han usado membranas de Nylon y Mitex, en las que se inmovilizaron tres ILs: [bmim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][PF₆⁻] y [bmim⁺][Tf₂N⁻]. Los análisis se efectuaron en tres etapas: membranas comerciales, membranas con líquido iónico ocluido, y tras siete días de operación en una célula de difusión con hexano/hexano como fases de contacto.

Las membranas de Nylon impregnadas con líquido iónico mostraron una distribución homogénea del mismo en el interior de los poros, así como cierto grado de recubrimiento superficial por parte del líquido iónico, en función de la viscosidad del mismo. En el caso de la membrana de Mitex, la cantidad de líquido iónico absorbido en los poros fue inferior, debido probablemente al carácter hidrofóbico de la misma y a sus peculiares propiedades texturales. Esta observación subraya la importancia del carácter hidrofóbico/hidrofílico, así como de las propiedades texturales de la membrana soporte en el diseño de membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos. Las seis SLMs estudiadas mantuvieron los ILs ocluidos en el interior de sus poros después de haber estado sumergidas durante una semana en una célula de difusión con n-hexano en ambos compartimentos, demostrando así a nivel microscópico su elevada estabilidad operacional.

10.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Poliwoda, N. Ilczuk, P.P. Wieczorek, Transport of peptides through supported liquid membranes, *Sep. Purif. Technol.* (2007) *En prensa*.
- [2] G. Muthuramam, K. Palanivelu, Transport of textile dye in vegetable oils based supported liquid membrane, *Dyes Pigments* 70 (2006) 99-104.
- [3] S. Happel, R. Streng, P. Vater, W. Ensinger, Sr/Y separation by supported liquid membranes based on nuclear track micro filters, *Radiat. Measur.* 36 (2003) 761-766.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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 (2002a) 3865-3871.
- [7] P. Bonhôte, A.-P. Dias, N. Papageorgio, K. Kalayanasundaram, M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts, *Inorg. Chem.* 35 (5) (1996) 1168-1178.
- [8] T. Welton, Room-temperature ionic liquids, Solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2083.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.

10. Estudio de la estabilidad operacional de SLMs basadas en líquidos iónicos

- [12] 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.
- [13] A. P. de los Ríos, F. J. Hernández, M. Rubio, D. Gómez, G. VÍllora, Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 190-195.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] R. Fortunato, C.A.M. Afonso, J. Benavente, E. Rodríguez-Castellón, J.G. Crespo, Stability of supported ionic liquid membranes as studied by X-ray photoelectron spectroscopy, *J. Membr. Sci.* 256 (2005) 216-223.
- [17] 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.

11

Conclusiones generales

11. CONCLUSIONES GENERALES

Los líquidos iónicos han sido utilizados satisfactoriamente como nuevos medios de reacción y separación en reacciones de transesterificación enzimáticas.

Con relación al empleo de los líquidos iónicos como medios de reacción cabe destacar los siguientes logros:

1. Los líquidos iónicos inmiscibles con agua han resultado medios muy adecuados para llevar a cabo la síntesis de ésteres catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica*, incrementando la actividad y selectividad enzimática con respecto a los valores obtenidos en disolventes orgánicos convencionales como n-hexano.
2. El uso de líquidos iónicos miscibles con agua ha dado lugar a menores valores de actividad enzimática que el del disolvente orgánico convencional, n-hexano, aunque la selectividad en estos medios es mucho mayor (> 99.9%).
3. Los estudios de estabilidad de la lipasa B de *Candida antarctica* en medios líquido iónico indican una mayor estabilidad de la misma en líquidos iónicos inmiscibles con agua que en líquidos iónicos miscibles con ésta.
4. Se ha observado que los líquidos iónicos constituidos por cationes más hidrofóbicos y aniones menos nucleófilos conducen a mayores valores de actividad y estabilidad enzimática.
5. Se ha obtenido un nuevo derivado enzimático de la lipasa B de *Candida antarctica* mediante absorción y entrecruzamiento covalente de la enzima sobre un soporte de polipropileno (CALB-PP) que mantiene su actividad catalítica en líquidos iónicos miscibles con agua, los cuales desactivan la enzima libre.

Considerando la utilización de los líquidos iónicos como fase líquida en membranas líquidas soportadas, se han obtenido los siguientes resultados:

1. Se han desarrollado membranas líquidas soportadas basadas en líquidos iónicos que permiten llevar a cabo la separación selectiva de sustratos y productos de reacciones de transesterificación: ésteres vinílicos, alcoholes, ésteres alquílicos y ácidos carboxílicos.

2. Se ha determinado la influencia de las membranas poliméricas utilizadas como soporte para inmovilizar el líquido iónico, encontrando que cuando se soporta el líquido iónico en membranas de naturaleza hidrofílica se consigue la separación de los compuestos de interés de forma más selectiva. La caracterización mediante microscopía de barrido electrónico acoplada a energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX) de las membranas líquidas soportadas ha permitido comprobar que las membranas soporte de naturaleza hidrofílica son capaces de ocluir una mayor cantidad de líquido iónico en sus poros, lo que explicaría la mayor selectividad mostrada por éstas en la separación de compuestos de interés.
3. Se ha estudiado la influencia del líquido iónico utilizado como fase líquida soportada en la separación selectiva de los compuestos de interés, encontrándose que un incremento en los valores de hidrofiliidad de los líquidos iónicos se traduce en un incremento en la eficacia de separación de las membranas líquidas soportadas resultantes.
4. Se observado que un incremento de los coeficientes de reparto de los compuestos en estudio entre el líquido iónico y la fase alimentación/receptora (n-hexano) se traduce en un incremento los valores de permeabilidad obtenidos para los mismos, lo que permite concluir que el fenómeno de transporte a través de la membrana está regulado principalmente por la afinidad del líquido hacia cada uno de los compuestos.
5. El estudio del mecanismo molecular implicado en el fenómeno de transporte a través de membranas líquidas soportadas ha permitido establecer una relación matemática entre la permeabilidad de los compuestos y los coeficientes de reparto de los mismos entre el líquido iónico y la fase alimentación/receptora, que ha sido validada experimentalmente. Esta correlación matemática permite predecir fácilmente la capacidad de una membrana líquida soportada basada en líquidos iónicos para separar dos compuestos mediante la evaluación del coeficiente de reparto de cada compuesto entre el líquido iónico y la fase alimentación/receptora.
6. Se ha analizado la estabilidad operacional de las membranas líquidas soportadas obtenidas someténdolas a ocho ciclos de operación sucesivos, no habiéndose observado merma alguna en la capacidad de separación de las mismas, lo que demuestra su excelente estabilidad operacional. La caracterización microscópica de las membranas líquidas soportadas mediante microscopía de barrido electrónico acoplada a energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX) ha permitido comprobar que el líquido iónico permanece ocluido en el interior de los poros de las membranas después de una semana de operación, constatando así a nivel microscópico la elevada estabilidad operacional de las mismas.

11. Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en la presente Tesis auguran un enorme potencial para la aplicación de los líquidos iónicos como disolventes alternativos a los disolventes orgánicos convencionales en procesos industriales de química fina y farmacéutica, con importantes beneficios medioambientales y socioeconómicos.

12

Perspectivas futuras

12. PERSPECTIVAS FUTURAS

A la vista de las conclusiones extraídas de la presente Tesis, el número de líneas de trabajo e investigación que se pueden seguir es enorme, y algunas son evidentes.

En primer lugar, sería muy interesante aplicar las metodologías de reacción y separación descritas a otros procesos de gran interés químico-farmacéutico como la producción de compuestos enantioméricamente puros mediante resoluciones racémicas de alcoholes secundarios, que pueden ser realizadas mediante reacciones de transesterificación catalizadas por lipasas. La síntesis de biodiésel, que también puede llevarse a cabo mediante este tipo de reacciones, sería otro potencial proceso en el que las metodologías descritas podrían resultar ventajosas.

También resultaría muy interesante llevar a cabo la síntesis de nuevos líquidos iónicos tomando como punto de partida las conclusiones extraídas en relación a las composiciones catiónicas y aniónicas más adecuadas para llevar a cabo los procesos de reacción y separación propuestos.

Se podrían desarrollar además nuevos derivados entrecruzados de la *lipasa B de Candida antarctica* como cristales de las enzimas entrecruzados covalentemente (CLECs), como enzimas en disolución entrecruzadas covalentemente (CLEs) o como agregados enzimáticos entrecruzados covalentemente (CLEAs), que hicieran posible la eliminación completa del soporte de inmovilización.

Sería muy interesante utilizar módulos de membrana en espiral como soportes de inmovilización del líquido iónico, ya que permitirían la inmovilización de una mayor cantidad de líquido iónico manteniendo un área de contacto interfacial elevada, con lo que presumiblemente se lograrían mayores capacidades de separación de los compuestos de interés, permitiendo además el diseño de procesos continuos.

Además, los resultados expuestos en la presente Tesis podrían ser la base del diseño de procesos de producción intensificados basados en líquidos iónicos en los cuales la conversión catalítica, la producción, la separación y/o concentración de los productos y la recuperación del catalizador se integraran en una operación única, empleando bioreactores de membrana. Estos procesos integrados de reacción y separación podrían suponer importantes beneficios económicos y medioambientales comparados con los procesos de producción convencionales. Entre las ventajas más evidentes de su implementación podrían destacarse las altas velocidades de reacción y separación, la generación de pocos residuos y de bajos consumos de energía, la alta calidad en la producción y la creación de condiciones de trabajo más seguras.

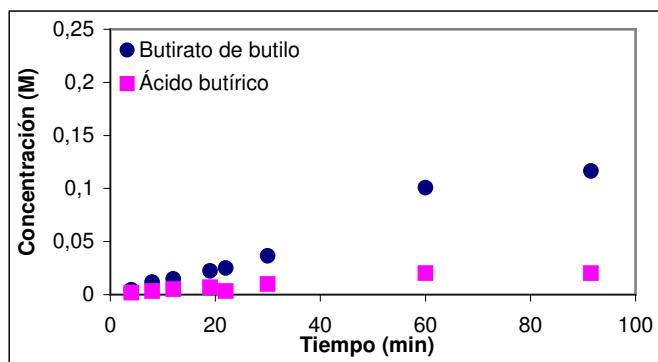
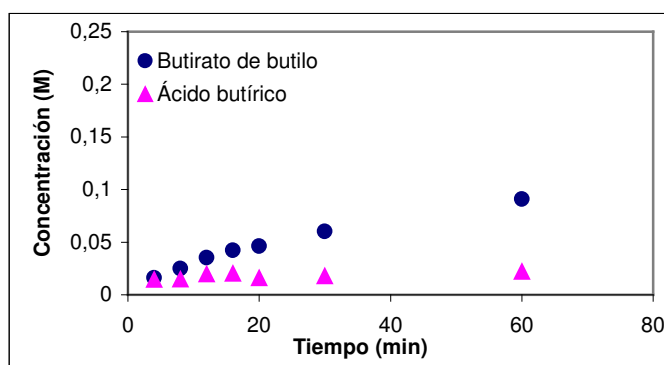
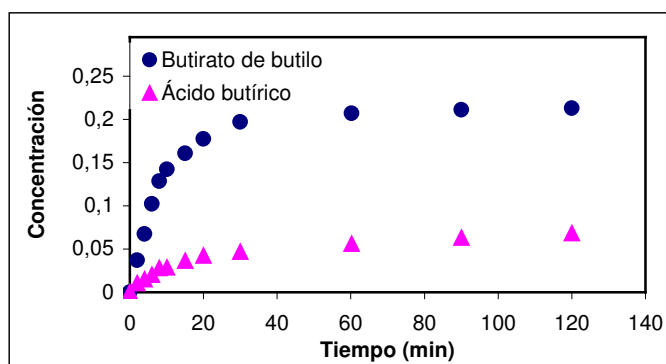
Para la implementación a nivel industrial de procesos basados en líquidos iónicos sería necesario abordar los siguientes aspectos:

- Conocer todos los aspectos relacionados con el impacto medioambiental de los líquidos iónicos, fundamentalmente su toxicidad y biodegradabilidad. Este campo de investigación presenta un enorme potencial, ya que para muchos líquidos iónicos estos datos no han sido determinados, y podrían sentar las bases para el diseño de líquidos iónicos no tóxicos y biodegradables mediante la adecuada selección del catión y el anión.
- Desarrollar modelos que predigan las propiedades físico-químicas de los líquidos iónicos en función del catión y del anión constituyentes del mismo. Esto haría posible diseñar el líquido iónico más adecuado para cada aplicación concreta sin necesidad del largo y costoso periodo de experimentación a escala de laboratorio.
- Realizar estudios a escala piloto con el fin de obtener la información necesaria para llevar a cabo un diseño eficiente de estos procesos.

Como última reflexión, es conveniente comentar que aunque los líquidos iónicos podrían ser aplicados satisfactoriamente en numerosos procesos químicos, es de esperar que sólo sean aplicados industrialmente en aquellos donde su utilización sea altamente ventajosa frente a los disolventes orgánicos convencionales debido fundamentalmente a los largos ciclos de vida de las actuales plantas de producción y el alto riesgo que se percibe en el proceso de innovación. No obstante, aunque no se espera que los líquidos iónicos cambien el conjunto de la industria química, seguro que encontrarán aplicación en un importante número de procesos industriales.

13

Anexos

ANEXO I. PERFILES DE CONCENTRACIONES DE LOS COMPUESTOS EN REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN**Figura 13.1.** Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en n-hexano a 30°C y pH=7**Figura 13.2.** Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [bmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH=7.**Figura 13.3** Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [omim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH=7.

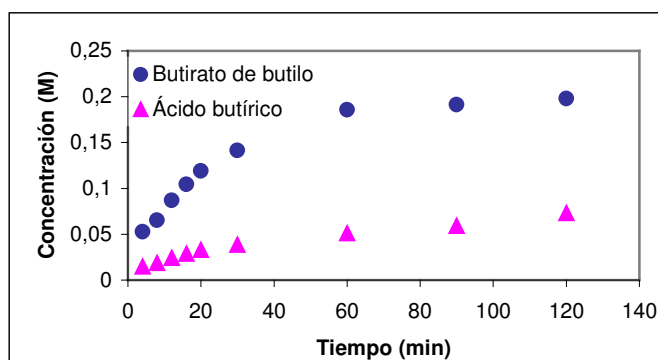


Figura 13.4. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[bmim^+][PF_6^-]$ a $30^\circ C$ y $pH = 6$.

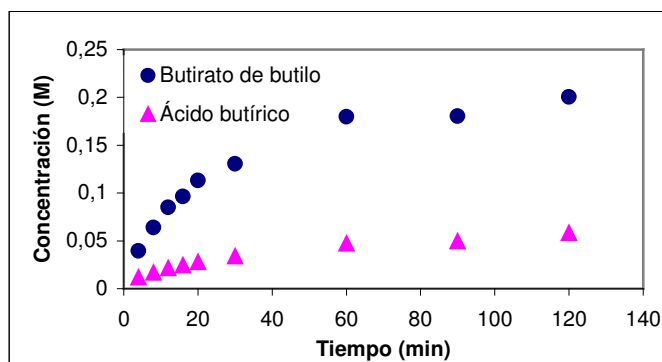


Figura 13.5. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[bmim^+][PF_6^-]$ a $30^\circ C$ y $pH = 6.54$.

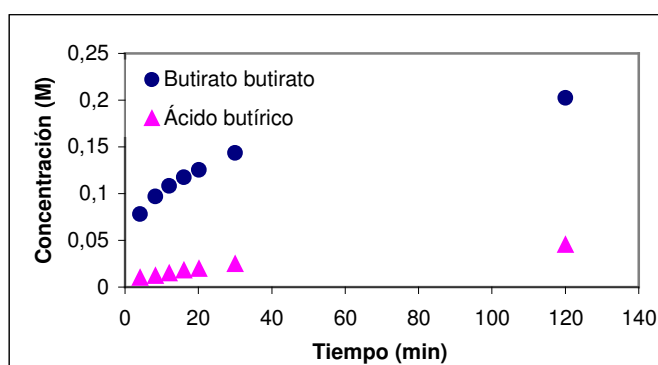


Figura 13.6. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[bmim^+][PF_6^-]$ a $30^\circ C$ y $pH = 7.54$.

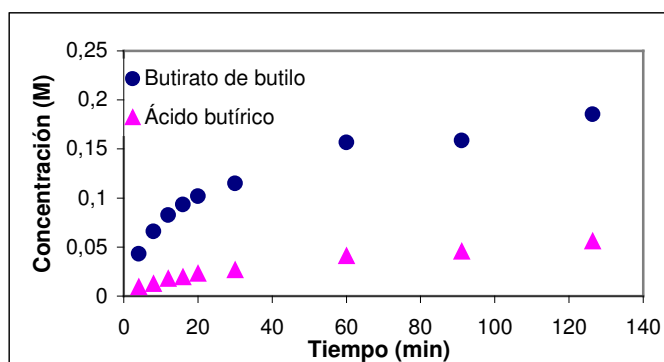


Figura 13.7. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y pH = 8.19.

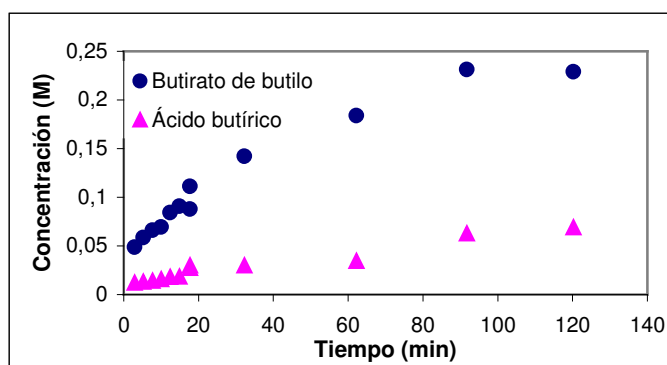


Figura 13.8. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 40°C y pH = 7.

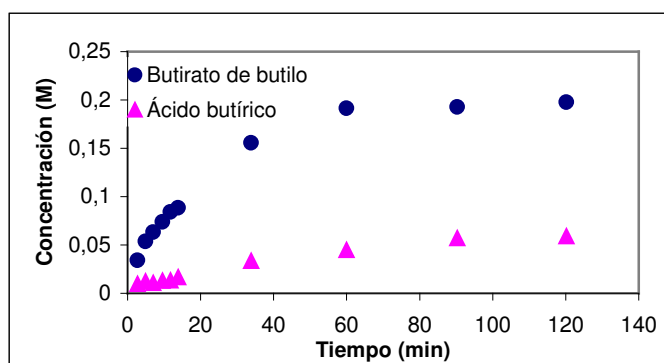


Figura 13.9. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 50°C y pH = 7.

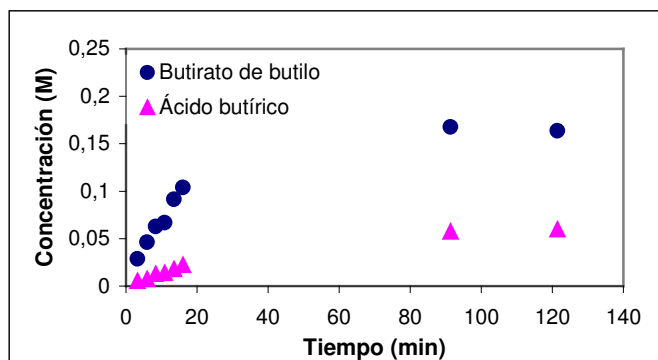


Figura 13.10. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 60°C y $\text{pH} = 7$.

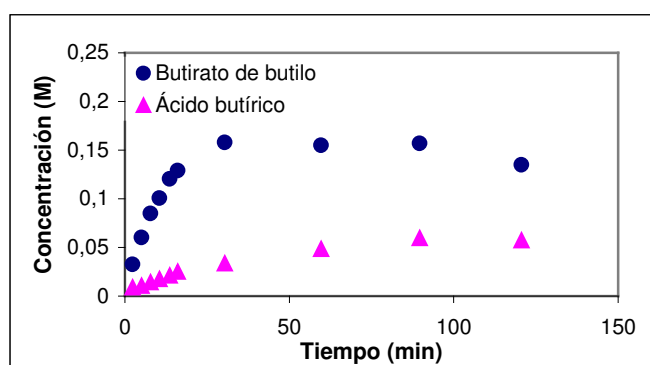


Figura 13.11. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 70°C y $\text{pH} = 7$.

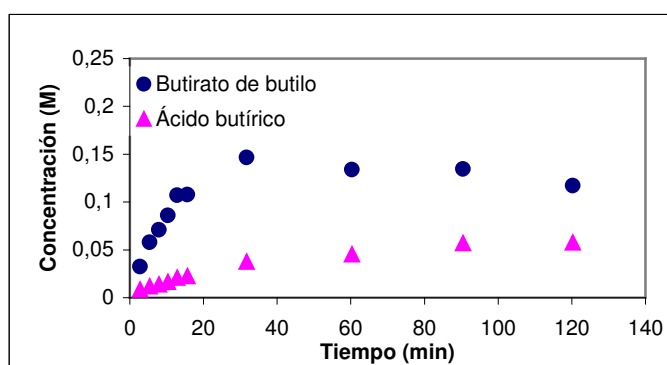


Figura 13.12. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 80°C y $\text{pH} = 7$.

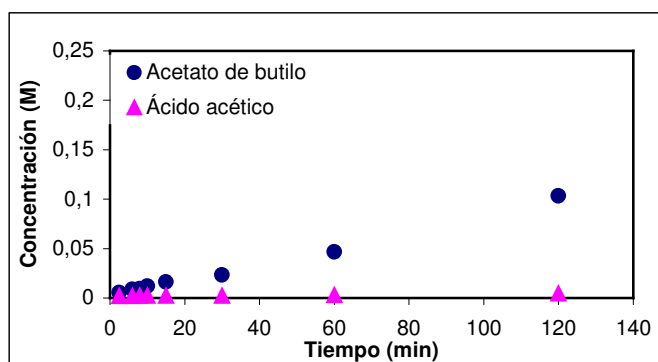


Figura 13.13. Perfil de reacción para la síntesis de acetato de butilo en [bmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH = 7.

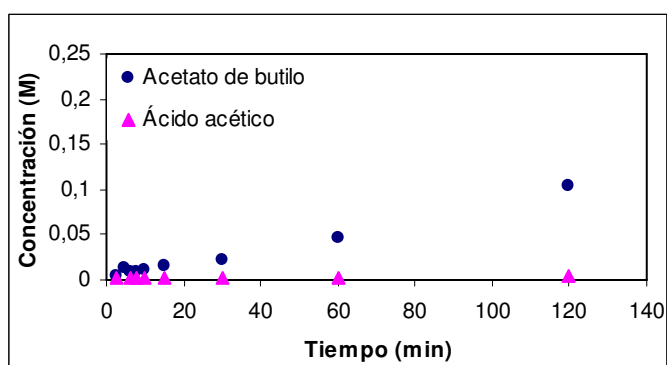


Figura 13.14. Perfil de reacción para la síntesis de acetato de butilo en [omim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH = 7.

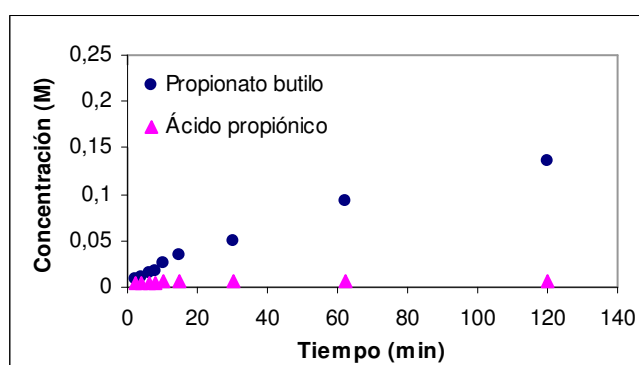


Figura 13.15. Perfil de reacción para la síntesis de propionato de butilo en [bmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH = 7.

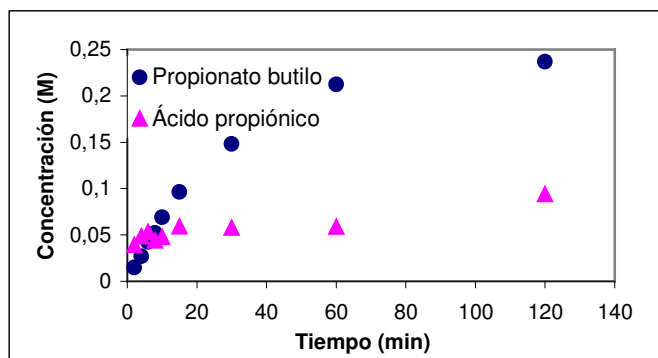


Figura 13.16. Perfil de reacción para la síntesis de propionato de butilo en $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y $\text{pH } 7$.

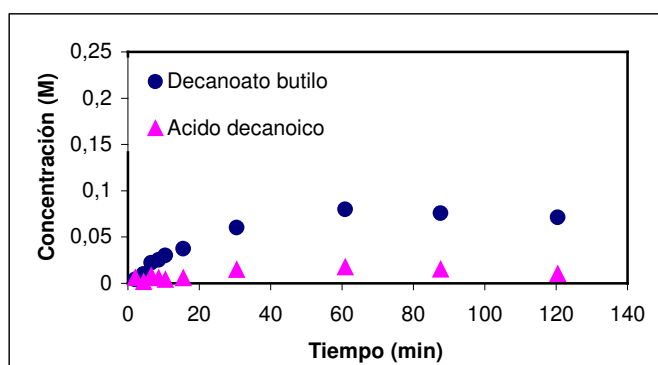


Figura 13.17. Perfil de reacción para la síntesis de decanoato de butilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y $\text{pH } 7$.

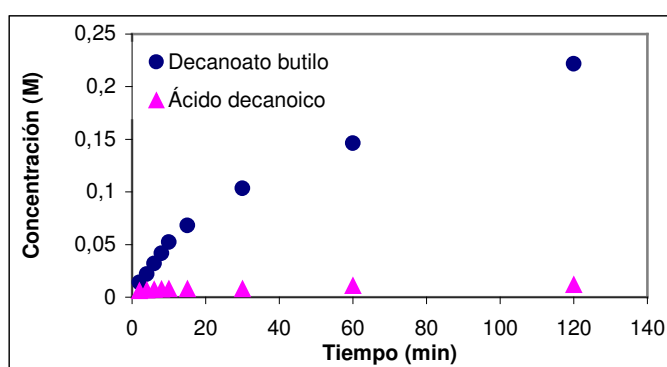


Figura 13.18. Perfil de reacción para la síntesis de decanoato de butilo en $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y $\text{pH } 7$.

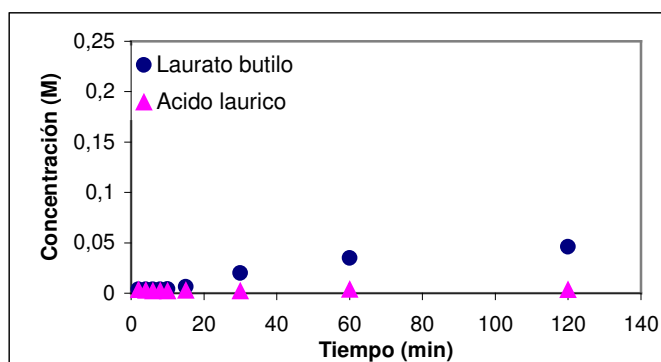


Figura 13.19. Perfil de reacción para la síntesis de Laurato de butilo en [bmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH 7.

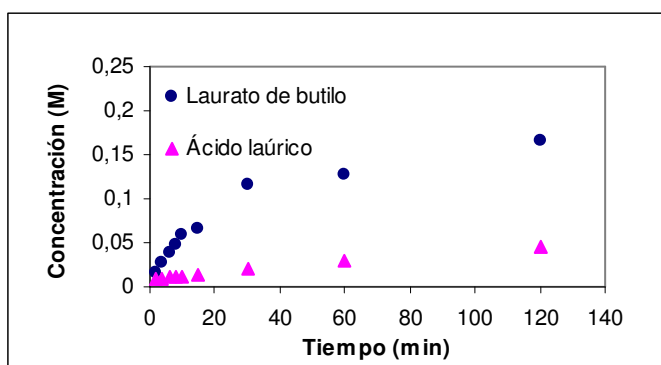


Figura 13.20. Perfil de reacción para la síntesis de Laurato de butilo en [omim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH 7.

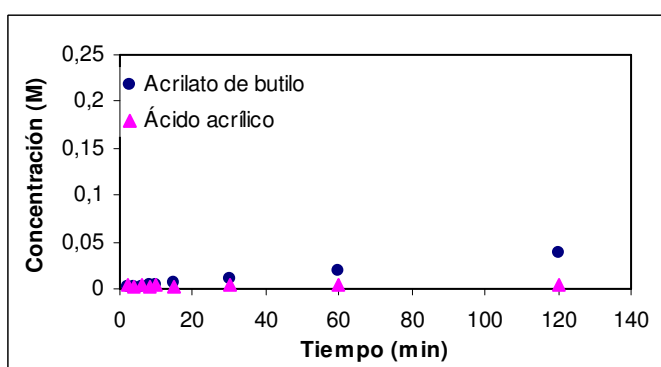


Figura 13.21. Perfil de reacción para la síntesis de Acrilato de butilo en [bmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH 7.

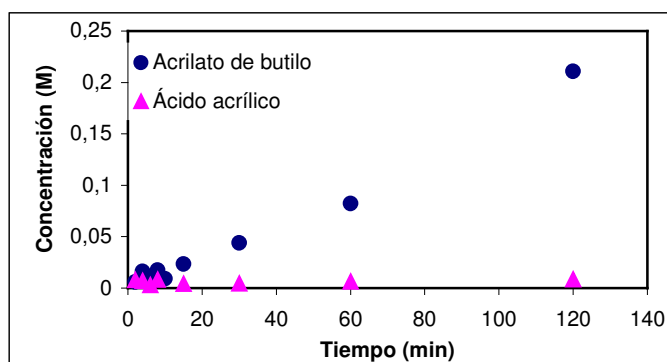


Figura 13.22. Perfil de reacción para la síntesis de acrilato de butilo en $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y pH 7.

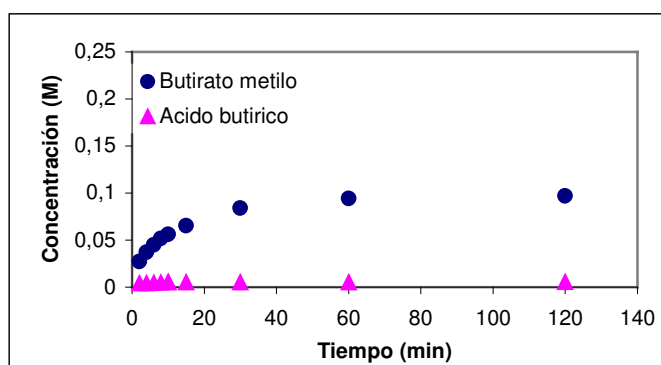


Figura 13.23. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de metilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y pH 7.

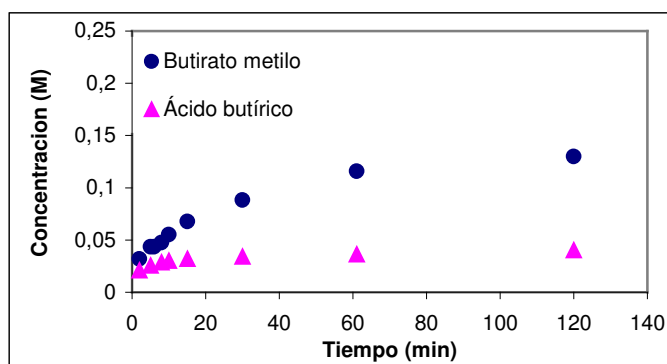


Figura 13.24. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de metilo en $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 30°C y pH 7.

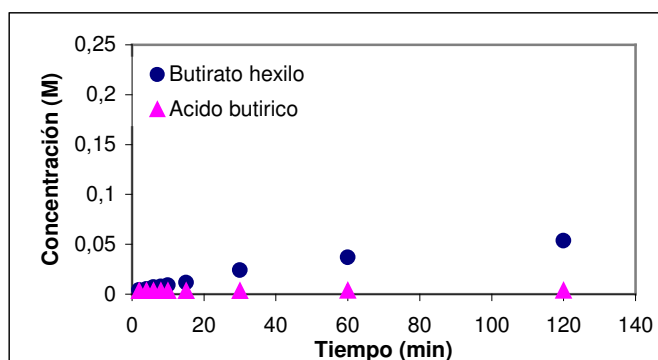


Figura 13.25. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de hexilo en [bmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH 7.

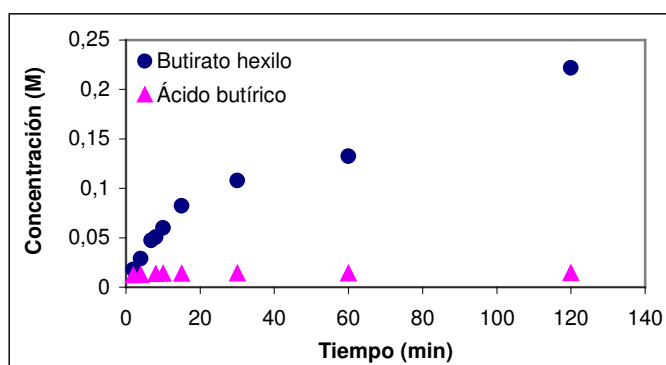


Figura 13.26. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de hexilo en [omim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH 7.

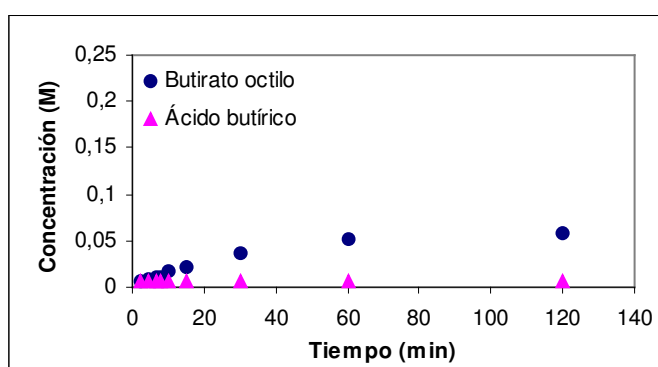


Figura 13.27. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de octilo en [BMIM⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH 7.

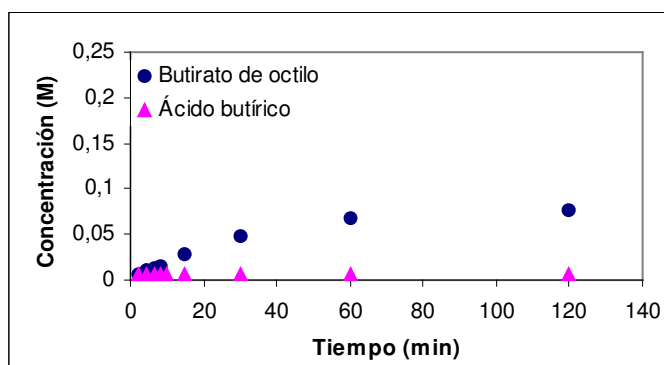


Figura 13.28. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de octilo en [omim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH 7.

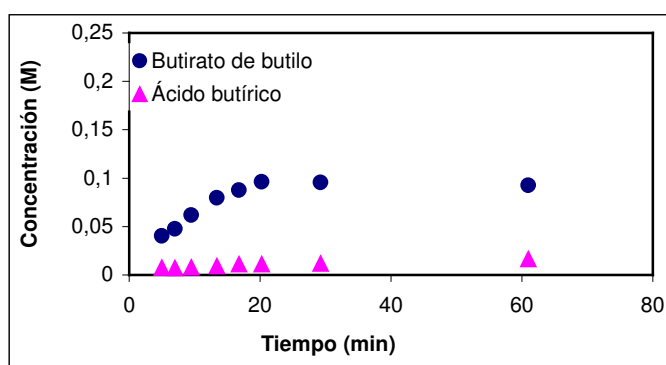


Figura 13.29. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [bdmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH 7.

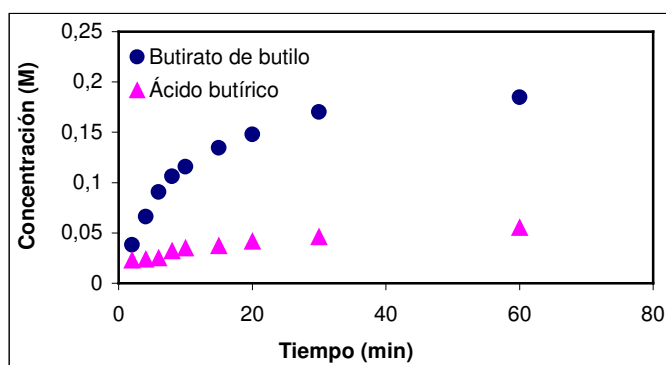


Figura 13.30. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [hmim⁺][PF₆⁻] a 30°C y pH 7.

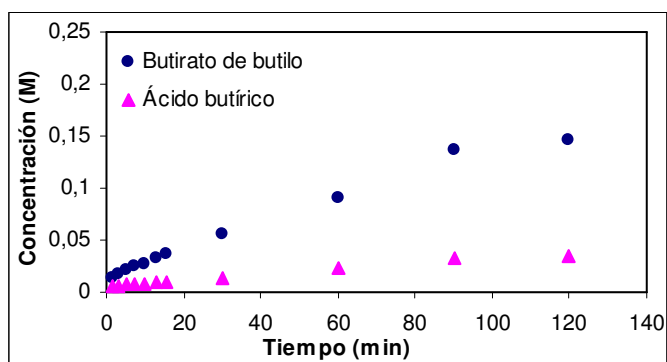


Figura 13.31. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [emim⁺][NTf₂⁻] a 30°C y pH 7.

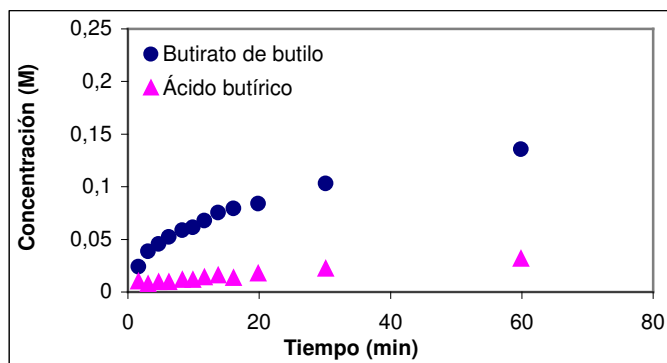


Figura 13.32. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [bmim⁺][NTf₂⁻] a 30°C y pH 7.

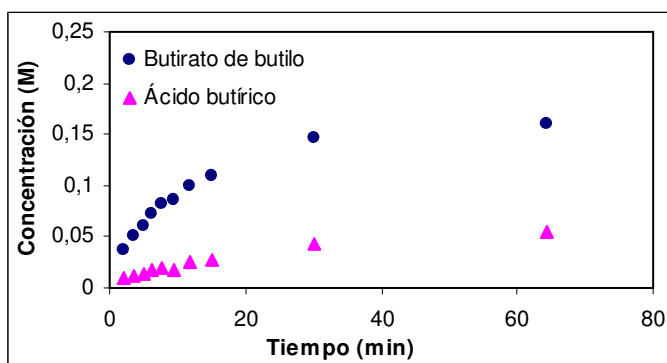


Figura 13.33. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [hmim⁺][NTf₂⁻] a 30°C y pH 7.

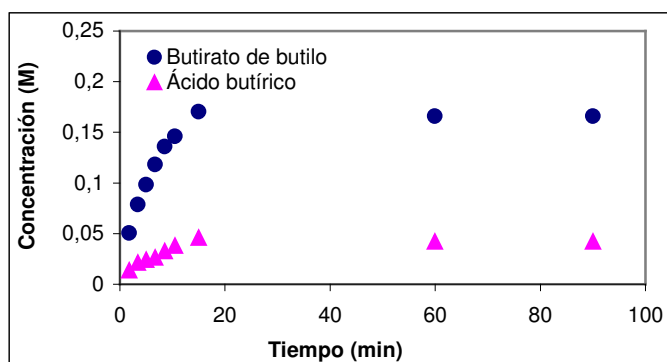


Figura 13.34. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [omim⁺][NTf₂⁻] a 30°C y pH 7.

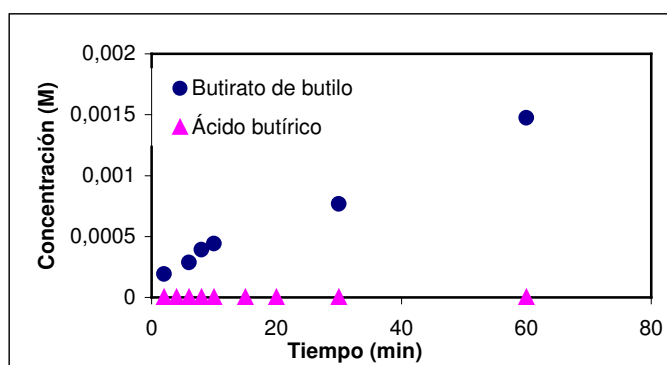


Figura 13.35. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [emim⁺][BF₄⁻] a 30°C y pH 7.

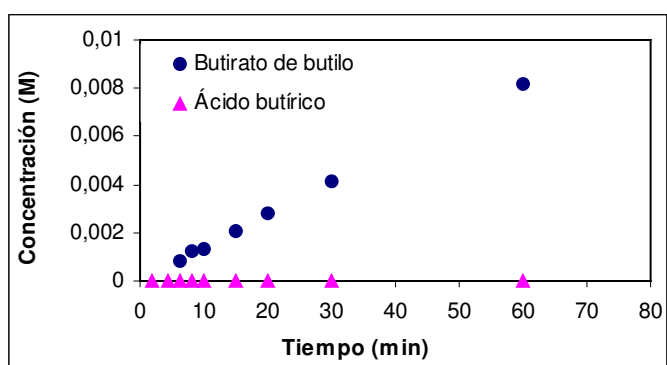


Figura 13.36. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [bmim⁺][BF₄⁻] a 30°C y pH 7.

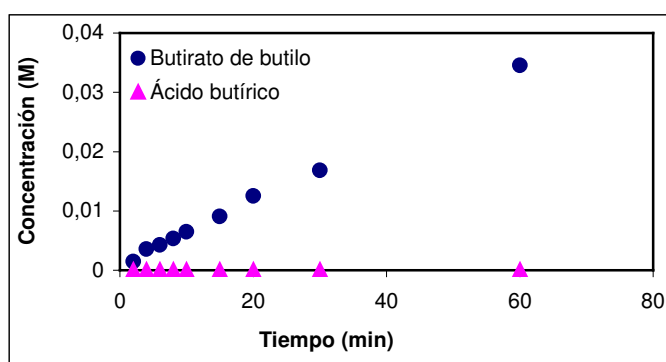


Figura 13.37. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [bdmim⁺][BF₄⁻] a 30°C y pH 7.

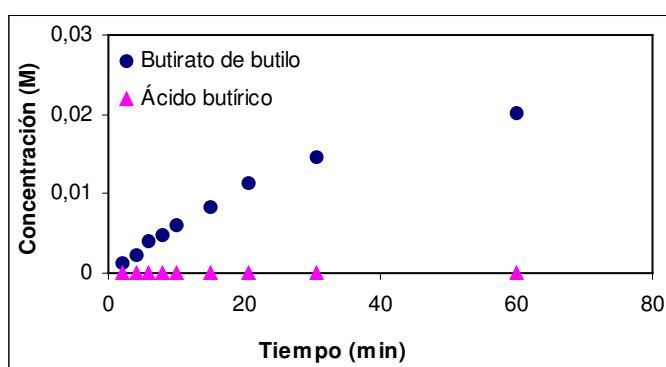


Figura 13.38. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [hmim⁺][BF₄⁻] a 30°C y pH 7.

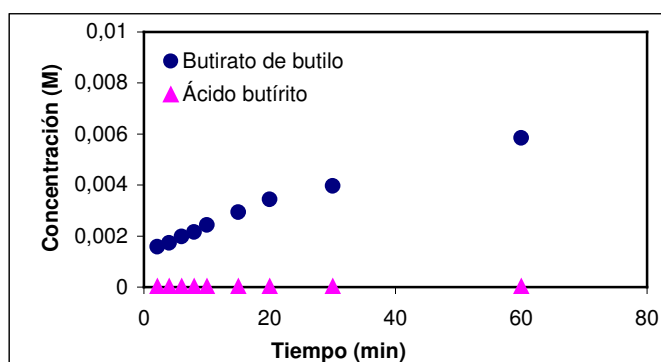


Figura 13.39. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [emim⁺][dca⁻] a 30°C y pH 7.

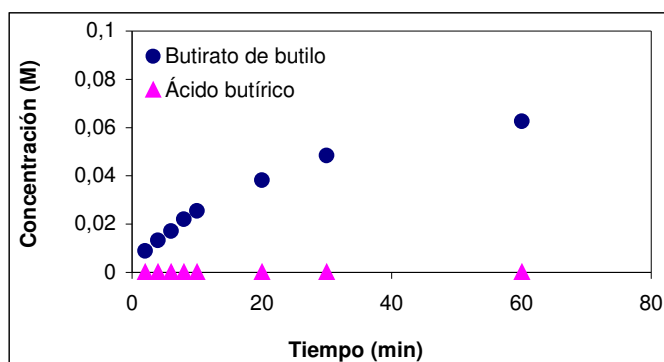


Figura 13.40. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [bmim⁺][dca⁻] a 30°C y pH 7.

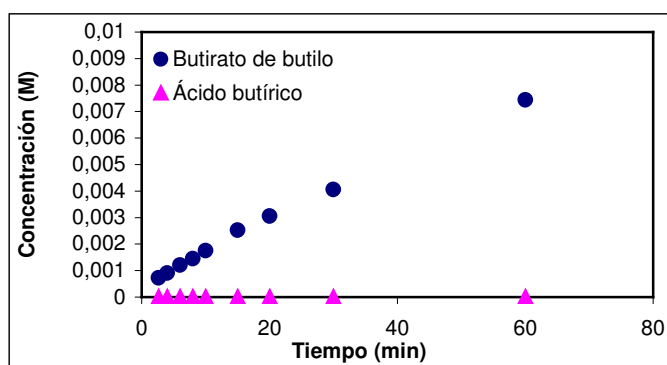


Figura 13.41. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en [omim⁺][dca⁻] a 30°C y pH 7.

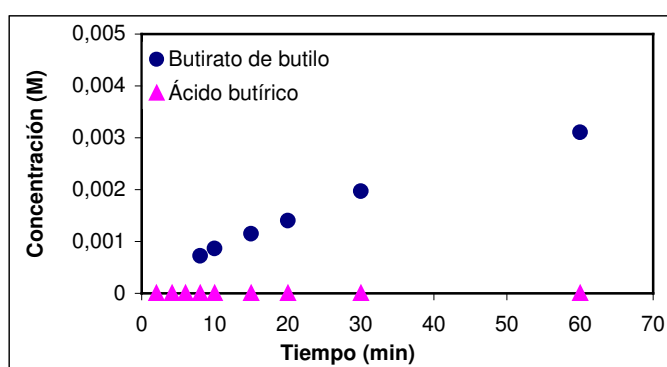


Figura 13.42. Perfil de reacción para síntesis de butirato de butilo en [bmim⁺][CH₃COO⁻] a 30°C y pH 7.

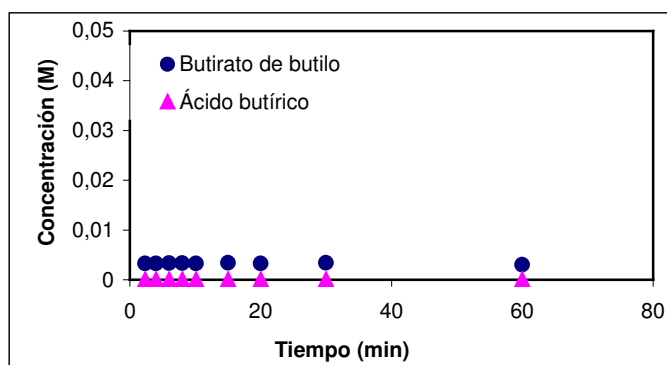


Figura 13.43. Perfil de reacción para la síntesis de butirato de butilo en $[bmim^+][OcSO_4^-]$ a 30°C y pH 7.

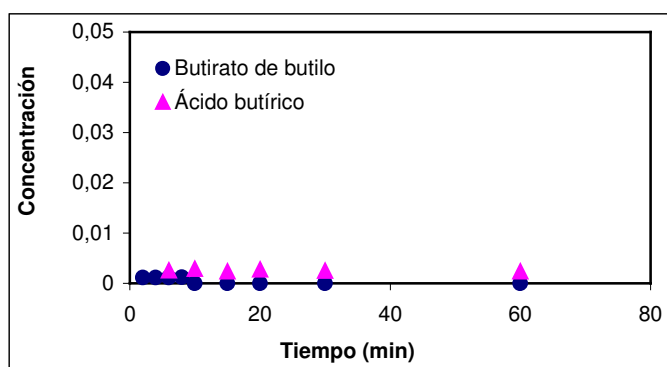


Figura 13.44. Perfil de reacción para síntesis de butirato de butilo en $[bmim^+][MDEGSO_4^-]$ a 30°C y pH 7.

ANEXO II. LINEALIZACIÓN DE LA 1ª LEY DE FICK PARA EL CÁLCULO DE LAS PERMEABILIDADES DE LOS COMPUESTOS A TRAVÉS DE MEMBRANAS LÍQUIDAS SOPORTADAS

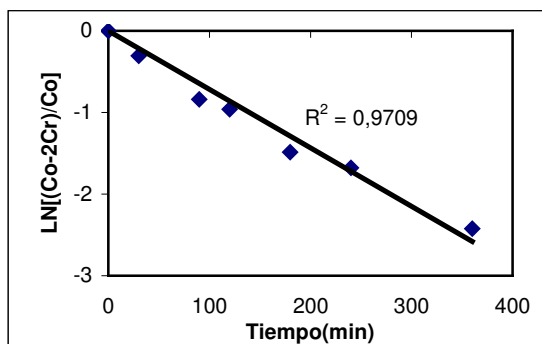


Figura 13.45. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Durapore®.

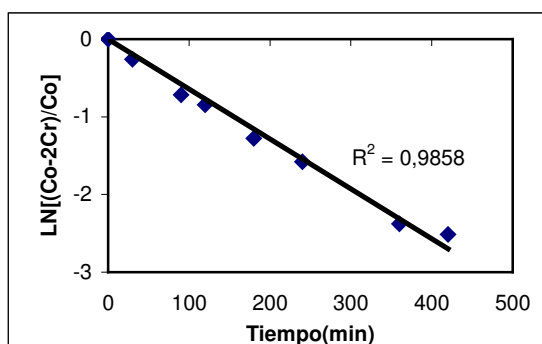


Figura 13.46. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Durapore®.

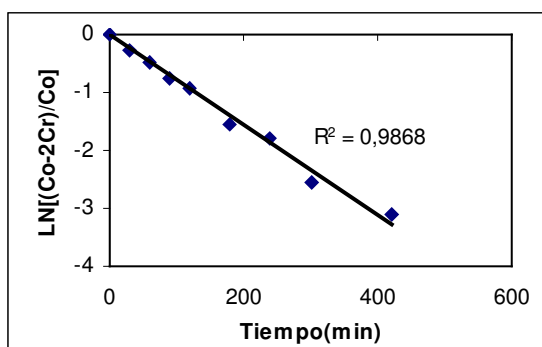


Figura 13.47. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Durapore®.

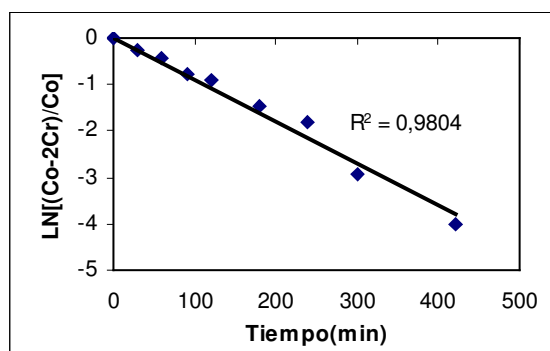


Figura 13.48. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Durapore®.

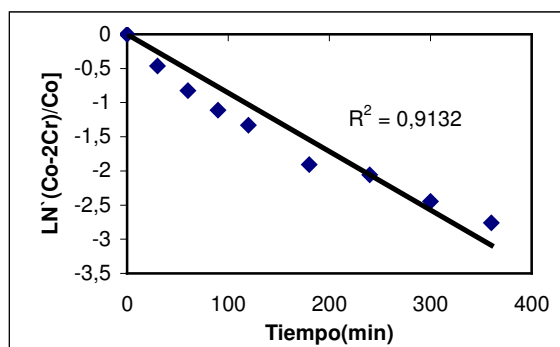


Figura 13.49. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Isopore®.

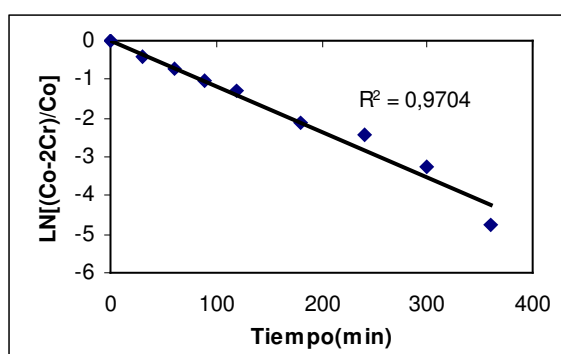


Figura 13.50. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Isopore®.

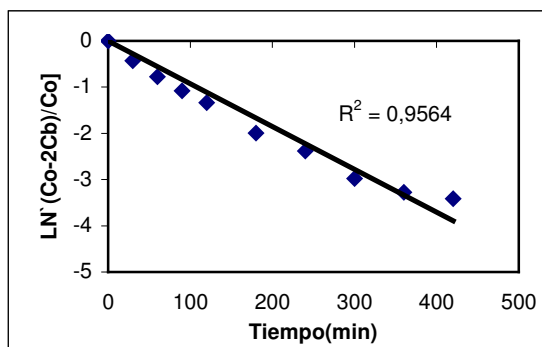


Figura 13.51. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Isopore®.

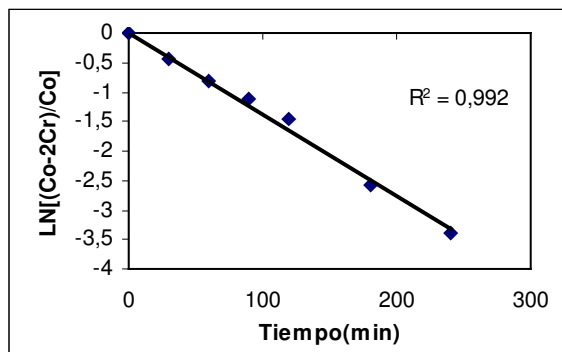


Figura 13.52. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Isopore®.

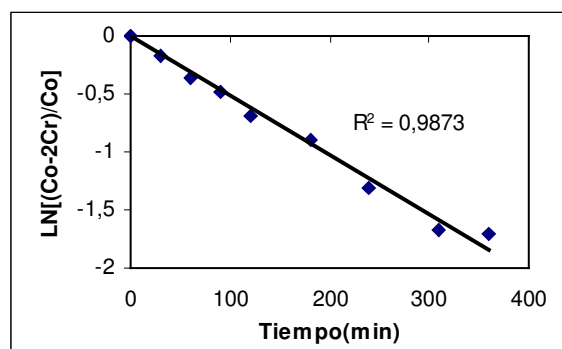


Figura 13.53. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Mitex®.

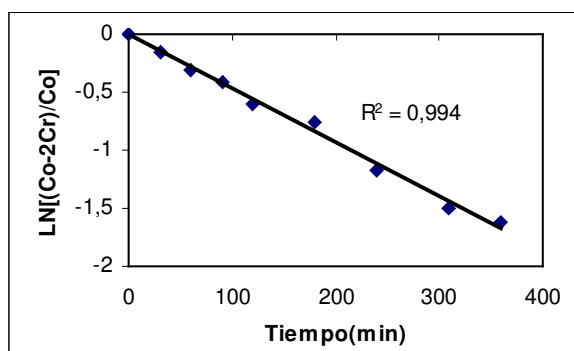


Figura 13.54. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Mitex[®].

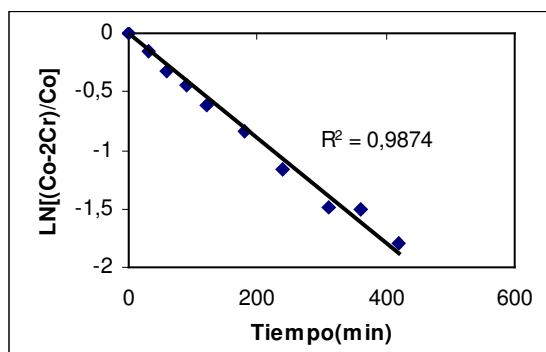


Figura 13.55. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Mitex[®].

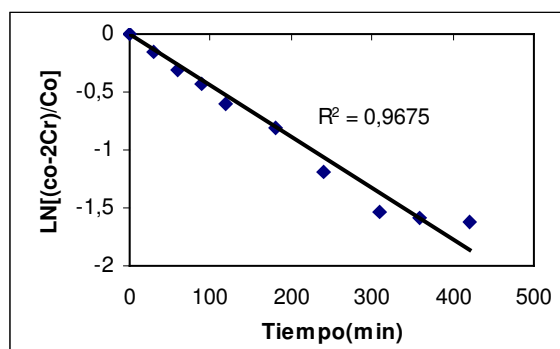


Figura 13.56. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Mitex[®].

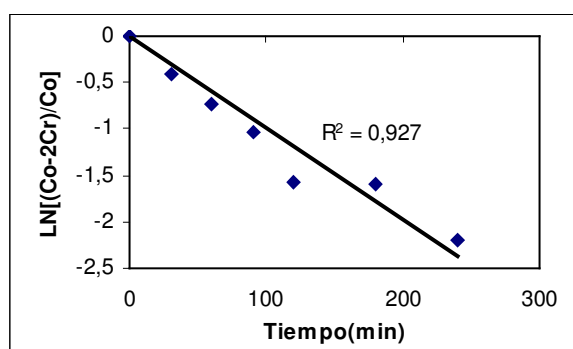


Figura 13.57. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Fluoropore®.

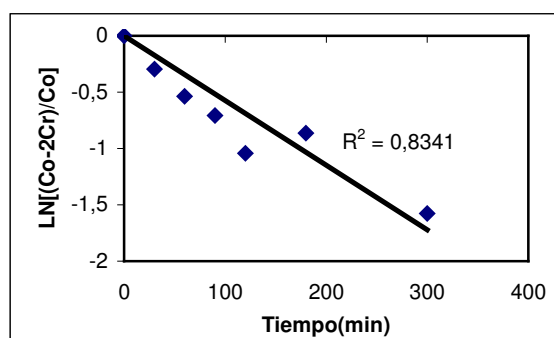


Figura 13.58. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Fluoropore®.

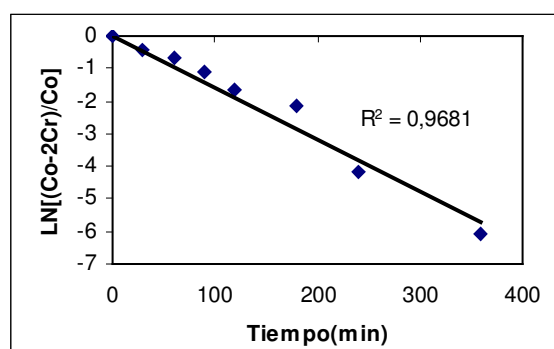


Figura 13.59. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Fluoropore®.

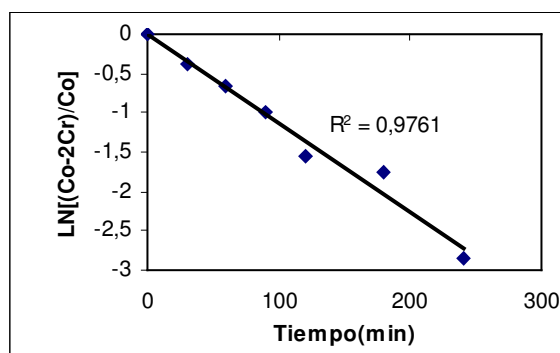


Figura 13.60. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Fluoropore®.

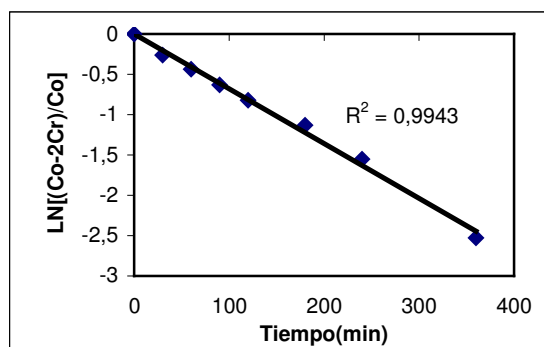


Figura 13.61. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Nylon®.

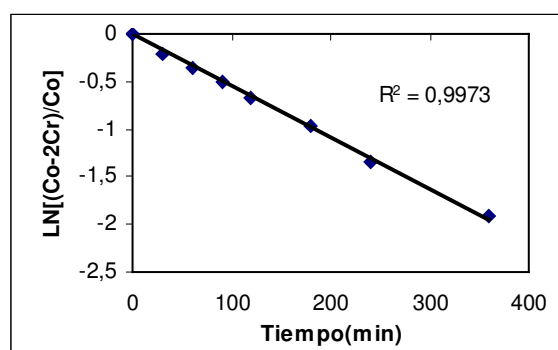


Figura 13.62. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Nylon®.

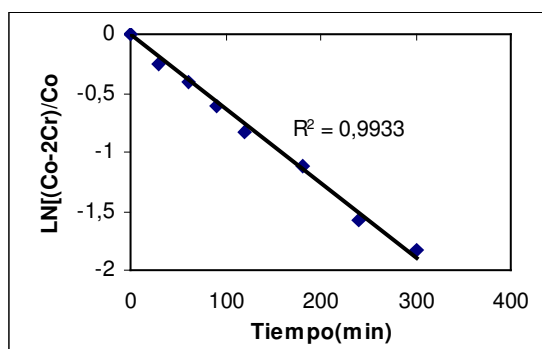


Figura 13.63. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Nylon®.

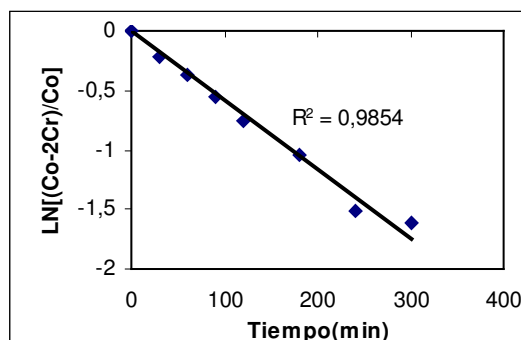


Figura 13.64. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Nylon®.

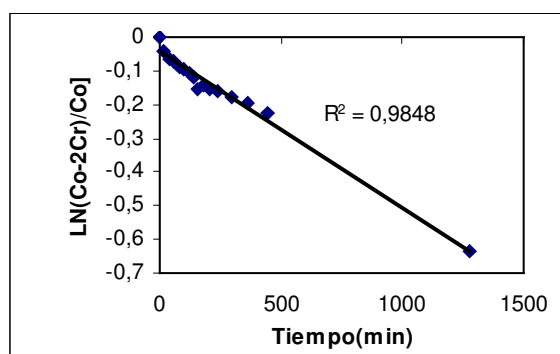


Figura 13.65. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Durapore® con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

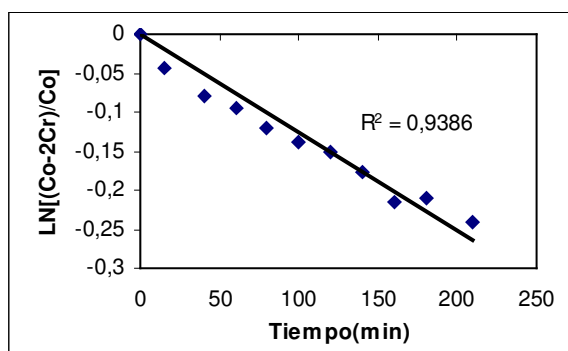


Figura 13.66. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Durapore® con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

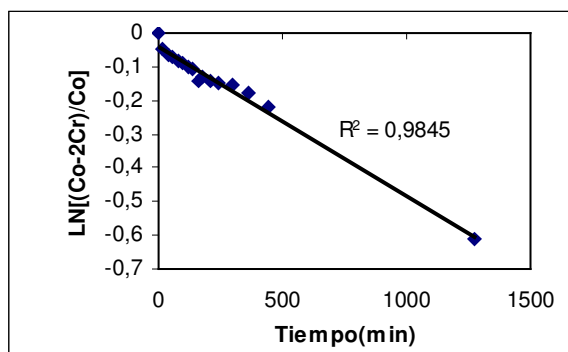


Figura 13.67. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Durapore® con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

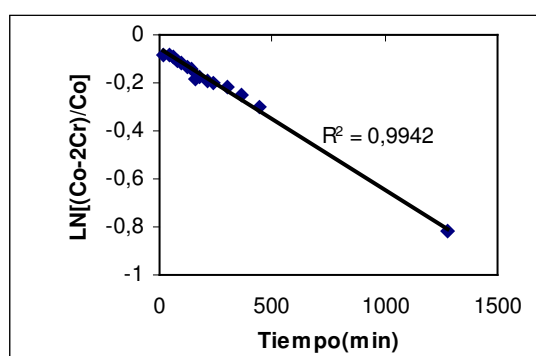


Figura 13.68. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Durapore® con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

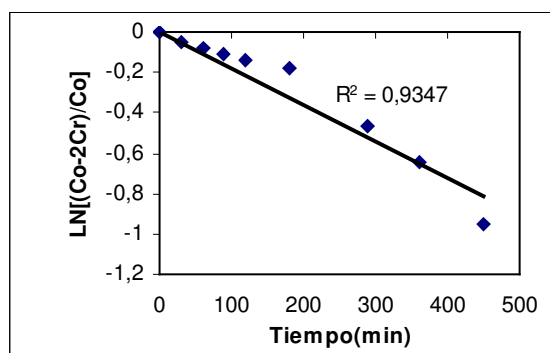


Figura 13.69. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Isopore® con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado

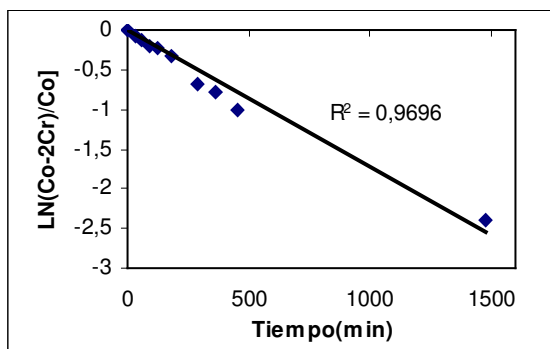


Figura 13.70. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Isopore® con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado

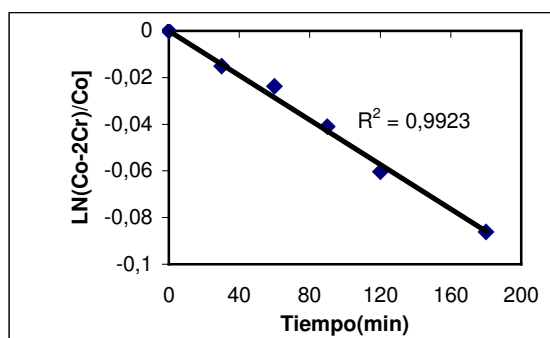


Figura 13.71. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Isopore® con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

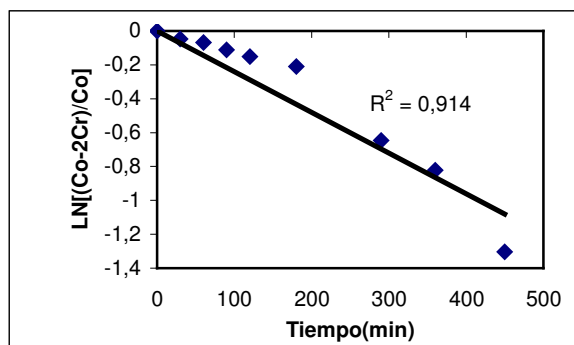


Figura 13.72. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Isopore[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

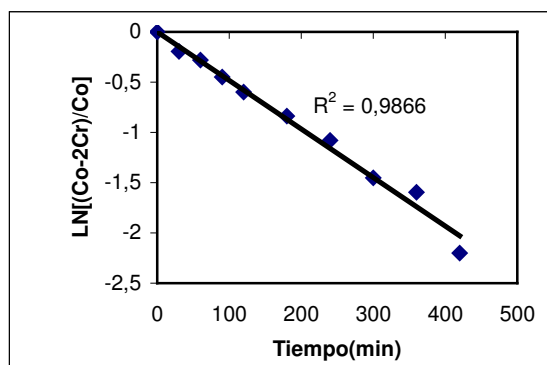


Figura 13.73. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Mitex[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

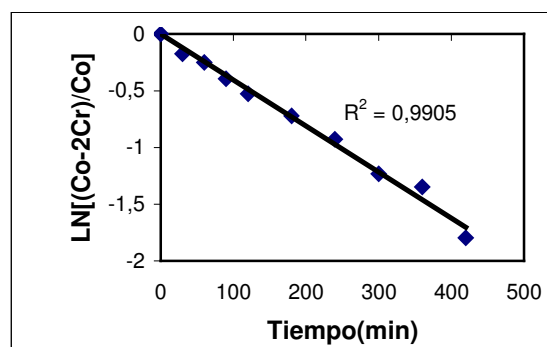


Figura 13.74. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Mitex[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

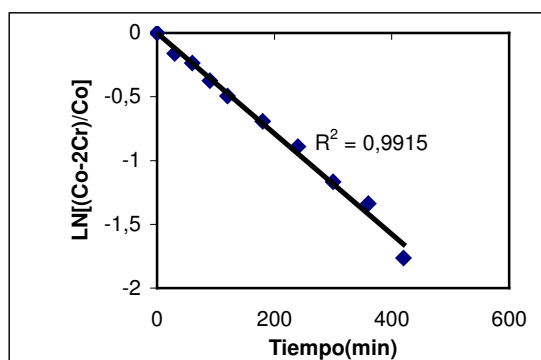


Figura 13.75. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Mitex[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

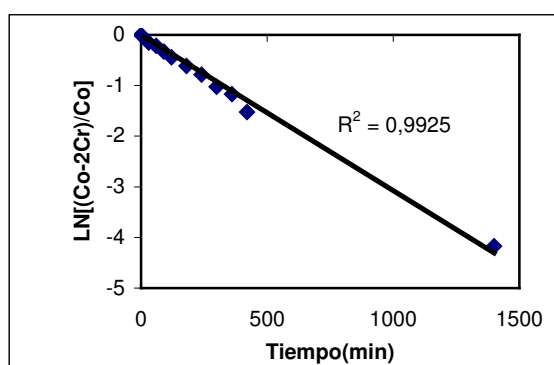


Figura 13.76. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Mitex[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

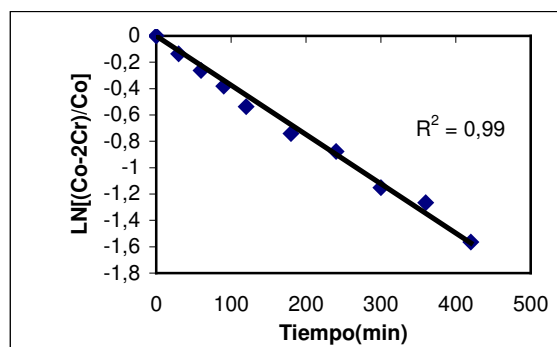


Figura 13.77. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Fluoropore[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

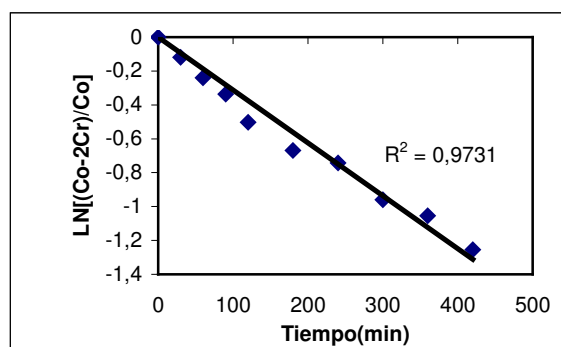


Figura 13.78. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Fluoropore® con $[bmim^+][PF_6^-]$ soportado.

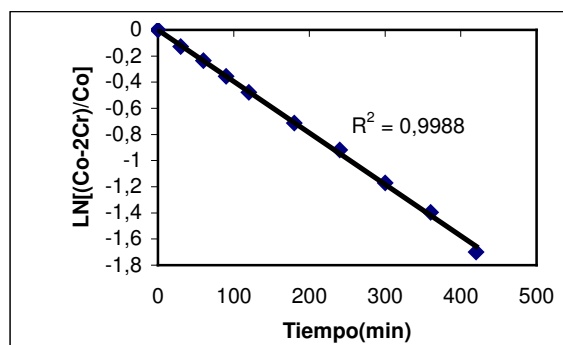


Figura 13.79. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Fluoropore® con $[bmim^+][PF_6^-]$ soportado.

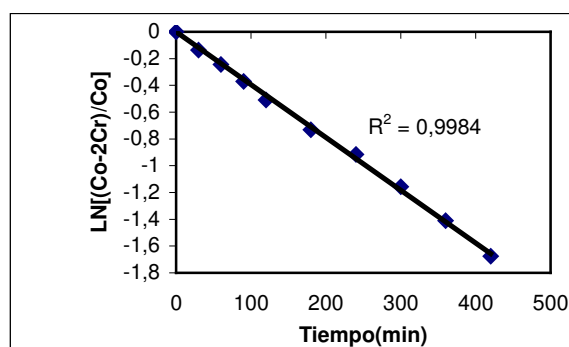


Figura 13.80. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Fluoropore® con $[bmim^+][PF_6^-]$ soportado.

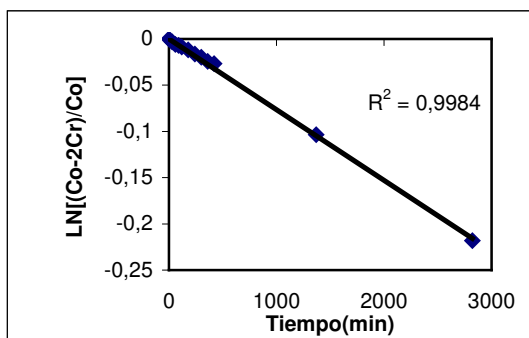


Figura 13.81. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

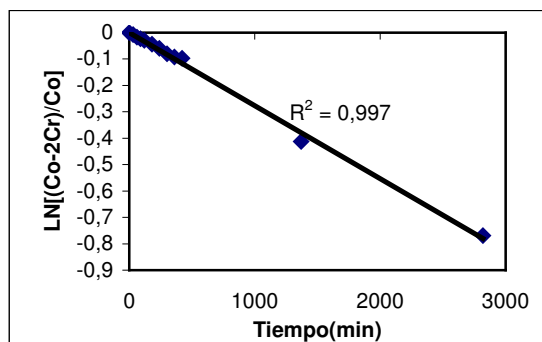


Figura 13.82. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

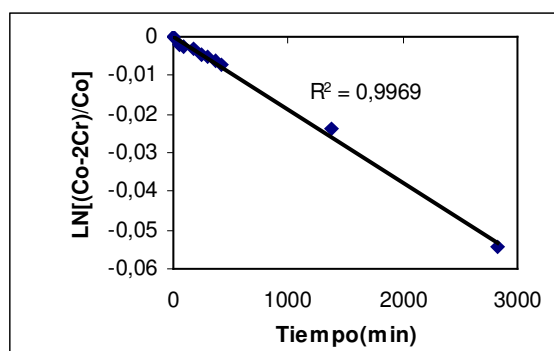


Figura 13.83. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

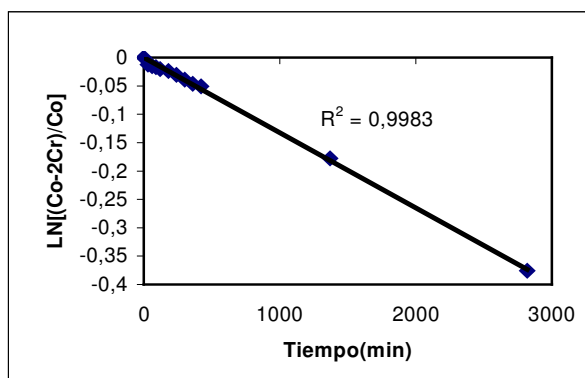


Figura 13.84. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

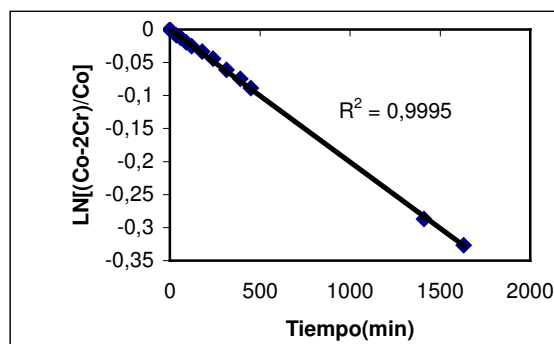


Figura 13.85. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

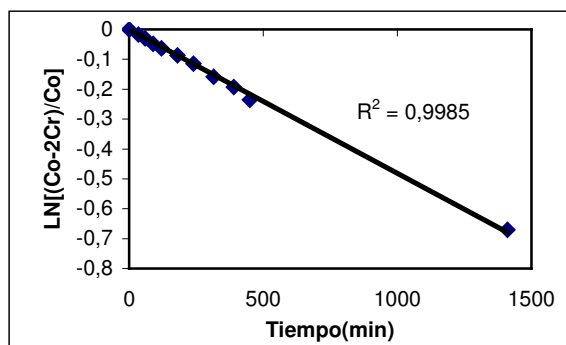


Figura 13.86. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

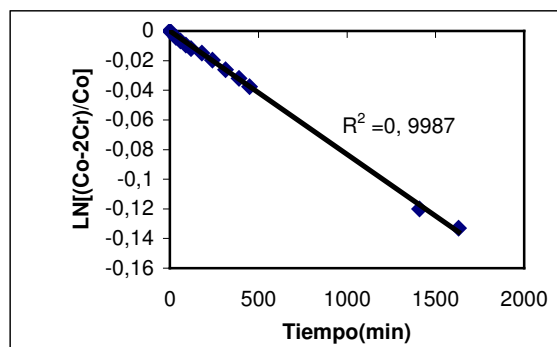


Figura 13.87. Cálculo de la permeabilidad butirato de butilo en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

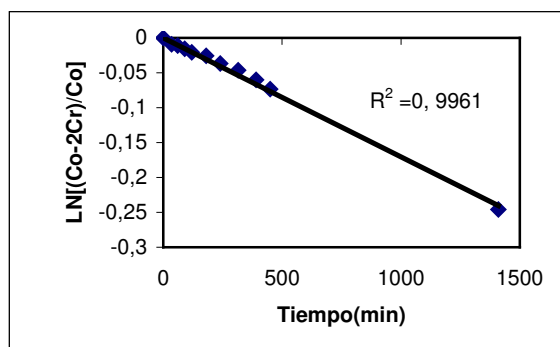


Figura 13.88. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

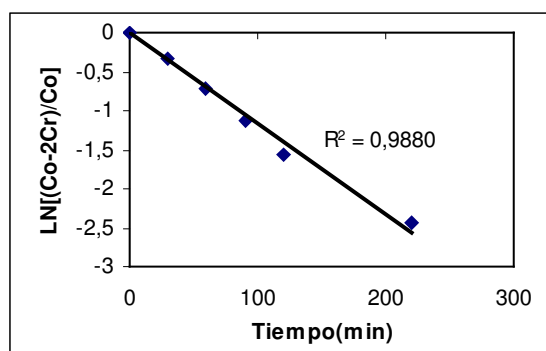


Figura 13.89. Cálculo de la permeabilidad para acetato de vinilo en la membrana Nylon[®].

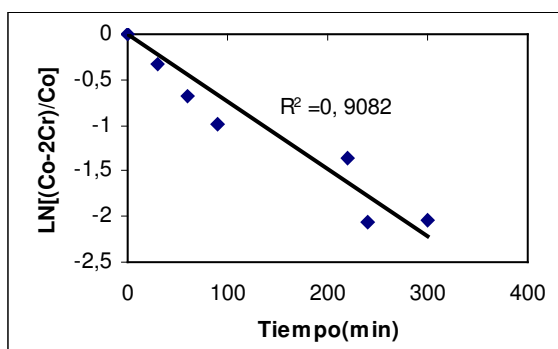


Figura 13.90. Cálculo de la permeabilidad para metanol en la membrana Nylon®.

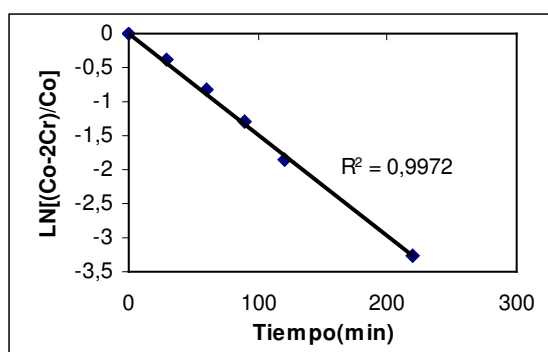


Figura 13.91. Cálculo de la permeabilidad para acetato de metilo en la membrana Nylon®.

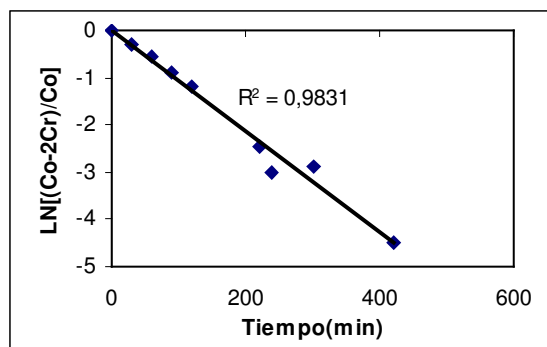


Figura 13.92. Cálculo de la permeabilidad para ácido acético en la membrana Nylon®.

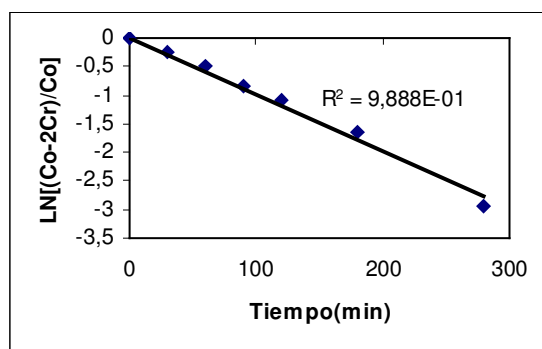


Figura 13.93. Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon®.

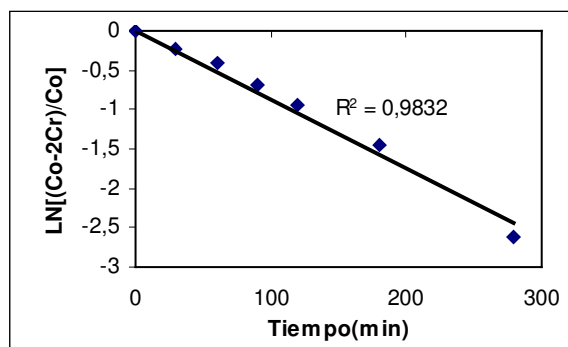


Figura 13.94. Cálculo de la permeabilidad para el 1-propanol en la membrana Nylon®.

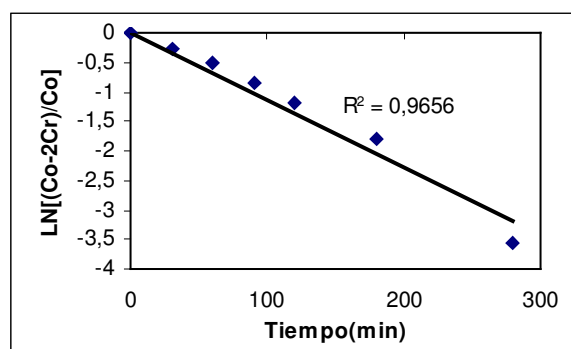


Figura 13.95. Cálculo de la permeabilidad para propionato de metilo en la membrana Nylon®.

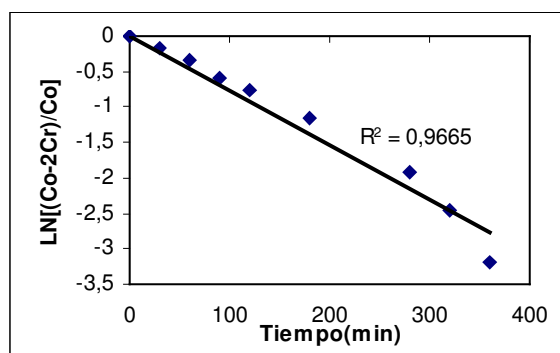


Figura 13.96. Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon®.

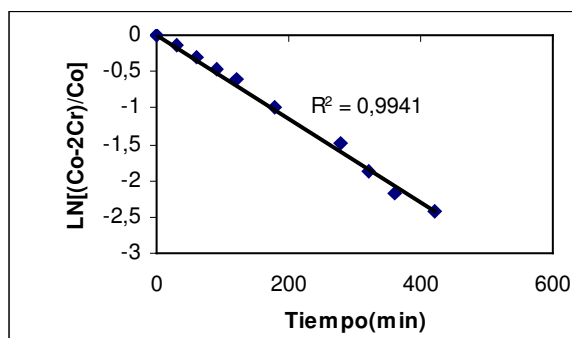


Figura 13.97. Cálculo de la permeabilidad para laurato de vinilo en la membrana Nylon®.

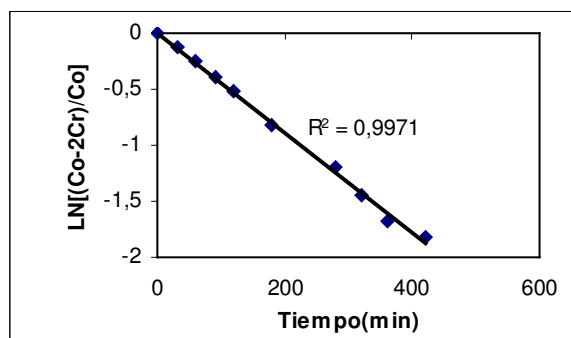


Figura 13.98. Cálculo de la permeabilidad para el 1-octanol en la membrana Nylon®.

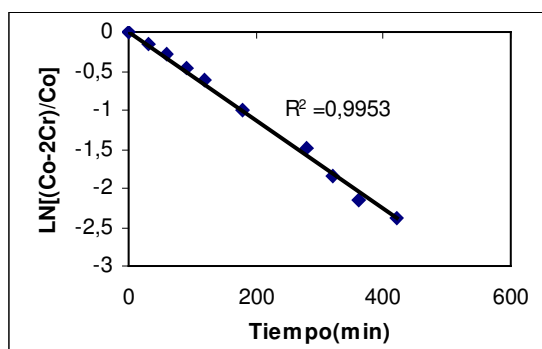


Figura 13.99. Cálculo de la permeabilidad para decanoato de etilo en la membrana Nylon®.

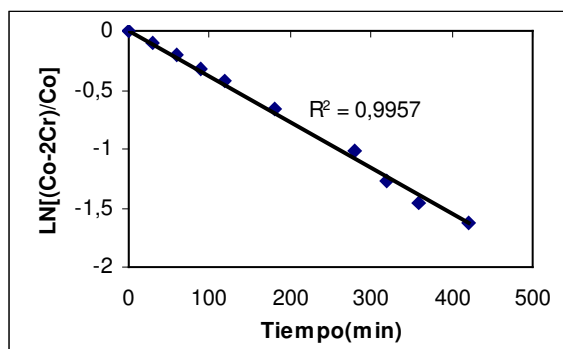


Figura 13.100. Cálculo de la permeabilidad para ácido láurico en la membrana Nylon®.

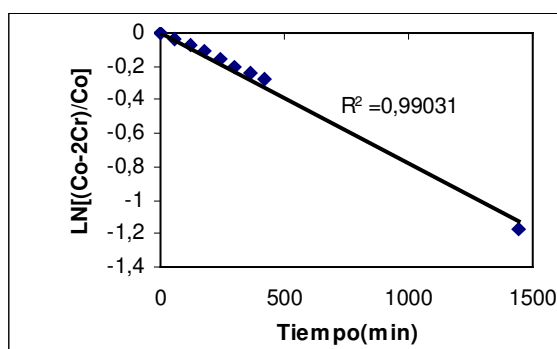


Figura 13.101. Cálculo de la permeabilidad para acetato de vinilo en la membrana Nylon® con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ soportado.

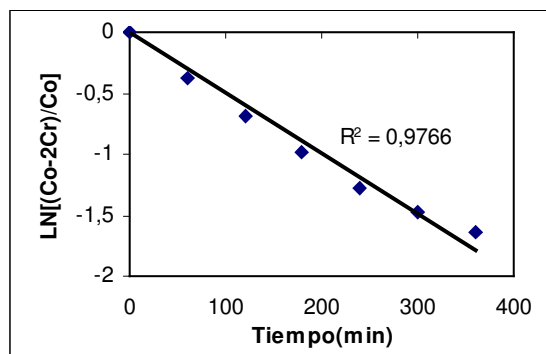


Figura 13.102. Cálculo de la permeabilidad para metanol en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

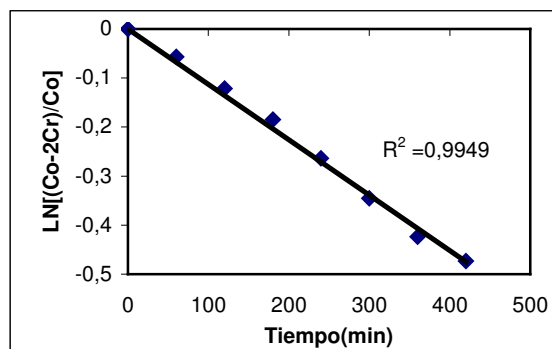


Figura 13.103. Cálculo de la permeabilidad para acetato de metilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

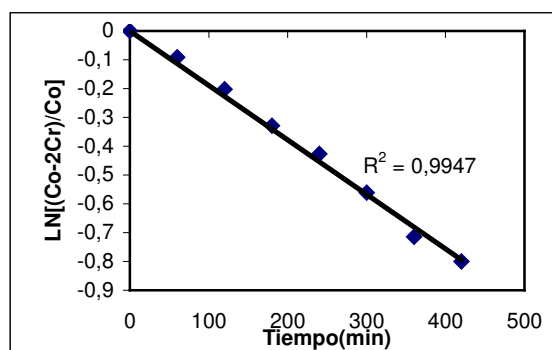


Figura 13.104. Cálculo de la permeabilidad para ácido acético en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

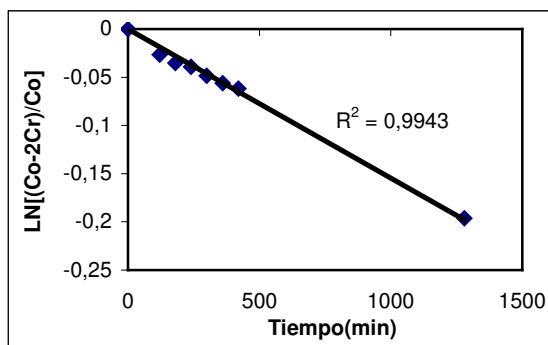


Figura 13.105. Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

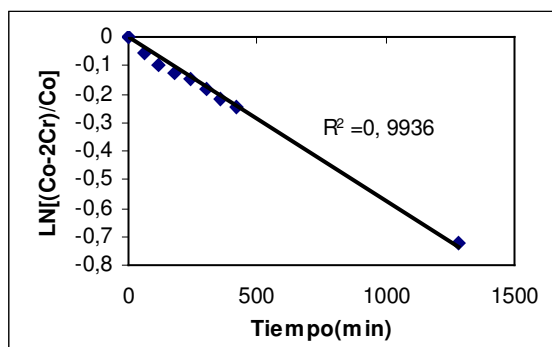


Figura 13.106. Cálculo de la permeabilidad para 1-propanol en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

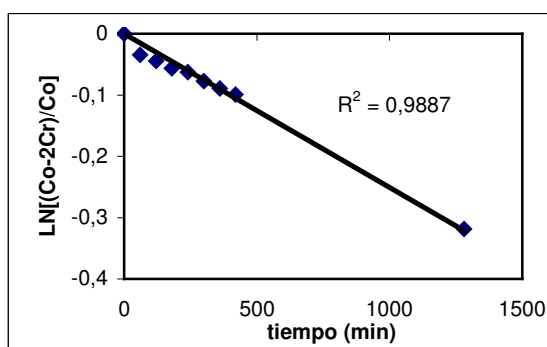


Figura 13.107. Cálculo de la permeabilidad para propionato de metilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

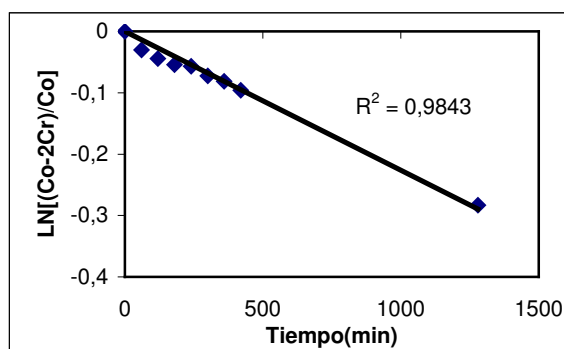


Figura 13.108. Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

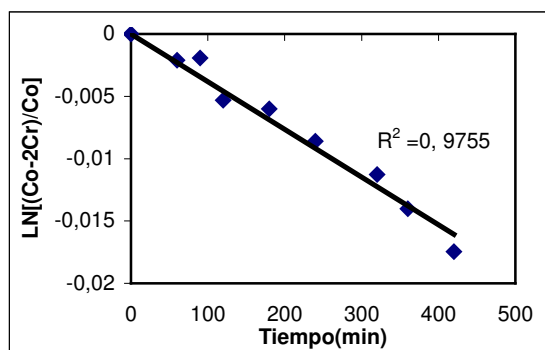


Figura 13.109. Cálculo de la permeabilidad para laurato de vinilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

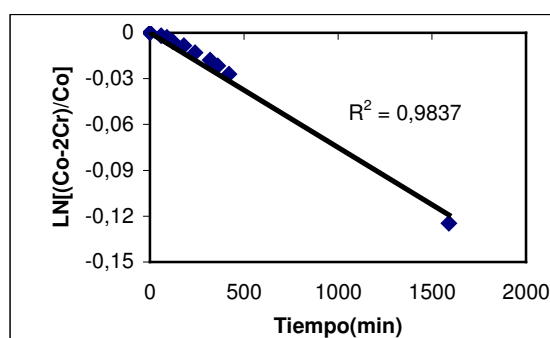


Figura 13.110. Cálculo de la permeabilidad para 1-octanol en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

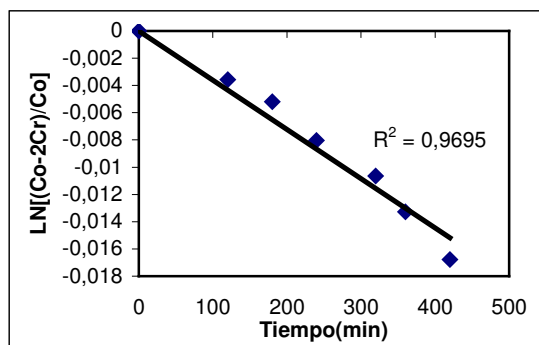


Figura 13.111. Cálculo de la permeabilidad para decanoato de etilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

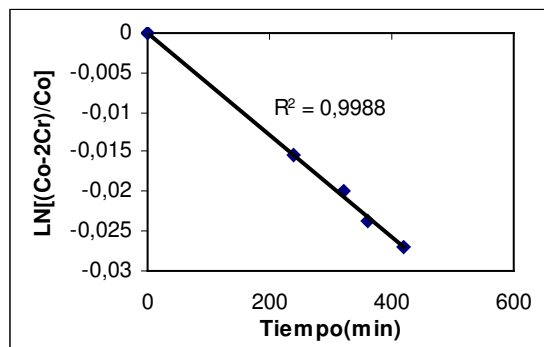


Figura 13.112. Cálculo de la permeabilidad para ácido laúrico en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

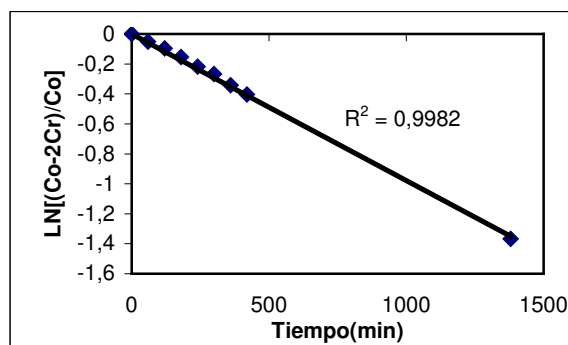


Figura 13.113. Cálculo de la permeabilidad para acetato de vinilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][PF₆⁻] soportado.

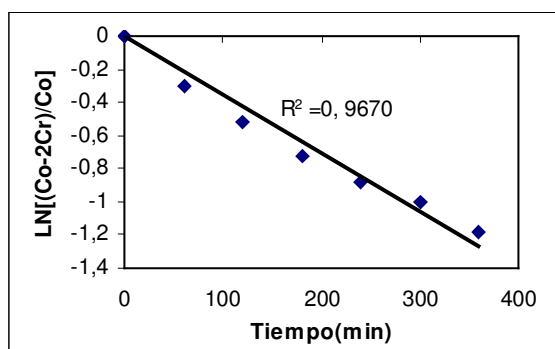


Figura 13.114. Cálculo de la permeabilidad para metanol en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

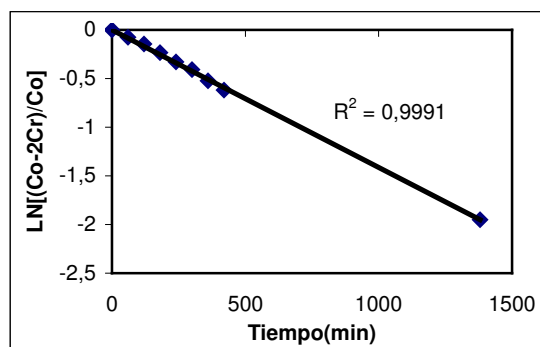


Figura 13.115. Cálculo de la permeabilidad para acetato de metilo en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

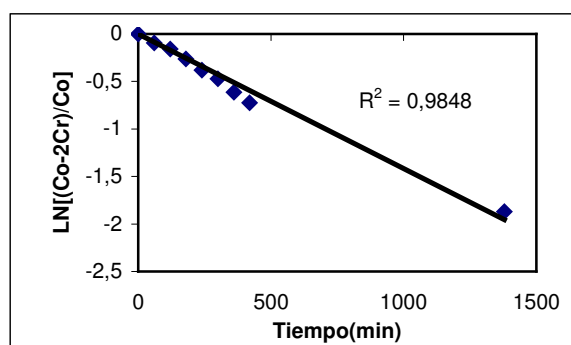


Figura 13.116. Cálculo de la permeabilidad para ácido acético en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

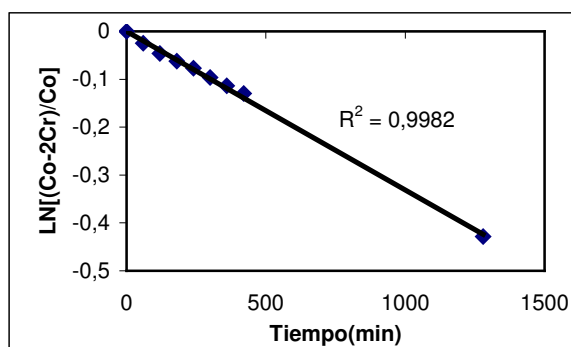


Figura 13.117. Cálculo de la permeabilidad para propionato de vinilo en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

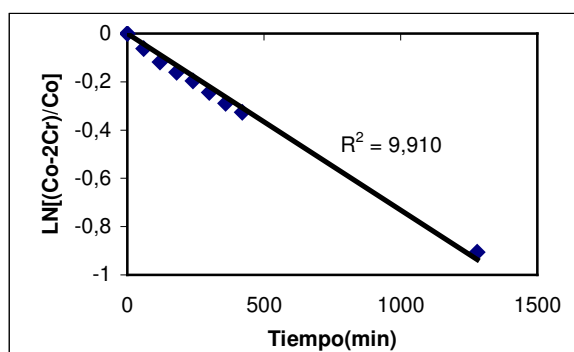


Figura 13.118. Cálculo de la permeabilidad para 1-propanol en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

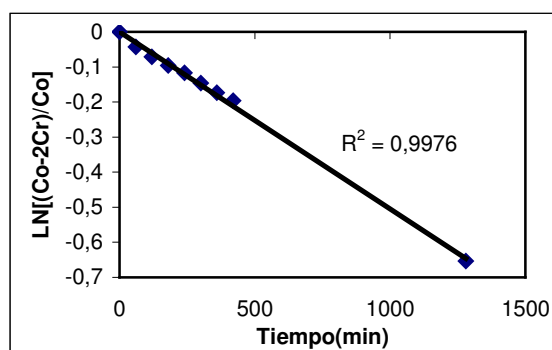


Figura 13.119. Cálculo de la permeabilidad para propionato de metilo en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

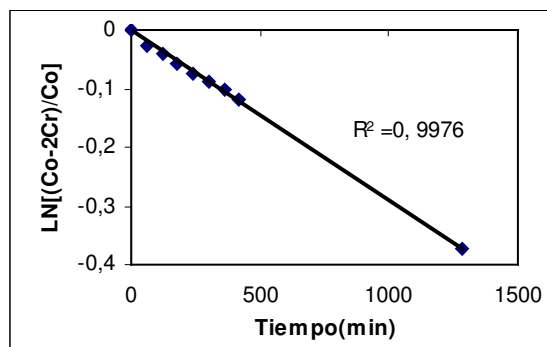


Figura 13.120. Cálculo de la permeabilidad para ácido propiónico en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

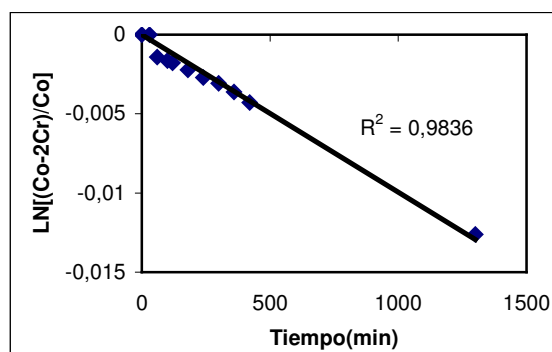


Figura 13.121. Cálculo de la permeabilidad para laurato de vinilo en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

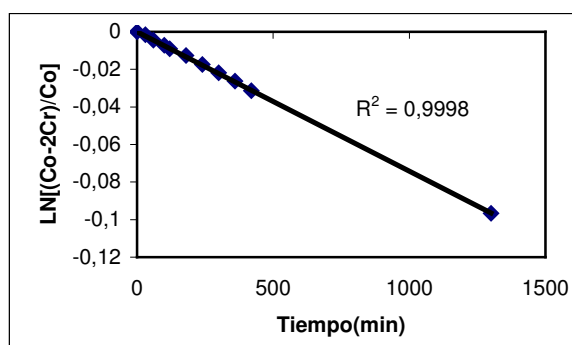


Figura 13.122. Cálculo de la permeabilidad para 1-octanol en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

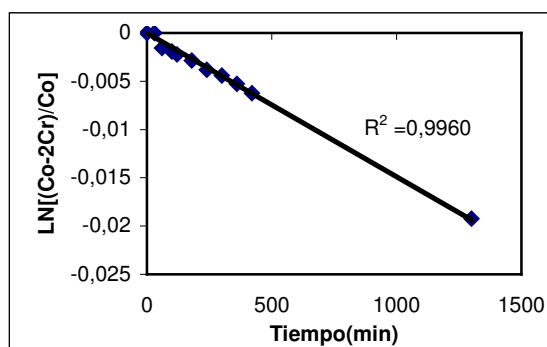


Figura 13.123. Cálculo de la permeabilidad para decanoato de etilo en la membrana Nylon® con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

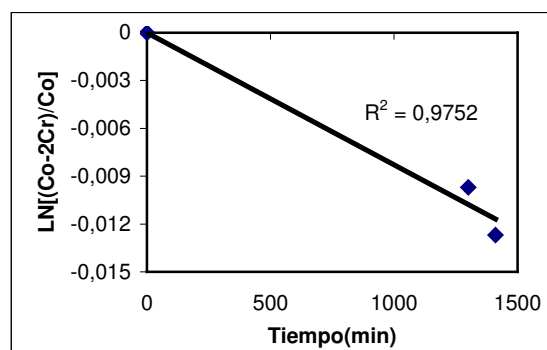


Figura 13.124. Cálculo de la permeabilidad para ácido laúrico en la membrana Nylon® con [omim⁺][PF₆⁻] soportado.

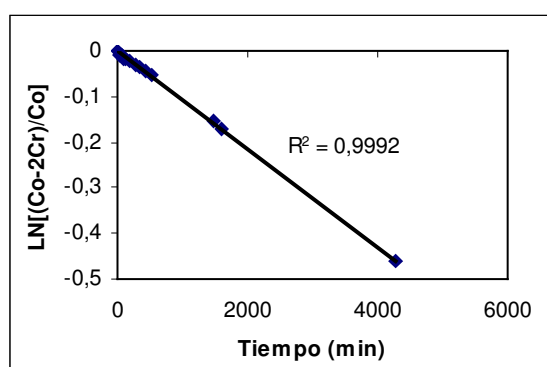


Figura 13.125. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Nylon® con [bmim⁺][BF₄⁻] soportado.

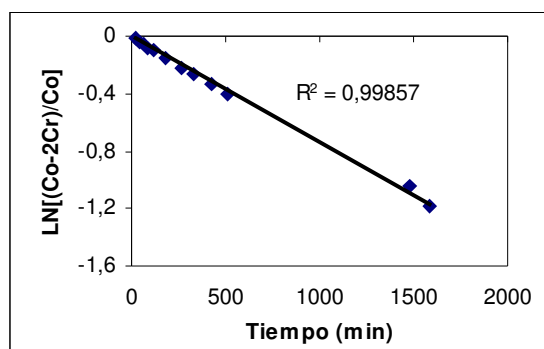


Figura 13.126. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][BF₄⁻] soportado.

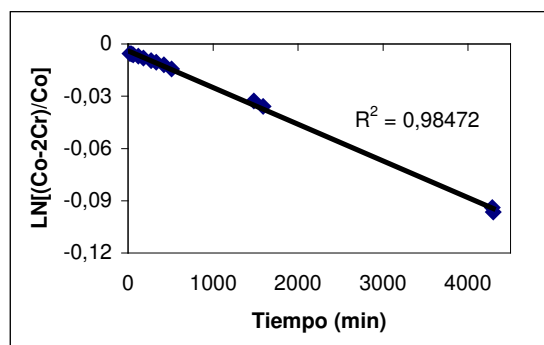


Figura 13.127. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][BF₄⁻] soportado.

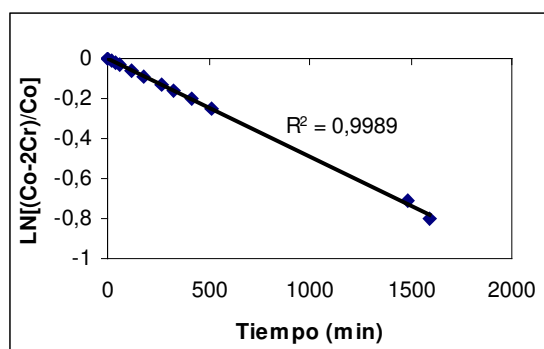


Figura 13.128. Cálculo de la permeabilidad para butirato de ácido butírico en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][BF₄⁻] soportado.

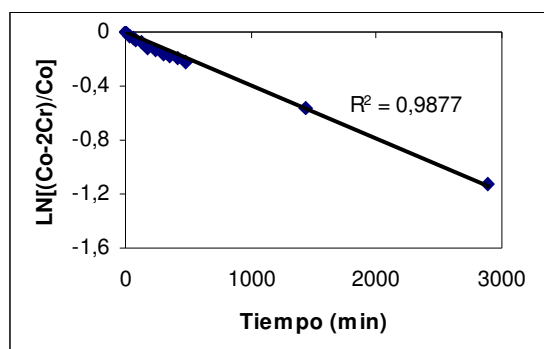


Figura 13.129. Cálculo de la permeabilidad en el estudio de estabilidad para butirato de vinilo en la membrana Nylon[®] con $[omim^+][BF_4^-]$ soportado.

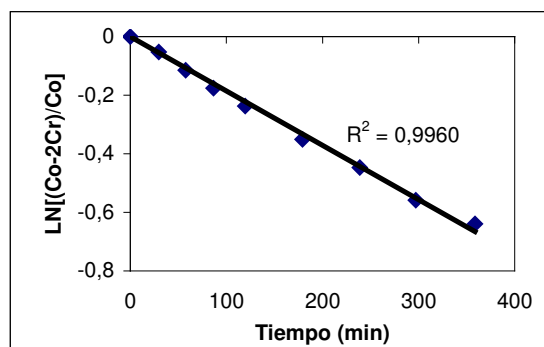


Figura 13.130. Cálculo de la permeabilidad en el estudio de estabilidad para 1-butanol en la membrana Nylon[®] con $[omim^+][BF_4^-]$ soportado.

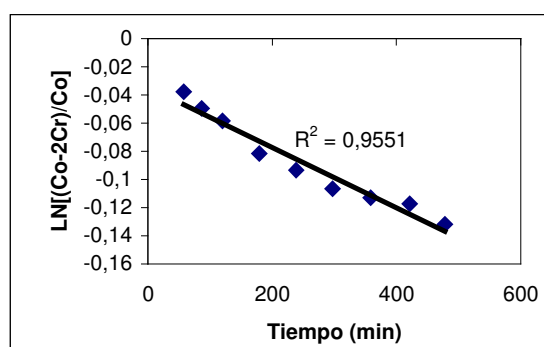


Figura 13.131. Cálculo de la permeabilidad en el estudio de estabilidad para butirato de butilo en la membrana Nylon[®] con $[omim^+][BF_4^-]$ soportado.

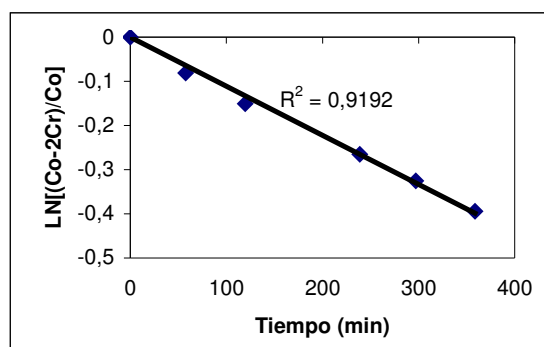


Figura 13.132. Cálculo de la permeabilidad en el estudio de estabilidad para ácido butírico en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][BF₄⁻] soportado.

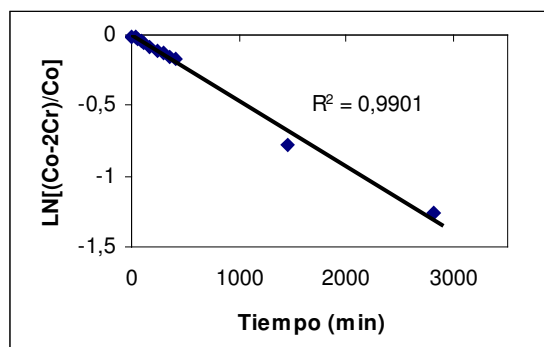


Figura 13.133. Cálculo de la permeabilidad para el butirato de vinilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][NTf₂⁻] soportado.

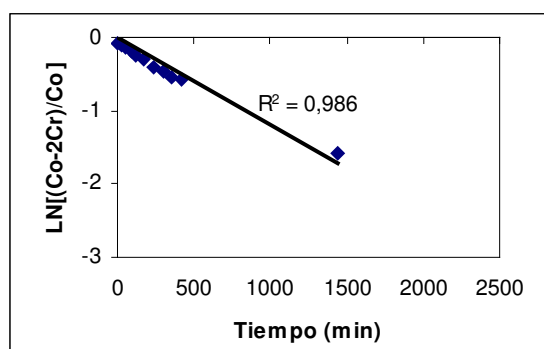


Figura 13.134. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][NTf₂⁻] soportado.

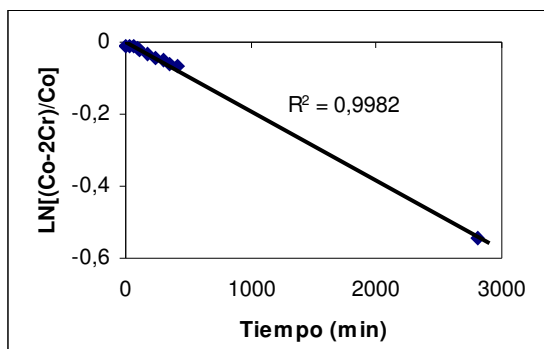


Figura 13.135. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][NTf₂⁻] soportado.

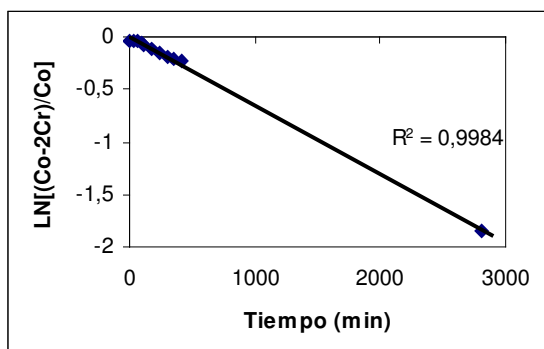


Figura 13.136. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Nylon[®] con [bmim⁺][NTf₂⁻] soportado.

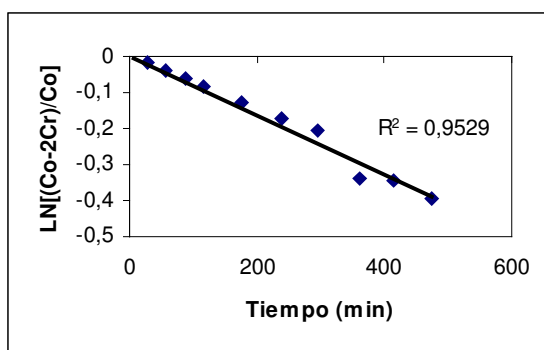


Figura 13.137. Cálculo de la permeabilidad para butirato de vinilo en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][NTf₂⁻] soportado.

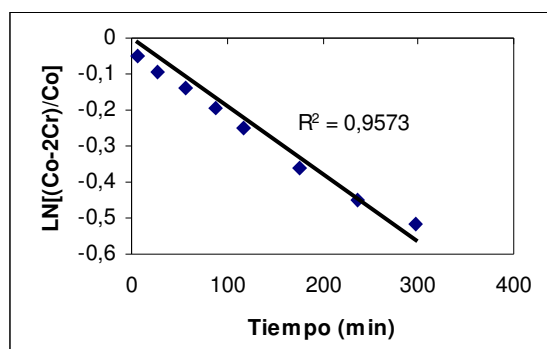


Figura 13.138. Cálculo de la permeabilidad para 1-butanol en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][NTf₂⁻] soportado.

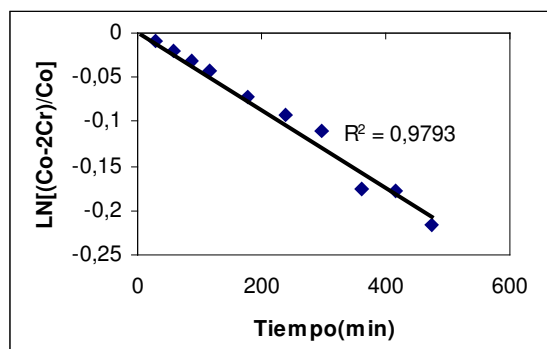


Figura 13.139. Cálculo de la permeabilidad para butirato de butilo en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][NTf₂⁻] soportado.

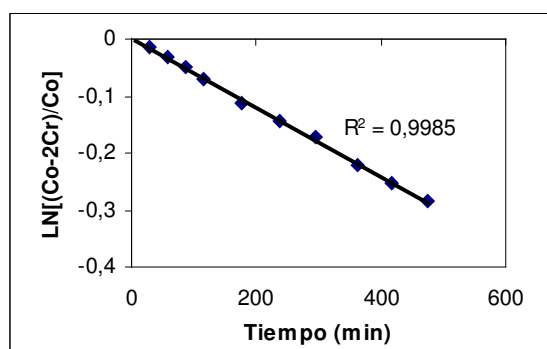


Figura 13.140. Cálculo de la permeabilidad para ácido butírico en la membrana Nylon[®] con [omim⁺][NTf₂⁻] soportado.

14

Resumen en inglés de la Tesis Doctoral



UNIVERSITY OF MURCIA

FACULTY OF CHEMISTRY

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING

***Ionic liquids as novel reaction and
separation media in enzymatic
transesterification reactions***

ANTONIA PÉREZ DE LOS RÍOS

MURCIA 2007

SUMMARY:

The definition of green chemistry is widely accepted as “*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” and “12 Principles of Green Engineering,” which set out standards with which new products and processes should be measured. The motivation behind this and other such programs is to alleviate the problems facing society like pollution, toxic wastes, bioaccumulation, and an over-reliance on non-renewable resources. Recent legislation has also put pressure on the chemical industry to pursue more environmentally benign processes. It is up to scientists and engineers to develop technology in such a way that it has minimal impact on the environment, and to make it sustainable enough to not rely on limited resources. One area where our group has made such an effort is in the replacement of traditional volatile organic compounds used in reaction and separation processes by new alternative solvents, in our case ionic liquids.

Ionic liquids are organic salts that are liquid close to room temperature. They are emerging as green solvents for chemical processes, because they combine good and tunable solubility properties with negligible vapour pressures and high thermal and chemical stabilities. Their widespread industrial use is still limited by a lack of fundamental knowledge due, among other factors, to the enormous variety of ionic liquids of potential use. The main objective of this thesis is to analyze the potential use of ionic liquids as reaction and separation media in lipase-catalysed transesterification reactions.

Lipases have shown good behaviour as catalysts in non-conventional media. Among the ionic liquids used for lipase-catalyzed reactions, those containing alkylimidazolium cations have shown to be one of the most interesting. In **Chapter 1**, a wide range of 1,3-dialkylimidazolium based ionic liquids were tested as reaction media for the synthesis of butyl butyrate from vinyl butyrate and 1-butanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (CaLB). Water-immiscible ionic liquids appeared as suitable media for the proposed reaction, increasing the activity and selectivity with respect to the values obtained with a classical organic solvent, n-hexane. However, the use of water-miscible ionic liquids led to lower activities than that obtained in n-hexane, although selectivity reached more than 99.9% in these media. The immobilisation of CaLB as a crosslinked enzyme aggregate (CLEA) allowed the enzyme to maintain its transesterification activity in water-miscible ionic liquids, such as [bmim⁺][NO₃⁻] and [bmim][dca], which deactivate the free enzyme (reported in **Chapter 2**).

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 costs 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 sequential operation. Among membrane-based separation processes, the use of supported liquid membranes (SLMs) has received growing attention during recent years. SLMs are porous supports whose pores are filled with a liquid; among their numerous advantages is the fact that the amount of solvent needed in the SLM process is minimal and 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. 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 ionic liquids as a liquid membrane phase results in the stabilization of the SLMs due to their negligible vapour pressure, the possibility of minimizing their solubility in the surrounding phases by adequate selection of the cation and anion, 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, high ion conductivity and are non-flammable. Furthermore, they dissolve a wide range of inorganic and organic compounds while being immiscible with many organic solvents and even with water in some cases. *In Chapter 3*, the use of two 1,3-dialkylimidazolium based ionic liquids, [bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻], as liquid phase in supported liquid membranes (SLMs) for the selective separation of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid, which are substrates and products of a transesterification reaction, was evaluated. No significant permeability differences were observed between the permeabilities of the compounds when five commercial polymeric membranes (Fluoropore, Durapore, Mitex, Isopore and Nylon) were used. However, transport selectivity was dramatically increased when the same membranes were used with the ionic liquids immobilized, especially in the case of membranes of a hydrophilic nature (Nylon and Isopore). As regards the operational stability of these SLMs, they were seen to be remarkably stable when tested over eight continuous cycles of 48 h each. *In Chapter 4*, further studies were conducted in order to elucidate the molecular mechanism involved in the transport phenomena of substrates and products of transesterification reactions through SLM based on ILs. For this, we evaluated the permeability of sixteen different organic compounds (vinyl esters, aliphatic esters, alcohols and carboxylic acids) through SLM based on ionic liquids ([bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻]) and the partition coefficients of the compounds between each ionic liquid and the feed/receiving phase. It was concluded that transport of the compounds was mainly regulated by the affinity of the ionic liquid towards each solute. A clear relationship between the permeability of the compounds and the partition coefficient of

the compounds between the ionic liquid and the feed/receiving phase was established. This relationship allows easy prediction of the capability of a given SLM based on IL to separate two compounds by simply evaluating the partition coefficient of each compound between the ionic liquid and the feed/receiving phase and the molar volume of each compound at its boiling point. In **Chapter 5**, the effect of the nature of the ionic liquid used as liquid phase on the selectivity of the resulting SLM for the separation of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid was investigated. Six ionic liquids were tested as liquid phase, analyzing the values of permeability for each organic compound through the SLMs. In all cases, significant permeability differences between the organic compounds were obtained. The hydrophilic/hydrophobic character of the IL, measured by the octanol-water partition coefficients (K_{ow}), was found to be a key parameter for the selective behaviour of the SLM. It was observed that an increase in the K_{ow} of the ionic liquid resulted in a higher separation efficiency of the resulting SLM. In **Chapter 6**, the high operational stability of the SLM based on ionic liquids was demonstrated at microscopic level. In this chapter, the operational stability of six different SLMs based on ionic liquids was evaluated. [bmim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻] and [bmim⁺][NTf₂⁻] were used as supporting phase in Nylon and Mitex membranes. Scanning electron-microscopy (SEM) combined with Energy Dispersive X-ray (EDX) analysis was used to characterize the membrane surface morphologically and examine the global chemical composition of the membranes and the distribution of the ILs within them. The Nylon membranes (hydrophilic) impregnated with ILs showed homogeneous distribution of the ILs inside the pores, and also showed some surface coating of ionic liquid, depending on the viscosity of the IL used. In the case of Mitex membranes, less ionic liquid was absorbed into the membranes, probably because of their hydrophobic character and textural properties. This observation underlines the importance that the hydrophobic/hydrophilic character and textural properties of the supporting membrane have for the design of supporting liquid membranes based on ionic liquids. The six SLMs studied maintained the ILs inside their pores when immersed for a week in a diffusion cell with n-hexane in both compartments, demonstrating at microscopic level their high operational stability.

Finally, in **Chapter 7** final conclusions and an outlook on the future potential of ionic liquids are presented.

TABLE OF CONTENTS

1. THE EFFECT OF IONIC LIQUID MEDIA ON ACTIVITY, SELECTIVITY AND STABILITY OF <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> LIPASE B IN TRANSESTERIFICATION REACTIONS.....	311
1.1. Introduction.....	312
1.2. Materials and Methods.....	313
1.3. Results and Discussion.....	316
1.4. Conclusions.....	321
1.5. References.....	322
2. CROSS-LINKED <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> LIPASE B IS ACTIVE IN DENATURING IONIC LIQUIDS.....	325
2.1. Introduction.....	326
2.2. Materials and Methods.....	326
2.3. Results and Discussion.....	329
2.4. Conclusions.....	331
2.5. References.....	332
3. 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.....	335
3.1. Introduction.....	336
3.2. Materials and Methods.....	337
3.3. Results and Discussion.....	341
3.4. Conclusions.....	349
3.5. Nomenclature.....	350
3.6. References.....	351
4. PREDICTION OF THE SELECTIVITY IN THE RECOVERY OF TRANSESTERIFICATION REACTION PRODUCTS USING SUPPORTED LIQUID MEMBRANES BASED ON IONIC LIQUIDS	353
6.1. Introduction.....	354
6.2. Materials and Methods.....	355
6.3. Results and Discussion.....	358
6.4. Conclusions.....	370

6.5. Nomenclature.....	371
6.6. References.....	372
5. 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.....	374
5.1. Introduction.....	375
5.2. Materials and Methods.....	376
5.3. Results and Discussion.....	380
5.4. Conclusions.....	386
5.5. Nomenclature.....	387
5.6. References.....	388
6. A SEM-EDX STUDY OF HIGHLY STABLE SUPPORTED LIQUID MEMBRANES BASED ON IONIC LIQUIDS	390
4.1. Introduction.....	391
4.2. Materials and Methods.....	392
4.3. Results and Discussion.....	393
4.4. Conclusions.....	405
4.5. References.....	406
7. CONCLUSIONS AND OUTLOOK.....	409
7.1. Conclusions.....	410
7.2. Outlook.....	411

1

The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of *Candida antarctica* lipase B in transesterification reactions

Nineteen different 1,3-dialkylimidazolium based ionic liquids (ILs) were used as reaction media for the synthesis of butyl butyrate by transesterification from vinyl butyrate and 1-butanol catalyzed by Candida antarctica lipase B (CaLB). The reaction was also carried out in n-hexane as a reference solvent. In all the water-immiscible ionic liquids assayed, the enzymatic activity and selectivity were higher than that obtained in n-hexane. However, in water-miscible ionic liquids the activity was lower than in the reference solvent, although they showed more than 99.99% selectivity. Two solvent properties, hydrophobicity and nucleophilicity, were considered as key parameters for analyzing the behaviour of CaLB in ILs. In the case of ILs based on the same anion, the synthetic activity was gradually enhanced by increasing cation hydrophobicity. Furthermore, the activity of CaLB was greater in ionic liquids containing anions of lower nucleophilicity. Stability studies indicate that CaLB exhibited greater stability in water-immiscible ionic liquids than in water-miscible ionic liquids.

1. THE EFFECT OF IONIC LIQUID MEDIA ON ACTIVITY, SELECTIVITY AND STABILITY OF CANDIDA ANTARCTICA LIPASE B IN TRANSESTERIFICATION REACTIONS.

1.1. INTRODUCTION

In nature, enzymes act as catalysts of living systems and are designed to function in aqueous solutions. However, anhydrous conditions are needed for synthetic transformations using enzymes. The use of organic solvents as non-aqueous environments offers the possibility of carrying out synthetic reactions by hydrolytic enzymes, increasing the solubility of organic substrates [1,2]. However, organic solvents are usually volatile liquids that may evaporate into the atmosphere with a detrimental impact on the environment and human health. The use of ionic liquids in biocatalytic processes has recently gained much attention as an environmentally attractive alternative to classical organic solvents [3], and they have been seen to be good solvents in a wide variety of biochemical processes [4]. Ionic liquids are organic salts that are liquid close to room temperature. They normally consist of an organic cation, being the most commonly used dialkylimidazolium and tetraalkylammomium salts, and a polyatomic inorganic anion (e.g. BF_4^- , PF_6^-) [5]. From an environmental point of view, the most important properties of ionic liquids are their negligible vapour pressure and their good chemical and thermal stabilities [6]. Additionally, the physical-chemical properties of ionic liquids, such as their hydrophobicity, density, viscosity, melting point, polarity and solvent properties, may be modified by altering the anion or the cation [3,7]. Indeed, this feature is a key factor for realizing successful reactions since appropriate combinations of the cationic and anionic parts of the solvent can be made. In this sense, ionic liquids are often referred to as designer solvents [8].

Lipase has shown good behaviour as a catalyst in non-conventional media [9-11]. Among the ionic liquids used for lipase-catalyzed reactions, those containing alkylimidazolium cations are showed to be one of the most interesting. In spite of this, it is known that some of these ionic liquids have a strong impact on the activity and stability of lipases [12-15].

This work studies the activity, selectivity and stability of free *Candida antarctica* lipase B (CaLB) in several ionic liquids consisting of dialkylimidazolium cations combined with a wide range of anions, including hexafluorophosphate, bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, tetrafluoroborate, dicyanamide, nitrate, acetate, octylsulfate and ethylenglycolmonomethylethersulfate (see Figure 1.1), as well as in a common organic solvent, n-hexane.

1. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CALB

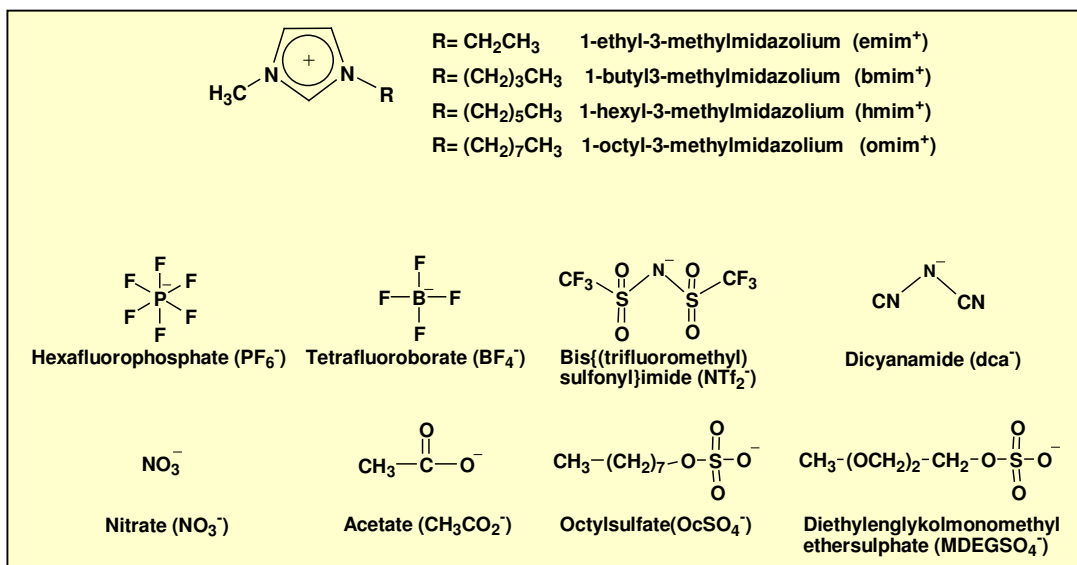


Figure 1.1. Ions involved in the assayed ionic liquids.

Butyl butyrate synthesis from vinyl butyrate and 1-butanol catalyzed by CaLB was chosen as reaction model (see Figure 1.2).

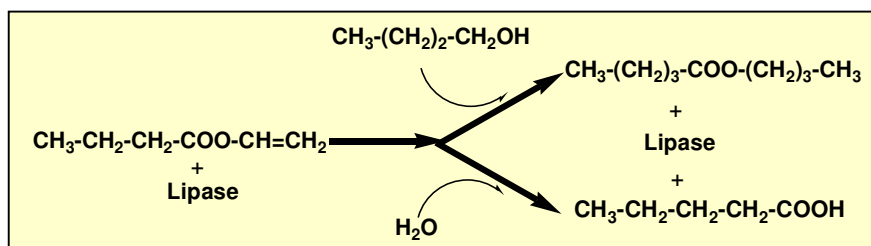


Figure 1.2. Stoichiometric scheme of kinetically controlled synthesis of butyl butyrate from vinyl propionate and 1-butanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B.

1.2. MATERIALS AND METHODS

1.2.1. Enzyme and chemicals

A commercial lipase (EC 3.1.1.3) preparation was used as catalyst: free *Candida antarctica* lipase B aqueous solution (Lipozyme[®] CaLB L), which was a gift from Novo España S.A. Prior to use, the enzyme solution was 4-fold diluted in 20 mM phosphate buffer at pH 7.

[emim⁺][Cl⁻], [bmim⁺][Cl⁻], [omim⁺][Cl⁻], [bmim⁺][PF₆⁻], [bdmim⁺][PF₆⁻], [hmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻], [emim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][BF₄⁻], [bdmim⁺][BF₄⁻], [hmim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][OcSO₄⁻] and [bmim⁺][MDEGSO₄⁻] were purchased from Solvent Innovation (purity > 99%). The ionic liquids [emim⁺][TfN₂⁻] (purity > 99%) and

1. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CALB

[bmim⁺][TfN₂⁻] (purity >99%) were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co. and Strem Chemical Inc., respectively and [hmim⁺][TfN₂⁻] (purity >99%) and [omim⁺][TfN₂⁻] (purity >99%) from Merck KgaA. Substrates, solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co., and were of the highest purity available.

1.2.2. Synthesis of ionic liquids

1-Ethyl-3-methylimidazolium dicyanamide, [emim⁺][dca⁻]: [emim⁺][Cl⁻] (43.9 g, 0.3 mol) was dissolved in acetone (50 mL) and sodium dicyanamide (28.6 g, 0.32 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 the ionic liquid (49.4 g, 93%), which was purified by column chromatography over active alumina. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS): δ 1.3 (t, 3H), 3.71 (s, 3H), 4.01 (m, 2H), 7.23 (m, 2H), 8.76 (s, 1H).

1-Butyl-3-methylimidazolium dicyanamide, [bmim⁺][dca⁻]: [bmim⁺][Cl⁻] (52.2 g, 0.3 mol) was dissolved in acetone (50 mL) and sodium dicyanamide (28.6 g, 0.32 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 yellow ionic liquid (53.4 g, 90%). This product was purified by column chromatography over active alumina. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 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).

1-Octyl-3-methylimidazolium dicyanamide, [omim⁺][dca⁻]: [omim⁺][Cl⁻] (60.7 g, 0.3 mol) was dissolved in acetone (50 mL) and sodium dicyanamide (28.6 g, 0.32 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 yellow ionic liquid (60.81 g, 87%). Then, the product was purified by column chromatography over active alumina. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS): δ 0.77 (t, 3H), 1.21 (m, 10H), 1.81 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 4.14 (t, 2H), 7.38 (m, 2H), 9.26 (s, 1H).

1-Butyl-3-methylimidazolium nitrate, [bmim⁺][NO₃⁻]: 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. [bmim⁺][Cl⁻] (26.3 g, 0.15 mol) was dissolved in Milli-Q water (200 mL) and the resulting solution was slowly run through 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. [bmim⁺][NO₃⁻] was obtained in a near-quantitative yield. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 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).

1. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CALB

1-Butyl-3-methylimidazolium acetate, [bmim⁺][CH₃CO₂⁻] was prepared by ion exchange as described above in a near-quantitative yield. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 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).

1.2.3. Enzyme activity in ionic liquids

19.2 μL (150 μmol) vinyl butyrate and 13.8 μL (150 μmol) 1-butanol were added to 1.5 mL screw-capped vials containing 457 μL of each ionic liquid, or n-hexane. The reaction was started by adding 10 μL of *Candida antarctica* lipase B (8.5 mg mL⁻¹ in 20 mM phosphate buffer at pH 7) and run for 2 h at 30°C. At different times, 15 μL aliquots were extracted and suspended in 485 μL n-hexane. The biphasic mixture was strongly shaken for 2 min to extract all the substrates and products into the hexane phase. Then, the hexane solution of ethyl hexanoate (internal standard) (100 μL, 30 mM) was added into the hexane extract (400 μL) and resulting solution (5 μL) was analyzed by GC. All experiments were carried out in duplicate and the mean values are reported. The efficiency of the catalytic action was measured by two parameters: the synthetic activity, defined as the amount of enzyme that produces 1 μmol 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.

1.2.4. Enzyme stability in ionic liquids

Mixtures containing 457 μL of ionic liquid and 10 μL of *Candida antarctica* lipase B (8.5 mg mL⁻¹ in 20 mM phosphate buffer at pH 7) were incubated at 30 °C in different screw-capped vials of 1.5 mL total volume. At different incubation times, 19.2 μL (150 μmol) vinyl butyrate and 13.8 μL (150 μmol) 1-butanol were added and the activity of CaLB was measured as described above.

1.2.5. Gas chromatographic analysis

GC analysis was performed with an Agilent 6890 N instrument equipped with FID detector and a NukolTM capillary column (15m × 0.53mm × 0.5μm, Supelco), using ethyl hexanoate as internal standard. The chromatographic conditions were as follows: carrier gas (N₂) at 1.89 psi (51 mL /min total flow); temperature program: 40 °C, 4 min; 5 °C/min, 135°C; split ratio: 7.9/1; detector: 220 °C. The retention times of the peaks were as follows: vinyl butyrate, 3.0 min; 1-butanol, 6.3 min; butyl butyrate, 8.8 min; ethyl hexanoate, 9.4 min; and butyric acid 21.6 min. Substrate and product concentrations were calculated from calibration curves using stock solutions of pure compounds.

1.3. RESULTS AND DISCUSSION

1.3.1. Effect of ionic liquid media

Lipase-catalysed reactions are greatly influenced by the reaction medium used. To study the influence of the cations and anions of ionic liquids on the activity and selectivity of *Candida antarctica* lipase B, nineteen different water-immiscible and water-miscible ionic liquids were tested as reaction media for the synthesis of butyl butyrate by transesterification from vinyl butyrate and 1-butanol (see Figure 1.2) at 2% (v/v) water content and 30°C. The water-immiscible ILs chosen for this study were: (i) [bmim⁺][PF₆⁻] (ii) [bdmim⁺][PF₆⁻], (iii) [hmim⁺][PF₆⁻], (iv) [omim⁺][PF₆⁻], (v) [emim⁺][TfN₂⁻], (vi) [bmim⁺][TfN₂⁻], (vii) [hmim⁺][TfN₂⁻] and (viii) [omim⁺][TfN₂⁻] and the water-miscible ILs were: (i) [emim⁺][BF₄⁻], (ii) [bmim⁺][BF₄⁻] (iii) [bdmim⁺][BF₄⁻], (iv) [hmim⁺][BF₄⁻], (v) [emim⁺][dca⁻], (vi) [bmim⁺][dca⁻], (vii) [omim⁺][dca⁻], (viii) [bmim⁺][NO₃⁻], (ix) [bmim⁺][CH₃COO⁻], (x) [bmim⁺][OcSO₄], (xi) [bmim⁺][MDEGSO₄⁻] (see Figure 1.1). Enzyme reaction in n-hexane, a classical organic solvent for lipase-catalyzed ester synthesis in non-aqueous environments [16], was also carried out under the same conditions to compare the efficiency of ionic liquids for use as reaction media.

Tables 1.1 and 1.2 show the synthetic activity and selectivity exhibited by the enzyme in n-hexane and in the water-immiscible and water-miscible ionic liquids, respectively. All the water-immiscible ionic liquids were found to be suitable media for the lipase-catalysed transesterification reaction, the initial synthetic rate being higher than that observed in n-hexane in all cases. Two solvent properties, cation hydrophobicity and anion nucleophilicity, were considered for analyzing the behaviour of CaLB for lipase-catalyzed reactions in ILs.

1. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CALB

Table 1.1. Synthetic activity and selectivity parameters exhibited by *Candida antarctica* lipase B for butyl butyrate synthesis in n-hexane and in water-immiscible ionic liquids at 30 °C.

Media	Synthetic activity (U mg ⁻¹ prot.)	Selectivity (%)
n-Hexane	7.605	75.3
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	16.745	90.7
[bdmim ⁺][PF ₆ ⁻]	28.061	93.9
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	60.438	85.8
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	116.097	86.6
[emim ⁺][NTf ₂ ⁻]	11.886	85.9
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	34.732	79.2
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	51.400	82.7
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	73.525	83.0

In general, for the ILs based on the same anion, the hydrophobicity increased with increasing length of the alkyl group on the cation [17]. According to the data summarized in Table 1.1, the synthetic activity was gradually enhanced by increasing hydrophobicity of the water-immiscible ILs, 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. As regards nucleophilicity, it is also well known that the anion [NTf₂⁻] is more nucleophilic than the anion [PF₆⁻] [18]. In this sense, we observed that the CaLB activity was greater in ionic liquids containing the anion of lower nucleophilicity, [PF₆⁻], which could be expected because of the higher tendency of the most nucleophilic anions to change the enzyme's conformation by interacting with the positively charged sites in the enzyme structure [14,19]. However, contrary to what might be expected from this tendency, the reaction rate in [bmim⁺][NTf₂⁻] was greater than in [bmim⁺][PF₆⁻]. This could be due to the high viscosity of [bmim⁺][PF₆⁻] (207 cP) [20] compared with [bmim⁺][NTf₂⁻] (52 cP) [21], which would involve more diffusional limitations. Several other authors have also reported that lipases are more active in [bmim⁺][NTf₂⁻] than in [bmim⁺][PF₆⁻] [16,22]. On the other hand, differences in selectivity between the assayed water-immiscible ILs (data included in Table 1.1) could be attributed to their specific abilities to reduce water activity (A_w) in the enzyme microenvironment. Thus, an increase in the hydrophobicity of the water-immiscible ILs generally involves an increase in free water molecules, which can act as nucleophile acceptors in the transesterification reaction, thus leading to a loss in selectivity.

1. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CALB

On the other hand, free CaLB was less active in water-miscible ionic liquids than in n-hexane in almost all cases (Table 1.2).

Table 1.2. Synthetic activity and selectivity parameters exhibited by *Candida antarctica* lipase B for butyl butyrate synthesis in n-hexane and in water-miscible ionic liquids at 30°C.

Media	Synthetic activity (U mg ⁻¹ prot.)	Selectivity (%)
n-Hexane	7.605	75.3
[emim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.139	> 99.9
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	0.818	> 99.9
[bdmim ⁺][BF ₄ ⁻]	3.480	> 99.9
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	3.580	> 99.9
[emim ⁺][dca ⁻]	0.634	> 99.9
[bmim ⁺][dca ⁻]	12.341	> 99.9
[omim ⁺][dca ⁻]	0.822	> 99.9
[bmim ⁺][NO ₃ ⁻]	0	-
[bmim ⁺][CH ₃ CO ₂ ⁻]	0.328	> 99.9
[bmim ⁺][OcSO ₄ ⁻]	0.079	> 99.9
[bmim ⁺][MDEGSO ₄ ⁻]	0.114	> 99.9

Interestingly, CaLB was more active in [bmim⁺][dca⁻] than in n-hexane and in [bdmim⁺][BF₄⁻] and [hmim⁺][BF₄⁻] the enzyme showed half of the activity as in this organic solvent, demonstrating the suitability of these water-miscible ionic liquids for use as solvents for the proposed reaction. However, CaLB was inactive in [bmim⁺][NO₃⁻], as can be seen in Table 1.2. It was attributed to the high nucleophilicity of the anion [NO₃⁻], which may coordinate very strongly to positively charged sites in the enzyme structure changing the enzyme's conformation. In the case of most of the water-miscible ILs, the negative effect observed on the lipase activity at low water content can be attributed to the direct interaction with the enzyme molecules, which would lead to protein denaturation by water stripping [23,24]. In the water-miscible ILs containing the same anion, the synthetic activity was gradually enhanced by an increase in cation hydrophobicity, showing the same tendency as the water-immiscible ILs. With regard to the selectivity parameter, more than 99.99% selectivity was achieved in all the water-

1. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CALB

miscible ionic liquids, which could be attributed to the low water activity around the protein.

1.3.2. Analysis of CaLB stability in ionic liquids

A 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 *Candida antarctica* lipase B stability was studied by incubating the enzyme in different ionic liquids at 30°C and 2% (v/v) water content. The ionic liquids selected for this study were a representative sample of those in which the enzyme showed the highest activity: [bmim⁺][PF₆⁻], [hmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻], [hmim⁺][TfN₂⁻], [hmim⁺][BF₄⁻] and [bmim⁺][dca⁻]. In all cases, the activity loss followed a second order deactivation kinetics, which permitted the half-life time ($t_{1/2}$) of the enzyme to be determined (see Table 1.3).

Table 1.3. Half-life times of *Candida antarctica* lipase B exhibited by incubation in different ionic liquids at 30°C.

Media	Half-life time (h)
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	48
[hmim ⁺][PF ₆ ⁻]	78
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	84
[hmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	72
[hmim ⁺][BF ₄ ⁻]	7
[bmim ⁺][dca ⁻]	1.5

Figure 1.3 shows the deactivation profile of the enzyme in three different ionic liquids based on hexafluorophosphate anion.

1. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CALB

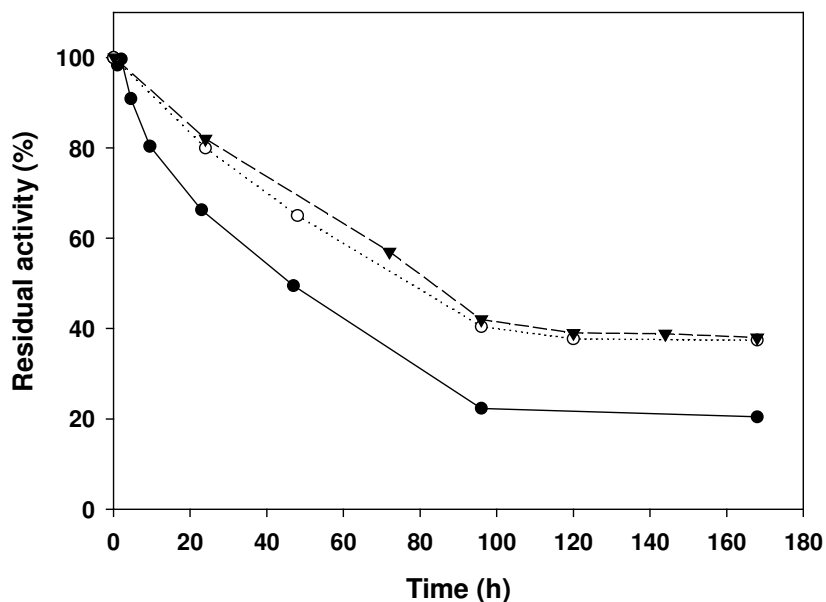


Figure 1.3. Deactivation profile of *Candida antarctica* lipase B in [bmim⁺][PF₆⁻] (●), [hmim⁺][PF₆⁻] (○) and [omim⁺][PF₆⁻] (▼) at 30 °C.

As can be seen, the stability of CaLB seems to increase with the increase in the alkyl chain length of the cation, which agrees with the increase in ILs hydrophobicity, although no significant differences in stability has been observed between [hmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻]. These results are in accordance with those obtained by Lozano *et al.* [25], who found that the enzyme was very sensitive to deactivation when hydrophobicity decreased, at 2 % water content.

The most important effect on CaLB stability was observed by changing the nature of IL anions, as can be observed in Table 1.3 by comparing the half-life times of CaLB in ionic liquids containing the same cation. For the ionic liquids containing the cation [bmim⁺], the half-life times increased in the following order: [bmim⁺][dca⁻] < [bmim⁺][PF₆⁻], and for those containing the cation [hmim⁺] in the following order: [hmim⁺][BF₄⁻] < [hmim⁺][TfN₂⁻] < [hmim⁺][PF₆⁻]. Bearing in mind the nucleophilicity sequence for the anions [dca⁻], [BF₄⁻] > [TfN₂⁻] > [PF₆⁻] [18,26], the increase in half-life time was in agreement with the decrease in this parameter. This could be explained by the fact that the most nucleophilic anion may interact more strongly with the enzyme, causing changes in the active enzyme structure.

1. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CALB

[omim⁺][PF₆⁻], composed of the least nucleophilic anion and the most hydrophobic cation, was seen to be the best IL for protecting the enzyme, with a half-life time of 84 h. In contrast, [bmim⁺][dca⁻], which contained the most nucleophilic anion and the least hydrophobic cation, produced a fast fall on CaLB activity, with a half-life time of 1.5 h. The same tendency was observed by Kaar *et al.* [27] with Novozym 435, which was more stable in [bmim⁺][PF₆⁻] than in [bmim⁺][NO₃⁻] and by Persson and Bornscheuer [16] using an esterase from *B. stearothermophilus*, which showed greater stability in [bmim⁺][PF₆⁻] than in [bmim⁺][BF₄⁻].

1.4. CONCLUSIONS

A wide range of 1,3-dialkylimidazolium based ionic liquids were tested as reaction media for the synthesis of butyl butyrate catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. Water-immiscible ionic liquids appeared as suitable media for the proposed reaction, increasing the activity and selectivity with respect to the values obtained with a classical organic solvent, n-hexane. The use of water-miscible ionic liquids led to lower activities than that obtained in n-hexane, although selectivity reached more than 99.99% in these media. It is noteworthy that an increase in cation hydrophobicity was in agreement with an increase in the activity of CaLB, but a decrease in selectivity. Furthermore, an increase in anion nucleophilicity involved a decrease in the activity values and an increase in the selectivity of the enzyme. Stability studies indicated that CaLB was more stable in water-immiscible ionic liquids than in water-miscible ionic liquids.

This work clearly demonstrates the exciting potential of ionic liquids for use in non-aqueous enzymology, since it is possible to design a specific ionic liquid for each application by changing either the anion or the alkyl substituent in the cation in order to create more efficient processes.

1.5. REFERENCES

- [1] P. Halling, Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, test and recommendations for experimental design and analysis, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 178-206.
- [2] A.M. Klivanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature* 409 (2001) 241-246.
- [3] S. Dzyuba, A Bartsch, Recent Advances in Applications of Room-Temperature Ionic Liquid-Supercritical Carbon Dioxide Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 148-150.
- [4] F. van Rantwijk, R.M. Lau, R.A. Sheldon, Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends Biotechnol.* 21 (2003) 131-138.
- [5] J.F. Brennecke, E.J. Maginn, Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [6] R. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.
- [7] 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.
- [8] M. Freemantle, Designer solvents. Ionic liquids may boost clean technology development, *Chem. Eng. News* 76 (1998) 32-37.
- [9] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Víllora. 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.
- [10] A.V. Paiva, D.V. Rossum, F.X. Malcata, Kinetics of lipase-mediated synthesis of butyl butyrate in n-hexane, *Biocatal. Biotransform.* 20 (2002) 43-51.
- [11] S. Srivastava, G. Madras, J. Modak, Esterification of myristic acid in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids* 27 (2003) 55-64.
- [12] R. Irimescu, K. Kato, Lipase-catalyzed enantioselective reaction of amines with carboxylic acids under reduced pressure in non-solvent system and in ionic liquids, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 523-525.

1. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of CALB

- [13] A. Kamal, G. Chouhan, Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure 1,2-diols employing immobilized lipase in the ionic liquid [bmim⁺][PF₆⁻], *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 8801-8805.
- [14] 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.
- [15] Y. Yuan, S. Bai, Y. Sun, Comparison of lipase-catalysed enantioselective esterification of (±)-menthol in ionic liquids and organic solvents, *Food Chem.* 97 (2006) 324-330.
- [16] 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.
- [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] 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, J.L. Iborra, Understanding structure-stability relationship of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *Biomacromolecules* 6 (2005) 1457-1464.
- [20] 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.
- [21] P. Bonhôte, A.P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient-. temperature molten-salts, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 1168-1178.
- [22] 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.

1. The effect of ionic liquid media on activity,selectivity and stability of CALB

- [23] P. Lozano, T. De Diego, J.P. Guegan, M. Vaultier, J.L. Iborra, Stabilization of α -Chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 563-569.
- [24] S.J. Nara, J.R. Harjani, M.M. Salunkhe, Enzymatic catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 2979-2982.
- [25] P. Lozano, T. De Diego, S. Gmouth, M. Vaultier, J.L. Iborra,. Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 661-669.
- [26] R. Irimescu, K. Kato, Investigation of ionic liquid as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 30 (2004) 189-194.
- [27] J.L. Kaar, A.M. Jesionowski, J.A. Berberich, R. Moulton, A.J. Russell. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4125-4131.

2

Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids

Candida antarctica lipase B, adsorbed and cross-linked on a polypropylene carrier, maintained its activity when dispersed in ionic liquids, such as [bmim⁺][NO₃⁻], that denatured the free enzyme.

2. 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⁺][dca⁻] 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, vinyl acetate and Dowex 1X8-200 anion-exchange resin were from Acros Organics. 1,2-Dimethoxybenzene was 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. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids

2.2.2. Analysis and equipment

Gas chromatography: non-chiral analyses were performed on a Varian Star 3600 GC instrument equipped with a FID detector and a Varian Inc. 50 m x 0.53 mm CP-Sil 5 CB column. Transesterification of ethyl butanoate: 8 min at 40 °C, then 15 °C/min to 235 °C.

The amount of Cl^- 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^- .

2.2.3. Cross-linking of CaLB [17]

CLEA CaLB-CL. Dipotassium hydrogen phosphate (0.45 g, 2.5 mmol, 20 mM final concentration) was added to 150 mL Novozyme 525F at room temperature. The pH was adjusted to 7.3 with phosphoric acid (1 M). Subsequently, 450 mL 2-propanol was added at once and the mixture was stirred at room temperature for 5 min. Then glutaraldehyde solution (25%, 22.6 mL, final concentration 100 mM) was added and stirring was continued for 3 h at room temperature. Then a solution of sodium cyanoborohydride (60 mL, 100 mM) was added. After 30 min the CLEA was isolated by centrifugation. The pellet was washed with water and subsequently dried with acetone and diethylether. From the resulting CLEA organic solvent residues were removed by a stream of air on a glass filter. Yield 8 g, activity 24 kU/g. One unit (U) will produce one μmol of butyric acid per min from tributyrin at pH 7.5 and 40 °C. 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⁺][Cl⁻]: 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%); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 0.96 (t, 3H), 1.38 (q, 2H), 1.94 (m, 2H), 4.16 (s, 3H), 4.39

2. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids

(t, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 10.52 (s, 1H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 13.47, 19.38, 32.15, 36.68, 49.72, 122.43, 123.91, 136.93.

1-Butyl-3-methylimidazolium dicyanamide [*bmim*⁺][*dca*⁻]: [*bmim*⁺][*Cl*⁻] (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 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 1 day and filtered. The filtrate was evaporated by rotary evaporation yielding a slightly yellow ionic liquid (109.2 g, 92%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 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). 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 [*bmim*⁺][*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. [*bmim*⁺][*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. [*bmim*⁺][*NO*₃⁻] was obtained in near-quantitative yield as a colourless liquid that contained < 10 ppm *Cl*⁻ according to the silver chromate test. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 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).

1-Butyl-3-methylimidazolium acetate [*bmim*⁺][*OAc*⁻] was prepared by ion exchange as described above in near-quantitative yield. The product contained < 10 ppm *Cl*⁻ according to the silver chromate test. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 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).

1-Butyl-3-methylimidazolium lactate [*bmim*⁺][*CH*₃*CH(OH)CO*₂⁻] was prepared by ion exchange as described above in near-quantitative yield. The product contained < 10 ppm *Cl*⁻ according to the silver chromate test. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 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).

2.2.5. Enzymatic reactions

Blank reactions without biocatalyst were carried out in all cases to ensure that there was no background reaction.

Ethyl butanoate (8 μL , 60 μmol), 1-butanol (15 μL , 300 μmol) and 1,2- dimethoxybenzene (8 μL , internal standard) were dissolved in the reaction medium (1.475 mL), together with 75 mg activated zeolite KA (powder), in a 2 mL screw-

2. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids

capped vial. CaLB (36 U) was added and the reaction mixture was shaken at 40°C in an oil bath. At regular time intervals, 15 μL aliquots were withdrawn and added to 0.6 mL n-hexane. The biphasic mixture was vortexed during 1 min and centrifuged at 12000 min^{-1} ; a 5 μL sample of the supernatant was analyzed by GC.

2.3. RESULTS AND DISCUSSION

The initial experiments involved a simple transesterification reaction of ethyl butanoate with butanol (see Figure 2.1). Two cross-linked preparations of CaLB were used, one a CLEA prepared via straightforward aggregation and crosslinking (CaLB-CL), as well as one cross-linked on a polypropylene carrier (CaLB-PP). The nature of this latter preparation, in particular the issue whether enzyme aggregation has occurred, is still being investigated.

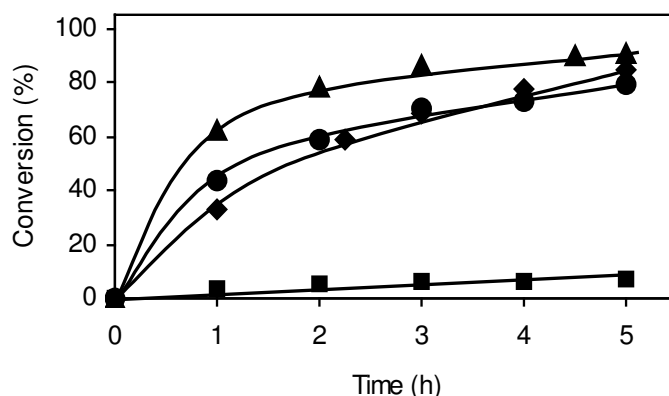


Figure 2.1. Transesterification: effect of medium and immobilisation procedure; CaLB-CL in t-BuOH (♦) and [bmim⁺][dca⁻] (■); CaLB-PP in t-BuOH (▲) and [bmim⁺][dca⁻] (●).

The transesterification activity of these preparations was assessed in two reaction media: *tert*-butyl alcohol, which was used as a polar and hydrophilic standard medium and the ionic liquid [bmim⁺][dca⁻]. We have previously found that CaLB dissolves in this latter ionic liquid with irreversible loss of activity [18].

In *tert*-butyl alcohol, the CaLB-CL preparation catalysed the transesterification reaction at an initial rate of 220 $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{g protein})^{-1}$, which is two orders of magnitude slower than aqueous hydrolysis. The CaLB-PP biocatalyst was significantly more active, on the basis of protein contents (see Table 2.1). This latter effect is tentatively ascribed to the shorter diffusion pathway in the carrier-supported biocatalyst. In

2. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids

[bmim⁺][dca⁻], CaLB-PP maintained its activity and mediated the transesterification at approx. 60% of the rate in tert-butyl alcohol but the activity of CaLB-CL, in contrast, was negligible (see Figure 2.1).

Table 2.1. Effects of the medium and biocatalyst on the transesterification^a

Medium	CLEA type, initial rate ($\mu\text{mol min}^{-1} (\text{g protein})^{-1}$)	
	CaLB-CL	CaLB-PP
tert-Butyl alcohol	220	374
[bmim ⁺][dca ⁻] ^b	6.6	228
[bmim ⁺][NO ₃ ⁻]	2.5	151
[bmim ⁺][AcO ⁻]	n.d.	62
[bmim ⁺][CH ₃ CH(OH)CO ₂ ⁻]	n.d.	58

- Reaction conditions: ethyl butanoate (0.04 M), 1-butanol (0.2 M), zeolite KA (50 mg mL⁻¹), lipase 24 U mL⁻¹, 40 °C.
- We have previously reported [20] initial rates of 136 and 270 $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{g protein})^{-1}$ in tert-butyl alcohol and [bmim⁺][dca⁻], respectively, in the presence of a CaLB CLEA, but its preparation proved difficult to reproduce.

We reasoned that the low activity of CaLB-CL in [bmim⁺][dca⁻] could possibly be caused by disruption of the intramolecular hydrogen bonds by the strongly coordinating dca anion [10]. Thus, the addition of a modest amount of water could have a beneficial effect, as highly hydrophilic ionic liquids, such as [bmim⁺][dca⁻], tend to bind water up to the hemihydrate quite tightly [19]. CaLB-CL indeed stayed active in [bmim⁺][dca⁻]. ½ H₂O (4.5 wt% H₂O). Hydrolysis prevailed, however, and ester formation peaked at only 15% (data not shown). We hypothesise that the water breaks the interference of the ionic liquid with the enzyme's structure and restores activity. From the extent of hydrolysis it appears that the water activity in the hemihydrate is still considerable; hence, adding water is not a remedy to deactivation. Slow hydrolysis was even observed in rigorously dried ionic liquids and we found it necessary to add zeolite KA to the reaction mixtures to obtain consistent results.

It would seem, so far, that the procedure for preparing the biocatalyst is crucial for preserving activity in the ionic liquid. Presumably, the thinly dispersed layer of, possibly aggregated, enzyme on the polypropylene surface in CaLB-PP is more extensively cross-linked than the more massive carrierless aggregates.

2. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids

Further experiments were conducted with CaLB-PP and involved a wider range of ionic liquids. In [bmim⁺][NO₃⁻], a potentially attractive solvent due to its inertness and high polarity, the reaction was fast. In the acetate and lactate, in contrast, the initial reaction soon abated and complete conversion was not reached (Figure 2.2 and Table 2.1).

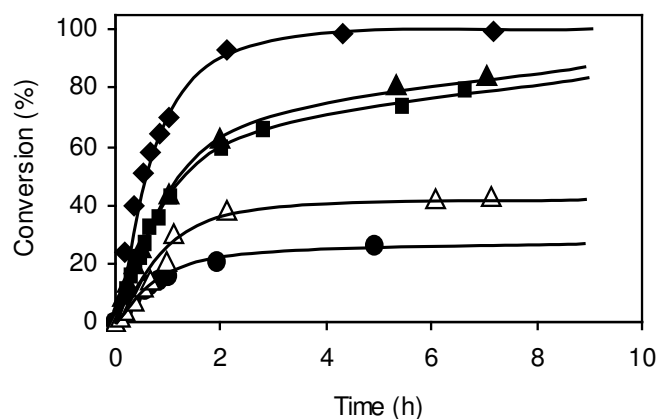


Figure 2.2. Transesterification of ethyl butanoate in the presence of CaLB-PP in t-BuOH (♦), [bmim⁺][dca⁻] (▲), [bmim⁺][NO₃⁻] (■), [bmim⁺][CH₃CH(OH)CO₂⁻] (Δ), [bmim⁺][AcO⁻] (●).

2.4. CONCLUSIONS

Candida antarctica lipase B, adsorbed and cross-linked on a polypropylene carrier, maintained its transesterification activity in the ionic liquids [bmim⁺][NO₃⁻] and [bmim⁺][dca⁻], which deactivate the free enzyme.

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: Enzym.* 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 antarctica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromol.* 6 (2005) 1457-1464.
- [9] R.A. Sheldon, R. Madeira Lau, M.J. Sorgedraeger, F. Van Rantwijk, K.R. Seddon, Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chem.* 4 (2002) 147-151.
- [10] R. Madeira Lau, M.J. Sorgedraeger, 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.
- [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.* (2002) 714-715.

2. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids

- [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] M.H.A. Janssen, F. Van Rantwijk, R.A. Sheldon, paper in preparation.
- [19] 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.
- [20] F. Van Rantwijk, F. Secundo, R.A. Sheldon, Structure and activity of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *Green Chem.* 8 (2006) 282-286.
- [21] 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.
- [22] T. Itoh, Y. Nishimura, N. Ouchi, S. Hayase, *J. Mol. Catal. B: Enzym* 26 (2003) 41-45.
- [23] V. Gotor, R. Brieva, F. Rebolledo, Enantioselective acylation of amino alcohols by porcine pancreas lipase, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1988) 957-958.
- [24] 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 (808).

2. Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids

- [25] F. Balkenbohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation, *J. Prakt. Chem.* 339 (1997) 381-384.
- [26] T. Wagegg, M.M. Enzelberger, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmidt, The use of methoxy acetoxy esters significantly enhances reaction rates in the lipasecatalyzed preparation of enantiopure 1-(4-chloro phenyl) ethyl amines, *J. Biotechnol.* 61 (1998) 75-78.

3

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

This work evaluates the use of ionic liquids (ILs) based on 1-n-alkyl-3-methylimidazolium cation (n-butyl, n-octyl) and the hexafluorophosphate anion, as liquid phase in supported liquid membranes (SLMs) for the selective separation of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid, which are substrates and products of a transesterification reaction.

No significant permeability differences was observed between the permeabilities of the compounds when five polymeric membranes (Fluoropore, Durapore, Mitex, Isopore and Nylon) were used. However, transport selectivity was dramatically increased when the same membranes were used with [bmim⁺][PF₆⁻] immobilized, especially in the case of membranes of a hydrophilic nature (Nylon and Isopore). Good permeabilities and selectivities were also found when [omim⁺][PF₆⁻] was immobilized in the Nylon membrane.

The molecular mechanism involved in the transport phenomena through the SLMs has been also investigated by determining the partition coefficients of the different compounds between n-hexane and the ILs, concluding that transport is mainly regulated by the ionic liquid's affinity towards each solute.

As regards the operational stability of these SLMs, they were seen to be remarkably stable when tested over eight continuous cycles of 48 hours each.

3. 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

3.1. INTRODUCTION

The selective separation of organic compounds is a critical issue in the chemical industry, where 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 [1] since they do not require high energy consumption for their operation and because they can be conducted under moderate operating conditions and sequential operation.

Among membrane-based separation processes, the use of supported liquid membranes (SLMs) has received growing attention during recent years [2-4]. SLMs are porous supports whose pores are filled with a liquid; among their numerous advantages is the fact that the amount of solvent needed in the SLM process is minimal and that the processes of extraction and stripping are combined into one single stage [5]. Nevertheless, their industrial application is still limited, mainly due to concerns about SLM stability and long-term performance [6,7]. 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).

Ionic liquids (ILs) have recently been revealed as interesting clean alternatives to classical organic solvents [8]. They are organic salts that are liquid close to room temperature and they normally consist of an organic cation, being the most commonly used dialkylimidazolium and tetraalkylammomium salts, and a polyatomic inorganic anion (e.g. BF_4^- , PF_6^-) [9]. Ionic liquids have been shown to be good solvents for a wide variety of chemical processes (i.e., extraction, reaction media, chemical catalysis, etc.) [10-12].

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 minimizing their solubility in the surrounding phases by adequate selection of the cation and anion [13], 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 [14], high

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

ion conductivity [14] and are non-flammable. Furthermore, they dissolve a wide range of inorganic and organic compounds [15,16] while being immiscible with many organic solvents [17] and even with water in some cases.

Recently, some researchers have reported that SLMs based on ILs [13,18-20] achieved selective transport of organic compounds such as alcohol, ketones and amines [19-20]. The present work seeks to broaden the field of application of supported ionic liquid membranes to the selective separation of the substrates and products of a transesterification reaction, for possible use in future integrated reaction/separation processes. This paper analysed the transport of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid, substrates and products of a transesterification reaction, through ILs based on the 1-n-alkyl-3-methylimidazolium cation (n-butyl, n-octyl) and the PF₆⁻ anion immobilized in different polymeric membranes, evaluating the influence of the physicochemical properties of the ionic liquids and the nature of the supporting organic membranes on the behaviour of the resulting supported liquid membranes. Finally, membrane stability studies were performed.

3.2. MATERIALS AND METHODS

3.2.1. Reagents and membranes

Five different polymeric membranes of 25 mm diameter from Millipore were tested as supporting membranes:

- Durapore[®] HVHP: hydrophobic polyvinylidene fluoride membrane with a pore size of 0.45 μm and a thickness of 125 μm.
- Fluoropore[®] FHLP: hydrophobic polytetrafluoroethylene membrane bonded to a high density polyethylene support with a pore size of 0.5 μm and a thickness of 150 μm.
- Mitex[®] LCW: hydrophobic polytetrafluoroethylene membrane with a pore size of 10 μm and a thickness of 130 μm.
- Isopore[®] HTTP: hydrophilic polycarbonate membrane with a pore size of 0.4 μm, a thickness of 20 μm.
- Nylon[®] HNWP: hydrophilic polyamide membrane with a pore size of 0.45 μm, a thickness of 170 μm.

The imidazolium-based ionic liquids used in this study, 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [bmim⁺][PF₆⁻] and 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [omim⁺][PF₆⁻], were purchased from Solvent Innovation (purity > 99%). Substrates, solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co., and were of the highest purity available.

3.2.2. Preparation of supported liquid membranes

Immobilization was conducted by placing the membrane in a 10 ml AmiconTH 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 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 of ionic liquid from the membrane surface.

3.2.3. Transport studies

The transport of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid through the SLMs was evaluated. The transport studies were performed at 30 °C using a glass diffusion cell with two independent compartments, with 30 mL each, separated by the SLM (Figure 3.1). O-rings were inserted on each side of the SLM. The entire assembly was held together by a threaded connector.

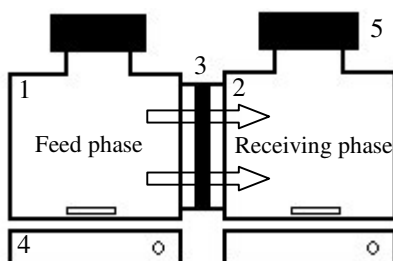


Figure 3.1. Schematic illustration of the glass diffusion cell set up with two independent compartments used for experiments: 1) feed solution containing solutes; 2) receiving solution containing fresh solvent; 3) supported liquid membrane; 4) magnetic stirrer; 5) septum.

In each experiment, the initial solute concentrations in the feed phase were 100 mM in n-hexane. n-Hexane was used as a receiving solution in all cases. The transport experiment was begun by adding 30 mL of each solution into their respective compartments. Both compartments were mechanically stirred to avoid concentration polarization conditions at the membrane interfaces. The solute concentrations were monitored by sampling 100 μ L of each compartment at regular time intervals during 48 h. A hexane solution of ethyl hexanoate (internal standard) (100 μ L, 60 mM) and n-hexane (800 μ L) were added to the sampling vials and the resulting solution (5 μ L) was analyzed by GC as described in the section 2.5.

3.2.4. Determination of the partition coefficients of the compounds between n-hexane and the ILs

The partition coefficient of the compounds between the ILs and a hexane solution was determined by the flash-shake method. Equal volume of both phases were used (1 mL) and the equilibrium was reached at 30 min. The composition of the organic phase before and after shaking with the IL phase was analysed by GC as described below. Equation (3.1) was used to calculate the partition coefficients:

$$K = \left(\frac{C_{H(0)} - C_{H(t)}}{C_{H(t)}} \right) \quad (3.1)$$

where $C_{H(0)}$ and $C_{H(t)}$ are the measured concentrations of the solute in the hexane donor phase before and after the extraction process, respectively.

3.2.5. GC analysis

GC analysis was performed with an Agilent 6890 N instrument equipped with FID detector and a NukolTM capillary column (15m × 0.53mm × 0.5μm, Supelco), using ethyl hexanoate as internal standard. The chromatographic conditions were as follows: carrier gas (N₂) at 1.89 psi (51 mL /min total flow); temperature program: 40 °C, 4 min; 5 °C/min, 135°C; split ratio: 7.9/1; detector: 220 °C. The retention times of the peaks were as follows: n-hexane, 1.1 min.; vinyl butyrate, 3.0 min; 1-butanol, 6.3 min; butyl butyrate, 8.8 min; ethyl hexanoate, 9.4 min; and butyric acid 21.6 min. Concentrations were calculated from calibration curves using stock solutions of pure compounds.

3.2.6. Calculation of permeability

The solute transport was analyzed by the permeability parameter. Figure 3.2 shows the concentration profile of a solute which is transported against its concentration gradient. No concentration polarization conditions at the membrane interfaces have been considered since both compartments were rigorously stirred.

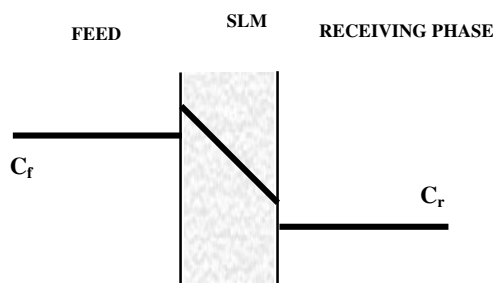


Figure 3.2. Schematic drawing of the concentration profile in a supported liquid membrane (SLM) process.

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

Under this hypothesis, the transport process of the solute from the feed phase to the receiving phase involves three steps:

- 1.- Forced convection from the bulk of the feed solution to the feed-membrane interface.
- 2.- Diffusion across the liquid membrane under the action of the concentration gradient to the membrane-receiving interface.
- 3.- Forced convection from the receiving/membrane interface to the bulk of the receiving phase.

Assuming no accumulation of the solutes in the membrane and liquid films, the overall equation of the permeation is:

$$J_r = - \bar{P} (C_r - C_f) \quad (3.2)$$

where J_r is the mass flux of solute, \bar{P} is the permeability of the membrane and C_r and C_f are the concentrations of the solute in the receiving and feed phases, respectively.

Since the flux can be alternatively expressed as the number of moles of solute (N_r) transported through a specific area of membrane surface (A) per time unit, the Eq. (3.2) can be written as:

$$\frac{dN_r}{dt} = - \bar{P} A (C_r - C_f) \quad (3.3)$$

N_r can be expressed in terms of the concentration of solute as

$$N_r = C_r \cdot V_r \quad (3.4)$$

where V_r is the volume of the receiving phase. Taking into consideration that the volume of both receiving and feed phases were kept identical throughout the experiment ($V_r = V_f = V$), Eq. (3.3) can be expressed as:

$$\frac{dC_r}{dt} = - \frac{\bar{P} A (C_r - C_f)}{V} \quad (3.5)$$

Since the flux of solute is very large, the concentration of the receiving phase (C_r) is not negligible versus the concentration of the feed phase (C_f). Thus, $(C_r - C_f)$ is calculated using Eq. (3.6) where C_0 is the initial concentration of solute in the feed phase:

$$C_f = C_0 - C_r \quad \text{and} \quad (C_r - C_f) = 2C_r - C_0 \quad (3.6)$$

Combining Eqs. (3.5) and (3.6) yields differential Eq. (3.7):

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

$$\frac{dC_r}{(2C_r - C_0)} = -\frac{\bar{P}A}{V}dt \quad (3.7)$$

Eq. (3.7) may be analytically solved with the following initial conditions:

$$t = 0, C_r = 0$$

and boundary conditions:

$$t = t, C_r = C_r$$

Integration of both terms of Eq. (3.7) yields Eq. (3.8):

$$\ln \left[\frac{(C_0 - 2C_r)}{C_0} \right] = -\frac{2\bar{P}A}{V}t \quad (3.8)$$

which shows that the $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$ is a linear function of t . The permeability parameter for the solute is calculated using Eq. (3.9), from the slope m of the plot of $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$ versus t :

$$\bar{P} = -\frac{mV}{2A} \quad (3.9)$$

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1. Selection of support material

A first set of experiments studied the permeability of four different compounds involved in a transesterification reaction (vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid) through supported liquid membranes based on 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ($[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$) immobilized in different polymeric organic membranes: Fluoropore, Mitex, Durapore, Isopore and Nylon. Our aim was to evaluate the effect of the supporting membrane nature on the permeability and selectivity of the SLMs based on $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$. Control experiments were performed with plain membranes (without ionic liquids immobilized into the membranes).

The experimental concentrations of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric 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 plot of $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$ for each compound versus t using Eq. (3.9). As an example, Figure 3.3 shows the plots used for the calculation of the compound permeabilities through the Nylon membrane with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ immobilized.

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

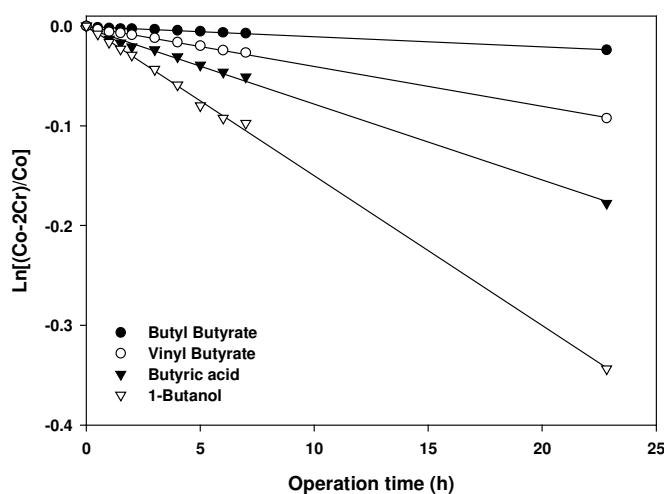


Figure 3.3. Plots of $\ln[(C_0-2C_r)/C_0]$ vs. operation time for the transport of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid through Nylon membrane with supported $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$.

The permeability values for each compound through the different membranes with and without ionic liquid are presented in Table 3.1.

Table 3.1. Effect of the liquid membrane on the transport of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid.

Membrane	Permeability $\times 10^6$ (cm/s)			
	Vinyl butyrate	1-Butanol	Butyl butyrate	Butyric acid
Fluoropore	466.2	516.2	486.3	377.3
Fluoropore with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$	190.7	159.0	200.8	200.8
Mitex	261.3	237.1	228.3	225.2
Mitex with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$	246.0	206.3	200.8	156.7
Durapore	335.3	325.5	420.8	461.8
Durapore with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$	25.5	64.2	20.3	30.5
Isopore	436.7	598.5	472.0	703.3
Isopore with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$	92.3	88.8	24.3	122.2
Nylon	294.5	275.2	323.2	296.8
Nylon with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$	3.75	14.7	0.9	6.6

Conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

As regards the permeability values, the values were appreciably higher in the plain membranes than in the supported liquid membranes. This could be explained by the fact that the liquid membranes introduce an additional mass-transfer resistance for the transport of the compounds.

However, as can be seen from Table 3.1, no appreciable permeability differences between the organic compounds were observed with the plain membranes, suggesting that the plain membranes can not be used for selective separation of the target compounds. The situation changed dramatically when [bmim⁺][PF₆⁻] was supported in the polymeric membranes, in which case different compounds showed substantial differences in permeability due to the fact that the ionic liquid offers different mass transfer resistance for each compound.

In order to find a numerical criterion to compare the ability of the different membranes to separate the target compounds, a new parameter, named average permselectivity of the membrane, is introduced defined as follows:

$$r\bar{P} = \frac{\sum_i^n rP_i}{n} \quad \text{with} \quad rP_i > 1 \quad (3.10)$$

where rP_i is the membrane permselectivity between two compounds (e.g. 1-butanol and butyl butyrate) and n is the number of possible pairs of different compounds. rP_i can be expressed as follows:

$$rP_i = \frac{\bar{P}_A}{\bar{P}_B} \quad (3.11)$$

The average permselectivity of the membrane indicates its efficiency in separating compounds: the higher $r\bar{P}$, the more selective it is in separating the target compounds. Values of permselectivity near 1 mean that the membranes are not useful for the separation of the compounds. The $r\bar{P}$ values for the different supported liquid membranes are shown in Table 3.2.

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

Table 3.2. Average permselectivity of the assayed SLM based on [bmim⁺][PF₆⁻].

Membrane	τP
Fluoropore with [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	1.14
Mitex with [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	1.27
Durapore with [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	1.95
Isopore with [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	2.70
Nylon with [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	6.07

Conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.

As can be observed in this table, the most suitable supporting organic membranes for the selective separation of the compounds were Nylon and Isopore. For Fluoropore and Mitex membranes, the efficiency of the separation was low while the corresponding value for Durapore was slightly better. Bearing in mind the wettability of the membranes, it may be concluded that the best results were obtained when [bmim⁺][PF₆⁻] was supported in the hydrophilic organic membranes (Nylon and Isopore). This might be explained by the fact that the interactions between the cation and anion of the ionic liquid and the hydrophilic organic membranes would be higher than when hydrophobic organic membranes were used as support, thus allowing more efficient immobilization.

Since the Nylon membrane was seen to be the most suitable supporting membrane, further studies were conducted with this membrane only.

3.3.2. Effect of the liquid membrane

As a second step, permeability studies of vinyl butyrate, butanol, butyl butyrate and butyric acid through SLMs based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cations (n-butyl, n-octyl) and the hexafluorophosphate anion (PF₆⁻) supported in Nylon were carried out in order to investigate the influence of the ionic liquid membrane on solute transport. Figure 3.4 illustrates the time courses for vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid in the receiving phase using the Nylon membrane without ionic liquid, with [bmim⁺][PF₆⁻] and with [omim⁺][PF₆⁻], respectively.

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

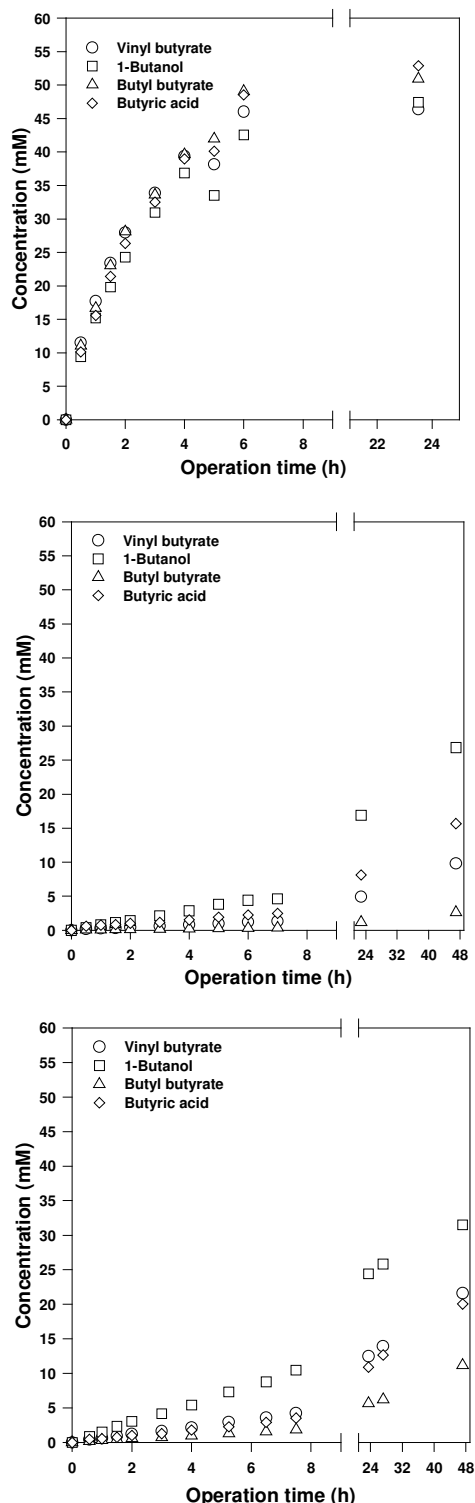


Figure 3.4. Time courses for vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid in the receiving phase using the Nylon membrane a) without ionic liquid, b) with [bmim⁺][PF₆⁻] and c) with [omim⁺][PF₆⁻].

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

As can be seen, significant permeability differences were found for the different compounds (vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid) when ILs were used as liquid membranes.

The average permselectivity of the Nylon membrane with both supported ILs was calculated. A higher average permselectivity value (6.07) was obtained for the Nylon membrane with supported $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ than for the same membrane with $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ (2.78), an observation that confirms the better behaviour of the SLM based on $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ for the selective separation of the target compounds.

In order to understand the molecular mechanism involved in the transport phenomena through the SLM, the partition coefficients of the different compounds between the ILs ($[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ and $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$) and n-hexane were determined (Table 3.3).

Table 3.3. Partition coefficients of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid between the ionic liquids, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ and $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, and n-hexane.

	K	
	$[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]/\text{n-hexane}$	$[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]/\text{n-hexane}$
<i>Vinyl butyrate</i>	0.47	0.68
1-Butanol	2.46	3.63
Butyl butyrate	0.17	0.35
Butyric acid	1.12	1.57

Compounds with a high IL/hexane partition coefficient (K) were more strongly adsorbed in the IL.

As can be seen in Figure 3.5, the permeability values were higher for all the compounds when Nylon with supported $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ was used.

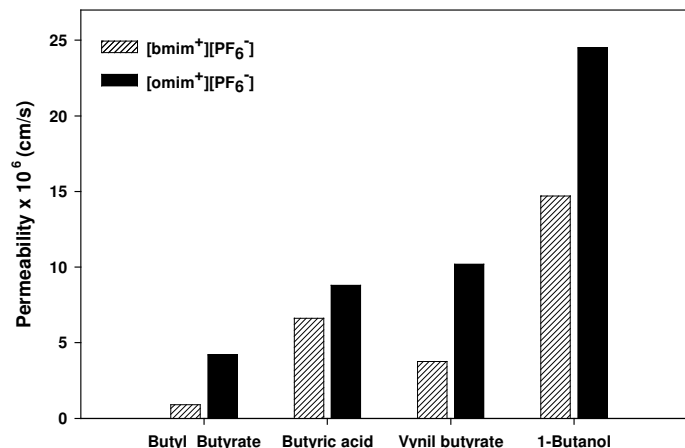


Figure 3.5. Compared permeabilities of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid through SLMs based the Nylon membrane with supported [bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻].

This may be explained by the fact that the IL/hexane partition coefficient (K) of the different compounds were higher when [omim⁺][PF₆⁻] was used. By comparing K and \bar{P} values for the same SLM, it can be observed that the increase in K values for these compounds was in agreement with the increase of \bar{P} values observed for the these compounds. It may be concluded therefore that transport is mainly regulated by the ionic liquid's affinity towards each solute. In the same way, Branco *et al.* [19] suggested that the high transport selectivity of a mixture of organic isomeric amines using a SLM based on ionic liquids could be explained by the affinity of each amine towards the ionic liquid. The relationship established between \bar{P} and K suggests that the capability of a given SLM to separate the target compounds can be assessed simply by evaluating the partition coefficient of each compound between the receiving /feed phase and the liquid phase supported in the membrane.

3.3.3. Operational stability

The stability of the SLMs is one of the major limitations of this separation technique [21]. Therefore, it was of interest to investigate the stability of the Nylon membrane with supported [bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻]. The stability of the SLMs was tested by carrying out the transport studies repeatedly using the same SLM. Eight consecutive runs of 48 h each were performed using fresh hexane solutions for each run in both compartments.

Figure 3.6 shows the average permselectivity of the membranes as a function of the number of runs the membrane is used. It is clear from the results obtained that average

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

permselectivity remains nearly constant (within experimental error limits) during the entire course of these experiments. These observations led us to the conclusion that the loss of liquid membrane phase out of the membrane phase was insignificant under the experimental conditions.

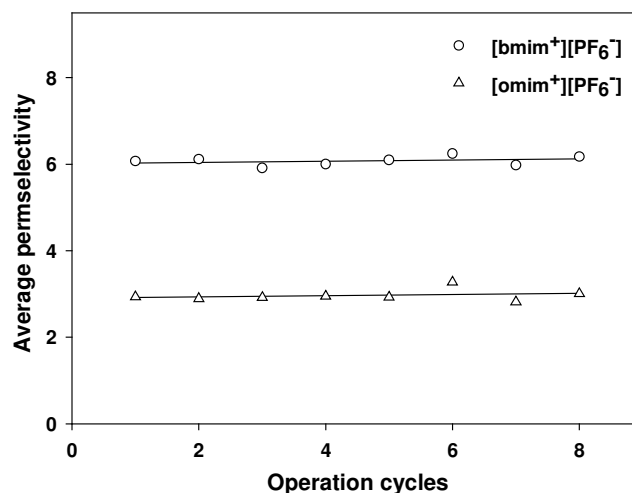


Figure 3.6. Operational stability of SLMs based the Nylon membrane with supported [bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻] during eight consecutive runs of 48 h each.

Our findings demonstrate the high operational stability of these SLMs, which could enable a long-term SLM operation for the separation of the substrates and products of the transesterification reaction studied. The high stability of SLMs based on ionic liquid has been also described by Fortunato et al. [21,22] when water was used as feed/receiving phases.

3.4. CONCLUSIONS

In this study we outlined the possibility of using SLMs based on ionic liquids for the selective separation of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid, which are substrates and products of a transesterification reaction. The permeability of these compounds through SLMs based on [bmim⁺][PF₆⁻] immobilized in five different polymeric organic membranes was studied. Interestingly, the most suitable supporting organic membranes for the selective separation of the compounds were Nylon and Isopore, both of which have a more hydrophilic character. The study was extended to [omim⁺][PF₆⁻] supported in Nylon in order to investigate the influence of the ionic liquid membrane on solute transport. Good permeabilities and selectivities were also found for this SLM.

Additionally, the increase in permeability values was associated with the increase in the partition coefficients of these compounds between the ILs and n-hexane, which allows us to conclude that transport is mainly regulated by the ionic liquid's affinity towards each solute. The polymeric membranes extensively used in the pharmaceutical industries separate the solutes or macromolecules based on their molecular size but not on the structure of the molecules. The greater advantage of the assayed supported liquid membrane is that they enable the selective separation of the compounds based on their molecular structure, as is demanded by the current progress of the fine chemical industry.

Finally, the operational stability of the supported liquid membranes was studied. Eight continuous cycles of 48 hours each were assayed, and excellent operational behaviour was observed.

The results of this study are quite encouraging and suggest that the designed SLMs might be incorporated in future reaction/separation processes.

3.5. NOMENCLATURE

K	partition coefficient (adimensional)
V_H	volume of the hexane phase (mL)
V_{IL}	volume of the ionic liquid phase (mL)
$C_{H(0)}$	solute concentration in the hexane phase before the extraction process ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
$C_{H(t)}$	solute concentration in the hexane phase after the extraction process ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
J_r	flux of solute ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
\bar{P}	permeability of the membrane ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
\bar{P}_A	permeability of the membrane to the compound A ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
\bar{P}_B	permeability of the membrane to the compound B ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
C_f	solute concentration in the feed phase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_r	solute concentration in the receiving phase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
N_r	moles of solute in the receiving phase (mol)
A	membrane area (cm^2)
t	time (s)
V_f	volume of the feed phase (mL)
V_r	volume of the receiving phase (mL)
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)

3.6. REFERENCES

- [1] J.G. Crespo, I.M. Coelho and R.M.C. Viegas, Encyclopedia of Separation Processes, Academic Press, San Diego (2000) 3303-3311.
- [2] A. Poliwoda, N. Ilczuk and P.P. Wiczorek, Transport of peptides through supported liquid membranes, *Sep. Purif. Technol.* In Press.
- [3] G. Muthuramam and K. Palanivelu, Transport of textile dye in vegetable oils based supported liquid membrane, *Dyes Pigments* 70 (2006) 99-104.
- [4] S. Happel, R. Streng, P. Vater and W. Ensinger, Sr/Y separation by supported liquid membranes based on nuclear track micro filters, *Radiat. Measurement* 36 (2003) 761-766.
- [5] X.J. Yang, A.G. Fane and K. Soldenhoff, Comparison of liquid membrane processes for metal separations: permeability, stability and selectivity, *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (2003) 392-403.
- [6] M. Teramoto, Sakaida, S.S. Fu, N. Ohnishi, H. Matsuyama, T. Fukui and K. Arai, Attempt for the stabilization of supported liquid membrane, *Sep. Purif. Technol.* 21 (2000) 137-142.
- [7] 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.
- [8] M.J. Earle and K.R. Seddon, Ionic liquids. Green solvents for the future, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1391-1398.
- [9] J.F. Brennecke and E.J. Maginn, Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [10] M. Freemantle, News horizons for ionic liquids, *Chem. Engin. News* 79 (2001) 21-25.
- [11] F. J. Hernández, A. P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio and G. Vllora. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B-Environ.* 67 (2006) 121-126.

3. A novel application of SLMs based on ionic liquids

- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] P. Bonhôte, A.-P. Dias, N. Papageorgio, K. Kalayanasundaram and M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts, *Inorg. Chem.* 35 (5) (1996) 1168-1178.
- [15] T. Welton, Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2083.
- [16] L.A. Blanchard and J.F. Brenneke, Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287-292.
- [17] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatloski, A.E. Visser and R.D. Rogers, Room temperature ionic liquids as novel media for “clean” liquid-liquid extraction, *Chem. Commun.* 16 (1998) 1765-1766.
- [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, and 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] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.

4

Prediction of the selectivity in the recovery of transesterification reaction products using supported liquid membranes based on ionic liquids

Previously, we reported the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction (vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid) through supported liquid membranes (SLMs) based on ionic liquids (ILs) and concluded that transport of the compounds was mainly regulated by the affinity of the ionic liquid towards each solute.

In this work, further studies were conducted in order to elucidate the molecular mechanism involved in the transport phenomena. With this aim, the permeability of sixteen different organic compounds (vinyl esters, aliphatic esters, alcohols and carboxylic acids) through SLM based on ionic liquids ($[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ and $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$) and the partition coefficients of the compounds between each ionic liquid and the feed/receiving phase were evaluated. A clear relationship between the permeability of the compounds and the partition coefficient of the compounds between the ionic liquid and the feed/receiving phase was established. This relationship allows the easy prediction of the capability of a given SLM based on IL to separate two compounds by simply evaluating the partition coefficient of each compound between the ionic liquid and the feed/receiving phase and the molar volume of each compound at its boiling point.

4. PREDICTION OF THE SELECTIVITY IN THE RECOVERY OF TRANSESTERIFICATION REACTION PRODUCTS USING SUPPORTED LIQUID MEMBRANES BASED ON IONIC LIQUIDS

4.1. INTRODUCTION

The supported liquid membrane (SLM) technique is one of several novel approaches for selective extraction and enrichment of organic compounds. SLMs consist of porous supports whose pores are filled with a liquid. The advantages of SLMs over conventional solvent extraction processes include the simplicity of operation, economical utilization of the extractant and lack of solvent entrainment. Despite these advantages, their industrial applications are limited because of problems related with the stability and lifetime of SLMs, which are in general too low to ensure good commercial application [1-2].

Supported liquid membranes with conventional solvents eventually deteriorate due to liquid vaporization, dissolution into a contacting phase and displacement from the porous structure under 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 emerging as alternative green solvents to the volatile organic compounds normally used in separation processes [3-6]. They are organic salts that are liquid close to room temperature and usually consist of an organic cation, the most commonly used being dialkylimidazolium and tetraalkylammomium, and a polyatomic inorganic anion (e.g. BF_4^- , PF_6^-) [7]. 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 adequate selection of the cation and anion [8], it is possible to obtain very stable and environmentally friendly supported liquid membranes using ionic liquids as supported liquid phase.

The supported liquid membrane (SLM) technique has been used as alternative to liquid-liquid extraction and other membrane separation techniques for the effective and selective isolation and separation of many classes of compounds, e.g. metal ions [9], organic acids [10], amines [11] and sugars [12]. Recently, we evaluated the potential of using SLMs with ILs for selective separation of the substrates and products of a transesterification reaction (vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid), for possible use in future integrated reaction/separation processes [13]. Transport selectivity was dramatically increased when hydrophilic membranes were used with supported ionic liquid, especially in the case of polyamide membranes (Nylon). As

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

regards the operational stability of these SLMs, they were seen to be extremely stable when tested over eight continuous cycles of 48 hours each [13,14]. In addition, a relationship between the permeability values for the different organic compounds and the partition coefficients of the organic molecules between the feed/receiving phase and the IL was observed [13]. This observation led us to further investigate the molecular mechanism involved in the transport phenomena. With this aim, the permeability of different vinyl esters, aliphatic esters, alcohols and carboxylic acids through ILs based on the 1-n-alkyl-3-methylimidazolium cation (n-butyl, n-octyl) and PF_6^- anion immobilized in polyamide membranes (Nylon) was analyzed, with particular attention paid to evaluating the influence of the alkyl chain length and functional group of the compounds on the permeability values. Furthermore, the partition coefficients of the compounds between the IL and the feed/receiving phase were determined and a relationship between this parameter and the permeability has been also established.

4.2. MATERIALS AND METHODS

4.2.1. Reagents and membranes

A hydrophilic polyamide membrane (Nylon[®] HNWP, Millipore) was used as supporting membrane. The membrane nominal pore size and thickness were $r_p=0.45\ \mu\text{m}$ and $l=170\ \mu\text{m}$, respectively.

The imidazolium-based ionic liquids used in this study, 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ and 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, were purchased from Solvent Innovation (purity > 99%). Substrates, solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co., and were of the highest purity available.

4.2.2. Preparation of supported liquid membranes

Immobilization was conducted by placing the membrane in a 10 ml Amicon[™] ultrafiltration unit and adding 3 mL of ionic liquid. Nitrogen pressure at 2 bar was applied, enabling the ionic liquid to flow 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 membrane pores were filled with liquid since the ionic liquids used are quite viscous. Then, the membrane was left to drip overnight to remove excess ionic liquid from the membrane surface.

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

4.2.3. Transport studies

The transport of different vinyl esters, aliphatic esters, alcohols and carboxylic acids through the SLMs was evaluated. The transport studies were performed at 30 °C using a glass diffusion cell with two independent compartments, of 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.

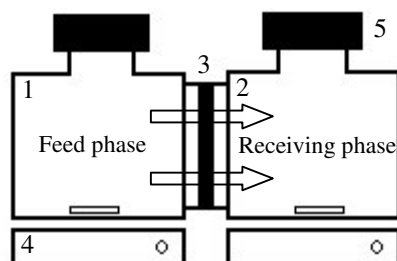


Figure 4.1. Schematic illustration of the glass diffusion cell set up with two independent compartments used for experiments: 1) feed solution containing solutes; 2) receiving solution containing fresh solvent; 3) supported liquid membrane; 4) magnetic stirrer; 5) septum.

In each experiment, the initial solute concentrations in the feed phase were 100 mM in n-hexane. n-Hexane was used as a receiving solution in all cases. The transport experiment was begun by adding 30 mL of each solution into their respective compartments. Both compartments were mechanically stirred to avoid concentration polarization conditions at the membrane interfaces. The solute concentrations were monitored by sampling 100 μ L of each compartment at regular time intervals during 48 h. An hexane solution of an internal standard (100 μ L, 60 mM) and n-hexane (800 μ L) were added to the sampling vials and the resulting solution (5 μ L) was analyzed by GC as described below.

4.2.4. Determination of the partition coefficients of the compounds between the ionic liquids and n-hexane

The partition coefficient of the compounds between the ILs and an hexane solution was determined by the flask-shake method. The composition of the organic phase before and after shaking with the IL phase was analysed by GC as described below. Eq.(4.1) was used to calculate the partition coefficients:

$$K = \left(\frac{C_{H(0)} - C_{H(t)}}{C_{H(t)}} \right) \frac{V_H}{V_{IL}} \quad (4.1)$$

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

where $C_{H(0)}$ and $C_{H(t)}$ are the measured concentrations of the solute 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.

4.2.5. GC analysis

GC analysis was performed with an Agilent 6890 N instrument equipped with FID detector and a NukolTM capillary column (15m × 0.53mm × 0.5μm, Supelco). Four chromatographic conditions were used to analyse all the compounds.

Chromatographic conditions 1: carrier gas (N₂) at 1 psi; temperature program: 25 °C, 4 min; 20 °C/min, 190°C; split ratio: 7.9/1; detector: 220 °C. Retention times of the peaks: methyl acetate, 2.0 min; vinyl acetate, 2.5 min; methanol, 2.9 min; ethyl propionate (internal standard), 3.5 min; and acetic acid 10.9 min.

Chromatographic conditions 2: carrier gas (N₂) at 1.5 psi; temperature program: 30 °C, 4 min; 7 °C/min, 135°C; split ratio: 7.9/1; detector: 220 °C. Retention times of the peaks: methyl propionate, 2.5 min; vinyl propionate, 3.4 min; 1-propanol, 5.5 min; butyl propionate (internal standard), 7.9 min; and propionic acid 17.4 min.

Chromatographic conditions 3: carrier gas (N₂) at 1.5 psi; temperature program: 40 °C, 4 min; 5 °C/min, 135°C; split ratio: 7.9/1; detector: 220 °C. Retention times of the peaks: vinyl butyrate, 3.0 min; 1-butanol, 6.3 min; butyl butyrate, 8.8 min; ethyl hexanoate (internal standard), 9.4 min; and butyric acid 21.6 min.

Chromatographic conditions 4: carrier gas (N₂) at 2.5 psi; temperature program: 40 °C, 0 min; 15 °C/min, 170°C; 170 °C, 9 min; split ratio: 7.9/1; detector: 220 °C. Retention times of the peaks: ethyl hexanoate (internal standard), 3.3 min; 1-octanol, 6.1 min; ethyl decanoate, 6.8 min; vinyl laurate, 8.3 min; and lauric acid 22.5 min.

4.2.6. Calculation of permeability

Solute transport was analyzed by the permeability parameter (\bar{P}), which was calculated using Eq. (4.2) [13], from the slope of the plot of $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$ versus t :

$$\ln \left[\frac{(C_0 - 2C_r)}{C_0} \right] = \frac{-2 \bar{P} A}{V} t \quad (4.2)$$

where C_0 is initial solute concentration in the feed phase (mol · L⁻¹), C_r is the solute concentration in the receiving phase (mol · L⁻¹), A is the membrane area (cm²) and V is the volume of the compartments (mL).

4.3. RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1. Transport studies

The permeability of sixteen different compounds involved in transesterification reactions (vinyl esters, alcohol, aliphatic esters and carboxylic acids) through supported liquid membranes based on 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [bmim⁺][PF₆⁻], and 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [omim⁺][PF₆⁻], immobilized in Nylon membranes was studied. Nylon was used as organic supporting membrane because in previous works [13,14], it was shown to be the most suitable. Control experiments were performed with plain membranes (Nylon without ionic liquids immobilized in the membranes).

The experimental concentrations of the different organic compounds 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 plot of $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$ for each compound versus t using Eq. (4.2). As an example, Figure 4.2 shows the plots used to calculate the permeabilities of four compounds (vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid) through the Nylon membrane with supported [omim⁺][PF₆⁻].

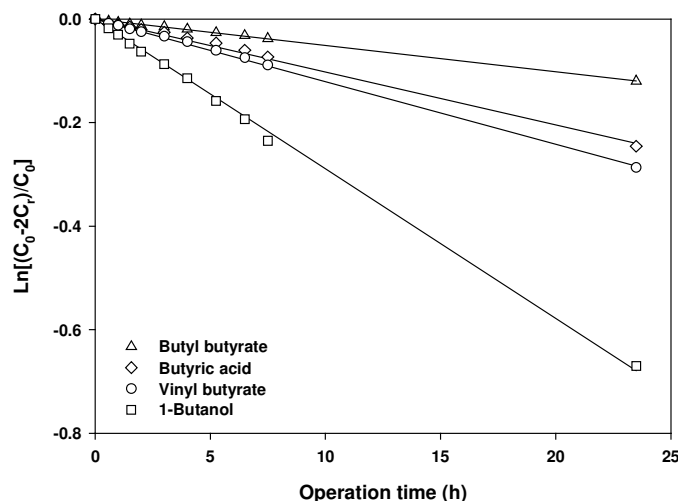


Figure 4.2. Plots of $\ln[(C_0 - 2C_r)/C_0]$ vs. operation time for the transport of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid through Nylon membrane with supported [omim⁺][PF₆⁻].

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

The permeability values for each compound through the different membranes with and without ionic liquid are presented in Table 4.1.

Table 4.1. Permeability of sixteen different organic compounds (vinyl esters, aliphatic esters, alcohols and carboxylic acids) through a plain Nylon membrane and through Nylon membranes with supported [bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻].

	Permeability of compounds × 10 ⁶ (cm/s)		
	Nylon without ionic liquid	Nylon with [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	Nylon with [omim ⁺][PF ₆ ⁻]
Vinyl acetate (C ₄ H ₆ O ₂)	592.5	39.9	49.8
Vinyl propionate (C ₅ H ₈ O ₂)	504.2	7.9	16.9
Vinyl butyrate (C ₆ H ₁₀ O ₂)	294.5	3.8	10.2
Vinyl laurate (C ₁₄ H ₂₆ O ₂)	293.0	1.9	0.5
Methyl acetate (C ₃ H ₆ O ₂)	756.5	57.5	72.0
Methyl propionate (C ₄ H ₈ O ₂)	582.4	12.8	25.7
Butyl butyrate (C ₈ H ₁₆ O ₂)	323.2	0.9	4.2
Ethyl decanoate (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	289.0	1.8	0.8
Metanol (C ₁ H ₄ O)	376.1	251.8	178.5
1-Propanol (C ₃ H ₈ O)	444.2	29.3	37.3
1-Butanol (C ₄ H ₁₀ O)	275.3	14.7	24.5
1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	226.6	3.8	3.8
Acetic acid (C ₂ H ₄ O ₂)	546.1	96.3	72.1
Propionic acid (C ₃ H ₆ O ₂)	392.0	11.5	14.9
Butyric acid (C ₄ H ₈ O ₂)	296.9	6.6	8.7
Lauric acid (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	197.4	3.3	1.9

Conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

As regards the permeability values, they were appreciably higher in the plain membranes than in the supported liquid membranes. This could be explained by the fact that the liquid membranes introduce an additional mass-transfer resistance for the transport of the compounds. However, no appreciable permeability differences between the organic compounds were observed with the plain membranes, suggesting that such membranes can not be used for selective separation of the target compounds. The situation changed dramatically when [bmim⁺][PF₆⁻] or [omim⁺][PF₆⁻] was supported in the polymeric membranes, and substantial differences in permeability between the different compounds were now seen due to the fact that the ionic liquid offers different mass transfer resistance for each compound.

The influence of the ionic liquid in the permeability values can be appreciated by comparing the permeability values for identical organic molecules. As can be observed in Table 4.1, the permeability values obtained for the supported liquid membrane based on [omim⁺][PF₆⁻] were higher than that obtained when [bmim⁺][PF₆⁻] was immobilized in the Nylon membrane, which means that an increase in the alkyl chain length of the ionic liquid cation results in an increase in the permeability values.

To evaluate the effect of the alkyl chain length of the different organic compounds for the same functional group on transport through the SLMs based on ionic liquids, the permeability values of these compounds were represented as a function of their alkyl chain length (Figure 4.3).

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

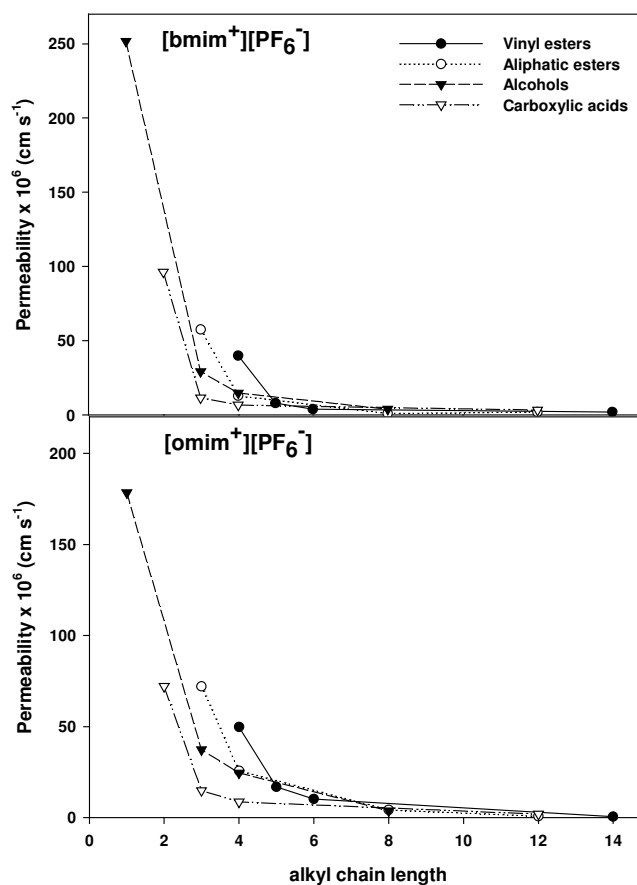


Figure 4.3. Effect of the alkyl chain length of the different organic compounds on the transport through the SLMs based on ionic liquids.

As can be seen from Figure 4.3, the permeability values of the compounds through SLMs based on [bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻] were enhanced by the decrease in alkyl chain length of these compounds, for the same organic functional group.

In addition, as can be observed from Figure 4.3, the permeability values of compounds with the same number of carbon atoms and different organic functional groups were as follows: esters > alcohols > acids. Furthermore, differences in permeability between these compounds increased with decreasing alkyl chain length.

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

4.3.2. Prediction of the permeability values of the compounds using the ionic liquid/hexane partition coefficient

A relationship between the permeability values of several compounds (\bar{P}) and the partition coefficient of these compounds between the liquid phase immobilized in the membrane (e.g. ionic liquid) and the feed/receive phase (K) has been observed by several authors [8,13], finding that the increase in the K values for the compounds was reflected in an increase in the P values for the same compounds.

In order to understand this relationship between \bar{P} and K values, the partition coefficients of the different organic compounds between the IL ([bmim⁺][PF₆⁻] or [omim⁺][PF₆⁻]) and n-hexane (feed and receive phases) were determined (Table 4.2).

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

Table 4.2. Partition coefficients of sixteen different organic compounds (vinyl esters, aliphatic esters, alcohols and carboxylic acids) between the ionic liquids, [bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻], and n-hexane.

Compound	K	
	[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]/n-hexane	[omim ⁺][PF ₆ ⁻]/n-hexane
Vinyl acetate (C ₄ H ₆ O ₂)	1.57	1.42
Vinyl propionate (C ₅ H ₈ O ₂)	0.73	1.15
Vinyl butyrate (C ₆ H ₁₀ O ₂)	0.47	0.68
Vinyl laurate (C ₁₄ H ₂₆ O ₂)	0.03	0.10
Methyl acetate (C ₃ H ₆ O ₂)	2.82	2.33
Methyl propionate (C ₄ H ₈ O ₂)	1.28	1.77
Butyl butyrate (C ₈ H ₁₆ O ₂)	0.17	0.35
Ethyl decanoate (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	0.03	0.17
Metanol (C ₁ H ₄ O)	30.51	19.09
1-Propanol (C ₃ H ₈ O)	5.10	6.39
1-Butanol (C ₄ H ₁₀ O)	2.46	3.63
1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	0.18	1.36
Acetic acid (C ₂ H ₄ O ₂)	12.17	5.81
Propionic acid (C ₃ H ₆ O ₂)	2.66	2.43
Butyric acid (C ₄ H ₈ O ₂)	1.12	1.57
Lauric acid (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	0.04	0.28

By definition, compounds with a higher IL/hexane partition coefficient (*K*) were more strongly adsorbed in the IL.

First, the influence of the alkyl chain length of the different organic compounds on the *K* values was evaluated (Figure 4.4). As can be seen in Figure 4.4, the IL/hexane

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

partition coefficient (K) of the different compounds decreased as the alkyl chain length of the compounds increased, for the same functional group, and the K values were higher when the ionic liquid used was $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ than when $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ was used. The same behaviour was observed for the \bar{P} values (Figure 4.3). Furthermore, by comparing K and \bar{P} values for the same ionic liquid, it can be observed that the increase in K values for a specific compound was in agreement with the increase of \bar{P} values observed for the same compound. These results indicate that there is a clear relationship between \bar{P} and K .

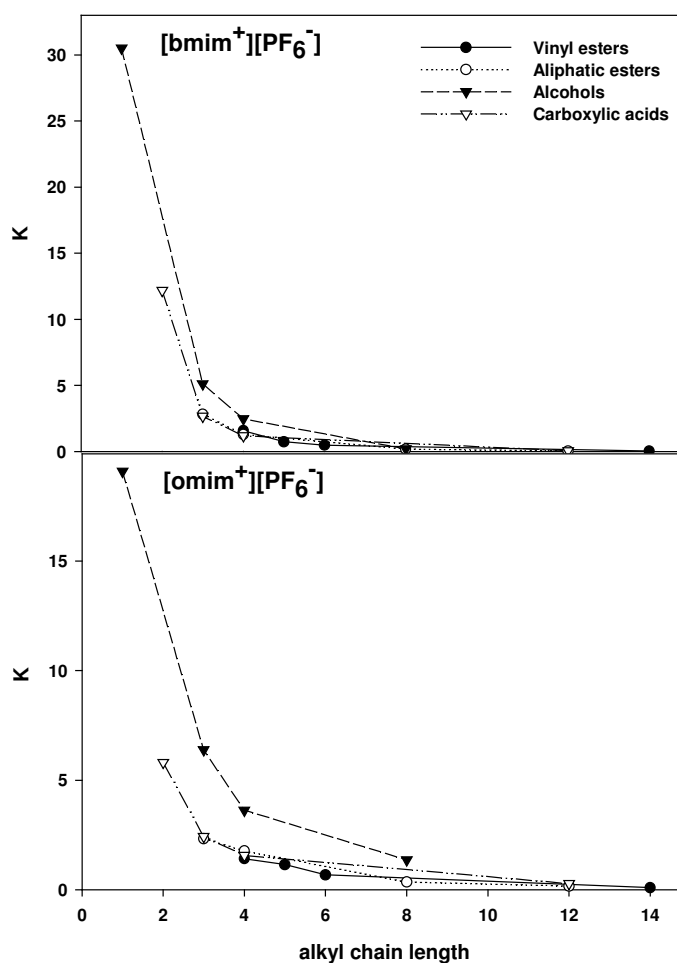


Figure 4.4. Effect of the alkyl chain length of the different organic compounds on the IL/hexane partition coefficients of the compounds.

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

In order to elucidate the mathematical relationship between \bar{P} and K , the mechanism of solute transport was analysed. Solute transport is attributed to the concentration gradient existing between the feed and receiving phases, so the flux of the organic species is assumed to be given by the Fick first's law. Under the hypothesis of non-concentration polarization conditions at the membrane interfaces, since both compartments were vigorously stirred, the transport process of the solute from the feed phase to the receiving phase involves five consecutive steps (Figure 4.5):

- 1.- Forced convection from the bulk of the feed solution to the feed-membrane interface.
- 2.- Partition of the substrates between the n-hexane of the feed phase (C_f) and the IL immobilized in the organic membrane (C_{fi}).
- 3.- Diffusion across the liquid membrane to the membrane-receiving interface under the action of the concentration gradient.
- 4.- Partition of the substrates between the IL immobilized in the organic membrane (C_{ri}) and the n-hexane of the receiving phase (C_r).
- 5.- Forced convection from the membrane-receiving interface to the bulk of the receiving phase.

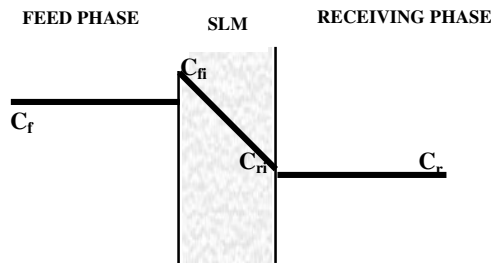


Figure 4.5. Schematic drawing of the concentration profile in a supported liquid membrane (SLM) process.

Assuming no accumulation of the solutes in the membrane and liquid films, the overall equation of the permeation is:

$$J = \bar{P} (C_f - C_r) \quad (4.3)$$

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

where J is the mass flux of solute, \bar{P} is the permeability of the membrane and C_r and C_f are the concentrations of the solute in the receiving and feed phases, respectively.

As the concentration of the solute in the feed (C_f) and receiving phase (C_r) and the concentration in the ionic liquid interfaces (C_{fi} and C_{ri}) are related through the partition coefficient of the compounds between the ionic liquid and n-hexane as indicated in Eq.(4.4):

$$K = \frac{C_{fi}}{C_f} = \frac{C_{ri}}{C_r} \quad (4.4)$$

Combining Eqs. (4.3) and (4.4) yields Eq. (4.5):

$$J = \frac{\bar{P} (C_{fi} - C_{ri})}{K} \quad (4.5)$$

According to Fick first's law, Eq.(4.6) represents the local mass flux (J_m) inside the liquid membrane:

$$J_m = \bar{D} \frac{(C_{fi} - C_{ri})}{l} \quad (4.6)$$

where \bar{D} is the diffusion coefficient of the diffusant inside the liquid film, l is the diffusional path through the membrane and C_{fi} and C_{ri} are the concentrations of the organic compound at the feed and receiving interface, respectively, and are equal to the solubility of the compound in the liquid when the thermodynamic equilibrium is reached at the interfaces.

According to the mass balance:

$$J_m = J \quad (4.7)$$

Substituting Eq.(4.5) and Eq.(4.6) into Eq.(4.7) and rearranging the equation is obtained obtained gives:

$$\bar{P} = \frac{K \bar{D}}{l} \quad (4.8)$$

As can be seen from Eq.(4.8), the permeability of a specific compound can be expressed in terms of the partition coefficient of this compound between the liquid membrane phase (ionic liquid) and the feed/receiving phase (n-hexane), the diffusion coefficient and the thickness of the membrane. The Eq.(4.8) shows mathematically the experimental relationship found between the permeability and the partitions coefficients.

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

The diffusion coefficient into the ionic liquid phase can be calculated by the empirical Wilke–Chang equation, with the bulk diffusion coefficient defined as:

$$\bar{D} = 7.4 \cdot 10^{-8} \frac{\chi^{0.5} M^{0.5} T}{\eta V_m^{0.6}} \quad (4.9)$$

where M , χ and η are the molecular weight ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), the association parameter and the viscosity (cP) of the solvent (ionic liquid), respectively. V_m is the molar volume of the diffusant (solute) at its boiling point ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$) and T is the temperature (K).

The Wilke-Chang equation can be substituted in the Eq.(4.8), yielding Eq.(4.10):

$$\bar{P} = C \frac{K}{V_m^{0.6}} \quad (4.10)$$

where C is a constant term at a fixed temperature for each supported liquid membrane (Eq.(4.11)):

$$C = 7.4 \cdot 10^{-8} \frac{\chi^{0.5} M^{0.5} T}{\eta l} \quad (4.11)$$

As can be seen in Eq.(4.10), the permeability can be expressed in terms of the partition coefficient (K) and the molar volume of the diffusant (V_m) for each supported liquid membrane. With the aim of checking Eq.(4.10), the permeability values of the different organic compounds for each supported liquid membrane were plotted versus $\frac{K}{V_m^{0.6}}$. The

molar volumes of the different compounds (V_m) were obtained from a commercial simulation package HYSYS and are shown in Table 4.3.

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

Table 4.3. Molar volumes of the different compounds at their boiling point (V_m) obtained from a commercial simulation package HYSYS.

Compound	V_m (cm ³ ·mol ⁻¹)
Vinyl acetate (C ₄ H ₆ O ₂)	99.6
Vinyl propionate (C ₅ H ₈ O ₂)	134.7
Vinyl butyrate (C ₆ H ₁₀ O ₂)	173.1
Vinyl laurate (C ₁₄ H ₂₆ O ₂)	353.7
Methyl acetate (C ₃ H ₆ O ₂)	84.2
Methyl propionate (C ₄ H ₈ O ₂)	104.8
Butyl butyrate (C ₈ H ₁₆ O ₂)	218.66
Ethyl decanoate (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	307.2
Metanol (C ₁ H ₄ O)	43.1
1-Propanol (C ₃ H ₈ O)	84.6
1-Butanol (C ₄ H ₁₀ O)	102.9
1-Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	194.3
Acetic acid (C ₂ H ₄ O ₂)	63.6
Propionic acid (C ₃ H ₆ O ₂)	86.6
Butyric acid (C ₄ H ₈ O ₂)	110.4
Lauric acid (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	314.6

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

Figure 4.6 shows the plot of the permeability values of the different organic compounds versus $\frac{K}{V_m^{0.6}}$ for the SLMs based on [bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻].

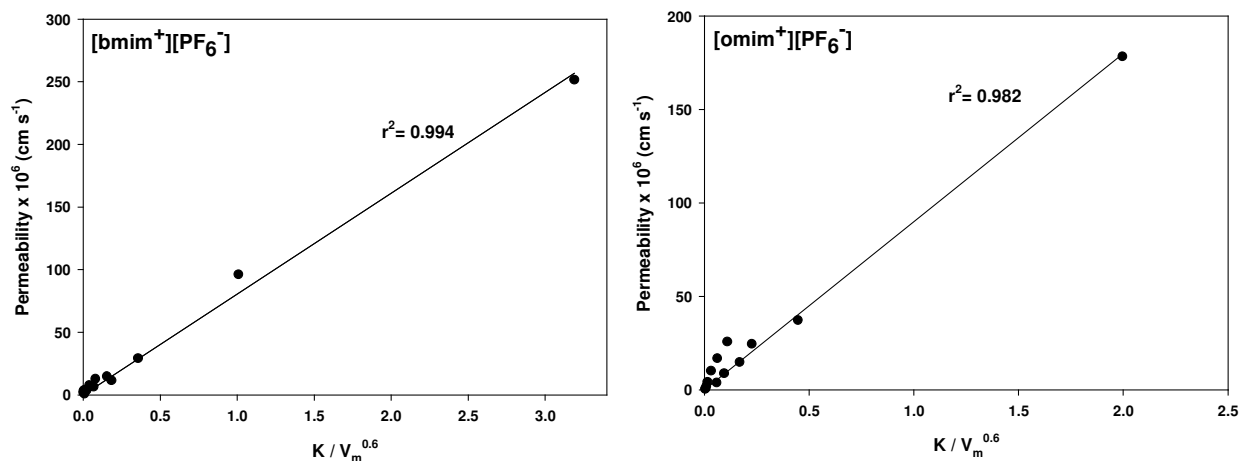


Figure 4.6. Plot of the permeability values of the different organic compounds versus $\frac{K}{V_m^{0.6}}$ for the SLMs based on [bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻].

As can be seen, a straight-line passing through the origin with a slope of C was obtained, showing that the relationship between \bar{P} and K and V_m has been adequately established. This relationship allows the easy prediction of the capability of a given SLM to separate two compounds by simply evaluating the partition coefficient of each compound between the liquid phase supported in the membrane and the feed/receiving phase and the molar volume of each compound at its boiling point. So, the selectivity of the transport of two compounds with different K and V_m values through a SLM based on IL could be estimated as follows:

$$S = \frac{\frac{K_1}{V_{m1}^{0.6}}}{\frac{K_2}{V_{m2}^{0.6}}} \quad (4.12)$$

where K_1 and K_2 are the partition coefficient of the compounds 1 and 2 between the IL and n-hexane, respectively, and V_{m1} and V_{m2} are the molar volumes of compounds 1 and 2, respectively.

4.4. CONCLUSIONS

The permeability of sixteen different organic compounds (vinyl esters, aliphatic esters, alcohols and carboxylic acids) through SLM based on ionic liquids ([bmim⁺][PF₆⁻] and [omim⁺][PF₆⁻]) was analysed. Significant permeability differences between the organic compounds was obtained in all cases. It was observed that the permeability value of a given compound was higher when [omim⁺][PF₆⁻] was used as liquid membrane phase than when [bmim⁺][PF₆⁻] was used. Furthermore, an important influence of the alkyl chain length of the compounds containing the same organic functional group on the permeability values of the compounds was observed, the values of this parameter diminishing with increasing alkyl chain length of the compounds.

To better understand the molecular mechanism involved in the transport phenomena, the partition coefficients of the compounds between each ionic liquid and the feed/receiving phase was evaluated. A relationship between the permeability and the partition coefficients was established based on the Wilke-Chang equation. The obtained relationship allows the easy prediction of the capability of a given SLM based on IL to separate two compounds by evaluating the partition coefficient of each compound between the ionic liquid and the feed/receiving phase and the molar volume of each compound at its boiling point.

4.5. NOMENCLATURE

K	partition coefficient (adimensional)
V_H	volume of the hexane phase (mL)
V_{IL}	volume of the ionic liquid phase (mL)
$C_{H(0)}$	solute concentration in the hexane phase before the extraction process ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
$C_{H(t)}$	solute concentration in the hexane phase after the extraction process ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
\bar{P}	permeability of the membrane ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
C_0	initial solute concentration in the feed phase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_f	solute concentration in the feed phase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_r	solute concentration in the receiving phase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_{fi}	solute concentration in the membrane-feed interface ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_{ri}	solute concentration in the membrane-receiving interface ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
A	membrane area (cm^2)
t	time (s)
V	volume of the compartments (mL)
J	mass flux of solute ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
J_m	mass flux of solute inside the liquid membrane ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
\bar{D}	diffusion coefficient of the diffusant inside the liquid film ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
l	diffusional path through the membrane (cm)
M	molecular weight of the ionic liquid ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
χ	association parameter of the ionic liquid (adimensional)
η	viscosity of the ionic liquid (cP)
V_m	molar volume of the solute at its boiling point ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)
T	temperature (K)

4.6. REFERENCES

- [1] M. Teramoto, Sakaida, S.S. Fu, N. Ohnishi, H. Matsuyama, T. Fukui and K. Arai, Attempt for the stabilization of supported liquid membrane, *Sep. Purif. Technol.* 21 (2000) 137-142.
- [2] 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.
- [3] G. Muthuramam and K. Palanivelu, Transport of textile dye in vegetable oils based supported liquid membrane, *Dyes Pigments* 70 (2006) 99-104.
- [4] Q. Gan, D. Rooney, M Xue, G. Thompson, Y. Zou. An experimental study of gas transport and separation properties of ionic liquids supported on nanofiltration membranes, *J. Membr. Sci.* 280 (2006) 948-956.
- [5] F. J. Hernández, A. P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio and G. Vllora. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B-Environ.* 67 (2006) 121-126.
- [6] 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.
- [7] J.F. Brennecke and E.J. Maginn, *Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing*, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [8] 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.
- [9] R. Molinari, T. Poerio, R. Cassano, N. Picci, P. Argurio. Copper (II) removal from wastewaters by a new synthesized selective extractant and SLM viability, *Ind. Eng. Chem. Res.* 43 (2004) 623-628.
- [10] L. Grönberg, Y. Shen, J.Å. Jönsson, Ion chromatographic determination of carboxylic acids in air with on-line liquid membrane pretreatment, *J. Chromatogr. A* 665 (1993) 207-215.
- [11] L. Grönberg, P. Lövkvist, J.Å. Jönsson, Measurements of aliphatic amines in ambient air and rainwater, *Chemosphere* 24 (1992) 1533-1540.

4. Prediction of the selectivity in the recovery of products using SLMs based on ILs

- [12] T. Rhlalou, M. Ferhat, M.A. Frouji, D. Langevin, M. Metayer, J.-F. Verchere, Facilitated transport of sugars by a resorcinarene through a supported liquid membrane, *J. Membr. Sci.* 168 (2000) 63-73.
- [13] F. J. Hernández-Fernández, A. P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez and G. Vllora. A novel application of supported liquid membranes based on ionic liquids to the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction, *J. Memb. Sci.* 293 (2007) 73-80.
- [14] A. P. de los Ríos, F. J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, J. M. Palacios, D. Gómez, M. Rubio and G. Vllora. A SEM-EDX study of highly stable supported liquid membranes based on ionic liquids, *J. Memb. Sci.* (2007) Accepted.

5

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

Previously, we reported the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction (vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid) through supported liquid membranes (SLMs) based on two ionic liquids (ILs): 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [bmim⁺][PF₆⁻], and 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [omim⁺][PF₆⁻]. The significant differences observed in the selectivity values, attributed to the different nature of the ionic liquid phase used, led us to further investigate this matter.

In this work, six ionic liquids were tested as liquid phase in SLMs for the selective separation of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid. The influence of the IL as liquid phase in the resulting SLMs was analyzed measuring the values of permeability for each organic compound through the SLMs. In all cases, significant permeability differences between the organic compounds were obtained. The hydrophilic/hydrophobic character of the IL used, measured by the octanol-water partition coefficients (K_{ow}), was found to be a key parameter for the selective behaviour of the SLM. It was observed that an increase in the K_{ow} of the ionic liquid resulted in a higher separation efficiency of the resulting SLM.

5. 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

5.1. INTRODUCTION

Supported liquid membranes (SLMs) is a novel and promising technique for the selective separation of organic compounds involved in pharmaceutical and fine chemical synthesis [1-6]. Their main advantages over conventional solvent extraction processes, such as simplicity of operation or economical utilization, are lessened by their well-known disadvantages relating to stability and lifetime [7,8], which are too low to ensure feasible commercial application. For this reason, the characteristics and application of ILs which can be used as solvents capable of stabilizing SLM have received growing attention during recent years [9-11]. Ionic liquids, which are liquid close to room temperature, normally consist of an organic cation, the most commonly used being dialkylimidazolium and tetraalkylammomium salts, and a polyatomic inorganic anion (e.g. BF_4^- , PF_6^-) [12]. 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 the adequate selection of the cation and anion [2], it is possible to obtain very stable and environmentally friendly supported liquid membranes using ionic liquids as supported liquid phase.

Recently, we reported the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction (vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid) using SLMs based on two ionic liquids (ILs): 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, and 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ [13]. These SLM showed high operational and structural stability [13,14]. Significant differences in the selectivity values between both SLMs were observed, which led us to further investigate the effect of the nature of the ionic liquid used as liquid phase on the selectivity of the resulting SLM. In this work, six ionic liquid with different cation and anion compositions (see Figure 5.1) were tested as liquid phase in SLMs for the separation of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid. The different cation and anion compositions of these ILs are reflected in their different hydrophilic/hydrophobic character, therefore, this parameter was also determined by the octanol-water partition coefficient (K_{ow}).

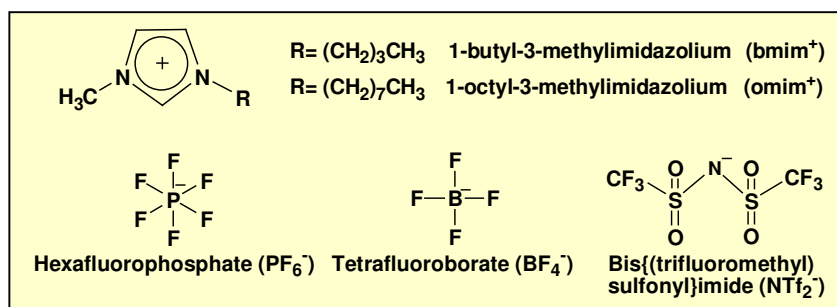


Figure 5.1. Ions involved in the assayed ionic liquids.

5.2. MATERIALS AND METHODS

5.2.1. Reagents and membranes

A polymeric membrane of 25 mm diameter from Millipore S.A. (Madrid, Spain) was used as supporting membrane, with the following specifications: Nylon[®] HNWP - hydrophilic polyamide membrane- with a pore size of 0.45 μm and thickness of 170 μm. The ionic liquids 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [bmim⁺][PF₆⁻] (purity >99%), 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [omim⁺][PF₆⁻] (purity >99%), 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [bmim⁺][BF₄⁻] (purity >99%), 1-octyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [omim⁺][BF₄⁻] (purity >99%) were purchased from Solvent Innovation GmbH (Cologne, Germany). 1-Butyl-3-methylimidazolium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide, [bmim⁺][TfN₂⁻] (purity >99%) was purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co. (Madrid, Spain) and 1-octyl-3-methylimidazolium bis((trifluoromethyl)sulfonyl)imide, [omim⁺][TfN₂⁻] (purity >99%) from Merck KgaA (Darmstadt, Germany). Substrates, solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co. (Madrid, Spain), and were of the highest purity available.

5.2.2. Preparation of supported liquid membranes

Immobilization was conducted by placing the membrane in a 10 ml Amicon[™] 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 excess ionic liquid from the membrane surface.

5.2.3. Transport studies

The transport of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid through the SLMs was evaluated. The transport studies were performed at 30 °C using a glass diffusion cell with two independent compartments, with 30 mL each, separated by the SLM (Figure 5.2). O-rings were inserted on each side of the SLM. The entire assembly was held together by a threaded connector.

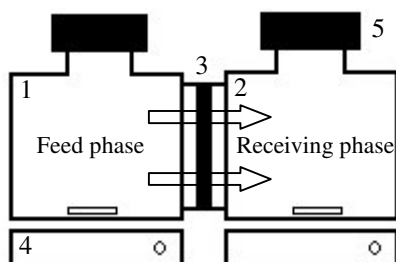


Figure 5.2. Schematic illustration of the glass diffusion cell with two independent compartments used for experiments: 1) feed solution containing solutes; 2) receiving solution containing fresh solvent; 3) supported liquid membrane; 4) magnetic stirrer; 5) septum.

In each experiment, the initial solute concentrations in the feed phase were 100 mM in n-hexane. n-Hexane was used as a receiving solution in all cases. The transport experiment was begun by adding 30 mL of each solution into their respective compartments. Both compartments were mechanically stirred to avoid concentration polarization conditions at the membrane interfaces. The solute concentrations were monitored by sampling 100 μ L of each compartment at regular time intervals over 48 h. A hexane solution of ethyl hexanoate (internal standard) (100 μ L, 60 mM) and n-hexane (800 μ L) were added to the sampling vials and the resulting solution (1 mL) was analyzed by GC as described in section 2.5.1.

Solute transport was analyzed by the permeability parameter (\bar{P}), which was calculated using Eq. (5.1) [13], 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 (cm^2) and V is the volume of the compartments (mL).

5. On the importance of the nature of ionic liquids

Furthermore, the average permselectivity ($r\bar{P}$) of the membrane [13] 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 in separating the target compounds.

5.2.4. Determination of the octanol-water partition coefficients of the ionic liquids

The partition coefficients of the assayed ionic liquids between octanol and water were evaluated. Two currently used methods for measuring the octanol-water partition coefficient are the shake-flash method and the slow-stirring method [15]. The former has the disadvantage that equilibrium attainment is not guaranteed, while the slow-stirring method can not be appropriate for ionic liquids, since some of them after continuous contact with water for a long period of time may decomposed. Consequently, we developed a combined version of both methods.

The experimental setup consisted of a 22 mL glass vial with an open-top screw cap sealed with a silicone/Teflon septum (Figure 5.3).

5. On the importance of the nature of ionic liquids

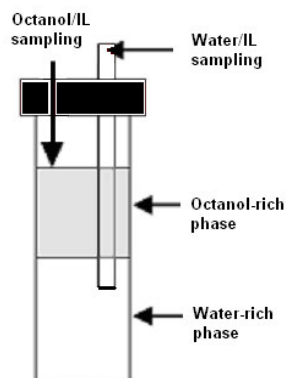


Figure 5.3. Experimental setup used for the determination of the octanol-water partition coefficients of the ionic liquids.

Approximately 10 mL of distilled, deionized water, presaturated with 1-octanol was added to the glass vial. A 12 gauge Teflon tube was introduced into the vial, reaching just below the water surface. Approximately 10 ml of octanol-IL “stock” solution, consisting of 1-octanol, presaturated with water and containing a known concentration of IL (1 mM), was added to the vial. The vial was shaken vigorously for 5 minutes and maintained at 30°C in a thermostatic bath without stirring. Samples were taken from the octanol-rich phase by penetrating the silicone septum with a glass syringe with a stainless-steel needle. Samples were withdrawn from the water-rich phase by inserting the needle through the Teflon tubing directly into the aqueous phase to prevent octanol contamination. Samples of each phase were taken from the vials during at least three sampling events occurring over a 3 to 13 day period. Sampling ceased when the concentrations in both phases stabilized. The IL concentration in each phase was analysed by UV-VIS as described in section 5.2.5.2. Determinations were made in triplicate to ensure the repeatability of the tests and the mean values are reported.

The octanol-water partition coefficient was calculated by the Nernst distribution law, Eq. (5.4), assuming “infinite dilution” conditions of the ILs in both phases:

$$K_{ow} = \frac{C_i^o}{C_i^w} \quad (5.4)$$

where C_i^o is the molar concentration of the IL dissolved in the octanol-rich phase, and C_i^w is the molar concentration of the IL dissolved in the water-rich phase.

5.2.5. Analytical methods

5.2.5.1. GC analysis

The concentration of the organic compounds in the hexane solutions was measured by GC analysis using an Agilent 6890 N instrument equipped with FID detector and a NukolTM capillary column (15m × 0.53mm × 0.5μm, Supelco). The chromatographic conditions were as follows: carrier gas (N₂) at 13.0311 × 10³ Pa (1.89 psi) (51 mL /min total flow); temperature program: 40 °C, 4 min; 5 °C/min, 135°C; split ratio: 7.9/1; detector: 220 °C. The retention times of the peaks were as follows: vinyl butyrate, 3.0 min; 1-butanol, 6.3 min; butyl butyrate, 8.8 min; ethyl hexanoate (internal standard), 9.4 min; and butyric acid 21.6 min. Concentrations were calculated from calibration curves using stock solutions of pure compounds.

5.2.5.2. UV-VIS analysis

The concentration of the ionic liquids in octanol and water was measured by UV-VIS spectrophotometry using a ThermoSpectronic UV-VIS recording spectrophotometer (Helios α), which has a sensitivity of ± 0.001. A calibration curve was prepared for the different ionic liquids at their maximum absorbance wavelength (212 nm), corresponding to the absorbance of the imidazolium ring of the assayed ionic liquids.

5.3. RESULTS AND DISCUSSION

5.3.1. Octanol-water partition coefficients

The octanol-water partition coefficients of the following ILs were determined: [bmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻], [omim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][NTf₂⁻] and [omim⁺][NTf₂⁻]. Before determining the octanol-water partition coefficients of these ILs, the experimental technique developed for measuring this parameter need to be validated. The compound chosen to validate the method was benzaldehyde, with a well-known log (K_{ow}) = 1.48 [17]. Benzaldehyde shows two characteristic peaks in water at 250 and 200 nm, and at 245 and 207 nm in 1-octanol. Wavelengths at 250 nm and 245 were selected for absorbance measurements in water and 1-octanol, respectively. The extinction coefficient in water and 1-octanol, and the octanol-water partition coefficient of benzaldehyde are shown in Tables 5.1 and 5.2, respectively. As can be seen from Table 5.2, the measured log (K_{ow}) of benzaldehyde was 1.43, which is very close to the literature value (1.48), confirming the validity of the proposed method.

Once the experimental technique for measuring the K_{ow} had been validated, the extinction coefficients (ε) of the ILs in octanol and water were measured, since it is necessary for determining the IL concentrations in each phase, and the resulting K_{ow}

5. On the importance of the nature of ionic liquids

values. Table 5.1 shows the extinction coefficients for each of the ILs in water and 1-octanol. All the extinction coefficients were measured at the wavelength of maximum absorption ($\lambda_{\max} = 212$ nm).

Table 5.1. Extinction coefficients of benzaldehyde and imidazolium based ionic liquids in water and octanol.

Compound	ϵ in water/IL ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	ϵ in octanol/IL ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Benzaldehyde ^a	1363.7	1303.6
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻] ^b	4472.5	3455.7
[omim ⁺][PF ₆ ⁻] ^b	3828.4	5100
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻] ^b	4212.3	4639.6
[omim ⁺][BF ₄ ⁻] ^b	4207.1	4787
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻] ^b	3367.6	4904.1
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻] ^b	3103.3	4483.1

^a $\lambda_{\max} = 250$ nm in water and $\lambda_{\max} = 245$ nm in octanol

^b $\lambda_{\max} = 212$ nm in water and octanol

The log (K_{ow}) values obtained for each ionic liquid are shown in Table 5.2.

5. On the importance of the nature of ionic liquids

Table 5.2. Measured octanol-water partition coefficients (K_{ow}) of benzaldehyde and imidazolium based ionic liquids the ionic liquids.

Compound	Log (K_{ow})
Benzaldehyde	1.43
[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	-2.27
[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	-1.49
[omim ⁺][BF ₄ ⁻]	-1.27
[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	-0.97
[omim ⁺][PF ₆ ⁻]	-0.62
[omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	0.56

Since a decrease in the K_{ow} values of the ionic liquids is related to an increase in the hydrophilic character, the following sequence of IL hydrophilicity can be proposed: [omim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][BF₄⁻] < [bmim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][BF₄⁻].

By examining the log (K_{ow}) values of all the ionic liquids with the same cation ([bmim⁺] or [omim⁺]), the effect of the anion can be determined. For the same cation, the hydrophilic order is [NTf₂⁻] < [PF₆⁻] < [BF₄⁻]. These results can be explained by the greater symmetry and consequent greater hydrophobic character of [PF₆⁻] compared with [BF₄⁻]. A similar reasoning can be applied to [NTf₂⁻] and [PF₆⁻], due to the inclusion of two carbon atoms in the [NTf₂⁻] skeleton.

The effect of the cation can be analysed by fixing the anion. The hydrophobic character of the ionic liquid increases with the alkyl chain length of the cation for the same anion. These results agree with those obtained by Ropel et al. [15].

5.3.2. Transport studies

The permeability of four different compounds involved in transesterification reactions (vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid) through supported liquid membranes based on six ionic liquids ([bmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻], [omim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][NTf₂⁻] and [omim⁺][NTf₂⁻]), immobilized in Nylon membranes was studied. Our aim was to investigate the influence of the ionic liquid membrane on

5. On the importance of the nature of ionic liquids

solute transport. Nylon was used as organic supporting membrane because in a previous work [13], it was shown to be the most suitable one. A control experiment was performed with a plain Nylon membrane (without ionic liquids immobilized into the membrane).

The experimental concentrations of the different organic compounds 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 following the procedure reported in section 2.3, from the slopes of the plot of $\ln [(C_0 - 2C_r)/C_0]$ for each compound versus t using Eq. (1). As an example, Figure 5.4 shows the plots used for the calculation of the permeabilities of four compounds (vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid) through the Nylon membrane with supported $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$.

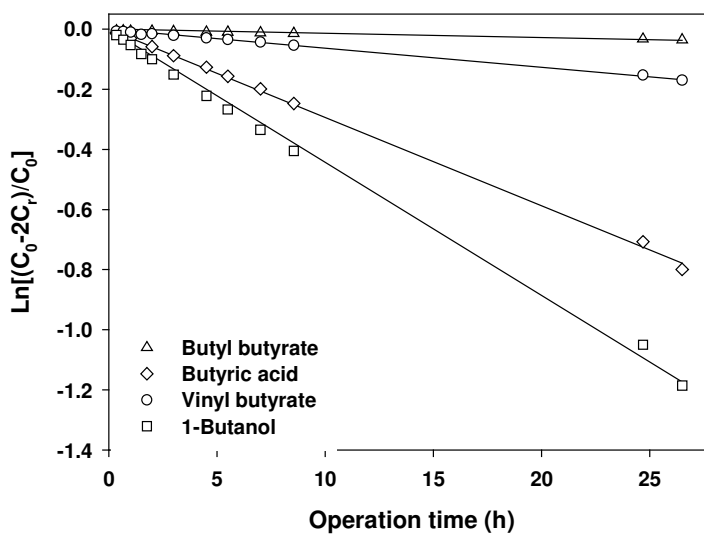


Figure 5.4. Plots of $\ln[(C_0 - 2C_r)/C_0]$ vs. operation time for the transport of vinyl butyrate, 1-butanol, butyl butyrate and butyric acid through Nylon membrane with supported $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ in n-hexane.

The permeability values for each compound through the plain Nylon membrane and through the SLMs are presented in Table 5.3.

5. On the importance of the nature of ionic liquids

Table 5.3. Permeability of vinyl butyrate, butyl butyrate, 1-butanol, and butyric acid through plain Nylon membrane and through Nylon membrane with the six ionic liquids supported.

Membrane	Permeability $\times 10^6$ (cm/s)			
	Vinyl butyrate	1-Butanol	Butyl butyrate	Butyric acid
Nylon	294.5	275.2	323.2	296.8
Nylon with [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	3.7	14.7	0.9	6.6
Nylon with [omim ⁺][PF ₆ ⁻]	10.2	24.5	4.2	8.7
Nylon with [bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	5.5	40.9	0.9	24.3
Nylon with [omim ⁺][BF ₄ ⁻]	25.4	119.9	12	102.4
Nylon with [bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	18.7	67.5	7.3	25.7
Nylon with [omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	41.4	96.4	22.1	30.8

Conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.

As regards the permeability values, they were appreciably higher in the plain Nylon membrane than in the supported liquid membranes [13]. However, no appreciable permeability differences between the organic compounds were observed with the plain membrane, suggesting that the plain membrane can not be used for selective separation of the target compounds. The situation changed when the ionic liquids were supported in the polymeric membrane, when substantial differences in permeability between the different compounds were observed due to the fact that the ionic liquid offers different mass transfer resistance for each compound. The influence of the ionic liquid on the permeability values can be appreciated by comparing the permeability values for identical organic molecules. As can be observed in Table 5.3, the permeability values obtained for the SLM based on [omim⁺][PF₆⁻] were higher than those obtained when [bmim⁺][PF₆⁻] 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 can be made when the [omim⁺][BF₄⁻]/[bmim⁺][BF₄⁻] and [omim⁺][NTf₂⁻]/[bmim⁺][NTf₂⁻] pairs are compared.

5. On the importance of the nature of ionic liquids

The $r\bar{P}$ values for the Nylon supported liquid membrane based on the assayed ionic liquids are shown in Table 5.4.

Table 5.4. Average permselectivity of the assayed SLM based on the six ionic liquids.

Membrane	$r\bar{P}$
Nylon with [bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	15.59
Nylon with [bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	6.07
Nylon with [omim ⁺][BF ₄ ⁻]	5.11
Nylon with [bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	3.83
Nylon with [omim ⁺][PF ₆ ⁻]	2.78
Nylon with [omim ⁺][NTf ₂ ⁻]	2.41

Conditions: initial solute concentrations, 100 mM; temperature, 30 °C; time, 48 h.

As can be observed in this table, the higher $r\bar{P}$ values were obtained for the SLMs based on the most hydrophilic ionic liquid. The most effective supported liquid membrane for separating the selected organic compounds was the one based on [bmim⁺][BF₄⁻], with the highest average permselectivity (15.59). Therefore, the following sequence for the average permselectivity values can be arranged from Table 4: [omim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][BF₄⁻] < [bmim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][BF₄⁻]. By comparison with the K_{ow} arrangement of ionic liquids obtained in section 5.3.1, it can be concluded 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. This underlined the clear relationship between the nature of the ionic liquid and the permselectivity of the supported liquid membranes.

5.4. CONCLUSIONS

In this study we observed a relationship between the selectivity values of four organic compounds (vinyl butyrate, butyl butyrate, 1-butanol and butyric acid) through SLM based on six ionic liquids ([bmim⁺][PF₆⁻], [omim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻], [omim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][NTf₂⁻] and [omim⁺][NTf₂⁻]) and the hydrophilic/hydrophobic character of the ILs used as liquid phase in the SLMs.

A new methodology for the experimental determination of the hydrophilic/hydrophobic character of the ionic liquids through the octanol-water partition coefficient (K_{ow}) was developed and the following hydrophilicity order was established: [omim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][NTf₂⁻] < [omim⁺][BF₄⁻] < [bmim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][BF₄⁻]. This sequence explained the different selectivity values obtained for the separation of the target compounds, since an increase in the hydrophilic character of the IL resulted, in all the cases in an increase in the average permselectivity of the resulting SLM, and therefore in a higher separation efficiency. The obtained relationship allows the easy prediction of the most suitable ionic liquid for use as liquid phase in SLM for the selective separation of the compounds involved in transesterification reactions, simply by evaluating the hydrophilic/hydrophobic character of the ionic liquid, determined experimentally by their octanol-water partition coefficient.

5.5. NOMENCLATURE

K_{ow}	octanol-water partition coefficient (adimensional)
C_i^o	concentration of the IL dissolved in the octanol-rich phase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
C_i^w	concentration of the IL dissolved in the water-rich phase ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
\bar{P}	permeability of the membrane ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
C_0	initial 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 (cm^2)
V	volume of the compartments (mL)
t	time (s)
$r\bar{P}$	average permselectivity of the membrane (adimensional)
\bar{P}_A	permeability of the membrane to the compound A ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
\bar{P}_B	permeability of the membrane to the compound B ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

5.6. REFERENCES

- [1] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio, G. Vllora, A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B-Environ.* 67 (2006) 121-126.
- [2] 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.
- [3] 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] R. Molinari, T. Poerio, R. Cassano, N. Picci, P. Argurio. Copper (II) removal from wastewaters by a new synthesized selective extractant and SLM viability, *Ind. Eng. Chem. Res.* 43 (2004) 623-628.
- [5] G. Muthuramam and K. Palanivelu, Transport of textile dye in vegetable oils based supported liquid membrane, *Dyes Pigments* 70 (2006) 99-104.
- [6] Q. Gan, D. Rooney, M Xue, G. Thompson, Y. Zou. An experimental study of gas transport and separation properties of ionic liquids supported on nanofiltration membranes, *J. Membr. Sci.* 280 (2006) 948-956.
- [7] M. Teramoto, Sakaida, S.S. Fu, N. Ohnishi, H. Matsuyama, T. Fukui and K. Arai, Attempt for the stabilization of supported liquid membrane, *Sep. Purif. Technol.*, 21 (2000) 137-142.
- [8] 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.
- [9] J.F. Brennecke, E.J. Maginn, Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [10] 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.

5. On the importance of the nature of ionic liquids

- [11] 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.
- [12] J.F. Brennecke and E.J. Maginn, Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [13] F.J. Hernández, A.P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez and G. VÍllora, A novel application of supported liquid membranes based on ionic liquids to selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction, *J. Membrane Sci.* 293 (2007) 73-80.
- [14] A. P. de los Ríos, F. J. Hernández-Fernández, F. Tomás-Alonso, J. M. Palacios, D. Gómez, M. Rubio and G. VÍllora. A SEM-EDX study of highly stable supported liquid membranes based on ionic liquids, *J. Memb. Sci.* (2007) Accepted.
- [15] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr and J.F. Brennecke, Octanol-water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green. Chem.* 7 (2005) 83-90.

6

A SEM-EDX study of highly stable supported liquid membranes based on ionic liquids

This work evaluates the operational stability of six different supported liquid membranes (SLMs) based on ionic liquids (ILs). [bmim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻] and [bmim⁺][NTf₂⁻] were used as supporting phase in Nylon and Mitex membranes. Scanning electron-microscopy (SEM) combined with Energy Dispersive X-ray (EDX) analysis was used to characterize the membrane surface morphologically and examine the global chemical composition of the membranes and the distribution of the ILs within them.

Study of the freshly impregnated membranes showed that, in all cases, the ILs were homogeneously distributed, mostly filling the pores of the membranes although, in some cases, a small amount of excess of IL was located on the external membrane surface. Stability tests were performed by keeping the respective impregnated membranes immersed for a week in a diffusion cell including two independent compartments and using n-hexane/ n-hexane as the respective feed and receiving phases. The SEM-EDX study of membranes after continuous operation showed that the ILs were still retained within the membrane pores and only small losses of the IL initially located on the external surface were observed. These observations are in complete agreement with the ionic losses determined by mass balance.

6. A SEM-EDX STUDY OF HIGHLY STABLE SUPPORTED LIQUID MEMBRANES BASED ON IONIC LIQUIDS

6.1. INTRODUCTION

The use of supported liquid membranes (SLMs), porous supports whose pores are filled with a liquid, has received growing attention during recent years [1-3]. Nevertheless, their industrial application is still limited, mainly due to concerns about SLM stability and long-term performance [4,5,6]. Therefore, the main challenge in the design of supported liquid membranes is to increase their stability. Unlike the solvents previously used in SLMs, ILs possess unique properties that are interesting in the context of liquid membranes. Ionic liquids are organic salts which are liquid close to room temperature and which normally consist of an organic cation (e.g. dialkylimidazolium, tetraalkylammomium) and a polyatomic inorganic anion (e.g. tetrafluoroborate, hexafluorophosphate) [7]. Among the numerous advantages of ionic liquids as regards SLM stability can be highlighted their negligible vapour pressure and their high capillary force associated with their high viscosity, which could reduce the displacement of the liquids from the micron pores under pressure. Another notable aspect of ILs is the possibility of tailoring their physicochemical properties by selection of the constituent ions [8]. Therefore, the adequate design of an IL could reduce its solubility in the surrounding phases, and so increase the stability of the SLM. Other interesting properties of ILs are their high chemical and thermal stability [9], high ion conductivity [9] and the fact that they are non-flammable. Furthermore, they dissolve a wide range of inorganic and organic compounds [10,11] while being immiscible with many organic solvents [12] and even with water in some cases. All these mentioned properties have led ILs to being considered “green designer solvents”, and to their successful use in numerous applications [13-15].

The use of SLMs based on ionic liquids (ILs) has been shown to be an very attractive way for the highly selective transport of organic compounds involved in the synthesis of pharmaceutical and fine chemicals [16], such as alcohol, esters, organic acids [17,18] and amino acids [19].

In a previous work [18], SLMs based on ionic liquid were successfully applied for the selective separation of the substrates and products of a transesterification reaction. All the assayed SLMs showed excellent operational stability when tested over eight continuous cycles of 48 hours each. On the basis of these results, our aim in this work was to the microscopically characterize the operational stability of six different SLMs based on ILs. Nylon (hydrophilic) and Mitex (hydrophobic) membranes were chosen as supporting membranes in order to study the influence of the hydrophilic/ hydrophobic character of the membrane in the stability of the resulting SLM. The ionic liquids used as liquid phase in the SLMs were

[bmim⁺][BF₄⁻], [bmim⁺][PF₆⁻] and [bmim⁺][NTf₂⁻]. These ILs have quite different hydrophilic character and, therefore, could allow us to analyze the influence of this parameter in the SLM stability. n-Hexane was used as feed and receiving phase since it is the most commonly used organic solvent in transesterification reactions. The macroscopic operational data obtained in a previous work [18] will be confronted with the microscopic characterization carried out by SEM-EDX.

6.2. MATERIALS AND METHODS

6.2.1. Reagents and membranes

Two different polymeric membranes of 25 mm diameter from Millipore were used as supporting membranes:

- Nylon[®] HNWP: hydrophilic polyamide membrane with a pore size of 0.45 μm and a thickness of 170 μm.
- Mitex[®] LCW: hydrophobic polytetrafluoroethylene membrane with a pore size of 10 μm and a thickness of 130 μm.

The ionic liquids 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [bmim⁺][PF₆⁻] (purity>99%), and 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [bmim⁺][BF₄⁻] (purity>99%), were purchased from Solvent Innovation and 1-butyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}imide, [bmim⁺][NTf₂⁻] (purity>99%), from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co. Substrates, solvents and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemical Co., and were of the highest purity available.

6.2.2. Preparation of supported liquid membranes

Immobilization was conducted by placing the membrane in a 10 ml Amicon[™] 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 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 of ionic liquid from the membrane surface. In order to determine the amount of ionic liquid immobilized in the supporting membrane all the membranes were weighed before and after impregnation with the ionic liquid.

6.2.3. Membrane stability studies

The stability studies were performed at 30°C using a glass diffusion cell with two independent compartments, of 30 mL each, separated by the SLM (Figure 6.1). O-rings were inserted on each side of the SLM. The entire assembly was held together by a threaded connector. n-Hexane was used as feed and receiving solutions, and both compartments were mechanically stirred. The obtained SLMs were characterized by SEM-EDX immediately after preparation (fresh membranes) and after seven days' immersion in the aforementioned diffusion cell as described below.

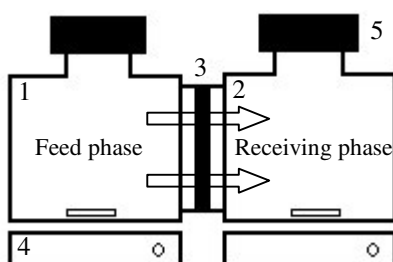


Figure 6.1. Schematic illustration of the glass diffusion cell set up with two independent compartments used for experiments: 1) feed solution containing solutes; 2) receiving solution containing fresh solvent; 3) supported liquid membrane; 4) magnetic stirrer; 5) septum.

6.2.4. SEM-EDX characterization

A Scanning Electron Microscope (SEM) ISI DS-130 coupled to a Kevex Si/Li detector and a Sun SparcStation 5 for Energy Dispersive X-ray (EDX) analysis was used to study the morphological appearance, the overall chemical composition and the distribution of the chemical elements of interest in the supported liquid membranes.

6.3. RESULTS AND DISCUSSION

6.3.1. Characterization of the commercial membranes

Before the preparation of supported liquid membranes, the respective morphology of the Nylon and Mitex membranes was studied by SEM. SEM micrographs (not shown) of the Nylon membrane showed a highly porous material consisting of macropores of about 1 μm average size. Mitex membrane, however, exhibited the presence of extremely thin fibers, probably, containing small pores which were not detected by SEM, together with large macropores and cracks several microns in size.

The EDX spectrum of the Nylon membrane (not shown) presented the characteristic peaks assigned to the C, O and N $K\alpha$ lines, the last two as a single broad peak unresolved due to their proximity and small concentration. The presence of these chemical elements corresponds to the chemical formulation of polyamide. The EDX spectrum of Mitex membrane (not shown) showed a very intense F $K\alpha$ peak and another less intense C $K\alpha$ peak associated to the formulation of polytetrafluoroethylene. Hydrogen and other light elements such as B can not be detected by EDX.

6.3.2. Characterization of supported liquid membranes

The supported liquid membranes impregnated with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ and $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$, respectively, were analyzed after immobilisation in order to ensure the complete filling of the membrane pores by ionic liquids and to verify their homogeneous distribution.

Figure 6.2 (a)-(c) showed the SEM micrographs of the Nylon membrane impregnated with the respective three ILs.

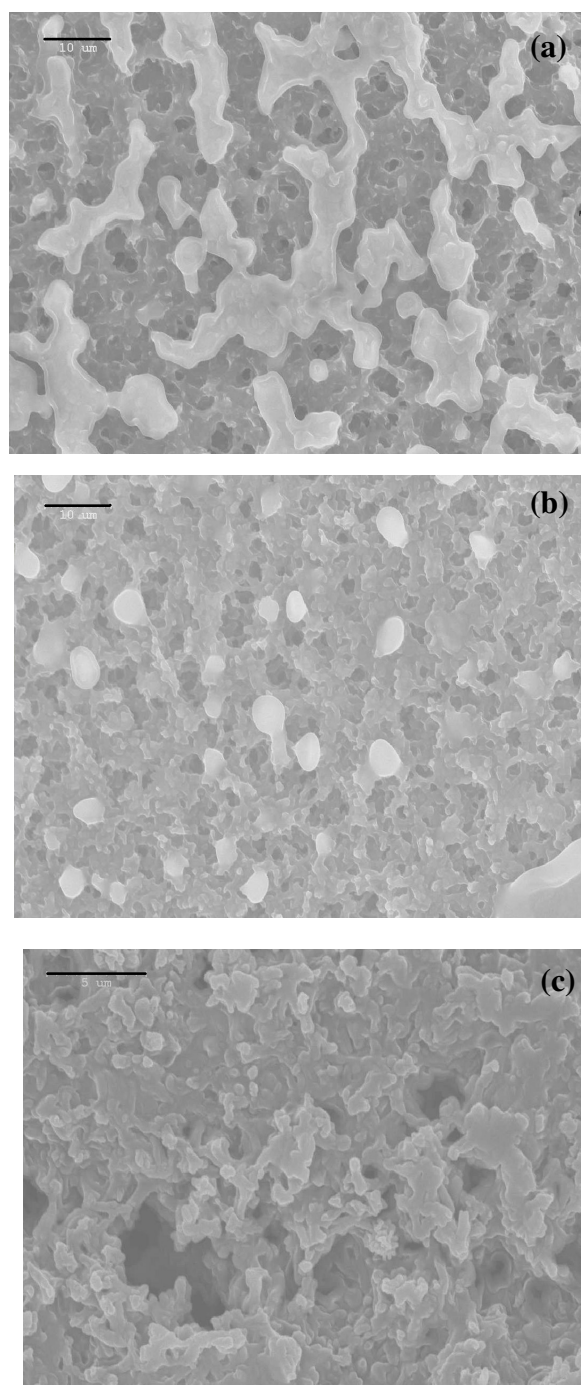


Figure 6.2. Scanning electron micrographs of the Nylon membrane impregnated with (a) $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ (1010x) (scale bar = 10 μm), (b) $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ (1010x) (scale bar = 10 μm) and (c) $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ (3040x) (scale bar = 5 μm).

The morphological study showed that, in general, after impregnation the smaller pores of the membranes become occluded with ionic liquid. Only the biggest ones remained partially filled. These pictures also show that excess ionic liquid appeared on the external surface of the membranes, extensively for $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, moderately for $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ and imperceptibly for $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$. As the preparation conditions were identical for all the ILs tested, these differential features seemed to be correlated with the viscosity of the respective ionic liquids, following the sequence: $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-] > [\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ [20]. Consequently, the accumulation of ionic liquid on the membrane surface seems to be a kinetic effect of liquid fluidity: the greater the IL viscosity, the higher the amount of IL remaining on the external surface of the membrane.

The EDX homogeneity study of supported liquid membranes was based on the selection of characteristic elements of interest in each ionic liquid: F and P for $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, F and B (not detected by EDX) for $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, and F and S for $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ as shown in Figure 6.3. The relative peak heights of identical elements in the different compounds is grossly related with their respective concentrations.

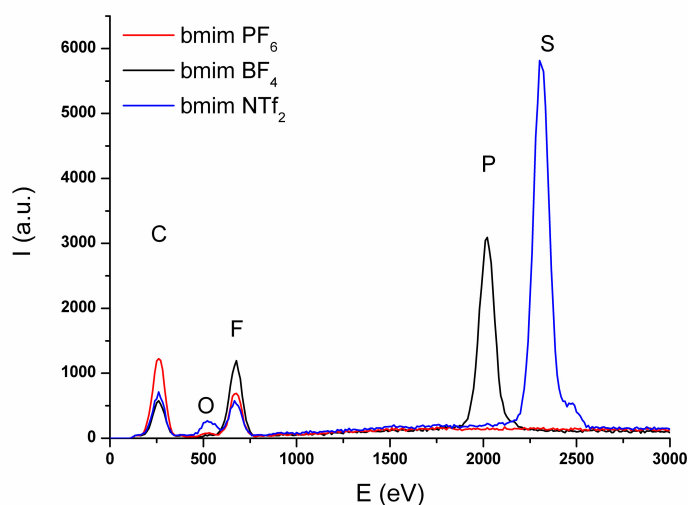


Figure 6.3. EDX spectra of the Nylon membrane impregnated with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ and $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$.

Therefore, F is a common element for the three ILs studied and, consequently, may be used for evaluating the relative homogeneity of each ionic liquid in the respective Nylon membrane.

The respective SEM-EDX F K α line profiles of the three supported liquid membranes are shown in Figure 6.4. It is clear that the homogeneity of the IL coatings increased in the following order [bmim⁺][PF₆⁻] < [bmim⁺][BF₄⁻] < [bmim⁺][NTf₂⁻], which is the same as that observed in the morphological study (Figure 6.2). Consequently, the non-homogeneities observed by EDX in samples with [bmim⁺][PF₆⁻] and [bmim⁺][BF₄⁻] are mostly derived from the ionic liquid deposited on the external membrane surface.

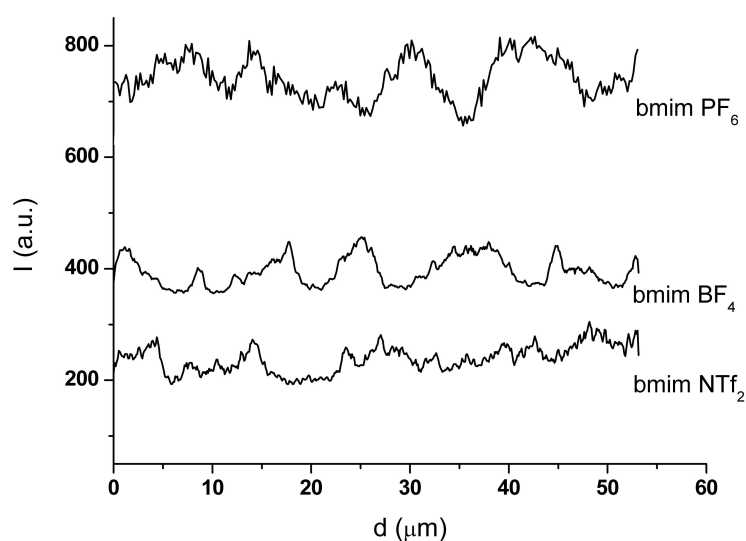


Figure 6.4. SEM-EDX line profiles of F K α in Nylon membranes impregnated with [bmim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻] and [bmim⁺][NTf₂⁻].

Similarly, SEM micrographs of the fresh Mitex membrane impregnated with the three ILs studied (not shown) reveal the typical morphology of PTFE membranes, including macropores and rough areas with the almost complete absence of excess ionic liquid deposited on the external membrane surfaces. Figure 6.5 displays the respective overall EDX spectra of the Mitex membrane with the three ILs immobilized.

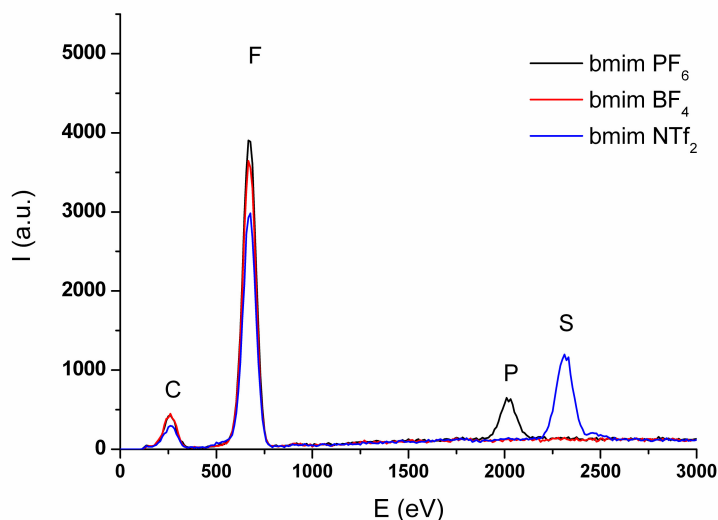


Figure 6.5. EDX spectra of the Mitex membrane alone and impregnated with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$; $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$; $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$.

In this case, the relatively smaller height of P and S peaks found in the Mitex membrane (Figure 6.5) compared with the peaks obtained with the Nylon membrane (Figure 6.3) indicates, qualitatively, the lower amount of ionic liquid absorbed in the Mitex samples. This could be explained by the different textural properties and the high hydrophobic character of the Mitex membrane, which probably restrict interaction with the hydrophilic ionic liquids [20] used. This observation is in complete agreement with the ionic losses determined by mass balance (Table 6.1) and with our previous work [18], in which it was observed that separation of the target compounds of Mitex (hydrophobic) membranes was much less efficient than that obtained with Nylon (hydrophilic) membranes, irrespective of the ILs used. These observations highlight the important role played by the textural properties and the hydrophobic/hydrophilic character of the supporting membrane in the design of supporting liquid membranes based on ionic liquids.

In this case, F cannot be selected as a characteristic element for the homogeneity study of ILs because it is also included in the composition of the Mitex membrane. SEM-EDX line profiles were taken from supported membranes based on ILs (Figure 6.6), using P and S $\text{K}\alpha$ as characteristic lines of elements contained in $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ and $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$, respectively. Unfortunately, B is the only characteristic element in IL

[bmim⁺][BF₄⁻] that can not be detected by EDX and, consequently, the respective line profile is not available.

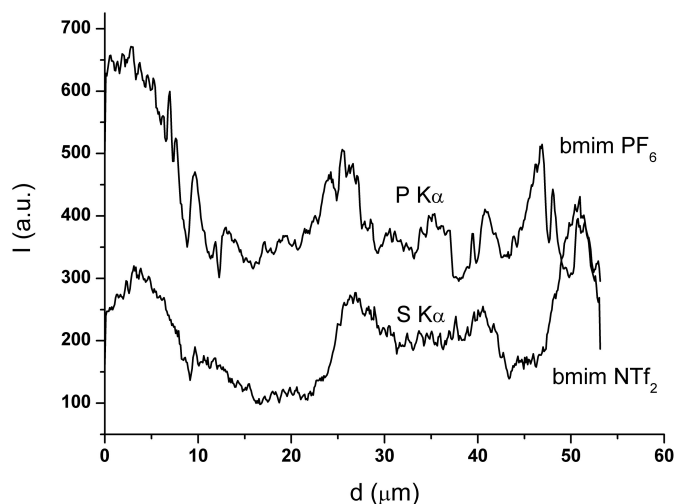


Figure 6.6. SEM-EDX line profiles of P K α and S K α in Mitex membranes impregnated with [bmim⁺][PF₆⁻] and [bmim⁺][NTf₂⁻].

From the SEM-EDX line profiles shown in Figure 6.6 it can be concluded that the dispersion degree of both ionic liquids was very similar and completely determined by the textural properties of the Mitex membrane used. In this type of membrane, excess IL was not found on the external surface, so the peaks in the line profiles are associated to the large macropores and fissures corresponding to the Mitex membrane.

6.3.3. Membrane stability studies

The membrane stability studies were performed to verify the possible displacement of ionic liquid from the membrane pores to the surrounding phases during operation. Stability experiments were performed, keeping the membranes with supported ILs immersed for a week in a diffusion cell with two independent compartments.

6.3.3.1. Characterization of Nylon membranes impregnated with ionic liquids after seven days' operation using n-hexane/ n-hexane as contacting phases

Figure 6.7 shows the morphological appearance of the Nylon membrane impregnated with the three different ILs studied after n-hexane/ n-hexane cell operation for seven days.

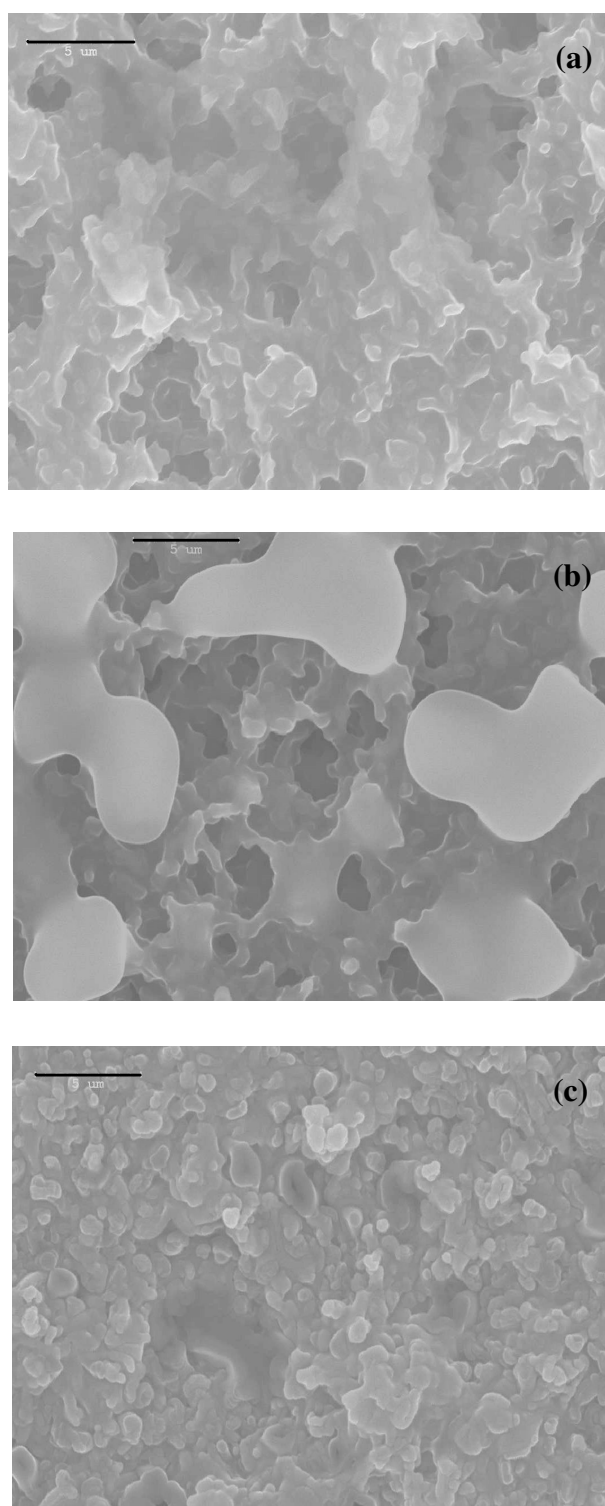


Figure 6.7. Scanning electron micrographs of the Nylon membrane impregnated with (a) $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ and $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ after seven days' operation (3040x) (scale bar = 5 μm) in n-hexane/n-hexane.

Figure 6.7a shows the microstructure of the Nylon membrane impregnated with IL $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ after cell operation, which could be compared with the appearance of the fresh $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ supported on the Nylon membrane in Figure 6.2a.

It can be concluded that most of the ionic liquid, at least, that from the external surface of the membrane disappeared during cell operation. However, comparison of the SEM-EDX spectra taken from membranes before (Figure 6.3) and after (Figure 6.8) immersion in the n-hexane/ n-hexane solution showed that they are very similar. The EDX spectra are taken from a sample of up to a few micrometers thick/depth and show the contribution of ionic liquid within the membrane pores to be much more important than that accumulated on the surface. Consequently, from the SEM study it can be deduced that only the ionic liquid deposited on the external membrane surface has been stripped off during operation. The amount ionic liquid retained in the membrane pores, however, is apparently kept constant and, consequently, the membrane is stable against the possible solvent action of n-hexane.

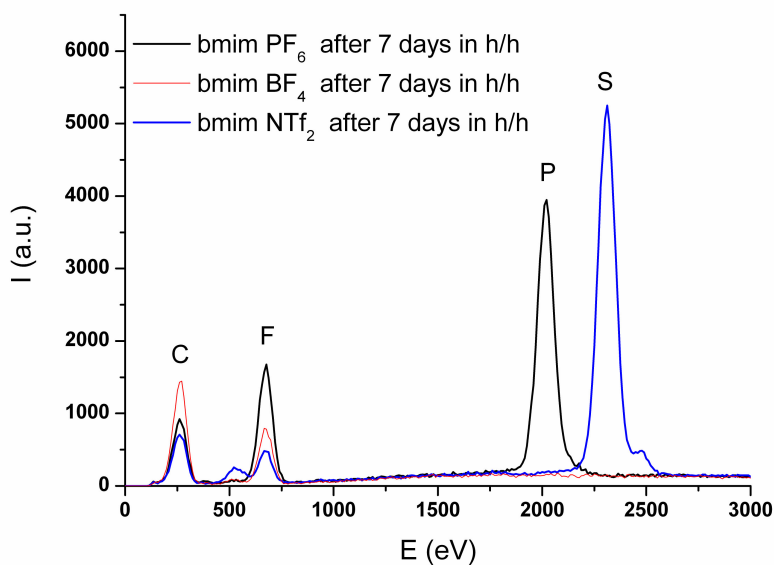


Figure 6.8. EDX spectra of the Nylon membrane impregnated with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ and $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ after seven days' operation in n-hexane/ n-hexane.

In the case of the Nylon membrane impregnated with $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, it was observed that some patches (brilliant areas) of ionic liquid on the external surface of the membrane still remained after operation (Figure 6.7b)).

The morphological appearance of $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ was the same before (Figure 6.2c) and after (Figure 6.7c) operation in n-hexane/ n-hexane, with the complete absence of

ionic liquid on the external surface of the membrane. Once again, the EDX peaks were practically superposed in the SLM before (Figure 6.3) and after (Figure 6.8) operation, demonstrating that ionic liquid remained inside the pores.

Therefore, from the above SEM-EDX study it can be concluded that, in all three cases studied of ILs supported on Nylon membranes, no substantial loss of ionic liquid occurred after a week of operation in a n-hexane/ n-hexane diffusion cell. Only minimal losses of the ionic liquid accumulated on the external surface of SLMs were detected qualitatively by the SEM pictures. Differential migration of the ionic liquids from the external surface of SLMs towards the surrounding hydrophobic n-hexane might be explained by taking into account the different hydrophilicity of the three ionic liquids studied in the sequence $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-] > [\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-] > [\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ [20]. Bearing in mind the hydrophobic character of the contacting phases (n-hexane), the probability of remaining on the external surface of the membranes would increase with the most hydrophilic ionic liquid ($[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, as evidenced in SEM micrographs (Figure 6.7 c)).

SEM-EDX line profiles of Nylon membranes impregnated with the three ionic liquids after operation are shown in Figure 6.9.

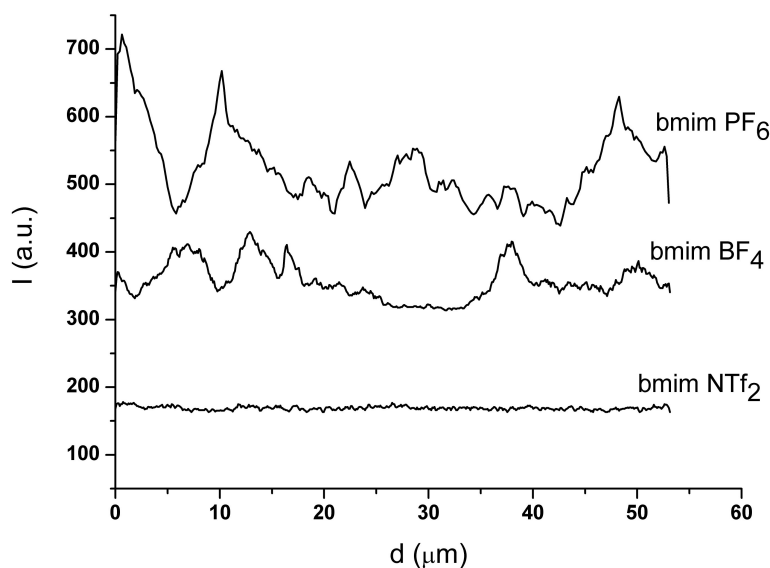


Figure 6.9. SEM-EDX line profiles of F K α in Nylon membranes impregnated with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ and $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ after seven days' operation in n-hexane/ n-hexane.

By comparison with the respective line profiles recorded for fresh SLMs in Figure 6.4, it can be observed that a more homogeneous distribution of ionic liquids exists after cell operation in n-hexane/ n-hexane.

The quantitative results obtained by weight differences of SLMs before and after seven days' operation in n-hexane/ n-hexane diffusion cell corroborate the SEM morphological and EDX spectral results for Nylon membranes as shown in Table 6.1.

Table 6.1. LM-phase remaining in the SLMs after seven days' operation in n-hexane/ n-hexane determined by mass balance method.

Membrane	IL	LM-phase weight (mg)	Remaining LM-phase (%)
Nylon	[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	85.5	99.3
	[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	77.6	99.5
	[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	82	99.9
Mitex	[bmim ⁺][PF ₆ ⁻]	18.7	82.1
	[bmim ⁺][BF ₄ ⁻]	12.2	85.1
	[bmim ⁺][NTf ₂ ⁻]	25.9	87.1

6.3.3.2. Characterization of Mitex membranes impregnated with ionic liquids after seven days operation using n-hexane/ n-hexane as contacting phases

The morphological aspect of the Mitex membrane impregnated with [bmim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻] and [bmim⁺][NTf₂⁻] after seven days' operation using n-hexane/ n-hexane in a diffusion cell as contacting phases was examined by SEM. SEM pictures of used samples (not shown) showed no significant morphological changes with respect to the fresh impregnated samples.

On the other hand, from a comparison of EDX spectra of these samples (Figure 6.10) with those obtained for fresh supported liquid membranes (Figure 6.5), it can be concluded, once again, that no substantial losses of the ionic liquid in the Mitex membrane could be detected after seven days of cell operation in n-hexane/ n-hexane.

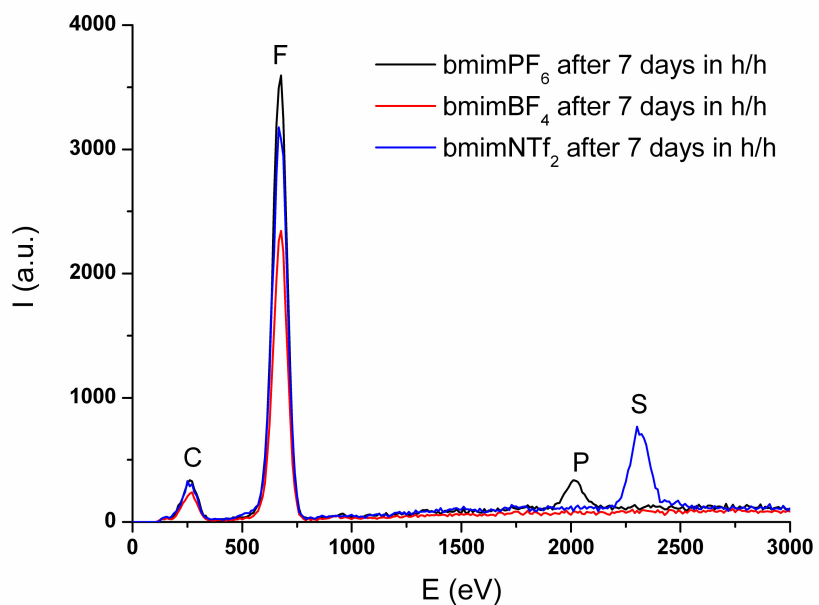


Figure 6.10. EDX spectra of Mitex membranes impregnated with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ and $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ after seven days' operation in n-hexane/ n-hexane.

Additionally, SEM-EDX line profiles of P $K\alpha$ and S $K\alpha$ in Mitex membranes impregnated with two of the ionic liquids studied are shown in Figure 6.11.

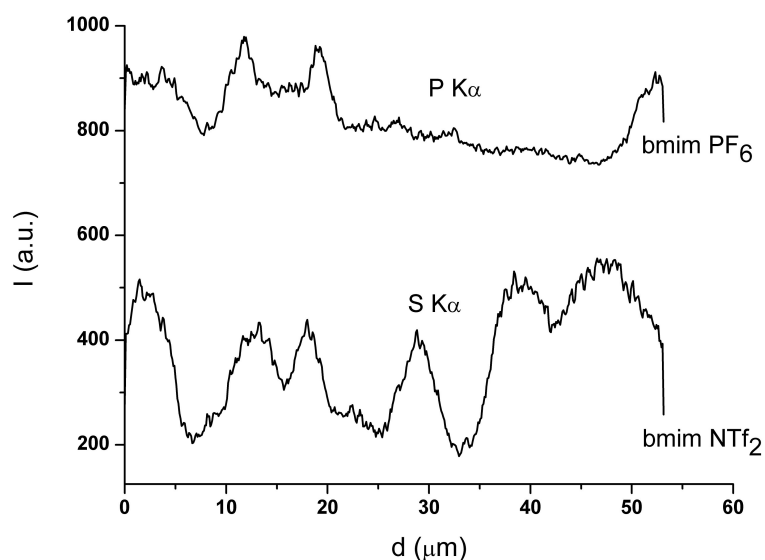


Figure 6.11. SEM-EDX line profiles of P $K\alpha$ and S $K\alpha$ in Mitex membranes impregnated with $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ and $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$, after seven days' operation in n-hexane/ n-hexane.

Compared with the respective line profiles recorded in Figure 6.6 (taken from the fresh SLMs) it can be seen that the distribution of ionic liquids is more homogeneous after immersion in n-hexane.

As in the case of Nylon membranes, the weight differences between fresh commercial Mitex membranes and the same membranes after seven days of operation (Table 6.1) are small. This confirms that the ionic liquids studied are mostly retained in the membrane pores and that any migration to the surrounding solvent is not significant. Therefore, our findings point out the high operational stability of these SLMs, which would enable long-term SLM operation. Similar results have been described by Fortunato *et al.* [21- 23].

6.4. CONCLUSIONS

A comparative SEM-EDX study was made for six different SLMs based on ILs. Nylon and Mitex membranes were used as supporting membranes, in which three ILs, ($[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ or $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$), were immobilized. The analysis was made in three stages: commercial membranes without IL, membranes with IL occluded, and after 7 days of operation in a diffusion cell with n-hexane/ n-hexane as contacting phases.

The Nylon membranes impregnated with ILs showed an homogeneous distribution of the ILs inside the pores, and also showed some surface coating of ionic liquid, depending on the viscosity of the IL used. In the case of Mitex membrane, less ionic liquid was absorbed into the membranes, probably because to their hydrophobic character and textural properties. This observation underlines the importance that the hydrophobic/hydrophilic character and textural properties of the supporting membrane have for the design of supporting liquid membranes based on ionic liquids. The six SLMs studied maintained the ILs inside their pores when immersed for a week in a diffusion cell with n-hexane in both compartments, demonstrating at microscopic level their high operational stability.

6.5. REFERENCES

- [1] A. Poliwoda, N. Ilczuk and P.P. Wieczorek, Transport of peptides through supported liquid membranes, *Sep. Purif. Technol.*, In Press.
- [2] G. Muthuramam and K. Palanivelu, Transport of textile dye in vegetable oils based supported liquid membrane, *Dyes Pigments* 70 (2006) 99-104.
- [3] S. Happel, R. Streng, P. Vater and W. Ensinger, Sr/Y separation by supported liquid membranes based on nuclear track micro filters, *Radiat. Measur.* 36 (2003) 761-766.
- [4] M. Teramoto, Sakaida, S.S. Fu, N. Ohnishi, H. Matsuyama, T. Fukui and K. Arai, Attempt for the stabilization of supported liquid membrane, *Sep. Purif. Technol.* 21 (2000) 137-142.
- [5] 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.
- [6] M. Szpakoska, O.B. Nagy, Stability of supported liquid membranes containing Acorga P-50 as carrier, *J. Memb. Sci.* 129 (1997) 251-261.
- [7] R. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, *Chem. Commun.* 23 (2001) 2399-2407.
- [8] 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.
- [9] P. Bonhôte, A.-P. Dias, N. Papageorgio, K. Kalayanasundaram and M. Grätzel, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts, *Inorg. Chem.* 35 (5) (1996) 1168-1178.
- [10] T. Welton, Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071-2083.
- [11] L.A. Blanchard and J.F. Brenneke, Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 40 (2001) 287-292.

- [12] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatloski, A.E. Visser and R.D. Rogers, Room temperature ionic liquids as novel media for “clean” liquid-liquid extraction, *Chem. Commun.* 16 (1998) 1765-1766.
- [13] F. J. Hernández, A. P. de los Ríos, D. Gómez, M. Rubio and G. Vllora. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems, *Appl. Catal. B-Environ.* 67 (2006) 121-126.
- [14] 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.
- [15] A. P. de los Ríos, F. J. Hernández, M. Rubio, D. Gómez and G. Vllora. (2006). Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (2007) 190-195.
- [16] J.F. Brennecke and E.J. Maginn, Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing, *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [17] 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.
- [18] F. J. Hernández, A. P. de los Ríos, M. Rubio, F. Tomás-Alonso, D. Gómez and G. Vllora. A novel application of supported liquid membranes based on ionic liquids to the selective simultaneous separation of the substrates and products of a transesterification reaction, *J. Membr. Sci.* 293 (2007) 73-80.
- [19] R. Fortunato, M.J. González-Muñoz, M. Kubasiewicz, S. Luque, J.R. Alvarez, C.A.M. Afonso, I.M. Coelho and J.G. Crespo, liquid membranes using ionic liquids: the influence of water on solute transport, *J. Membr. Sci.* 249 (2005) 153-162.
- [20] L. Ropel, L.S. Belvèze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr and J.F. Brennecke, Octanol–water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids, *Green. Chem.* 7 (2005) 83-90.
- [21] 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.

- [22] 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.
- [23] 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.

7

Conclusions and Outlook

7. CONCLUSIONS AND OUTLOOK

7.1. CONCLUSIONS

This thesis has focused on the use of ionic liquids as new solvents to both enhance the efficiency of biochemical reactions and to improve the separation of products.

The use of *ionic liquids* in *biocatalytic processes* has been shown to be an environmentally attractive alternative to classical organic solvents. Water-immiscible ionic liquids appeared as suitable media for the transesterification reactions catalysed by *Candida antarctica* lipase B (CaLB), increasing the activity and selectivity with respect to the values obtained with a classical organic solvent, n-hexane. However, the use of water-miscible ionic liquids led to lower activities than obtained in n-hexane. The immobilisation of CaLB as a crosslinked enzyme aggregate (CLEA) was seen to be a promising approach for rendering enzymes tolerant to denaturing ionic liquids.

Ionic liquids have also been shown to be promising solvents for the use in *separation processes*, more specifically as liquid phase in supported liquid membranes (SLMs). SLMs based on ionic liquids have been successfully used for the selective separation of sixteen different organic compounds (vinyl esters, aliphatic esters, alcohols and carboxylic acids), which are substrates and products of transesterification reactions. These SLM also showed high operational and structural stability. The hydrophilic/hydrophobic character of the IL used as liquid phase in the SLM, measured by the octanol-water partition coefficients (K_{ow}), was found to be a key parameter for the selective behaviour of the SLM. Furthermore, the study of the molecular mechanism involved in the transport phenomena led us to conclude that transport of the compounds was mainly regulated by the affinity of the ionic liquid towards each solute. A clear relationship between the permeability of the compounds and the partition coefficient of the compounds between the ionic liquid and the feed/receiving phase was established. This allows the easy prediction of the capability of a given SLM based on IL to separate two compounds by simply evaluating the partition coefficient of each compound between the ionic liquid and the feed/receiving phase and the molar volume of each compound at its boiling point.

7.2. OUTLOOK

As ionic liquids can be designed for each specific application, it is expected that the reaction and separation methods described in this thesis will be applicable to many industrial processes. Therefore, further research should focus on other systems with important applications in the fine chemistry and pharmaceutical industry, such as in the production of enantiomerically pure compounds by the kinetic resolution of chiral alcohols.

The results in this thesis not only contribute to the replacement of the traditional volatile organic compounds used in reaction and separation processes but also could shed light on another topic of green chemistry: “*Process Intensification*”, which basically consists of the integration of several units of operation into one single step. The results reported in this thesis could contribute to the design of an intensified production method using ionic liquid membrane reactors, which integrates catalytic conversion, product separation and/or concentration and catalyst recovery into a single operation.

As a final comment, that although many industrial applications of ionic liquids will surely be found, it is expected that ionic liquids as solvents will only be applied industrially for the production of specific chemicals, where ionic liquids offer huge advantages over conventional solvents. Ionic liquids will not change the whole chemical industry, but they will certainly find their way into a number of industrial processes.

