



Universidad
Politécnica
de Cartagena

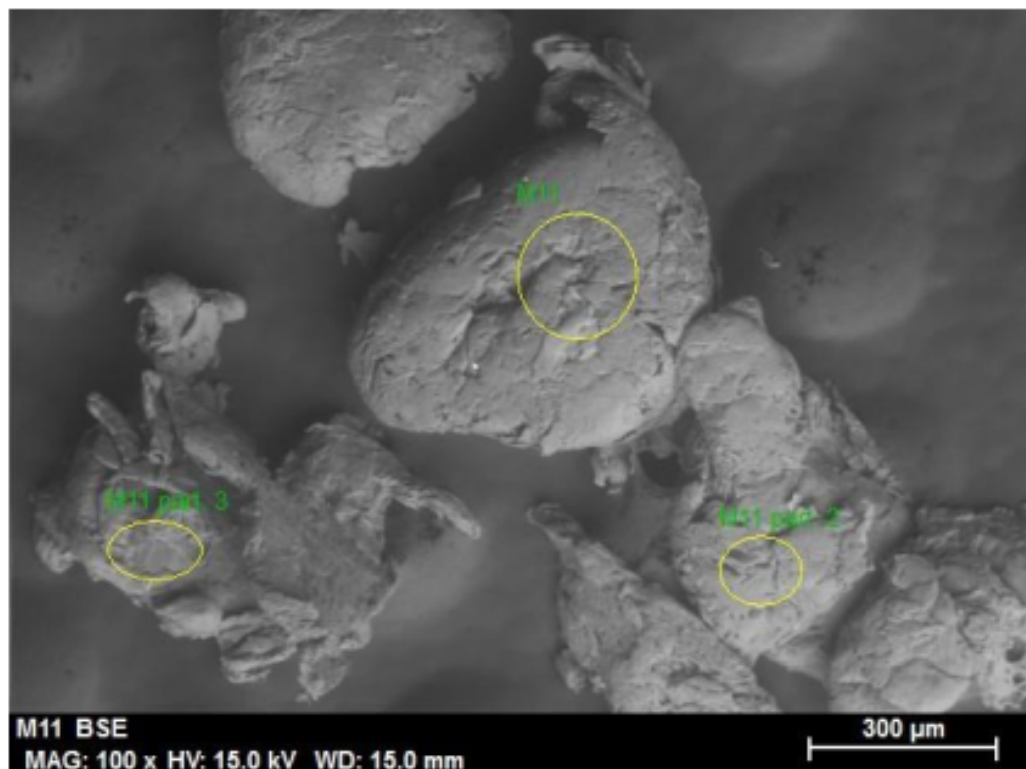


Universidad
Politécnica
de Cartagena

Campus
de Excelencia
Internacional

Inmovilización en ionogeles: un nuevo método para mejorar la actividad y estabilidad enzimática de Lipasa B de *Candida antarctica*.

Programa: Tecnologías Industriales.



Autor: Alfonso Escudero Solano.

Directores: Antonia Pérez de los Ríos y

Carlos Godínez Seoane.



**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS**

D. Carlos Godínez Seoane, Director/a de la Tesis doctoral “INMOVILIZACIÓN EN IONOGELES: UN NUEVO MÉTODO PARA MEJORAR LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD ENZIMÁTICA DE LA LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA*”

INFORMA:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D/D^a. **Alfonso Escudero Solano** dentro del Programa de Doctorado **Tecnologías Industriales**, dando mi conformidad para que sea presentada ante el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado para ser autorizado su depósito.

X Informe positivo sobre el plan de investigación y documento de actividades del doctorando/a emitido por el Director/ Tutor (**RAPI**).

La rama de conocimiento en la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 20 de Julio de 2020

EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS

CARLOS
GODINEZ
SEOANE

Firmado digitalmente por
CARLOS[GODINEZ]SEOANE
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=CARLOS[GODINEZ]SEOANE,
serialNumber=[REDACTED],
givenName=CARLOS,
sn=GODINEZ SEOANE,
ou=CIDUDIANOS, o=ACCU, c=ES
Fecha: 2020.07.19 13:22:36
+02'00'

Fdo. CARLOS GODÍNEZ SEOANE

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

D. JUAN SUARDÍAZ MURO, Presidente de la Comisión Académica del Programa en Tecnologías Industriales

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “INMOVILIZACIÓN EN IONOGELES: UN NUEVO MÉTODO PARA MEJORAR LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD ENZIMÁTICA DE LA LIPASA B DE *CANDIDA ANTARCTICA*”, ha sido realizada, dentro del mencionado Programa de Doctorado, por D. ALFONSO ESCUDERO SOLANO, bajo la dirección y supervisión del Dr. CARLOS GODÍNEZ SEOANE y la Dra. ANTONIA PÉREZ DE LOS RÍOS.

En reunión de la Comisión Académica, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización de los Directores de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado.

X Evaluación positiva del plan de investigación y documento de actividades por el Presidente de la Comisión Académica del programa (**RAPI**).


La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 11 de septiembre de 2020

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA

JUAN|
SUARDIAZ|
MURO



Firmado
digitalmente por
JUAN|SUARDIAZ|
MURO

Fdo: D. JUAN SUARDÍAZ MURO

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

*Inmovilización en Ionogeles: un nuevo método para
mejorar la actividad y estabilidad enzimática de
Lipasa B de **Candida antarctica***

ALFONSO ESCUDERO SOLANO

Cartagena, octubre de 2020

Índice general

Índice general	I
Índice de figuras	V
Índice de tablas	IX
Datos identificativos	XI
1. Introducción	1
1.1. Contexto y justificación de la investigación	1
1.2. Título	2
1.3. Resumen	2
1.4. Abstract	3
1.5. Objetivos	4
2. Estructura de la tesis	7
3. Plan de trabajo	9
3.1. Plan de trabajo	9
4. Estado del arte	13
4.1. Biotocatálisis enzimática	13
4.1.1. Enzimas	13
4.1.2. Lipasas	14
4.1.2.1. Estructura de lipasa B	14

4.1.2.2.	Mecanismo de catálisis de CaLB	15
4.2.	Medios no convencionales en biocatálisis	17
4.3.	Líquidos iónicos	19
4.4.	Enzimas usadas como catalizadores en líquidos iónicos	20
4.4.1.	Efecto de la estructura del líquido iónico en la actividad y estabilidad de enzimas	23
4.4.2.	Ésteres sintetizados en líquidos iónicos	27
4.4.3.	Otros sistemas de reacción utilizados para la biosíntesis de ésteres en líquidos iónicos	35
4.4.3.1.	Sistemas bifásicos líquido iónico/CO ₂ supercrítico	35
4.4.3.2.	Membranas soportadas basadas en líquido iónico	37
4.4.3.3.	Uso de aditivos en el medio líquido iónico	37
4.4.3.4.	La pureza del líquido iónico en biocatálisis	38
4.4.3.5.	Los líquidos iónicos como disolventes verdes	39
4.5.	Inmovilización de enzimas	40
4.5.1.	Tipos de inmovilización	41
4.5.2.	Inmovilización sobre soportes	41
4.5.2.1.	Polímeros orgánicos sintéticos	42
4.5.2.2.	Biopolímeros	42
4.5.2.3.	Hidrogeles	42
4.5.2.4.	Soportes inorgánicos	43
4.5.2.5.	Polímeros inteligentes	44
4.5.3.	Inmovilización por atrapamiento	45
4.5.4.	Inmovilización por entrecruzamiento en ausencia de soporte	46
4.5.4.1.	Cristales de enzima entrecruzada CLECs	46
4.5.4.2.	Agregados de enzima entrecruzada CLEAs	47
4.6.	Ionogeles	48
4.6.1.	Preparación de ionogeles	50
4.6.1.1.	Ionogeles orgánicos	50
4.6.1.2.	Ionogeles inorgánicos	50
4.6.1.3.	Ionogeles híbridos orgánicos-inorgánicos	51
4.6.2.	Aplicaciones de ionogeles	51

4.6.2.1.	Membranas electrolíticas.	51
4.6.2.2.	Membranas de separación	51
4.6.2.3.	Membranas catalíticas	53
4.6.2.4.	Liberación de fármacos	54
5.	Síntesis de butirato de butilo con CaLB en ionogeles a 30°C	57
5.1.	Introducción	57
5.2.	Materiales y métodos	58
5.2.1.	Enzima	58
5.2.2.	Líquido iónico	60
5.2.3.	Preparación del derivado inmovilizado: inmovilización de la enzima CaLB libre en geles basados en líquido iónico (Ionogel)	61
5.2.4.	Actividad, conversión y estabilidad de los nuevos derivados enzimáticos de ionogel	63
5.2.5.	Análisis cromatográfico	64
5.2.5.1.	Condiciones de operación del cromatógrafo	64
5.2.5.2.	Calibración del método cromatográfico	65
5.2.6.	Determinación de la actividad y selectividad de la enzima	66
5.2.7.	Determinación de la pendiente inicial de butirato de butilo	68
5.2.8.	Conversión	69
5.2.9.	Análisis SEM-EDX	70
5.3.	Resultados y discusión	71
5.3.1.	Caracterización SEM-EDX de los ionogeles	76
5.4.	Conclusiones	78
6.	Entrecruzamiento de ionogeles de CaLB con glutaraldehído	79
6.1.	Introducción	79
6.2.	Materiales y métodos	79
6.2.1.	Preparación de ionogeles con glutaraldehído	79
6.2.2.	Actividad y conversión de los ionogeles con glutaraldehído	80
6.3.	Resultados y discusión	82
6.3.1.	Caracterización SEM-EDX de ionogeles con glutaraldehído	87
6.4.	Conclusiones	89

7. Estabilidad operacional de ionogeles a altas temperaturas	91
7.1. Introducción	91
7.2. Material y métodos	91
7.3. Resultados y discusión	92
7.3.1. Caracterización SEM-EDX de ionogeles después de varios ciclos	94
7.4. Conclusiones	98
8. Conclusiones generales y perspectivas futuras	99
Bibliografía	120

Índice de figuras

1.1.	Hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil-imidazolio: [omim ⁺][PF ₆ ⁻]	1
1.2.	Esquema de una reacción de transesterificación	2
1.3.	Reacción de transesterificación tomada como modelo.	4
3.1.	Plan de trabajo estimado para la realización de la tesis.	11
4.1.	Lipasa produciendo la hidrólisis de un triacilglicerol.	14
4.2.	Centro activo de CaLB.	15
4.3.	Mecanismo ping-pong bi bi de CaLB.	16
4.4.	Reacción química directa de transesterificación.	16
4.5.	Competencia entre el nucleófilo externo y el grupo saliente que conduce a la ralentización del proceso catalítico.	17
4.6.	Algunos ejemplos de dadores de acilo activados.	17
4.7.	Transesterificación irreversible de un éster vinílico activado.	18
4.8.	Cation 1-butil-3-metil pirimidinio.	20
4.9.	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio (a) y tetrafluoroborato de 1-etil-3-metil imidazolio (b).	20
4.10.	Acilación de glucósidos catalizada por CrL.	29
4.11.	Transesterificación de N-acetil-L-fenilalanina etil eter catalizada por subtilisina con n-propanol.	29
4.12.	Síntesis de poliéster catalizada por lipasa de PS-C usando octano-1,8-dicarboxilato de dietilo y 1,4-butanodiol con (bmim ⁺)(PF ₆ ⁻).	30
4.13.	Reacciones de polimerización llevadas a cabo en (bmim ⁺)(NTf ₂ ⁻). . .	31

4.14. Esquema de reacción de la resolución cinética del racemato de 1-feniletanol.	32
4.15. Desracemización de ácido mandélico mediante un sistema de dos enzimas.	33
4.16. Esterificación enantioselectiva catalizada por lipasa de ácidos propánoicos sustituidos en posición dos con 1-butanol.	35
4.17. Esquema general de operación de una MFC.	53
5.1. Hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil-imidazolio: $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$	58
5.2. Preparado enzimático comercial Lipozime CaLB L (a) y presentación del líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ (b).	59
5.3. Vista del proceso de agitación, de los anillos Fluka y de un ionogel.	62
5.4. Vista de ionogel triturado y de los reactores (viales) donde tiene lugar el proceso de reacción a temperatura controlada.	62
5.5. Síntesis de butirato de butilo a partir de butirato de vinilo y 1-butanol catalizada por CaLB.	63
5.6. Perfil de temperaturas establecido en el horno del cromatógrafo de gases para el análisis de los diferentes componentes de las muestras.	65
5.7. Cromatograma de la mezcla de reacción, butanol, vinil butirato, butirato de butilo y ácido butírico.	65
5.8. Ejemplo de evolución a lo largo de tiempo de reacción de las concentraciones de las especies químicas detectadas en los análisis cromatográficos de un reactor con ionogel a 30°C.	66
5.9. Obtención de la pendiente inicial de la curva de formación del butirato de butilo.	69
5.10. Porcentaje de conversión en un ionogel de tipo <i>Enz-ionogel</i> a lo largo del proceso de reacción.	70
5.11. Espectro EDX e imagen SEM de un ionogel capturados por un equipo Hitachi S-3500N.	70
5.12. Esquema estequiométrico de la síntesis de ésteres controlada cinéticamente mediante transesterificación de vinilésteres y alcoholes catalizada por CaLB.	72
5.13. Transcurso de la reacción de síntesis de butirato de butilo.	73

5.14. Actividad y conversión exhibidas por CaLB para la síntesis de butirato de butilo en diferentes derivados y con la enzima libre a 30°C.	74
5.15. Gráficos comparativos de conversión en ionogeles a 30°C.	75
5.16. Imágenes del microscopio electrónico de barrido de derivados enzimáticos Enz-Ionogel-B (a) fresco y (b) sometido a un ciclo ($\times 100$) (escala = 300 μm).	76
5.17. Espectro EDX del derivado enzimático Enz-Ionogel-B fresco (a) y un ciclo (b).	76
5.18. Imagen del microscopio electrónico de barrido de un derivado enzimático Enz-Ionogel-B triturado para su uso en un reactor biológico ($\times 100$) (escala = 300 μm).	78
6.1. Síntesis de butirato de butilo a partir de butirato de vinilo y 1-butanol catalizada por CaLB.	80
6.2. Perfiles de conversión para síntesis de butirato de butilo con diferentes ionogeles a 30 y 70°C.	83
6.3. Actividad y conversión exhibidas por CaLB para la síntesis de butirato de butilo en diferentes derivados y con la enzima libre a 30°C.	85
6.4. Actividad y conversión exhibidas por CaLB para la síntesis de butirato de butilo en diferentes derivados y con la enzima libre a 70°C.	86
6.5. Espectro EDX de los derivados enzimáticos Enz-Ionogel-B-20 y Enz-Ionogel-B-100.	87
6.6. Imágenes del microscopio electrónico de barrido del ionogel con enzima diluida que incorpora glutaraldehído (solución acuosa al 25 %) (a) Enz-Ionogel-B-100 (100 μL) y (b) Enz-Ionogel-B-20G (20 μL)($\times 100$) (escala = 300 μm).	88
7.1. Perfil de desactivación de Enz-Ionogel-100G y Enz-Ionogel-20G a 70°C.	92
7.2. Imágenes del microscopio electrónico de barrido de derivados enzimáticos Enz-Ionogel-B (a) fresco, (b) sometido a un ciclo y (c) sometido a cinco ciclos ($\times 100$) (escala = 300 μm).	94
7.3. Espectro EDX del derivado enzimático Enz-Ionogel-B (a) fresco, (b) un ciclo y (c) cinco ciclos.	95

-
- 7.4. Espectro EDX de muestras preparadas con PVC y líquido iónico [omim⁺][PF₆⁻] en ausencia de enzima: (a) muestra fresca entera, (b) muestra fresca triturada, (c) muestra triturada sometida a un ciclo y (d) muestra triturada sometida a cinco ciclos. 96
- 7.5. Imágenes del microscopio electrónico de barrido de muestras preparadas con PVC y líquido iónico [omim⁺][PF₆⁻] en ausencia de enzima: (a) muestra fresca entera, (b) muestra triturada fresca, (c) muestra triturada después de un ciclo y (d) muestra triturada después de cinco ciclos ($\times 100$) (escala = $300 \mu m$). 97

Índice de tablas

5.1. Composición química de los diferentes derivados enzimáticos Ionogel probados a 30°C.	63
5.2. Coeficientes de las regresiones lineales correspondientes al calibrado de las distintas especies químicas que intervienen en el proceso.	66
5.3. Composición porcentual de ionogel de CaLB con tampón fosfato correspondientes a derivado fresco y después de un ciclo. Se corresponden con los espectros de la figura 5.17.	77
6.1. Composición química de los diferentes derivados enzimáticos (Ionogel) preparados. Se muestra en negrita la designación que se ha asignado a cada uno de ellos.	81
6.2. Composición porcentual de derivados ionogel con glutaraldehído.	88
7.1. Composición porcentual de ionogel de CaLB con tampón fosfato correspondientes a derivado fresco, después de un ciclo y después de cinco ciclos. Se corresponden con los espectros de la figura 7.3.	95
7.2. Composición porcentual de derivados sin enzima en función de los ciclos a los que han sido sometidos.	96

Datos identificativos

La presente memoria de tesis ha sido desarrollada dentro del Programa de Tecnologías Industriales de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de la Universidad Politécnica de Cartagena. Su redacción se debe a:

Doctorando: Alfonso Escudero Solano

Directores: Carlos Godínez Seoane
Antonia Pérez de los Ríos

A mi familia

1

Introducción

1.1 Contexto y justificación de la investigación

La conciencia de ser más cuidadosos con el medio ambiente es un sentimiento en auge en todo nuestro planeta. La certeza de nuestra mortalidad despierta en nuestro interior el deseo de dejar un lugar habitable para los que nos seguirán sobre la superficie de este asombroso punto azul alejado de cualquier otro lugar del universo. Esta labor ha sido auspiciada por los científicos y ha cuajado en toda la población con el apoyo de muchos otros colectivos. Prácticamente no se contempla un proceso industrial sin la debida aplicación del principio de desarrollo sostenible. Procesos más económicos donde se utilicen menos recursos energéticos y materias primas.

Bajo este criterio, la catálisis enzimática ha alcanzado unos niveles de desarrollo extraordinarios en las últimas décadas. Profundamente preocupados por la sustitución de disolventes orgánicos por otros que sean más respetuosos con el medio ambiente o el empleo de sistemas catalíticos más eficientes, se han ido dando pequeños pasos para superar el reto. Uno de ellos, el que nos ocupa en este trabajo, es el diseño de líquidos iónicos para desempeñar este papel. Algunos líquidos iónicos, como hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil-imidazolio (figura 1.1), se han empleado

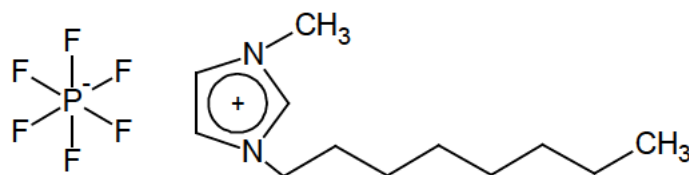


Figura 1.1. Hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil-imidazolio: [omim⁺][PF₆⁻]

como disolventes en la síntesis de ésteres (figura 1.2). El enzima usado en este proceso ha sido lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB).

Se han realizado numerosos estudios sobre la enzima CaLB, como se podrá verificar en el capítulo dedicado a los antecedentes y en la bibliografía aportada. Se sabe que esta enzima presenta mayor estabilidad cuando el medio de reacción está constituido por líquidos iónicos inmiscibles con agua.

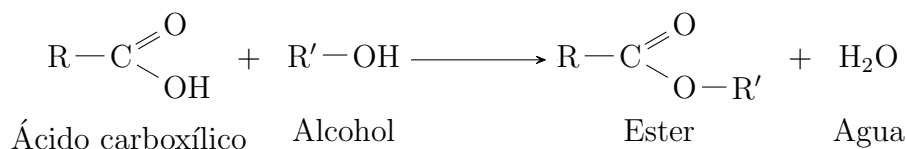


Figura 1.2. Esquema de una reacción de transesterificación

Así mismo, los procesos de inmovilización de enzimas se han empleado para estabilizar biocatalizadores y es el mejor recurso para conseguir reducir costes con su uso continuado en ciclos posteriores.

1.2 Título

Se propone como título de la tesis el siguiente: **“Inmovilización en Ionogeles: un nuevo método para mejorar la actividad y estabilidad enzimática de Lipasa B de *Candida antarctica*”**.

1.3 Resumen

Uno de los objetivos de la química sostenible es la sustitución de los disolventes orgánicos por sus efectos perjudiciales para el medio ambiente y la salud. Los líquidos iónicos se presentan como excelente alternativa de los disolventes orgánicos y en la presente tesis se han empleado en la síntesis de nuevos derivados enzimáticos de lipasa B de *Candida antarctica*. Estos se obtienen por oclusión de la enzima en un organogel de líquido iónico ($[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$) y cloruro de polivinilo. La principal ventaja de estos nuevos derivados enzimáticos es que presentan una mayor actividad enzimática que la enzima libre, además de una mayor estabilidad frente a altas temperaturas y mayor selectividad.

Por otro lado, la inclusión de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento mejoró las propiedades del ionogel, permitiendo que el derivado enzimático alcance una actividad 5 veces mayor que la enzima libre y también permitiendo que se reutilice a 70°C. La nueva metodología permite diseñar derivados enzimáticos cambiando el líquido iónico, proporcionando así un microambiente adecuado para la enzima. El líquido iónico puede actuar sobre sustratos para aumentar su concentración local, al tiempo que reduce la actividad del agua en el entorno enzimático. Todo esto permite mejorar la actividad y la selectividad de la enzima y desarrollar procesos más sostenibles. La composición química y la morfología del ionogel también se estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de rayos X por dispersión de energía, encontrando que la porosidad, que estaba relacionada con la composición química, era un factor clave para la actividad enzimática.

1.4 Abstract

One of the goals of sustainable chemistry is the replacement of organic solvents for their harmful effects on the environment and health. Ionic liquids are presented as possible substitutes for organic solvents and in this thesis they have been used in the synthesis of new enzymatic derivatives of lipase B of *Candida antarctica*. These are obtained by occlusion of the enzyme in an organogel of ionic liquid ($[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$) and polyvinyl chloride. The main advantage of these new enzymatic derivatives is that they present a higher enzymatic activity than the free enzyme, as well as greater stability against temperature variations and greater selectivity.

On the other hand, the inclusion of glutaraldehyde as a crosslinker improved the properties of the ionogel, allowing the enzyme derivative to achieve 5 times greater activity than the free enzyme and also allowing it to be reused at 70°C. The new methodology allows designing enzyme derivatives by changing the ionic liquid, thus providing a suitable microenvironment for the enzyme. The ionic liquid can act on substrates to increase its local concentration, while reducing the activity of water in the enzyme microenvironment. All this allows to improve the activity and selectivity of the enzyme and to develop more ecological processes. The chemical composition and morphology of the ionogel were also studied using scanning electron microscopy

and energy dispersive X-ray spectroscopy, finding that porosity, which was related to the chemical composition, was a key factor for enzymatic activity.

1.5 Objetivos

La finalidad de esta tesis es la consecución de un derivado enzimático para la síntesis de productos demandados en procesos de Química Fina de alto valor añadido. Estos catalizadores biológicos funcionan bajo unas condiciones de reacción que emplean sustancias no convencionales (líquidos iónicos) como medios de reacción/inmovilización y provocan una menor toxicidad que la síntesis tradicional, ya sea por la naturaleza del nuevo disolvente o porque la inmovilización permite su uso continuado en ciclos posteriores.

Estos nuevos derivados se han desarrollado a partir de un soporte orgánico polimérico (PVC) en el que se han ocluido el enzima como catalizador y el líquido iónico como medio de reacción. Estos derivados —ionogeles— se presentan como membranas (PILIMs) con un aspecto externo de plástico blanquecino que son trituradas previamente a su uso en reactores biológicos de flujo discontinuo.

Con estos ionogeles se han realizado procesos enzimáticos donde la estabilidad, actividad y selectividad del enzima ha resultado estimulada. Al mismo tiempo, los ionogeles pueden separarse fácilmente del medio de reacción, de forma que pueden ser reutilizados.

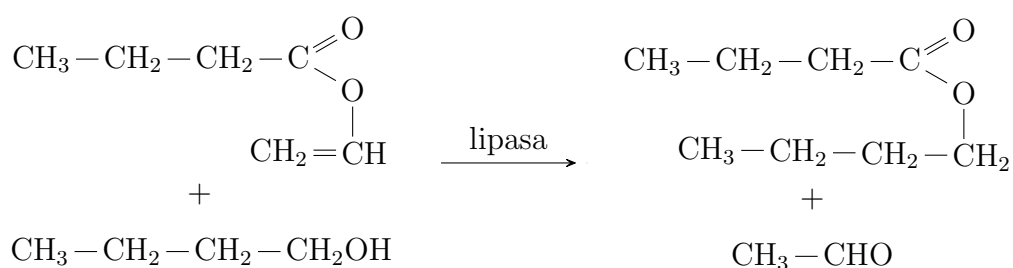


Figura 1.3. Reacción de transesterificación tomada como modelo.

Por último, las condiciones de reacción se han extremado en lo que a la temperatura se refiere (70°C) y se ha reforzado la integridad de los ionogeles mediante la adición de glutaraldehído para que continuaran funcionales después de varios ciclos de uso.

Como reacción modelo para el uso de enzima CaLB, se ha empleado la transesterificación de butirato de vinilo con 1-butanol para producir butirato de butilo y acetaldehído (figura 1.3). También se ha usado $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ como líquido iónico para formar el ionogel.

2

Estructura de la tesis

Se propone la siguiente estructura para la tesis en la que se describe brevemente el contenido de cada capítulo:

1. Introducción. Se pone en contexto la investigación que se realiza, se justifica y se concretan objetivos generales. Se pone de manifiesto la relevancia del estudio y se comentan las limitaciones y suposiciones.
2. Estructura de la tesis.
3. Plan de trabajo.
4. Estado del arte. Se recogen los conocimientos generales y específicos de la materia en base a la literatura creada por autores que han realizado aportaciones significativas en el mismo campo científico. Se trata de una extensión detallada de la presentación inicial realizada en la introducción. Se tratarán individualmente cada una de las disciplinas de las que se nutre esta tesis.
5. Desarrollo de un derivado para inmovilización enzimática (ionogel). En líneas generales se trata de, haciendo uso de la bibliografía consultada, encontrar y poner en funcionamiento un soporte para inmovilizar conjuntamente enzima y líquido iónico.
6. Síntesis enzimática de butirato de butilo mediante lipasa B empleando los derivados inmovilizados basados en líquidos iónicos. Desarrollo del proceso químico seleccionado en reactores biológicos basados en los derivados diseñados previamente.

7. Inclusión de glutaraldehído en ionogeles de CaLB. Se modifica la formulación de los ionogeles para mejorar la actividad sintética y la estabilidad.
8. Estabilidad operacional de ionogeles después de varios ciclos de actividad. Se analiza la estabilidad estructural de los derivados inmovilizados.
9. Conclusiones generales sobre el empleo de estas nuevas técnicas de oclusión enzimática en el ámbito de la bioquímica actual.
10. Perspectivas futuras.
11. Referencias bibliográficas.

3

Plan de trabajo

3.1 Plan de trabajo

En este capítulo se presenta el plan de trabajo con una estimación del calendario previsto (figura 3.1). Así pues, las diferentes etapas u objetivos parciales del trabajo han sido las siguientes:

1. Revisión bibliográfica.
2. Síntesis de derivados inmovilizados de la enzima lipasa B de *Cándida antarctica* empleando el líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ en su formulación. En este punto se comenzará a producir los ionogeles de PVC que ocluyen al líquido iónico y a la enzima y que serán utilizadas en las pruebas posteriores de actividad y estabilidad. Se continuará fabricando ionogeles conforme se vayan haciendo necesarias a lo largo del desarrollo de la tesis.
3. Desarrollo y optimización de un método de análisis mediante cromatografía de gases para la cuantificación de las diferentes especies químicas que intervienen en la reacción.
4. Estudio de la actividad sintética y estabilidad de CaLB para una reacción de síntesis de butirato de butilo. Se trata de realizar un seguimiento del proceso de reacción mediante el seguimiento de la reacción tomando muestras en los reactores a tiempos establecidos. De esta forma se obtienen los perfiles de reacción que nos permitirán determinar la actividad y estabilidad del catalizador enzimático.

5. Estudio del grado de conversión alcanzado en la reacción de síntesis de butirato de butilo.
6. Estudio de la estabilidad del derivado a diferentes temperaturas. Se forzarán condiciones de reacción en lo referente a la temperatura para comprobar la estabilidad térmica del derivado enzimático.
7. Estudio del comportamiento del derivado inmovilizado en reactores discontinuos tras sucesivos usos a diferentes temperaturas.
8. Caracterización de los ionogeles fabricados mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (análisis SEM-EDX).
9. Publicación de los resultados en revistas especializadas.

Todo ello ha ido acompañado del uso de las herramientas informáticas necesarias: lenguaje de programación, cálculo matemático y estadístico, hoja de cálculo y editor de texto. Se ha tenido un especial cuidado en la elección del software empleado, consiguiendo realizar la totalidad de la tesis mediante software libre. Así, por ejemplo, se ha usado TexStudio como editor de textos científicos en entorno L^AT_EX para la redacción de esta memoria y RStudio para la gestión de bases de datos y diseño de gráficos.

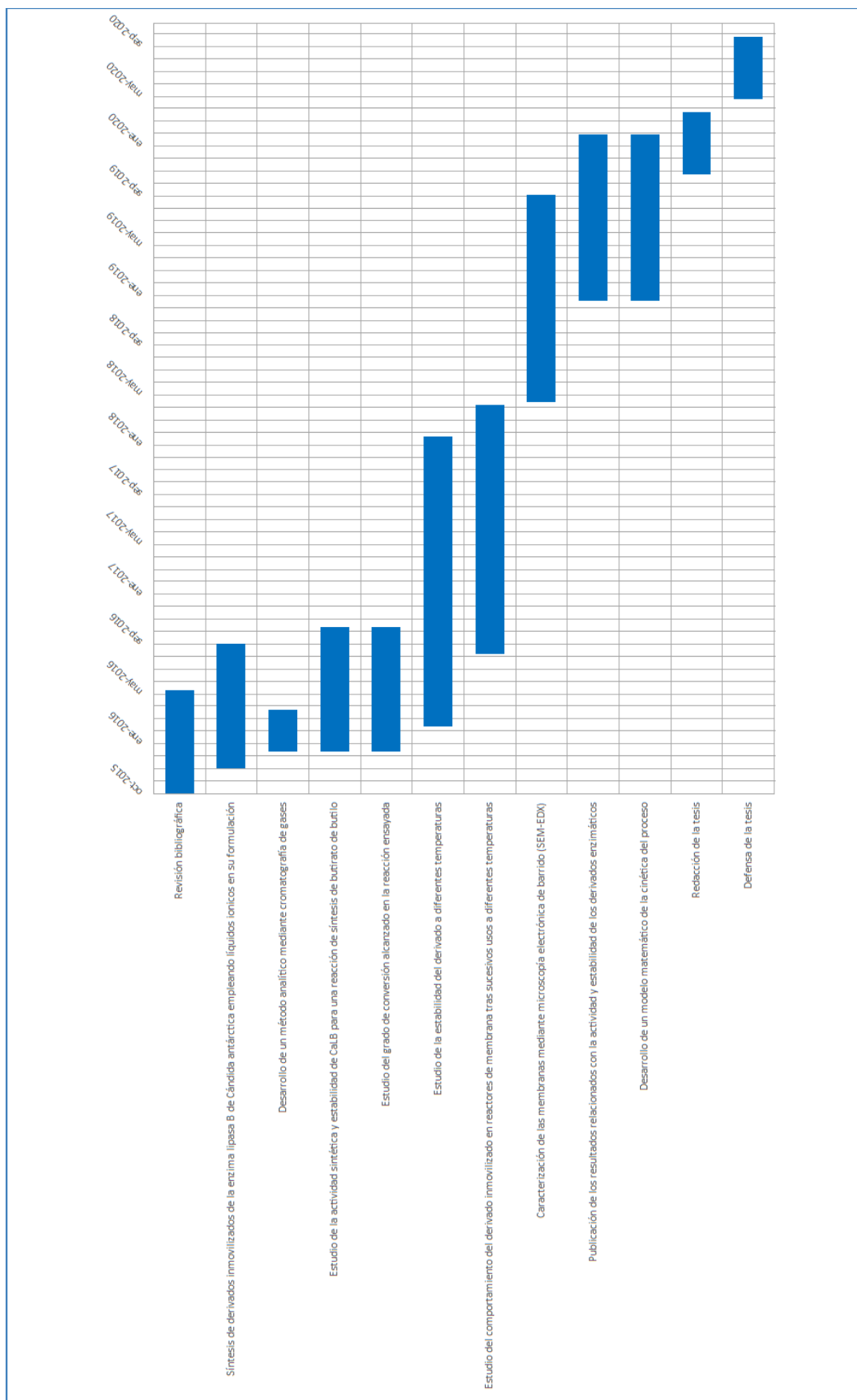


Figura 3.1. Plan de trabajo estimado para la realización de la tesis.

4

Estado del arte

A continuación, se exponen los resultados más significativos de las investigaciones que se han realizado en los últimos años sobre las materias de interés en esta memoria. Algunas de las palabras clave en esta revisión son: enzimas, lipasas, biocatálisis, líquidos iónicos, inmovilización enzimática e ionogeles.

4.1 Biocatálisis enzimática

4.1.1 Enzimas

Las enzimas son proteínas con funciones biocatalíticas en el interior de las células. Así pues, son capaces de disminuir la energía de activación de las reacciones en las que intervienen y por tanto, aumentan la velocidad de esos procesos biológicos, algunas veces multiplicándola por cientos de miles de veces.

Las enzimas poseen una elevada especificidad debida a sus estructuras tridimensionales. De esta forma, se tienen dos modelos para explicar su comportamiento tan específico: (i) modelo llave-cerradura y (ii) modelo de encaje inducido.

Es un hecho muy destacable que la selectividad de los enzimas es muy alta, presentan enantio-selectividad, regio-selectividad, estéreo-selectividad y quimio-selectividad.

Los enzimas forman un “complejo activado” junto a los sustratos. A través de este estado de transición, se llega a los productos y se regenera de nuevo el enzima. El contacto entre enzima y sustrato se produce en un lugar específico del enzima denominado “centro activo”.

Al actuar en medios celulares, el medio habitual en el que los enzimas realizan su trabajo es acuoso y las condiciones de pH, temperatura y presión no son muy exigentes. Llamaremos condiciones “no convencionales” a las que no coincidan con las habituales en lo referente al medio y condiciones de reacción.

4.1.2 Lipasas

Las lipasas son las enzimas más empleadas en biocatálisis. De acuerdo a la clasificación internacional de enzimas, también reciben el nombre de glicerol éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.3) [1] ya que actúan sobre grupos carboxílicos de ésteres.

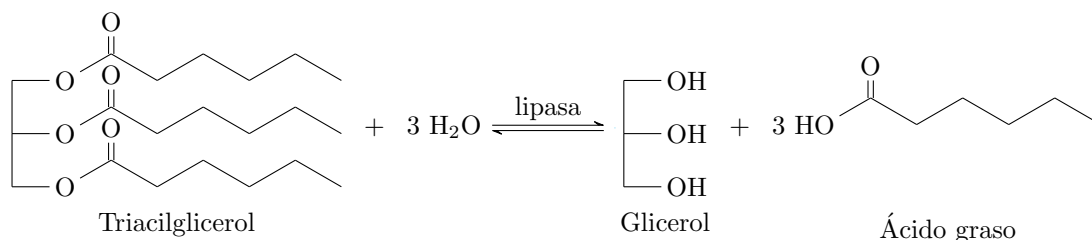


Figura 4.1. Lipasa produciendo la hidrólisis de un triacilglicerol.

Muchas de las lipasas empleadas en procesos industriales son de origen microbiano. Las más habituales proceden de bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Clerodendrum viscosum*, *Bacillus subtilis* y de hongos, como por ejemplo, *Candida antarctica* y *Candida rugosa*.

4.1.2.1 Estructura de lipasa B

El objeto principal de esta tesis es la enzima lipasa B de *Candida antarctica*. La levadura *Candida antarctica* produce dos tipos de lipasa: A y B, a las que nos referiremos como CaLA y CaLB [2].

CaLB cataliza reacciones tales como hidrólisis de ésteres, tioésteres, péptidos, epóxidos y haluros de alquilo o ruptura de enlaces de carbono en hidroxinitrilos [3]. CaLB está formada por 317 aminoácidos y tiene un peso molecular de 33 kDa.

La estructura de CaLB fue establecida en 1994 [4, 5]. El sitio activo de CaLB se muestra en la figura 4.2. En la proteína, también es característica la secuencia Ser105-His224-Asp187, presente en todas las serina hidrolasas. Tal tríada catalítica existe en enzimas con diferentes plegamientos, incluidas tripsina y subtilisina [3]. El

sitio activo de CaLB posee un hueco de oxianión que estabiliza el estado de transición y el oxianión en el intermedio de reacción. Este agujero de oxianión es una disposición espacial de tres donadores de enlaces de hidrógeno, uno de la cadena lateral de Thr40 y dos de la cadena posterior de las amidas de Thr40 y Gln106. El sitio activo también contiene una pequeña cavidad llamada bolsa de estereoespecificidad [5], en la que los alcoholes secundarios tienen que orientar un sustituyente durante la catálisis [6, 7]. Esto le da a CaLB una alta enantioselectividad hacia alcoholes secundarios quirales.

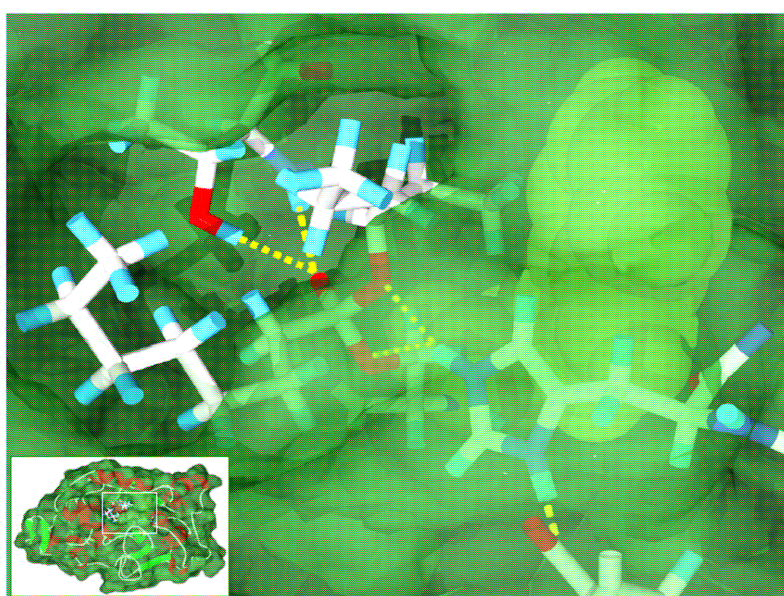


Figura 4.2. Centro activo de CaLB [5].

4.1.2.2 Mecanismo de catálisis de CaLB

La forma de actuación de CaLB se ajusta a un mecanismo ping-pong bi-bi. El detalle del mencionado mecanismo queda ilustrado en la figura 4.3. Comienza el proceso con la fijación del compuesto con el grupo funcional éster al sitio activo de la enzima, generando un intermedio tetraédrico (arriba a la derecha), donde tiene lugar una reorganización de enlaces que prosigue con la salida del primer producto fuera del centro activo y al mismo tiempo, la formación de la acil-enzima (abajo a la derecha). Liberado el sitio activo del producto que se acaba de originar, queda disponible para la llegada del segundo sustrato. Cuando se logra la unión de este último sustrato, queda establecido el segundo intermedio tetraédrico (abajo a la izquierda) para que la reacción pueda avanzar mediante otra reestructuración hasta

el segundo producto. Con la salida del último producto del sitio activo, el enzima queda preparado para otro ciclo (arriba a la izquierda). De forma global, el proceso que tiene lugar es el intercambio de grupos acilo entre varias especies químicas.

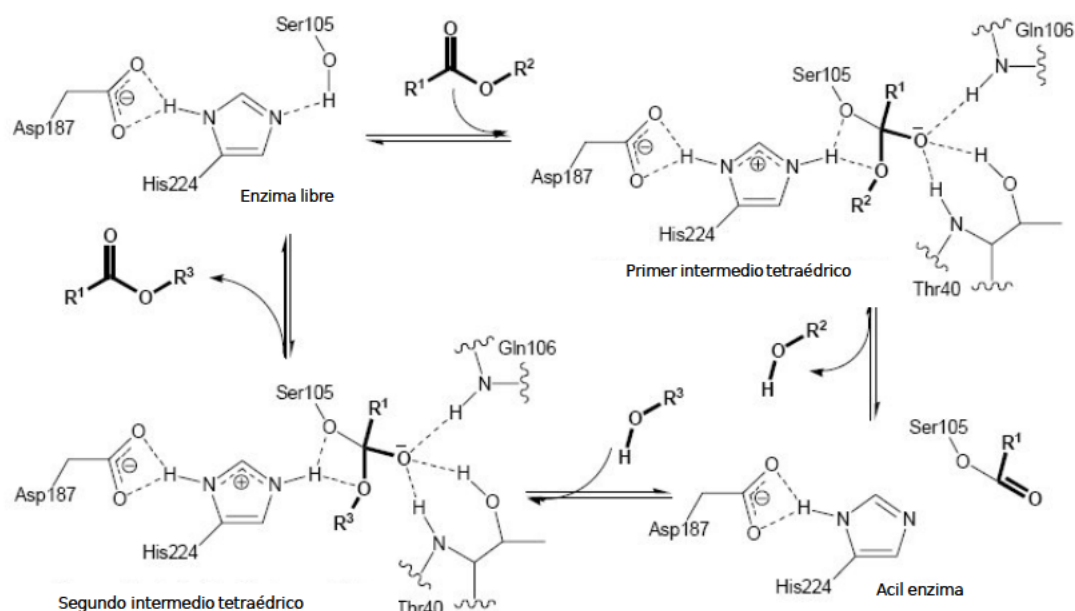


Figura 4.3. Mecanismo ping-pong bi bi de CaLB [8].

Reacciones de transesterificación Como regla general, la reacción entre un ácido y un alcohol transcurre lentamente (incluso en catálisis enzimática) y de forma reversible [9]. Resulta evidente que la eliminación de agua (producto de reacción) desplazaría el equilibrio en el sentido de los productos (figura 4.4).

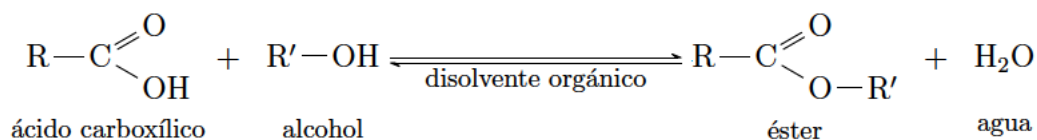


Figura 4.4. Reacción química directa de transesterificación.

Las transesterificaciones en catálisis enzimática en las que se emplean ésteres metílicos o etílicos como dadores de acilo también son reversibles, ya que el carácter nucleófilo de los grupos entrante (nucleófilo externo) y saliente son similares, y por tanto, se establece entre ellos una relación de competencia para formar el intermedio acil-enzima (figura 4.5).

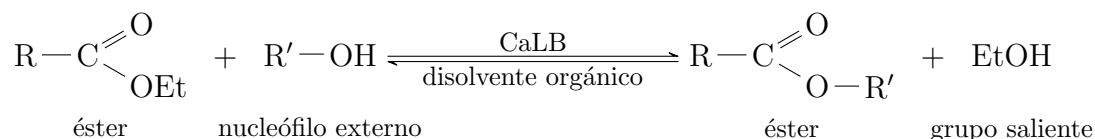


Figura 4.5. Competencia entre el nucleófilo externo y el grupo saliente que conduce a la ralentización del proceso catalítico.

Esta competencia entre el agente nucleófilo externo y el grupo saliente desemboca en la ralentización de la reacción global. Para vencer este problema, una de las alternativas preferidas en biocatálisis es el empleo de dadores de acilo *activados* (figura 4.6). Esta activación consiste simplemente en la elección de un segundo sustrato (que funciona como dador de acilos) tal que la evolución posterior del producto final que forme sea espontánea y se retire del medio como tal. Al no formar parte del proceso inverso, el equilibrio queda totalmente desplazado hacia la formación de productos (considerando las reacciones como se muestran escritas en el texto).

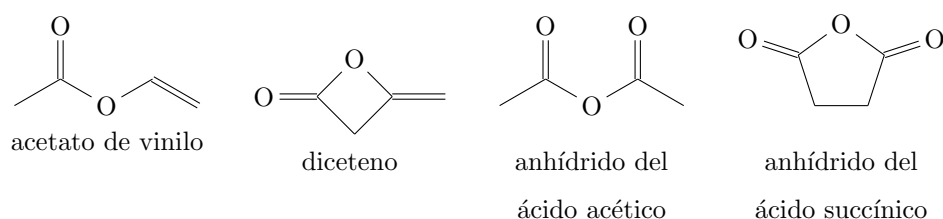


Figura 4.6. Algunos ejemplos de dadores de acilo activados.

Sin duda, los enol-ésteres son los dadores de acilo activados más frecuentemente usados. El grupo saliente alcohol producido tautomeriza al correspondiente compuesto carbonílico, que ha perdido su carácter nucleófilo. De esta forma, deja de ser sustrato en la reacción inversa y provoca el desplazando el equilibrio en el sentido de los productos. Concretamente, si se trata de acetato de vinilo, el producto tautomeriza a acetaldehído, que es volátil y se retira así del medio de reacción. Este proceso es irreversible de hecho (figura 4.7). Wong *et al.* fueron pioneros en el empleo de esta técnica en transesterificaciones catalizadas por lipasas [10].

4.2 Medios no convencionales en biocatálisis

Incluso popularmente, se habla de las enzimas como proteínas que desempeñan el papel de catalizadores de las reacciones químicas que se producen en el inte-

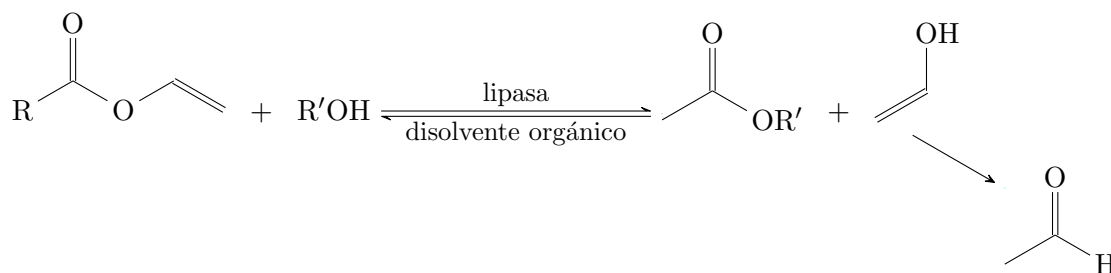


Figura 4.7. Transesterificación irreversible de un éster vinílico activado.

rior celular de los seres vivos. El agua es el componente mayoritario de todos los seres vivos, sin embargo, los enzimas no funcionan adecuadamente en agua pura. Existen muchas otras especies químicas en el interior de una célula: carbohidratos, lípidos, sales inorgánicas ionizadas, etc. Consideraremos como medio convencional a este medio acuoso habitual en la célula. Al referirse a otros medios distintos, serán considerados como medios no convencionales [11].

Nos ha tocado vivir el despertar ecológico a escala mundial. Este acierto se ha hecho notar en la industria química como reflejo de la educación medio ambiental que han recibido los profesionales en virtud de la época. Los procesos asistidos por enzimas son menos contaminantes y más eficaces. Transcurren en condiciones más suaves de temperatura y pH. En muchas ocasiones, con ventajas que resultan abrumadoras sobre los procesos más antiguos, sobre todo, en química fina.

Sin embargo, cuando se trata de procesos catalizados por enzimas en medios convencionales, las dificultades se acentúan. Muchos sustratos orgánicos son insolubles en agua o/y ocurren procesos colaterales no satisfactorios que pueden conducir a la desactivación del enzima. Por otro lado, los productos obtenidos se han de purificar y el agua es un hándicap (elevado punto de ebullición). Se sabe que una baja actividad de agua, previene los problemas de desactivación y, por tanto, los medios no convencionales tienden a estabilizar la proteína. Así por ejemplo, algunas lipasas catalizan procesos en medios anhidros y además, son resistentes a altas temperaturas y aumentan su selectividad enormemente. De hecho, los disolventes orgánicos constituyen los medios no convencionales a los que se ha vuelto la cara.

A pesar de todo lo mencionado, la función catalítica de un enzima necesita un contenido crítico de agua para llevarse a cabo. El agua resulta indispensable para mantener su estructura tridimensional responsable de su papel como catalizador

biológico.

Por otro lado, no todos los disolventes orgánicos ejercen la misma influencia sobre los enzimas. En general, la actividad enzimática decae conforme aumenta la polaridad del disolvente orgánico usado. Con el propósito de escalar esta influencia del disolvente sobre la actividad catalítica del enzima, se ha definido el parámetro siguiente: el logaritmo del coeficiente de partición en una mezcla bifásica estándar 1-octanol/agua, $\log K_{ow}$ [12]. Sin embargo, líquidos iónicos con valores de este parámetro que los hacían totalmente descartables como medio de reacción, han demostrado de forma experimental que eran viables. De esa forma, el parámetro $\log K_{ow}$ no parece ser fiable para establecer un criterio que permita establecer un orden de adecuación de los líquidos iónicos como medio de reacción. Finalmente, se recurre al carácter hidrofóbico del líquido iónico para establecer una regla práctica: a medida que el líquido iónico tiene mayor carácter hidrofóbico actúa mejor como disolvente en reacciones de catálisis enzimática.

Así pues, como se ha ido narrando anteriormente, del medio convencional acuoso se llegó al medio orgánico, que de la misma manera, no fue capaz de superar todos los retos que iban apareciendo conforme el nivel de exigencia aumentaba. Los disolventes orgánicos han demostrado ser inflamables, tóxicos y altamente volátiles. En esta situación, los líquidos iónicos surgen como importante alternativa en biocatálisis.

4.3 Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos son sales orgánicas que permanecen como líquidos a temperatura ambiente. En general, constan de un catión orgánico y un anión inorgánico poliatómico. De entre los cationes orgánicos, destacan las sales de dialquilimidazolio y tetraalquilamonio, y los aniones inorgánicos más frecuentes se encuentran el tetrafluoroborato y hexafluorofosfato. Las principales características de los líquidos iónicos resultan ser su presión de vapor cercana a cero y su excelente estabilidad tanto química como térmica. Estas propiedades hacen que se consideren más apropiados como disolventes que los orgánicos volátiles ya que resultan más respetuosos con el medio ambiente.

A todo lo anterior, se le une que todas las propiedades fisicoquímicas de los líqui-

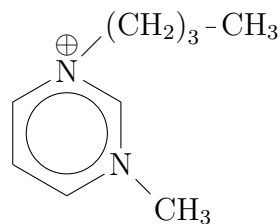


Figura 4.8. Cation 1-butil-3-metil pirimidinio.

dos iónicos, incluido su carácter hidrófobo, densidad, viscosidad, punto de fusión, polaridad y miscibilidad del disolvente, pueden ajustarse con precisión seleccionando combinaciones apropiadas de cationes y aniones. De esta forma, se puede diseñar el líquido iónico óptimo para cada reacción enzimática específica. De hecho, esta característica es un factor clave para realizar procesos biocatalíticos con éxito, ya que la elección adecuada de cationes y aniones podría aumentar la solubilidad de los sustratos, mejorar la selectividad de la enzima o mejorar la actividad y/o estabilidad de la enzima [13].

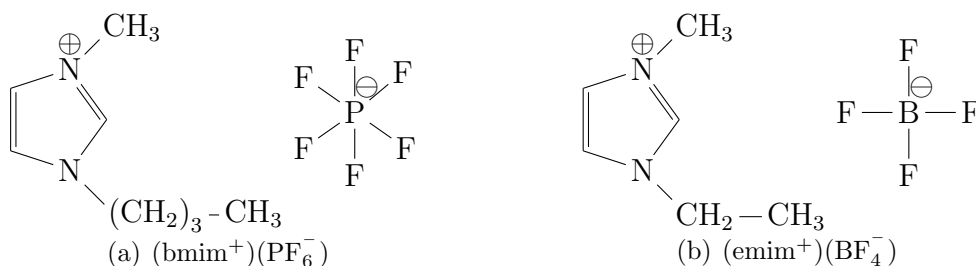


Figura 4.9. Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio (a) y tetrafluoroborato de 1-etil-3-metil imidazolio (b).

4.4 Enzimas usadas como catalizadores en líquidos iónicos

El uso de enzimas en medios prácticamente anhidros requiere un contenido mínimo de agua que depende de la enzima y va desde unas pocas moléculas de agua estrechamente unidas por molécula de enzima a una capa de hidratación casi intacta. La síntesis de ésteres se realiza preferentemente en medios anhidros como disolventes orgánicos o líquidos iónicos para suprimir las reacciones secundarias hidrolíticas no

deseadas. Por esa razón, es necesario utilizar enzimas que toleren fácilmente tales condiciones. Las lipasas, debido a su excelente tolerancia a los disolventes orgánicos, son candidatas obvias para la biocatálisis en líquidos iónicos.

Se ha demostrado que diferentes tipos de lipasas muestran actividad catalítica en líquidos iónicos. El uso de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) en líquidos iónicos es particularmente interesante debido a la mayor estabilidad y especificidad de reacción mostrada por este tipo de lipasas en disolventes orgánicos en comparación con otras lipasas [14]. De hecho, en numerosos ejemplos de reacciones de esterificación catalizadas por CaLB en líquidos iónicos se habló de un aumento de la actividad sintética, enantio-selectividad y estabilidad del biocatalizador en estos medios. El primer ejemplo de biosíntesis de éster catalizado por CaLB en medios líquidos iónicos ($[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$) fue realizado por el grupo de Sheldon [15]. Este grupo de investigadores encontró velocidades de reacción comparables, o incluso, mejores que las observadas en t-butanol, un medio de reacción orgánico convencional, utilizando un derivado inmovilizado de CaLB (Novozym[®] 435). El equipo de Lozano [16] trabajó con éxito en la biosíntesis de éster en líquidos iónicos basados en dialquilimidazolio o cationes de amonio cuaternario asociados con perfluoratos o aniones bis{(trifluorometil)sulfonyl}amida. Todos los líquidos iónicos ensayados demostraron ser medios adecuados para la transesterificación catalizada por lipasa, la actividad sintética se mejoró claramente con respecto a las obtenidas con disolventes orgánicos. Otro ejemplo interesante del uso de CaLB en líquidos iónicos fue realizado por de los Ríos *et al.* [17]. Estudiaron la síntesis de butirato de butilo por transesterificación a partir de butirato de vinilo y 1-butanol catalizado por CaLB en una amplia gama de líquidos iónicos basados en imidazolio. Estos autores encontraron actividades enzimáticas más elevadas y selectividades en todos los líquidos iónicos inmiscibles con agua empleados ($[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{bdmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$, $[\text{hmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{NTf}_2^-]$) que las obtenidas con n-hexano como referencia de disolvente orgánico.

A pesar de que CaLB es la lipasa más utilizada en líquidos iónicos, otras lipasas como la de *Pseudomonas cepacia* (PcL) y *Candida rugosa* (CrL) se utilizan a menudo como biocatalizadores para la síntesis de ésteres en líquido iónico [18–20]. Nara *et al.* [20] estudió la capacidad de PcL para catalizar la transesterificación de

2-hidroxiometil-1,4-benzodioxano utilizando acetato de vinilo como donante de acilo en medios de reacción orgánicos o líquidos iónicos. Se comprobó como la lipasa PcL exhibía inicialmente una alta eficiencia catalítica con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ en comparación con el diclorometano. CrL también se utilizó con éxito en líquidos iónicos según lo publicado por Kim *et al.* [18]. Estos autores estudiaron las acilaciones selectivas enzimáticas de carbohidratos con acetato de vinilo tanto en disolventes orgánicos (THF y cloroformo) como en líquidos iónicos ($[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{moemim}^+][\text{PF}_6^-]$) como medios de reacción. Observaron que las reacciones en líquidos iónicos tuvieron lugar de forma más rápida y selectiva y proporcionaron mayores rendimientos que los de los disolventes orgánicos.

La aplicación de líquidos iónicos en la biocatálisis con lipasa no se ha limitado por completo a CaLB, PcL o CrL. Otras lipasas se han utilizado con líquidos iónicos en la síntesis de ésteres, tales como la lipasa A de *Candida antarctica* (CaLA) [21, 22], lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), lipasa de *Rhizomucor miehei* (RmL), lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Pfl) [23], lipasa del páncreas (PpPpL) [24] y lipasa de *Alcaligenes* sp. (AsL) [22].

El comportamiento de otras esterasas también se ha investigado en líquidos iónicos, sin embargo, se ha demostrado que son mucho menos tolerantes a estos medios anhidros que las lipasas. En este contexto, las esterasas de *Bacillus stearothermophilus* (BstE) y *Bacillus subtilis* (BsE) se utilizaron como medios de reacción para la transesterificación de rac-1-feniletanol en $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$. No se detectó ninguna actividad de transesterificación en estos líquidos iónicos cuando la esterasa liofilizada se utilizó como biocatalizador. Sin embargo, un derivado inmovilizado de estas enzimas en celita mostró actividades comparables en líquidos iónicos y en disolventes orgánicos convencionales (n-hexano, MTBE y acetato de vinilo) [25]. También se utilizó una esterasa de feruloilo de *Aspergillus niger* (AnFaeA) para catalizar la esterificación del glicerol con ácido sinápico en $[\text{OHemim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{moeemim}^+][\text{PF}_6^-]$. Fue necesario un 15 % de contenido de agua y 150 veces el exceso molar de glicerol sobre ácido sinápico para alcanzar alrededor del 75 % de rendimiento de conversión [26].

La cutinasa de *Fusarium solani pisi* inmovilizada en zeolita NaY también mostró actividad en $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ a un valor de actividad

de agua de 0,7 según García *et al.* [27]. Encontraron que las actividades catalíticas de cutinasa en la transesterificación de 2-fenil-1-propanol con butirato de vinilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ eran similares a las de n-hexano.

También se ha analizado la actividad catalítica de proteasas como la quimotripsina [28, 29] y Subtilisin Carlsberg [30] en líquidos iónicos. Laszlo y Compton [31] examinaron la reacción de transesterificación del éster etílico de N-acetil-fenilalanina con 1-propanol catalizado por α -quimotripsina en líquidos iónicos ($[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$) y disolventes orgánicos (isooctano, acetonitrilo y n-hexano). Encontraron que las tasas de transesterificación utilizando α -quimotripsina en líquidos iónicos, a un 1% de contenido de agua, eran comparables con las obtenidas en disolventes orgánicos. La proteasa subtilisin en forma libre no mostró ninguna actividad significativa de transesterificación en líquidos iónicos [32]. Sin embargo, el subtilisin inmovilizado pudo catalizar la transesterificación del éster etílico N-acetil-L-fenilalanina en $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ [30, 32].

4.4.1 Efecto de la estructura del líquido iónico en la actividad y estabilidad de enzimas

Del análisis de la literatura se deriva que las enzimas siguen básicamente el mismo mecanismo catalítico en agua, disolventes orgánicos y líquidos iónicos. Una enzima en un líquido iónico, como en un disolvente orgánico, funciona con una fase microacuosa que rodea la molécula enzimática. Por lo tanto, un líquido iónico puede desempeñar el mismo papel que un disolvente orgánico [33–36] en relación con la enzima: (i) desprender el agua esencial asociada con la enzima; (ii) penetrar en la fase microacuosa para interactuar con la enzima cambiando la dinámica proteica, la conformación proteica y/o el sitio activo de las enzimas; y (iii) interactuando con sustratos y productos, ya sea reacciones directas con ellos o alterando su partición entre las fases acuosas y no acuosas [37].

Entre los líquidos iónicos utilizados para reacciones catalizadas por enzimas, se muestra que los que contienen cationes de dialquilimidazolio son de los más interesantes. A pesar de esto, se sabe que algunos de estos líquidos iónicos tienen un fuerte impacto en la actividad y estabilidad de las lipasas [38–41]. De los Ríos *et al.* [17] es-

tudieron el efecto de los líquidos iónicos a base de dialquilimidazolio en la actividad, selectividad y estabilidad de CaLB para la síntesis de butirato de butilo por transesterificación de butirato de vinilo y 1-butanol. Estos autores probaron 19 diferentes líquidos iónicos inmiscibles en agua y miscibles en ella que consisten en cationes de dialquilimidazolio combinados con una importante cantidad de aniones, incluyendo hexafluorofosfato, bis(trifluorometilsulfonil)imida, tetrafluoroborato, dicianamida, nitrato, acetato, octilsulfato y etilenglicol-monometiletersulfato como medio de reacción con un contenido de agua del 2 % (v/v) y 30°C. Específicamente, los líquidos iónicos inmiscibles en agua analizados fueron: (i) [bmim⁺][PF₆⁻], (ii) [bdmim⁺][PF₆⁻], (iii) [hmim⁺][PF₆⁻], (iv) [omim⁺][PF₆⁻], (v) [emim⁺][NTf₂⁻], (vi) [bmim⁺][NTf₂⁻], (vii) [hmim⁺][NTf₂⁻] y (viii) [omim⁺][NTf₂⁻] y los líquidos iónicos miscibles fueron: (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⁻]. En todos los líquidos iónicos inmiscibles en el agua, la actividad enzimática fue mayor que la obtenida en n-hexano. Por el contrario, en todos los líquidos iónicos miscibles en el agua ensayados la actividad enzimática era menor que la obtenida en n-hexano.

En cuanto a la composición de aniones de líquidos iónicos inmiscibles en agua, de los Ríos *et al.* [17] observaron que la actividad de CaLB era mayor en líquidos iónicos que contenían el anión [PF₆⁻] que en [NTf₂⁻], lo que se explicó debido a la mayor tendencia del anión más nucleófilo ([NTf₂⁻]) a cambiar la conformación de la enzima interactuando con los sitios cargados positivamente en la estructura enzimática. Sin embargo, contrariamente a lo que cabría esperar de esta tendencia, la velocidad de reacción en [bmim⁺][NTf₂⁻] fue mayor que en [bmim⁺][PF₆⁻]. Esto podría deberse a la alta viscosidad de [bmim⁺][PF₆⁻] (207 cP) en comparación con [bmim⁺][NTf₂⁻] (52 cP), lo que implicaría más limitaciones en la difusión. Varios otros autores también han informado de que las lipasas son más activas en [bmim⁺][NTf₂⁻] que en [bmim⁺][PF₆⁻] [24, 25]. En el caso de la mayoría de los líquidos iónicos miscibles en agua [17], el efecto negativo observado sobre la actividad de la lipasa con bajo contenido de agua puede explicarse por la interacción directa entre el anión y las moléculas de la proteína, lo que conduciría a la desnaturalización de las enzimas [20, 42]. CaLB permaneció inactiva en [bmim⁺][NO₃⁻], lo que se atribuyó al alto carácter nucleófilo

del anión $[\text{NO}_3^-]$, que puede coordinarse muy fuertemente con sitios cargados positivamente en la estructura enzimática cambiando la conformación de la enzima según observaron Van Rantwijk *et al.* [43] en la síntesis de butirato de butilo a partir de butanoato de etilo y 1-butanol catalizado por CaLB. Observaron una desactivación de CaLB en $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$, que son líquidos iónicos miscibles con agua, atribuidos a la disolución de CaLB en estos líquidos iónicos. Por lo tanto, los líquidos iónicos hidrófobos muestran ser mejores medios para las biotransformaciones investigadas que los líquidos iónicos hidrófilos. Se observó un comportamiento similar para otras enzimas como la lipasa de *Pseudomonas* sp. (PsL) [19, 20, 44, 45], CrL [41] y subtilisin [30]. Se ha observado que, con pocas excepciones, la actividad enzimática [46–48] y la solubilidad en líquidos iónicos son mutuamente excluyentes [40]. Los líquidos iónicos que disuelven las enzimas podrían formar fuertes enlaces de hidrógeno que pueden disociar los enlaces de hidrógeno que mantienen la integridad estructural de las α -láminas y β -hélices y, haciendo que la proteína se despliegue total o parcialmente [43]. También se han realizado estudios estructurales de enzimas en dos líquidos iónicos inmiscibles en agua bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-etil-3-metilimidizolio y bis(trifluorometilsulfonil)imida de butiltrimetilammonio [49]. De estos estudios se concluye que una solución acuosa de moléculas de enzimas libres añadidas a líquidos iónicos inmiscibles con agua podría considerarse incluida en una matriz iónica pero no disuelta en el medio, proporcionando un microambiente adecuado capaz de mantener la conformación activa de la proteína. Este hecho se asoció con la evolución observada de las estructuras alfa y beta secundarias de la enzima, lo que resultó en una conformación enzimática más compacta capaz de exhibir actividad catalítica.

Por otro lado, los líquidos iónicos fuertemente coordinados, como $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$ son disolventes potencialmente útiles debido a su alta capacidad de disolvente [50–52]. Por esta razón, se han desarrollado enzimas derivados compatibles con este tipo de líquidos iónicos. En este contexto, CaLB, absorbido y entrecruzado en un soporte de polipropileno, mantuvo su actividad catalítica en los líquidos iónicos $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$, que desactivan la enzima libre [50].

En cuanto a la composición catiónica de los líquidos iónicos [17], se ha observado que la actividad catalítica aumenta conforme lo hace la longitud de la cadena

alquílica unida al catión, lo que implica un aumento del carácter hidrófobo del líquido iónico. El aumento de este carácter hidrófobo del medio podría permitir que la capa de agua esencial alrededor de la molécula de proteína se mantuviera intacta, reduciendo así las interacciones directas proteína-iones [53]. Varios autores también observaron un aumento de la actividad enzimática con la longitud de la cadena alquilo del catión [11, 21, 54].

Las diferencias en la selectividad de las reacciones biosintéticas en los líquidos iónicos se han atribuido a sus capacidades específicas para hacer que disminuya la actividad del agua (a_w) en el entorno enzimático. Por lo tanto, un aumento del carácter hidrófobo de los líquidos iónicos generalmente implica un aumento de las moléculas de agua libre, que pueden actuar como aceptores de sustancias nucleófilas en la reacción de transesterificación, lo que conduce a una pérdida de selectividad [17].

En los últimos años, se ha evidenciado que la estabilidad de las enzimas es, a menudo, mejor en líquidos iónicos que en medios orgánicos [49, 55]. Se han investigado diferentes tipos de estabilidad enzimáticas en líquidos iónicos: estabilidad de almacenamiento y estabilidad operativa. La estabilidad de almacenamiento se ha medido mediante incubación enzimática en un líquido iónico a una temperatura determinada, monitoreando la actividad residual en el mismo medio. Los valores de estabilidad operativa de la enzima en líquidos iónicos se entiende como actividad enzimática a lo largo del tiempo en las condiciones de reacción.

La estabilidad de almacenamiento de CaLB en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, $[\text{hmim}^+][\text{NTf}_2^-]$, $[\text{hmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$ fue estudiada por de los Ríos *et al.* [17]. Encontraron que el efecto más importante en la estabilidad de CaLB era la naturaleza de los aniones del líquido iónico. Para los líquidos iónicos que contienen el catión $[\text{bmim}^+]$, los tiempos de vida media aumentaron en el siguiente orden: $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-] < [\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, y para aquellos que contienen la catión $[\text{hmim}^+]$ en el siguiente orden: $[\text{hmim}^+][\text{BF}_4^-] < [\text{hmim}^+][\text{NTf}_2^-] < [\text{hmim}^+][\text{PF}_6^-]$. Este resultado se explicó por el hecho de que el anión más nucleófilo puede interactuar más fuertemente con la enzima, causando cambios en la estructura activa de la enzima. Kaar *et al.* [56] encontraron la misma tendencia con Novozym[®] 435, que era más estable en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ que en $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ y por Persson y Borns-

cheuer [25] utilizando una esterasa de *B. stearothermophilus*, que mostró una mayor estabilidad en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ que en $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$, siendo considerablemente mayor en estos líquidos iónicos que en disolventes orgánicos convencionales como n-hexano y MTBE. También se encontró que la estabilidad de CaLB se incrementó con el aumento del número de carbonos del sustituyente alquílico del catión, lo que está de acuerdo con el aumento del carácter hidrófobo de líquidos iónicos. Estos resultados están de acuerdo con aquellos obtenidos por Lozano *et al.* [57] que afirmaron que esta enzima era muy sensible a la desactivación cuando el carácter hidrófobo disminuía.

También se ha analizado la estabilidad de almacenamiento de otras lipasas. Por ejemplo, la estabilidad de almacenamiento de PsL en líquidos iónicos hidrófobos durante un período de 20 días a temperatura ambiente, medida mediante la variación de la actividad enzimática en la transesterificación de 3-fenilpropanoato de etilo con diferentes alcoholes, dio lugar a un aumento del rendimiento en $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ y en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$, dependiendo del alcohol utilizado en la reacción de transesterificación. En estos líquidos iónicos, también se midió la estabilidad operativa y se encontró que la mezcla de PsL-IL podía reciclarse cinco veces sin ninguna disminución en la actividad de transesterificación [19].

En resumen, las enzimas en líquidos iónicos podrían mantener su actividad durante un período mucho más largo que en los disolventes orgánicos moleculares. Esta estabilización se ha explicado no sólo por la interacción de los iones líquidos iónicos, sino también por la mayor viscosidad de los líquidos iónicos con respecto al disolvente orgánico convencional, lo que podría causar una migración más lenta de los dominios proteicos de la conformación activa hacia la inactiva [52].

4.4.2 Ésteres sintetizados en líquidos iónicos

El grupo de Sheldon fue el primero en mostrar las ventajas del uso de líquidos iónicos en la síntesis enzimática de ésteres [15]. Desde entonces, son muy numerosos los estudios sobre biosíntesis de ésteres en líquidos iónicos.

De los Ríos *et al.* [58,59] sintetizaron una amplia gama de ésteres orgánicos alifáticos, comúnmente utilizados en las industrias de perfumería, aromas y farmacéutica,

por transesterificación de ésteres de vinilo y alcoholes, procesos estos catalizados por CaLB libre en diferentes líquidos iónicos a base de 1,3-dialquilimidazolio. Analizaron el efecto de la longitud de la cadena alquímica del dador de acilo y el alcohol, estableciendo un óptimo (C6 para donante de acil y C4 para alcohol), disminuyendo la actividad con el aumento en la longitud de la cadena de alquilo. Los autores atribuyeron el comportamiento enzimático a una modulación de sustrato principalmente debida a la diferente afinidad de la lipasa hacia los diferentes sustratos, impedimentos estéricos o desnaturalización por pequeñas moléculas de alcohol.

También se han sintetizado ester aromáticos en líquidos iónicos. En este contexto, la acilación catalizada por lipasa de 2-hidroximetil-1,4-benzodioxano con acetato de vinilo se llevó a cabo en dos líquidos iónicos, [bmim⁺][PF₆⁻s] y [bmim⁺][BF₄⁻] [20]. Encontraron una conversión mejor o comparable en estos medios no convencionales que en los disolventes orgánicos convencionales. Otro ejemplo interesante de biosíntesis de ésteres aromáticos en líquidos iónicos fue realizado por Vidya *et al.* [19]. Estos autores llevaron a cabo la transesterificación de 3-fenilpropanoato de etilo con 11 alcoholes catalizados por PsL en [bmim⁺][PF₆⁻], [bmim⁺][BF₄⁻] y [bmim⁺][NTf₂⁻] como medios de reacción.

Los líquidos iónicos son particularmente útiles como medios para transformaciones enzimáticas de sustratos polares, como polisacáridos y nucleótidos, que son difíciles de disolver en disolventes orgánicos convencionales. Park *et al.* [45] llevaron a cabo la acetilación de glucosa catalizada por CaLB en líquidos iónicos, encontrando que la reacción era más regioselectiva en estos medios que en disolventes orgánicos ya que la glucosa era hasta cien veces más soluble en los líquidos iónicos. Otro ejemplo son las acilaciones selectivas de glucósidos monoprottegidos catalizadas por CrL tanto en disolventes orgánicos (THF y cloroformo) como en líquidos iónicos ([bmim⁺][PF₆⁻] y [moemim⁺][PF₆⁻]) (figura 4.10) [18]. Se constató que estas reacciones se llevaban a cabo de forma más rápida y selectiva y proporcionaban mayores rendimientos en líquidos iónicos que los de los disolventes orgánicos. También se investigó la síntesis selectiva catalizada por la lipasa de ésteres de ácidos grasos de glucosa en sistemas bifásicos que consisten en un líquido iónico ([bmim⁺][PF₆⁻] o [bmim⁺][BF₄⁻]) y *t*-butanol como disolvente orgánico [60]. Después de una optimización exhaustiva de varias condiciones de reacción, se podrían lograr conversiones de hasta 60% utili-

zando vinil ester de ácidos grasos como dador de acilo en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ en presencia de 40 % t-BuOH con CaLB a 60°C.

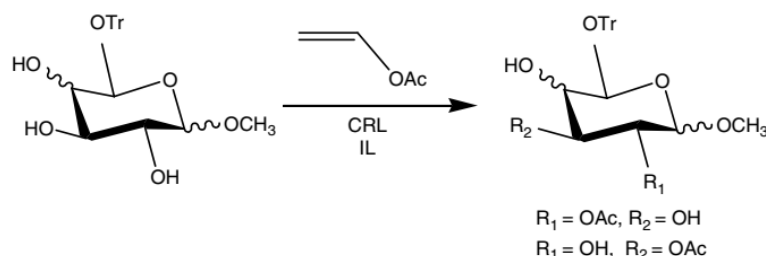


Figura 4.10. Acilación de glucósidos catalizada por CrL [18].

Se han estudiado diferentes formas de mejorar la solubilidad de los polisacáridos en líquidos iónicos. Recientemente, el uso de ultrasonidos se ha empleado para aumentar la actividad enzimática en esterificaciones catalizadas por lipasa de glucosa con laurato de vinilo o ácido láurico en los líquidos iónicos [61]. Se encontró que la irradiación por ultrasonido mejoró significativamente la actividad enzimática, lo que se explicó por un aumento en la velocidad de disolución y la velocidad de transferencia de materia, sin ninguna pérdida en la estabilidad de las enzimas.

Las reacciones con nucleótidos también se han llevado a cabo en líquidos iónicos. En este contexto, la transesterificación del N-acetil-L-fenilalanina etil ester con n-propanol catalizado por subtilisin precipitado y lavado con n-propanol se llevó a cabo con éxito en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ (figura 4.11) [30].

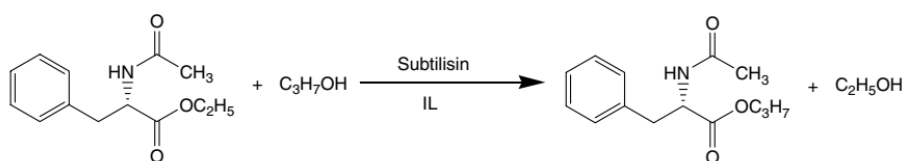


Figura 4.11. Transesterificación de N-acetil-L-fenilalanina etil eter catalizada por subtilisina con n-propanol [30].

La producción de biodiesel también se ha investigado en líquidos iónicos a través de la metanolisis de aceite de soja catalizada por lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* [54]. Para ello, se probaron 23 líquidos iónicos, encontrando la producción más alta de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) después de 12 h a 50°C con $[\text{emim}^+][\text{TfO}^-]$. Con este líquido iónico, el rendimiento de producción fue 80 %, que

fue ocho veces mayor en comparación con el sistema convencional libre de disolventes y alrededor de 15 % mayor que el obtenido utilizando tert-butanol como aditivo. Recientemente, hongos productores de lipasa inmovilizados en partículas se han utilizado con éxito para la biosíntesis del biodiesel por metanolisis del aceite de soja en $[\text{emim}^+][\text{BF}_4^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$. En estos sistemas, los líquidos iónicos funcionarían como un reservorio de metanol para suprimir la desactivación de la enzima [62].

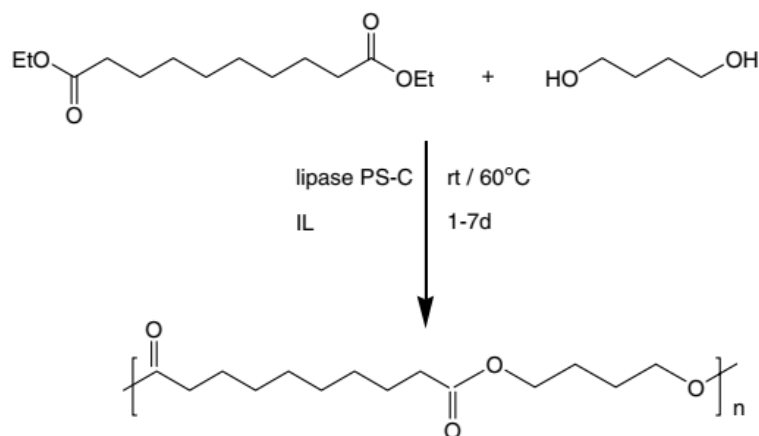


Figura 4.12. Síntesis de poliéster catalizada por lipasa de PS-C usando octano-1,8-dicarboxilato de dietilo y 1,4-butanodiol con $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ [63].

También resultan muy destacables las conclusiones obtenidas en el empleo de líquidos iónicos como medios de reacción en la síntesis de poliésteres catalizada por lipasa, reemplazando a la polimerización química tradicional a temperaturas mayores de 200°C. Nara *et al.* [63] notificaron la síntesis de poliésteres alifáticos catalizada por lipasa en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ (figura 4.12). Encontraron que PsL-C exhibió una alta actividad catalítica en la policondensación de octan-1,8-dicarboxilato de dietilo y 1,4-butanodiol a temperatura ambiente y a 60°C. También se ha estudiado la polimerización de cinco lactonas catalizadas por CaLB en líquidos iónicos (figura 4.13) [64]. Estas reacciones arrojaron polihidroxicanoatos de pesos moleculares moderados de hasta 13.000 Mn. En el líquido iónico $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ y con una baja relación de peso de enzima a lactona (1:100) se obtuvieron polímeros de β -propiolactona, δ -valerolactona, y ϵ -caprolactona con grados de polimerización de hasta 170, 25 y 85, respectivamente; oligómeros de β -butirolactona y γ -butirolactona con grados de polimerización de 5; y un copolímero de β -propiolactona y β -butirolactona con un grado de polimerización de 180.

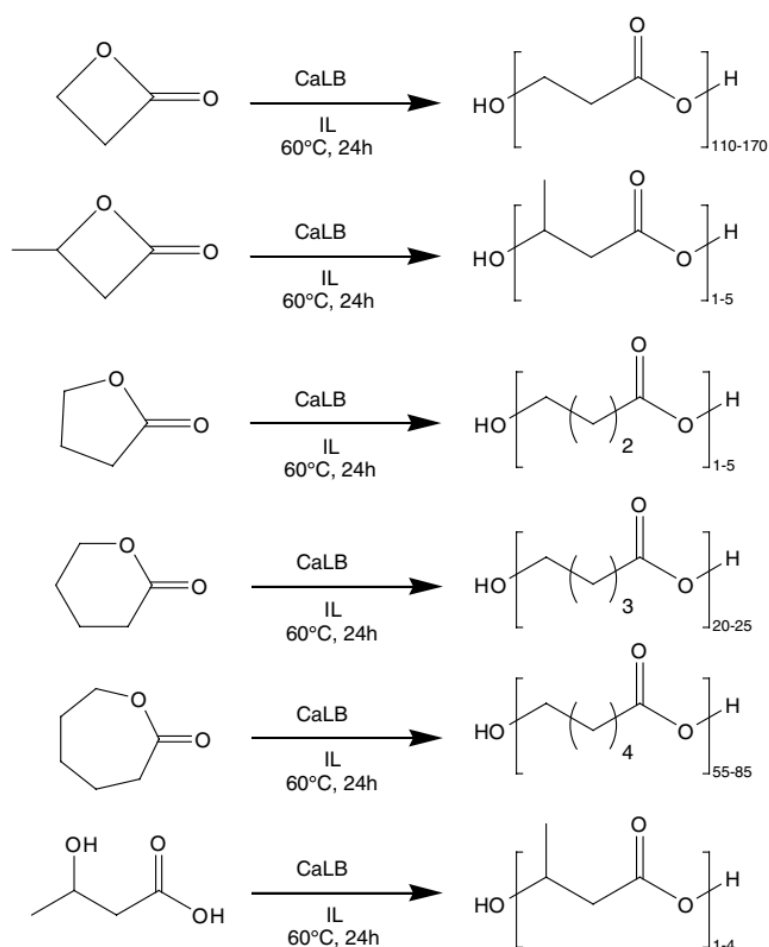


Figura 4.13. Reacciones de polimerización llevadas a cabo en [bmim⁺][NTf₂⁻] [64].

La resolución cinética de racematos constituye una ruta importante para fabricar compuestos ópticamente puros. En este contexto, Itoh *et al.* [22] realizó la acilación enantioselectiva de alcoholes alílicos catalizada por lipasa. Encontraron que la velocidad de acilación dependía en gran medida del contra-anión de la sal de imidazolio, mientras que la acilación catalizada por lipasa sucedía con alta enantioselectividad en todos los líquidos iónicos probados. Se obtuvieron buenos resultados cuando la reacción se llevó a cabo en [bmim⁺][PF₆⁻] o [bmim⁺][BF₄⁻]. También demostraron en primer lugar que era posible utilizar repetidamente la enzima en el sistema de disolvente líquido iónico. Otros ejemplos de resolución cinética de alcohol alílico catalizado por lipasas en líquidos iónicos fueron realizados por estos mismos autores [65,66]. Llevaron a cabo la transesterificación de 5-fenil-1-penten-3-ol bajo presión reducida a 27 hPa a 40°C utilizando el metilfeniltioacetato como donante de acilo en [bmim⁺][PF₆⁻] y [bimim⁺][BF₄⁻], obteniendo el compuesto acilado correspondiente

en forma óptica pura [65]. La acetilación del mandelato de metilo catalizada por PsL inmovilizada en [bdmim⁺][BF₄⁻] es otro ejemplo notificado por estos autores sobre la aplicación exitosa de líquidos iónicos en resoluciones racémicas [66]. Otras investigaciones sobre la resolución cinética de rac-2-pentanol, un sec-alcohol, catalizado por CaLB libre usando propionato de vinilo, se llevó a cabo de forma satisfactoria en [bmim⁺][NTf₂⁻] al 2% (v/v) de contenido de agua [67]. La actividad sintética de la lipasa en [bmim⁺][NTf₂⁻] fue hasta 2,5 veces mayor que en n-hexano, y mostró alta enantioselectividad (ee >99,99%).

Diferentes grupos han estudiado la resolución cinética de rac-1-feniletanol por transesterificación con acetato de vinilo utilizando lipasas en líquidos iónicos como los medios de reacción (figura 4.14) [24, 25, 45]. Schofer *et al.* [24] ensayaron la actividad catalítica de la enzima en diez líquidos iónicos diferentes y compararon los resultados con la reacción realizada en MTBE como disolvente. Las lipasas mostraron una buena actividad y, en algunos casos, mejoraron la enantioselectividad en estos nuevos medios de reacción. Por ejemplo, el exceso enantiomérico con PsL y AsL en [bmim⁺][NTf₂⁻] era 98 y 15, respectivamente, mientras que este parámetro para estas enzimas en MTBE fue 84 y 0, respectivamente.

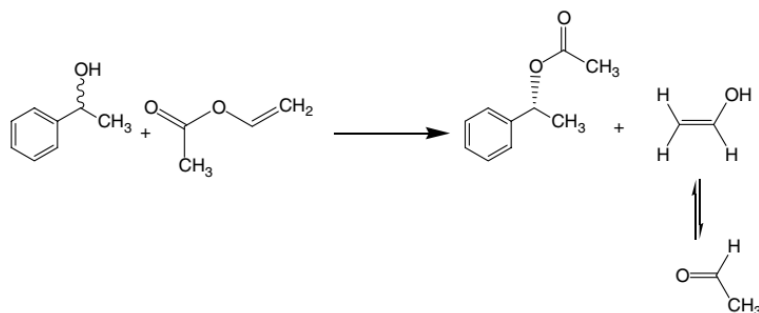


Figura 4.14. Esquema de reacción de la resolución cinética del racemato de 1-feniletanol [24,25,45].

Se han desarrollado diferentes enfoques para mejorar la actividad de las lipasas en la resolución cinética de 1-feniletanol en líquidos iónicos. Por ejemplo, Park *et al.* [45] introdujeron el lavado con carbonato sódico acuoso en la preparación de líquidos iónicos. La acetilación de 1-feniletanol catalizado por lipasa de PcL en estos líquidos iónicos fue tan rápida y tan enantioselectiva como en disolventes orgánicos no polares como el tolueno. Otros autores utilizaron derivados inmovilizados de lipasas para mejorar la estabilidad en líquidos iónicos. En este contexto, la transe-

terificación de 1-feniletanol catalizado por esterasas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus* inmovilizadas en celita también se llevaron a cabo con éxito en $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$, $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ [25]. La resolución cinética también se realizó con dos lipasas, CaLB y PsL, en estos líquidos iónicos [25]. Habulin *et al.* [68] también investigaron esta resolución cinética utilizando una preparación comercial inmovilizada de CaLB (Novozym[®] 435). Encontraron que usando Novozym[®] 435 como biocatalizador en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ a 313,15 K, la mayor conversión posible (50 %) se alcanzó con exceso enantiomérico para sustrato superior al 99 %. El grupo de Sheldon [50] encontró que CaLB, adsorbido y entrecruzando en un soporte de polipropileno, mantenía su actividad de transesterificación en los líquidos iónicos $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{dca}^-]$, que desactivan la enzima libre. Este último biocatalizador mediaba la acilación de 1-feniletanol y 1-feniletilamina con alta enantioselectividad, en disolventes orgánicos convencionales, así como en $[\text{bmim}^+][\text{NO}_3^-]$.

El primer ejemplo del uso de un sistema de dos enzimas en líquidos iónicos fue reportado por Kaftzik *et al.* [69], que investigó la desracemización del ácido (\pm)-mandélico usando un sistema de dos enzimas racemato de mandelato-lipasa (figura 4.15). Llevaron a cabo una combinación de la racemización de ácido (R)-mandélico catalizada por racemato de mandelato y la resolución cinética de ácido (S)-mandélico catalizada por lipasa a ácido (S)-acetil mandélico en un sistema bifásico constituido por $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ y agua en una relación 1:10, encontraron una actividad de racemato medible y la formación de una cantidad también medible de ácido (S)-acetilmandélico.

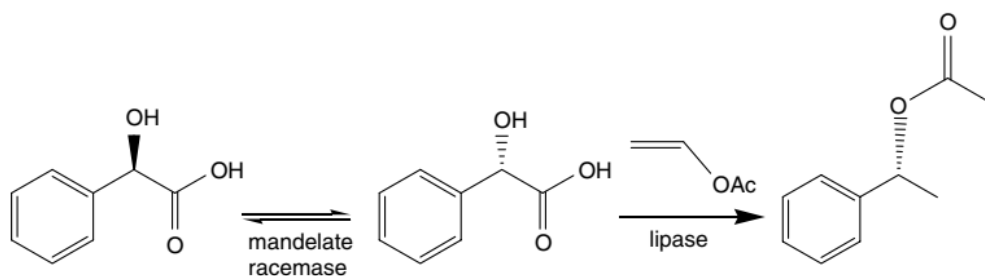


Figura 4.15. Desracemización de ácido mandélico mediante un sistema de dos enzimas.

Los líquidos iónicos también han sido usados como medio en reacciones de esteri-

ficación biocatalítica. En este contexto, Ulbert *et al.* [70] realizaron la esterificación enantioselectiva de ácidos propanoicos sustituidos en posición dos con 1-butanol catalizado por CrL en líquidos iónicos (figura 4.16). Se demostró que la aplicación de $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ era beneficiosa no sólo para la actividad enzimática, sino también para la enantioselectividad. En la esterificación del ácido (R,S)-2-cloro-propanoico, una enantioselectividad mayor al 98 y 150 % pudo lograrse en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ que con el uso de n-hexano. Yuan *et al.* [41] estudiaron la esterificación enantioselectiva de (\pm)-mentol con anhídrido propiónico utilizando CrL en líquidos iónicos $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$ y en disolventes orgánicos con diferentes niveles de carácter hidrófobo. Se alcanzó una conversión y enantioselectividad comparable en $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y n-hexano en una reacción de 24 horas. El sistema de líquido iónico mostraba la ventaja de usar menos ácido anhidro para lograr una mayor conversión de (\pm)-mentol y una mejor enantioselectividad. Además, CrL exhibió mayor estabilidad y enantioselectividad durante una incubación a largo plazo en líquido iónico que en n-hexano. Otros ejemplos interesantes fueron investigados por Contesini *et al.* [71], que probaron cuatro lipasas disponibles comercialmente y dos lipasas nativas de *Aspergillus niger* AC-54 y *Aspergillus terreus* AC-430 para la resolución de (R,S)-ibuprofeno por esterificación en sistemas que contienen los líquidos iónicos $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{bmim}^+][\text{BF}_4^-]$. Las lipasas mostraron una mayor conversión en un sistema bifásico utilizando $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ e isoocetano en comparación con los del isoocetano puro. Feher *et al.* [72] probaron un derivado inmovilizado de CaLB (Novozym[®] 435) en la producción enzimática de acetato de isoamilo a partir de sustratos de ácido acético y alcohol isoamílico, utilizando como medio de reacción una mezcla bifásica de exceso de alcohol isoamílico y $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$. En condiciones óptimas se alcanzaron unos rendimientos y una velocidad de reacción inicial excelentes. La esterificación enzimática del glicerol con ácido sinápico catalizada por una feruloil esterasa (AnFaeA), libre e inmovilizada como agregados de enzima entrecruzada, fue el primer ejemplo de uso de esta esterasa en líquidos iónicos [26]. Se utilizaron dos líquidos iónicos que contienen aniones hexafluorofosfato como medio de reacción: $[\text{OHemim}^+][\text{PF}_6^-]$ y $[\text{moeoemim}][\text{PF}_6^- \text{o}]$. Encontraron que AnFaeA era activa en su forma libre e inmovilizada, con este último conservando una parte de su actividad sintética después de cinco ciclos consecutivos

cruzada del extracto por los líquidos iónicos [78]. Además, scCO_2 muestra una alta capacidad de difusión, lo que dio lugar a una disminución de la viscosidad de los líquidos iónicos, aumentando las velocidades de transferencia de materia [78].

De entre las capacidades más destacables de los sistemas bifásicos en biocatálisis es la alta estabilidad operativa de la enzima, que contrasta con la desactivación generalmente rápida en scCO_2 puro [79, 80]. El uso de scCO_2 como medio de reacción puede tener un efecto adverso sobre la actividad enzimática debido a la modificación química del grupo amino libre, los cambios en el pH local causados por el CO_2 o los cambios de conformación producidos durante los pasos de presurización/despresurización, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias de estabilización enzimática [81, 82]. De esta manera, se ha investigado sobre la eficiencia de los líquidos iónicos para proteger las enzimas contra las condiciones extremas provocados por scCO_2 [74, 83]. Otra ventaja importante que se ha notificado en estos sistemas bifásicos es el aumento de la selectividad con respecto a scCO_2 solo [77]. Este comportamiento se explica por el hecho de que se utilizaron líquidos iónicos inmiscibles con agua, que tienen una capacidad específica para hacer disminuir la actividad del agua en el microambiente que rodea a la enzima, y que por tanto, reduce la formación de producto hidrolítico. Por el contrario, se ha publicado que la actividad sintética de la lipasa inmovilizada en los sistemas bifásicos LI/ scCO_2 es inferior a la de scCO_2 solo. En estos sistemas, los sustratos deben ser transportados desde la fase scCO_2 hasta la fase líquida iónica, donde se lleva a cabo la biotransformación. Por lo tanto, la pérdida de actividad en estos sistemas se relacionó con las limitaciones a la transferencia de materia a través del medio líquido iónico [77]. Se ha constatado el hecho de que la actividad enzimática en estos sistemas bifásicos LI/ scCO_2 depende del efecto de los medios líquido iónico en la enzima y de los fenómenos de transferencia de materia a través de la capa de líquido iónico alrededor del biocatalizador [77]. En resumen, el éxito en el uso de estos sistemas bifásicos líquido iónico/ CO_2 supercrítico en la síntesis enzimática de ésteres se basa en el hecho de que los líquidos iónicos proporcionan un microambiente adecuado para la actividad catalítica de la enzima, mientras que el uso de dióxido de carbono supercrítico hace posible la fácil recuperación de productos sin ninguna contaminación del extracto con líquido iónico. Tal metodología, que evita el uso de disolventes

orgánicos volátiles, podría ser considerada como una tecnología limpia y sostenible donde desarrollar procesos biocatalíticos.

4.4.3.2 Membranas soportadas basadas en líquido iónico

La biosíntesis de ésteres se puede llevar a cabo por transesterificación a partir de ésteres de vinilo y alcoholes catalizada por enzimas en medios no convencionales (es decir, n-hexano [84] y líquido iónico [59]) con bajo contenido de agua. Por lo tanto, cuando la reacción bioquímica alcanza el equilibrio, el medio de reacción podría consistir en una mezcla de un alcohol, un éster de vinilo, un ácido orgánico y un éster de alquilo. La posibilidad de utilizar membranas líquidas soportadas (SLM) a base de líquidos iónicos, membrana cuya poros se llenan con un líquido iónico, para la separación selectiva de estas mezclas de reacción ha sido ampliamente analizada [84–93]. El uso de estos nuevos disolventes como fase líquida soportada por membranas poliméricas da lugar a la estabilización de las membranas resultantes respecto a las basadas en disolventes orgánicos [94–97]. Varios trabajos de investigación han demostrado el potencial de acoplar la enantioselectividad de las lipasas con la selectividad de los líquidos iónicos inmovilizados en membranas para el desarrollo de nuevas metodologías para la producción de compuestos enantioméricos puros o enriquecidos. Esta metodología se ha aplicado a la separación selectiva de rac-2-pentanol [98] y rac-1-feniletanol [84] por transesterificación con un éster de vinilo catalizado por un CaLB inmovilizado comercial. En este sistema la esterificación enantioselectiva tiene lugar en la fase de alimentación, y el isómero no reaccionado del alcohol se difunde a través de la membrana a la fase de recepción. Por otro lado, Miyako *et al.* [99] lograron la penetración selectiva de (S)-ibuprofeno a través de la SILM por esterificación con etanol utilizando diferentes lipasas en las fases de alimentación y recepción.

4.4.3.3 Uso de aditivos en el medio líquido iónico

Hasta ahora, ha habido pocos trabajos que traten sobre el uso de aditivos en líquidos iónicos empleados en biosíntesis enzimática de ésteres. En este contexto, Hernández-Fernández *et al.* [11] aplicaron diversos tratamientos a medios líquidos

iónicos como el equilibrio con soluciones acuosas de sales, NaHCO_3 o Na_2CO_3 , o la adición de trietilamina. Para ello, se probaron como disolventes siete líquidos iónicos basados en el catión 1-alkil-3-metilimidazolio en combinación con aniones hexafluorofosfato y bis(trifluorometil)sulfonilo. Todos los tratamientos mejoraron la actividad sintética de la enzima, los mejores resultados se lograron con la adición de trietilamina. La adición de una cantidad catalítica de trietilamina a los líquidos iónicos dio lugar a un aumento significativo tanto en la actividad sintética como en los valores de selectividad. Por ejemplo, la actividad sintética en $[\text{emim}^+][\text{NTf}_2^-]$ se mejoró más de 12 veces y la selectividad aumentó del 86 % al 95 % cuando se utilizó trietilamina. Estos tratamientos podrían ser enfoques fáciles de usar para mejorar la eficiencia de las reacciones enzimáticas en líquidos iónicos cuando la reacción no se produce tan fácilmente.

4.4.3.4 La pureza del líquido iónico en biocatálisis

Se pueden encontrar diferentes impurezas en líquidos iónicos, tales como agua, haluros, productos de descomposición (HF), sales orgánicas e inorgánicas no reaccionadas [100]. La presencia de estas impurezas debe ser considerada por los usuarios, ya que pueden influir en las propiedades del disolvente [101] y/o interferir con el biocatalizador.

El agua es un contaminante común ya que incluso los líquidos iónicos inmiscibles en el agua son higroscópicos y pueden absorber algo de agua [101]. Por lo tanto, los líquidos iónicos que se utilizarán en sistemas anhidros deben mantenerse libres de agua mediante almacenamiento sobre un agente desecante fuerte, como el pentaóxido de fósforo. Además, el agua en líquidos iónicos que contienen grupos hidrolizables, tales como aniones $[\text{BF}_4^-]$ y $[\text{PF}_6^-]$, puede causar hidrólisis parcial de estos últimos aniones con formación de HF, lo que inhibe muchos tipos de enzimas. En este contexto, Hernández-Fernández *et al.* [11] estudiaron una reacción de transesterificación con líquidos iónicos basados en $[\text{PF}_6^-]$ no purificado, encontrando que la reacción catalizada por lipasa en estos líquidos iónicos era lenta o no ocurría, lo que fue explicado por la presencia de HF en el medio, detectado por análisis ^{19}F -NMR. Los restos de este compuesto se eliminaron fácilmente en líquido iónico inmisible con agua lavando primero con una solución acuosa de carbonato sódico

y luego con agua mili-Q hasta que alcanzaron el pH del agua mili-Q. Mediante la aplicación de este método, se logró un gran aumento en la actividad sintética de la enzima libre sobre la que se obtuvo utilizando líquidos iónicos comerciales ensayados sin purificación adicional.

Pequeñas cantidades de ion cloruro causan la desactivación de enzimas [102]. Por este motivo, los líquidos iónicos preparados a través de la vía del cloruro deben analizarse en busca de halogenuros, por ejemplo, mediante una prueba de cromato de plata. Las resinas de intercambio podrían utilizarse para una mayor purificación si se requiere una menor concentración de halogenuros.

Los compuestos orgánicos también podrían separarse por evaporación bajo presión reducida en un evaporador rotatorio debido a que los líquidos iónicos no se evaporan en estas condiciones.

Aunque podría ser necesaria una mayor purificación de líquidos iónicos comerciales dependiendo de la aplicación específica de estos disolventes, cada día los proveedores proporcionan líquidos iónicos más puros.

4.4.3.5 Los líquidos iónicos como disolventes verdes

Durante los últimos 15 años, se ha mostrado un gran interés por la toxicidad de los líquidos iónicos [103–109]. Se han encontrado diferentes grados de toxicidad para los líquidos iónicos, en comparación con los productos químicos utilizados actualmente como disolvente en la industria química, lo que podría explicarse por la enorme variedad de líquidos iónicos. A partir de estos estudios de toxicidad, se ha obtenido información estructural para un diseño racional de líquidos iónicos más seguros. Por ejemplo, la toxicidad del líquido iónico a base de imidazolio se ha correlacionado directamente con la longitud del sustituyente de alquilo en el catión, mientras que el anión tiene poco efecto sobre este parámetro [104, 105].

Las evaluaciones de la exposición al medio ambiente por líquidos iónicos en comparación con la de disolventes industriales tradicionales deben tener en cuenta no sólo la toxicidad, sino también esta supuesta reducida exposición a líquidos iónicos. La reducida exposición a líquidos iónicos no sólo se debe a la insignificante presión de vapor del líquido iónico, sino también a la posible menor bioacumulación de líquidos iónicos. La bioacumulación, la capacidad de la penetración a través de las

membranas y la acumulación en organismos, podría medirse por el coeficiente de partición octanol-agua. Cuanto mayor sea el coeficiente de partición octanol-agua de un compuesto, más fácil puede cruzar a través de membranas orgánicas para acumularse en tejidos hidrofóbicos, tales como el cerebro. Este parámetro se ha medido para una amplia gama de líquidos iónicos y es significativamente menor que el de los disolventes orgánicos convencionales [110]. Otras ventajas importantes de los líquidos iónicos sobre los disolventes orgánicos convencionales son sus escasos niveles de inflamabilidad y explosividad.

La insignificante presión de vapor de los líquidos iónicos junto con su alta estabilidad química y térmica [111], permiten un reciclaje y reutilización [19]. Siendo de esta forma, la reutilización de líquidos iónicos podría reducir el coste de los procesos donde intervienen.

La naturaleza ajustable de los líquidos iónicos y la relación estructura-toxicidad permiten su diseño de forma que se reduzca su toxicidad. Sin embargo, se necesita profundizar más en la evaluación de sus riesgos. Para ello, debe aplicarse un conjunto más amplio de métodos de ensayo, incluidos estudios centrados en las vías de exposición, así como en la bioacumulación y los procesos de degradación.

4.5 Inmovilización de enzimas

La biotecnología actual ha hecho posible, gracias a las técnicas de ADN recombinante, la obtención de la mayoría de los enzimas a un precio comercialmente aceptable [112]. Sin embargo, al dar el paso a su aplicación industrial aparecen problemas de falta de estabilidad operativa a largo plazo y la difícil recuperación y reutilización de los enzimas. Frecuentemente, estos inconvenientes se pueden superar por la inmovilización de el enzima [113]. Por tanto, podría afirmarse que hay varias razones para inmovilizar un enzima. Entre ellas destaca un mejor manejo del enzima para una separación fácil del producto, haciendo posible la recuperación y reutilización eficiente de enzimas costosos. Por otro lado, también se consigue una mayor estabilidad, tanto en condiciones de almacenamiento como de funcionamiento, por ejemplo, evitando la desnaturalización por calor o disolventes orgánicos.

Con el objetivo de aumentar los rendimientos en biotransformaciones, los últi-

mos desarrollos de nuevas técnicas de inmovilización han sido el uso de soportes novedosos, por ejemplo, polímeros inteligentes, nuevos métodos de atrapamiento y el reciente desarrollo de agregados enzimáticos entrecruzados (FEI).

4.5.1 Tipos de inmovilización

Básicamente, se pueden distinguir tres métodos tradicionales de inmovilización enzimática:

1. La unión a un soporte. Puede ser física (como interacciones hidrofóbicas y Van der Waals), iónica o covalente. Sin embargo, la unión física es generalmente demasiado débil para mantener la enzima fijada al soporte en condiciones industriales de altas concentraciones de reactivos y productos y alta resistencia iónica. La unión iónica es generalmente más fuerte y la covalente, la que más, lo que tiene la ventaja de que la enzima no se puede lixiviar de la superficie. Sin embargo, esto también tiene una desventaja: si la enzima se desactiva irreversiblemente tanto la enzima como el soporte (a menudo costoso) se hacen inutilizables. El soporte puede ser una resina sintética, un biopolímero o un polímero inorgánico como sílice (mesoporosa) o una zeolita.
2. Atrapamiento mediante la inclusión de una enzima en un polímero orgánico. Las fuerzas de unión físicas son demasiado débiles, por lo que, a menudo, se requiere un enlace covalente adicional. El atrapamiento requiere la síntesis de la red polimérica en presencia de la enzima.
3. Entrecruzamiento (cross-linking) de agregados o cristales enzimáticos, utilizando un reactivo bifuncional, para preparar macropartículas sin soporte.

4.5.2 Inmovilización sobre soportes

Las propiedades de las preparaciones enzimáticas soportadas se rigen por las propiedades tanto de la enzima como del soporte. La interacción entre los dos proporciona una enzima inmovilizada con propiedades químicas, bioquímicas, mecánicas y cinéticas específicas. El soporte puede ser un polímero orgánico sintético, un biopolímero o un sólido inorgánico.

4.5.2.1 Polímeros orgánicos sintéticos

Las resinas acrílicas son ampliamente utilizadas como soportes. Por ejemplo, la lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) [2], está disponible comercialmente en forma inmovilizada como Novozym[®] 435 que consiste en la enzima adsorbida en una resina acrílica macroporosa. Una desventaja de la inmovilización de esta manera es que, debido a que no está unida covalentemente, la enzima puede ser lixiviada del soporte en un medio acuoso.

4.5.2.2 Biopolímeros

Una variedad de biopolímeros, principalmente polisacáridos insolubles en agua como celulosa o almidón y proteínas como gelatina y albúmina se han utilizado ampliamente como soportes para la inmovilización de enzimas. De hecho, la primera aplicación industrial de una enzima inmovilizada en una biotransformación es el proceso Tanabe, para la producción de L-aminoácidos por resolución de acilaminoácidos racémicos utilizando una aminoacilasa de *Aspergillus oryzae*. La enzima fue inmovilizada por adsorción iónica en una celulosa modificada y el proceso se realizó en continuo en un reactor de lecho fijo. Este método todavía se utiliza ampliamente, por ejemplo, en la inmovilización de una hidrolasa de *Aspergillus niger* [114]. El biocatalizador inmovilizado conserva una actividad del 70 %, era activo a altas concentraciones de sustrato (306 g/L) y podía reciclarse 7 veces, pero presentaba una enantioselectividad ligeramente menor en comparación con la enzima libre.

4.5.2.3 Hidrogeles

En medios no acuosos, los enzimas también se pueden inmovilizar en hidrogeles o criogeles naturales o sintéticos. Sin embargo, las enzimas libres, debido a su menor tamaño, pueden difundirse fuera de la matriz de gel y, en consecuencia, el tamaño de la enzima debe aumentar, por ejemplo, por entrecruzamiento. Groger et al. [115] lograron el entrecruzamiento de una (R)-oxinitrilasa utilizando una mezcla de glutaraldehído y quitosano (también llamado chitosán, es un biopolímero de aminopolisacáridos). La enzima entrecruzada fue posteriormente atrapada en un hidrogel Lentikat PVA (hidrogel de alcohol polivinílico con forma de lente). El biocatalizador

inmovilizado resultante tenía un tamaño de partícula bien definido de 3-5 mm y no mostraba lixiviación en la hidrocianización enantioselectiva de benzaldehído en un sistema bifásico tampón/disolvente orgánico. Podría reciclarse 20 veces sin pérdida de rendimiento o enantioselectividad.

4.5.2.4 Soportes inorgánicos

Se puede utilizar una variedad de sólidos inorgánicos para la inmovilización de enzimas, por ejemplo, alúmina, sílice, zeolitas y sílices mesoporosas como MCM-41 y SBA-15 [116,117]. Uno de los métodos más simples y baratos para inmovilizar una enzima es en gránulos de sílice [2]. Se utiliza, por ejemplo, para formular enzimas para polvos detergentes que liberan la enzima en el líquido durante el proceso de lavado. La tecnología de granulación se utilizó para inmovilizar la lipasa de CaLB en gránulos de sílice, absorbiendo primero la lipasa en polvo de sílice seguido de aglomeración [40]. Debido a la composición de los granulados, están destinados a ser utilizados sólo en medios orgánicos. En un medio acuoso la lipasa se desorbe y la partícula se desintegra lentamente. Sin embargo, los gránulos de sílice CaLB se pueden utilizar en una síntesis directa de éster si el agua es eliminada por, por ejemplo, mediante evaporación bajo vacío. La aplicación de los gránulos en reactores de lecho fijo también minimiza el tiempo de contacto con altas concentraciones de agua. Los gránulos de sílice de CaLB mostraron una actividad similar a Novozym[®] 435 en la síntesis directa del emoliente de la piel, miristato de isopropilo.

Con el fin de mantener su integridad en un ambiente acuoso, la enzima debe estar unida covalentemente al soporte de sílice. Por ejemplo, la inmovilización de la epóxido hidrolasa de *Aspergillus niger* por unión covalente a la sílice funcionalizada dio lugar a una retención de la actividad del 90 %, que se retuvo durante un período de meses, en la hidrólisis enantioselectiva (E-85) del óxido p-nitroestireno [116]. Además, se observó una estabilidad mejorada hacia el 20 % con el uso de DMSO¹ como disolvente y no se produjo lixiviación en una prueba de filtración.

Las sílices mesoporosas, conocidas a menudo como nanosílices, tienen varias ventajas como soportes: tienen diámetros de poro uniformes (2-40 nm), áreas superfi-

¹Dimetilsulfóxido, (CH₃)₂SO

ciales muy altas (300-1500 m²/g) y grandes volúmenes (alrededor de 1 mL/g), y además, son inertes y estables a temperaturas elevadas. La superficie se puede funcionalizar fácilmente. Debido a los grandes tamaños de poro de estos materiales, se pueden acomodar enzimas relativamente pequeñas en los mencionados poros.

Un nuevo tipo de inmovilización en soportes inorgánicos son los llamados microcristales recubiertos de proteínas (PCMCs) [118]. Los PCMCs se preparan mezclando una solución acuosa de la enzima con una solución concentrada de una sal como el sulfato de potasio (también se puede utilizar un azúcar o un aminoácido). La solución resultante se añade gota a gota con fuerte agitación a un disolvente miscible en agua como el alcohol isopropílico, con lo cual se forman microcristales, que contienen la enzima en la superficie. Una ventaja importante de la técnica es que las moléculas enzimáticas se deshidratan por un mecanismo que deja la mayoría de las enzimas en una conformación activa y minimiza la desnaturalización. Los PCMCs pueden separarse y almacenarse o utilizarse como suspensión en un disolvente orgánico. Obviamente en un medio acuoso se disuelven para liberar la enzima libre. En una transesterificación de N-acetiltirosina etil éster con alcohol isopropílico, PCMCs de Carlsberg subtilisin (EC 3.4.21.62) exhibieron una actividad tres órdenes de magnitud superior a la del polvo liofilizado [119]. Del mismo modo, los PCMC de lipasas mostraron una mejora sustancial de la tasa en la mayoría de los casos, en comparación con los polvos liofilizados correspondientes, en la resolución cinética de 1-feniletanol por transesterificación [119].

4.5.2.5 Polímeros inteligentes

Otro enfoque para la inmovilización de enzimas es a través de la fijación covalente a polímeros sensibles al estímulo que sufren cambios drásticos de conformación en respuesta a pequeños cambios en su entorno, por ejemplo, temperatura, pH y resistencia iónica. El ejemplo más estudiado es el polímero poli-N-isopropilacrilamida (poliNIPAM). Las soluciones acuosas de poliNIPAM exhiben una temperatura crítica de disolución (LCST) alrededor de 32°C, por debajo de la cual el polímero se disuelve fácilmente en agua mientras que, por encima de la LCST se vuelve insoluble debido a la expulsión de moléculas de agua de la red polimérica. Por lo tanto, la biotransformación se puede realizar en condiciones donde la enzima es soluble,

minimizando así las limitaciones de difusión y la pérdida de actividad debido a los cambios en la conformación de las proteínas en la superficie del soporte. Posteriormente, elevar la temperatura por encima de la LCST que lleva a la precipitación de la enzima inmovilizada, facilitando así su recuperación y reutilización. Una ventaja adicional del uso de estas enzimas inmovilizadas termo-sensibles es que se evitan las condiciones de fuga porque cuando la temperatura de reacción supera la LCST el catalizador precipita y la reacción se detiene.

Se utilizan generalmente dos métodos para preparar los conjugados enzima-poliNIPAM: (i) introducción de grupos de vinilo polimerizables en la enzima seguidos de copolimerización con NIPAM o (ii) reacción de grupos NH_2 en la superficie de la enzima con un copolímero de NIPAM que contiene grupos de ésteres reactivos o el homopolímero que contiene una función éster N-succinimida como grupo final. Por ejemplo, la penicilina G amidasa (PA) se inmovilizó por condensación con un copolímero de NIPAM que contiene grupos activos éster [120]. El conjugado enzima-polímero resultante presentaba una actividad hidrolítica cercana a la de la enzima libre.

4.5.3 Inmovilización por atrapamiento

Los enzimas pueden ser inmovilizados mediante atrapamiento en matrices sol-gel formadas por polimerización hidrolítica de alcóxidos metálicos. Avnir *et al.* fueron los pioneros en el uso de la inmovilización en sol-geles de sílice por polimerización de tetraetoxisilano en presencia de enzima. Es necesario destacar que la morfología de los sol-geles de sílice depende del método de secado [121].

Lipasas de *Burkholderia cepacia* y *Candida antarctica* fueron atrapadas en geles de sílice, preparados a partir de mezclas de $\text{Si}(\text{OMe})_4$ y $\text{MeSi}(\text{OMe})_3$ y reforzadas con fibras de cuarzo para mejorar sus propiedades mecánicas [122]. Los biocatalizadores resultantes mostraron actividades similares a la de Novozym[®] 435 en la síntesis de biodiesel por esterificación del aceite de semilla de girasol con acetato de metilo en iso octano. Sin embargo, a altas concentraciones de sustrato, en ausencia de disolvente, fueron menos eficaces que Novozym[®] 435, presumiblemente debido a limitaciones de difusión.

4.5.4 Inmovilización por entrecruzamiento en ausencia de soporte

A principios de la década de 1960, los estudios de química de proteínas de fase sólida llevaron al descubrimiento de que el entrecruzamiento (cross-linking) de enzimas disueltas a través de la reacción de grupos superficiales NH_2 con agentes químicos de entrecruzamiento, como el glutaraldehído ($\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$), ofrecía enzimas entrecruzadas insolubles (CLEs) con retención de la actividad catalítica. Sin embargo, este método de producción de enzimas entrecruzadas (CLEs) tenía varios inconvenientes, como baja actividad, mala reproducibilidad, baja estabilidad mecánica y dificultades para manipular las CLEs gelatinosas. La estabilidad mecánica y la facilidad de manejo podrían mejorarse mediante el entrecruzamiento de la enzima en una matriz de gel o en un soporte, pero esto condujo a la pérdida de actividad. En consecuencia, a finales de la década de 1960, el auge de las enzimas unidas a soporte, se convirtió en la metodología industrial más utilizada para la inmovilización de enzimas durante las siguientes tres décadas.

4.5.4.1 Cristales de enzima entrecruzada CLECs

El entrecruzamiento de una enzima cristalina por glutaraldehído fue descrita por primera vez por Quiocho y Richards en 1964. Su objetivo principal era estabilizar los cristales enzimáticos para estudios de difracción de rayos X, pero también mostraron que la actividad catalítica se mantenía. El uso de cristales enzimáticos entrecruzados (CLEC) como biocatalizadores industriales fue usado por primera vez por científicos de Vertex Pharmaceuticals a principios de la década de 1990 y posteriormente comercializado por Altus Biologics. Los CLECs demostraron ser significativamente más estables a la desnaturalización por calor, disolventes orgánicos y proteólisis que la enzima soluble correspondiente o polvo liofilizado. Los CLECs son enzimas inmovilizadas robustas y altamente activas de tamaño de partícula controlable, que varían de 1 a 100 μm . Su estabilidad operativa y facilidad de reciclaje, junto con sus altas productividades catalizadoras y volumétricas, los hace ideales para biotransformaciones industriales. Como ejemplo, un CLEC de cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* exhibió una mayor estabilidad térmica y tolerancia a los

disolventes orgánicos que CPO libre [123].

4.5.4.2 Agregados de enzima entrecruzada CLEAs

Una desventaja inherente de los CLECs es la necesidad de cristalizar la enzima, que a menudo es un procedimiento laborioso que requiere enzima de alta pureza. Por otro lado, se sabe bien que la adición de sales, o disolventes orgánicos miscibles en agua o polímeros no iónicos, a soluciones acuosas de proteínas conduce a su precipitación como agregados físicos de moléculas de proteína, unidos por la unión no covalente sin alteración de su estructura terciaria, es decir, sin desnaturalización. Se dedujo que el posterior entrecruzamiento de estos agregados físicos los haría permanentemente insolubles manteniendo su superestructura previamente organizada y, por lo tanto, su actividad catalítica. De hecho, esto resultó ser el caso y condujo al desarrollo de una nueva familia de enzimas inmovilizadas: agregados de enzimas entrecruzadas (CLEA). Dado que la precipitación desde un medio acuoso, mediante la adición de sulfato de amonio o polietilenglicol, se utiliza a menudo para purificar enzimas, la metodología CLEA combina esencialmente la purificación y la inmovilización en una sola operación unitaria que no requiere una enzima altamente pura. Podría ser usadas, por ejemplo, para el aislamiento directo de una enzima, en un forma purificada e inmovilizada adecuada para biotransformaciones.

Los primeros ejemplos de CLEAs se realizaron con penicilina G amidasa, una enzima de importancia industrial utilizada en la síntesis de antibióticos semisintéticos de penicilina y cefalosporina. La enzima libre presenta una estabilidad térmica limitada y una baja tolerancia a los disolventes orgánicos, lo que la convierte en un candidato ideal para la estabilización por inmovilización. De hecho, los CLEAs de penicilina G amidasa, preparadas por precipitación con, por ejemplo, sulfato de amonio o tert-butanol, demostraron ser catalizadores eficaces para la síntesis de ampicilina [124].

Los CLEAs de CaLB también exhiben excelentes actividades en dióxido de carbono supercrítico y líquidos iónicos [50]. Así, CLEA de CaLB mostraron una actividad superior a la de Novozym[®] 435 en la resolución cinética de 1-feniletanol y 1-tetralol, por acilación con acetato de vinilo, en scCO₂. En la resolución cinética de 1-feniletanol y 1 feniletilamina en los líquidos iónicos, [bmim⁺][NO₃⁻] y [bmim⁺][N(CN)₂⁻]

se observaron los mejores resultados con CaLB absorbido y entrecruzado en un soporte de polipropileno (Accurel EP100). Por el contrario, CaLB libre o inmovilizada como Novozym[®] 435 se disuelve en estos líquidos iónicos con pérdida completa de actividad.

Una propiedad importante de los CLEA desde el punto de vista de las aplicaciones a gran escala es su tamaño de partícula, que obviamente tiene un efecto directo en las limitaciones de transferencia de masa y la capacidad de filtrado. Las concentraciones de enzima y glutaraldehído son, entre otros, factores importantes para determinar el tamaño de las partículas de los CLEAs, tal como se observó para la lipasa de *Candida rugosa* [125]. Para ella, se encontró una actividad óptima con partículas de 40–50 nm.

El glutaraldehído es generalmente el agente de entrecruzamiento más usado, ya que es barato y está fácilmente disponible en cantidades comerciales. Sin embargo, con algunas enzimas, por ejemplo, nitrilasas, a veces se observa una retención baja o nula de la actividad utilizando glutaraldehído como agente de entrecruzamiento. Una posible causa de la desactivación es la reacción del glutaraldehído con residuos de aminoácidos que son cruciales para la actividad de la enzima. Esto es debido a la alta reactividad y pequeño tamaño del glutaraldehído, lo que le permite penetrar en el interior de la proteína. Por lo tanto, la desactivación podría evitarse mediante el uso de polialdehídos voluminosos, obtenidos por oxidación con periodato de dextranos, como agente de entrecruzamiento [126], seguido de la reducción de los restos de base de Schiff con tetrahidruoborato de sodio para formar enlaces amina irreversibles. La retención de actividad de estos CLEAs fue generalmente mucho mayor que la observada con los CLEAs preparadas con glutaraldehído.

4.6 Ionogeles

Actualmente existe una necesidad de inmovilizar líquidos iónicos en dispositivos sólidos, manteniendo sus propiedades intactas. Para ello, una posibilidad es impregnar un soporte, utilizándose el líquido iónico adsorbido en la película. Esta idea se está desarrollando en catálisis soportada por líquidos iónicos (SILC), en la que los catalizadores metálicos se inmovilizan dentro de películas de líquido iónico sopor-

tadas en perlas de sílice, lo que da como resultado un polvo que fluye libremente y es particularmente adecuado para reactores continuos de lecho fijo [127, 128]. Otra forma de inmovilización implica la formación de una red tridimensional a través de la cual percola el líquido iónico y es responsable del comportamiento sólido del material resultante, llamado ionogel (o gel iónico). En realidad, si cualquier gel puede considerarse como una fase sólida y otra líquida que interactúan entre sí, en los ionogeles la presión de vapor insignificante y la estabilidad térmica de la fase líquida los hace materiales estables a lo largo del tiempo y permite usarlos hasta temperaturas mucho más altas que la ambiental.

Los ionogeles pueden clasificarse en geles físicos y químicos. En los geles físicos, la red interna tridimensional está entrecruzada a través de interacciones débiles (reversibles) (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, uniones cristalinas, etc.), mientras que en geles químicos el entrecruzado de la red resulta de la unión covalente. Los geles físicos se pueden obtener utilizando un gelificante orgánico (especies moleculares de baja masa molecular o polímeros) o un sólido dividido (por ejemplo, partículas de sílice fumante, nanotubos de carbono) que coagulan todo el conjunto. Sin embargo, los geles físicos presentan a menudo una consistencia en forma de pasta que limita su estabilidad mecánica. Otra posibilidad es crear geles químicos, insertando el líquido iónico en una red interconectada covalentemente. Típicamente, el entrecruzamiento químico de los polímeros mencionados anteriormente da como resultado matrices orgánicas muy resistentes mecánicamente.

Vale la pena subrayar que el carácter híbrido de los ionogeles se basa en la combinación de un líquido iónico y una red sólida. Se espera que las propiedades de los ionogeles deriven tanto de las de los líquidos iónicos como de las del componente que forma la red sólida. Como se mencionó anteriormente, este componente puede ser orgánico (óxido de polietileno, celulosa, etc.), inorgánico (nanotubos de carbono, sílice, etc.) u orgánico-inorgánico (silsesquioxano, etc.). Sin embargo, las propiedades pueden verse afectadas por el ensamblaje a escala nanométrica. Este es el caso en algunos ionogeles a base de polímeros orgánicos, en los que sólo se observa una transición vítrea a una temperatura inferior a la del polímero puro y superior a la del líquido iónico puro.

4.6.1 Preparación de ionogeles

Las rutas sintéticas de ionogeles se dividen en tres categorías dependiendo de la naturaleza de la red de tipo sólido, que puede ser orgánica (utilizando gelificantes o polímeros de bajo peso molecular), inorgánicas (normalmente utilizando nanopartículas de óxido, nanotubos de carbono), o compuestos híbridos orgánico-inorgánico (normalmente polímeros reforzados con rellenos inorgánicos).

4.6.1.1 Ionogeles orgánicos

Uso de gelificantes de bajo peso molecular. Los gelificantes de bajo peso molecular (LMWGs) son moléculas orgánicas, que se añaden en pequeñas cantidades a líquidos a temperatura elevada y luego inducen la formación física del gel al enfriarse. En realidad, los LMWG son capaces de autoensamblarse en solución mediante uniones intermoleculares tales como los enlaces de hidrógeno, interacciones $\pi - \pi$ o interacciones electrostáticas.

Geles de polímero. El uso de polímeros para inmovilizar los líquidos iónicos combinan la flexibilidad mecánica de un polímero y la conductividad característica de los líquidos iónicos. Estos materiales han sido ampliamente desarrollados, particularmente como materiales para dispositivos electroquímicos. Muchos de estos sistemas se obtienen simplemente mezclando el polímero y el líquido iónico junto con un disolvente que posteriormente es eliminado. Otra vía es la polimerización de monómeros en un líquido iónico utilizado como disolvente, pero la pérdida de miscibilidad por encima de un cierto grado de polimerización puede ser una limitación [129]. En este tipo de ionogeles, la clave es la capacidad de mezcla entre el líquido iónico y el polímero [130].

4.6.1.2 Ionogeles inorgánicos

Geles "Bucky". En estos geles se emplean nanotubos de carbono (tubos "bucky", CNT) que consisten en una lámina de grafeno enrollada con átomos de carbono con hibridación sp^2 y proporcionan buenas propiedades electrónicas y ópticas. Los CNT poseen extraordinarias propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas, sin embargo,

uno de los principales inconvenientes es que son difíciles de procesar. Un enfoque para aumentar la solubilidad y la procesabilidad es absorber moléculas orgánicas en sus superficies.

Ionogeles a base de sílice. Los ionogeles a base de sílice se pueden obtener ya sea mediante la dispersión de nanopartículas de sílice en los líquidos iónicos o mediante un procedimiento sol-gel.

4.6.1.3 Ionogeles híbridos orgánicos-inorgánicos

La incorporación de nanopartículas inorgánicas a ionogeles de polímeros se ha usado ampliamente para mejorar propiedades mecánicas. En consecuencia, es una forma de contrarrestar el efecto plastificante de las altas cargas de líquido iónico, preservando al mismo tiempo la flexibilidad y la docilidad de los materiales híbridos resultantes.

4.6.2 Aplicaciones de ionogeles

4.6.2.1 Membranas electrolíticas.

Los líquidos iónicos son de considerable interés para implementar dispositivos electroquímicos avanzados, específicamente dispositivos energéticos, cuyo desarrollo apunta hacia la búsqueda de energías renovables y la lucha contra el calentamiento global. Algunos de estos dispositivos son baterías de litio, células de combustible y células solares. De hecho, la sustitución de medios convencionales, disolventes orgánicos en baterías o agua en células de combustible de membrana de intercambio de protones (PEMFC), por líquidos iónicos no inflamables implica ventajas sobre las temperaturas de seguridad y funcionamiento superiores a 100°C.

4.6.2.2 Membranas de separación

Además de su uso como electrolitos, los líquidos iónicos también son bien conocidos por su capacidad para disolver una amplia gama de especies, desde compuestos orgánicos hasta sales metálicas. En realidad, las propiedades específicas de los líquidos iónicos amplían considerablemente la gama de aplicaciones de separación, desde

separaciones de iones metálicos hasta cromatografía. El diseño de iones específicos para una aplicación correcta y la combinación adecuada del anión y catión del líquido iónico permiten ajustar la capacidad de solvatación alta o selectiva y la no miscibilidad en agua u otros disolventes. Sin embargo, el desafío de implementar líquidos iónicos en técnicas de separación es también desarrollar membranas soportadas basadas en líquidos iónicos, ya sea inmovilizándolos dentro de membranas poliméricas o en soportes inorgánicos porosos [131].

Se ha demostrado la estabilidad operativa de las membranas soportadas de líquidos iónicos basadas en polímeros hidrófilos [94]. La naturaleza de la membrana polimérica soporte afecta fuertemente a las velocidades de transporte (es decir, permeabilidad) y a la selectividad en la separación de los productos orgánicos [91, 132]. Las membranas poliméricas selectivas de iones que involucran líquidos iónicos (normalmente sales de fosfonio), se utilizaron con éxito en sensores potenciométricos [133, 134]. En esos casos, el carácter hidrófobo del polímero (normalmente PMMA o PVC) podría prevenir la extracción espontánea no específica de iones de la muestra acuosa, mientras que el líquido iónico actúa como plastificante, mejorando la solubilidad y la migración de los analitos.

En 2015 Hernández-Fernández *et al.* [135] estudiaron una nueva aplicación de membranas de separación basadas en líquidos iónicos. En este caso, se proponía el uso de membranas de inclusión poliméricas basadas en líquidos iónicos (PILIMs) como membranas de intercambio protónico en pilas de combustible microbiano (MFC). Los líquidos iónicos empleados fueron $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ y cloruro de metiltrioctilamonio. Se usó PVC como polímero. En esta investigación se comprobó que la PILIM con el líquido iónico (70 % m/m) basado en amonio llegaba a alcanzar una potencia de 450 mW/m^3 y una disminución de la demanda química de oxígeno del 80 %. Además, un aumento de líquido iónico inmovilizado en la membrana implicaba un aumento en la potencia de la MFC, lo que significaba que el líquido iónico juega un importante papel en el transporte de protones a través de la membrana. De esta forma, se abría la posibilidad de estas PILIMs se incorporaran a MFC sustituyendo a las convencionales y costosas membranas de intercambio protónico tales como Nafion[®] y Ultrex[®].

Más recientemente, se ha analizado el transporte de nutrientes tales como CaCl_2

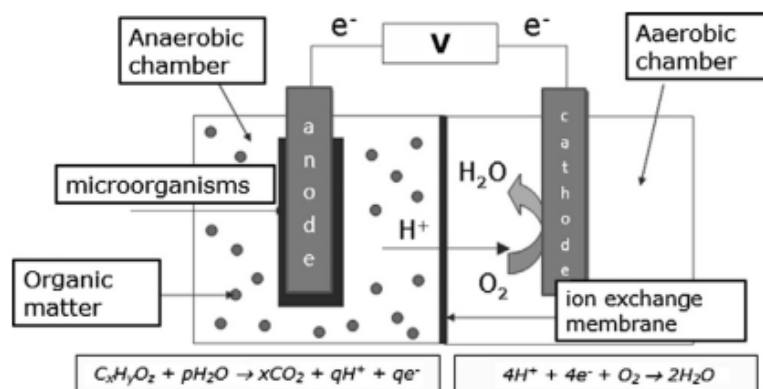


Figura 4.17. Esquema general de operación de una MFC [135].

y Na_2HPO_4 a través de PILIMs basadas en cloruro de metiltrioctilamonio [136]. En el caso de CaCl_2 , se observó una baja permeabilidad debido a su baja solubilidad en el líquido iónico. Sin embargo, Na_2HPO_4 fue más permeable y su permeabilidad aumentaba al aumentar la cantidad de líquido iónico presente en la membrana. Los resultados son prometedores en el campo de separación y purificación de mezclas salinas. El proceso se llevó a cabo en MFC de dos cámaras conteniendo algas en una de las mencionadas cámaras.

4.6.2.3 Membranas catalíticas

En SILC, donde el líquido iónico (que contiene el catalizador) se inmoviliza como una película delgada en soportes de gran superficie, ha sido ampliamente desarrollada para eludir los problemas de viscosidad y reciclaje [128, 131]. En este caso, los reactivos y productos se difunden a través del vacío residual que existen en los poros que han sido recubiertos con la película catalizadora líquida.

Se demostró que los ionogeles a base de sílice proporcionan una alternativa a los sistemas de nanorreactores [131]. La presencia de dos redes interpenetradas (sílice y líquido iónico) permite el libre transporte de reactivos y productos a través de la fase líquida, mientras que los diámetros de los poros son lo suficientemente pequeños como para evitar la lixiviación de líquido iónico [137].

4.6.2.4 Liberación de fármacos

Una aplicación reciente de los ionogeles es la liberación de fármacos. Contrariamente a las aplicaciones anteriores, esta última se basa en ionogeles que son capaces de perder gradualmente el líquido iónico. En otras palabras, mientras que todas las demás aplicaciones requieren la estabilidad completa de los ionogeles en las condiciones de funcionamiento, la liberación de fármacos implica la entrega *in situ* de la carga de líquido iónico.

Un problema frecuente con muchos ingredientes farmacéuticos activos (API) es su baja solubilidad. Como resultado, muchas líneas de investigación se llevan a cabo en la búsqueda de maneras de mejorar la solubilidad y disponibilidad de medicamentos. Se ha demostrado que los líquidos iónicos pueden disolver compuestos que son insolubles o escasamente solubles en agua y disolvente orgánico, incluyendo celulosa y compuestos que tienen actividad farmacéutica. Sin embargo, estos estudios estaban limitados por la cuestión toxicológica de los líquidos iónicos. Se han realizado algunos esfuerzos para obtener líquidos iónicos no tóxicos y biodegradables [138, 139]. Algunos componentes de los líquidos iónicos tienen actividad biológica, como los cationes de amonio que son bien conocidos como agentes antibacterianos. Recientemente, se han creado nuevos líquidos iónicos a partir de APIs, algunos de ellos combinando APIs aniónicos y catiónicos con actividades biológicas que se complementan entre sí. Estos nuevos fármacos-líquidos iónicos presentan ventajas prometedoras sobre las API sólidas habituales, que pueden sufrir conversión polimórfica, baja solubilidad y baja biodisponibilidad asociada con la forma sólida.

De hecho, la disponibilidad de las APIs es un problema clave. La industria farmacéutica está realizando un enorme esfuerzo para desarrollar sistemas de administración de medicamentos en los que la liberación de la sustancia activa se controla a demanda. Los portadores de fármacos que se consideran candidatos adecuados incluyen polímeros solubles, micropartículas hechas de polímeros naturales y sintéticos insolubles o biodegradables, microcápsulas, células, lipoproteínas, liposomas y micelas. Las matrices de sílice muestran alta biocompatibilidad: biodegradabilidad y resistencia al ataque microbiano y presentan una mayor resistencia mecánica, mayor estabilidad térmica, en comparación con la mayoría de los polímeros orgánicos. To-

das estas características hacen los soportes de sílice adecuados para la formulación de sistemas de administración de medicamentos. Varios grupos de investigación han publicado sobre el almacenamiento de medicamentos y las propiedades de administración de sílice mesoporosa tales como MCM-41 y SBA-15 y de materiales de sílice sol-gel [140]. El uso de ionogeles para aplicaciones biológicas es muy limitado hasta la fecha. Lin fue el primero en informar sobre la síntesis de materiales mesoporosos que contienen líquidos iónicos antibacterianos con largas cadenas alquílicas y su uso como dispositivo de liberación controlada [141]. Otros trabajos recientes informan de la síntesis de un nuevo fármaco que contiene líquido iónico compuesto de un catión imidazolio y anión ibuprofenato [142]. Se logró sintetizar ionogeles que contenían una alta cantidad de ibuprofeno por un procedimiento simple sol-gel de un solo paso. Estos ionogeles fueron fácilmente formados y no necesitan ningún proceso adicional para lograr una forma farmacéutica final. La liberación de ibuprofeno parece llevarse a cabo en las superficies internas y externas del ionogel y, por tanto, depende de la naturaleza química de la superficie.

5

Síntesis de butirato de butilo con CaLB en ionogeles a 30°C

5.1 Introducción

En las últimas décadas se ha demostrado que los líquidos iónicos pueden ser usados como medios de reacción y separación en biocatálisis con propiedades excelentes. Así por ejemplo, en operaciones de separación, se han usado como sistemas bifásicos líquido-líquido [143,144] y como fase líquida en membranas líquidas soportadas y en membranas de inclusión polimérica [145–147]. Como medio de reacción en biocatálisis, los líquidos iónicos se han usado bien directamente como disolventes [50,148], bien adsorbidos [76] o bien enlazados covalentemente a partículas [149]. En todos los casos, el objetivo era crear un microambiente adecuado para la enzima. Las ventajas del uso de líquidos iónicos sobre disolventes orgánicos como medios de reacción en biocatálisis incluye una mejora de la actividad, la selectividad e incluso, la estabilidad de la enzima [76]. Desde un punto de vista medio ambiental, la principal ventaja de los líquidos iónicos es su baja presión de vapor, evitando de esta forma, su emisión a la atmósfera.

Por otra parte, en muchas aplicaciones industriales, las enzimas deben ser inmovilizadas para incrementar su estabilidad en las condiciones de operación requeridas. Por ello, es necesario desarrollar protocolos simples y de bajo coste para mejorar las propiedades funcionales de las enzimas tales como la actividad, estabilidad y selectividad. Entre los diferentes métodos para inmovilización, la encapsulación es de particular interés debido a la simplicidad de la preparación y la disponibilidad de la biomolécula. El proceso de encapsulación está basado en el atrapamiento de la

enzima en la matriz de un polímero (gel) sin que exista una asociación covalente entre la red del polímero y la biomolécula [150]. Otra ventaja es la permeabilidad de la matriz, que podría modificarse a voluntad para permitir aumentar la selectividad del biocatalizador. Muy recientemente, el grupo de investigadores de *Pérez de los Ríos* ha desarrollado una nueva tecnología de inmovilización enzimática para lacasa mediante atrapamiento en ionogeles (geles basado en líquidos iónicos). Para ello, bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio, dihidrogenofosfato de colina y formiato de hidroxietilamonio han sido estudiados como constituyentes de la fase activa del ionogel. Usando una nueva formulación, la actividad y estabilidad de la enzima ha sido enormemente mejorada. Los nuevos derivados fueron aplicados también en reactores discontinuos para la decoloración del tinte antraquinónico *Remazol Brilliant Blue R* con excelentes resultados [151, 152].

En presente trabajo, un nuevo método de inmovilización ha sido aplicado a la lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) para la síntesis de esterés. De esta forma, se ha usado PVC como polímero en el cual se ha inmovilizado por oclusión una suspensión de líquido iónico con el enzima. Como líquido iónico se ha empleado hexafluorofosfato de 1-octil-3-imidazolio (figura 5.1) debido a que se ha demostrado que es un medio adecuado para CaLB [17]. En capítulos posteriores también se han analizado la actividad y estabilidad operacional del ionogel en función de la temperatura.

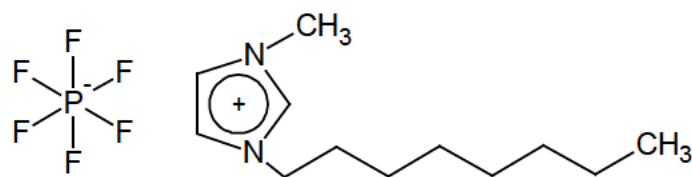


Figura 5.1. Hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil-imidazolio: $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Enzima

Se ha utilizado un preparado de lipasa B de *Candida antarctica* como biocatalizador suministrado por Novo España S.A., cuyo nombre comercial es *Lipozyme*[®]

CALB L. Se trata de una disolución acuosa de la enzima libre con pH de 4,5 y que contiene 14,2 mg de proteína por mL de disolución. Este último dato se ha determinado experimentalmente mediante el método de Lowry.



(a) CaLB

(b) [omim⁺][PF₆⁻]

Figura 5.2. Preparado enzimático comercial Lipozyme CaLB L (a) y presentación del líquido iónico [omim⁺][PF₆⁻] (b).

A partir de este preparado comercial se han realizado ionogeles con diferentes dosis de enzima:

- Usando el preparado comercial directamente, que equivaldría a una dosis de 16 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de derivado enzimático.
- Usando una disolución de la enzima comercial preparada con una disolución tampón de fosfato 20 mM a pH 7. Se trata de una dilución 1:4 del preparado enzimático comercial con una disolución tampón fosfato 20 mM a pH 7. En este caso el derivado contiene una dosis de 4 $\mu\text{L}/\text{mg}$.

Para la preparación de 100 mL de la disolución tampón de fosfato 20 mM a pH 7 se han utilizado $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en las siguientes cantidades: 0,272 g y 0,171 g respectivamente. Los cálculos fueron realizados sobre la ecuación de Henderson-Hasselbalch para el obtener el pH de una disolución reguladora, utilizando como pK_a el valor de 7,21 a 25°C.

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{HPO}_4^{-2}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

5.2.2 Líquido iónico

La nula presión de vapor de los líquidos iónicos los ha convertido en los candidatos idóneos para sustituir a los disolventes orgánicos convencionales como medio de reacción en procesos enzimáticos. Uno de los objetivos que pretende esta investigación es desarrollar derivados inmovilizados mediante técnicas de oclusión que incorporen líquidos iónicos. La idea se orienta a mejorar los valores de estabilidad y actividad de los derivados enzimáticos en relación a la enzima libre, así como la de permitir su reutilización y por lo tanto, reducir los costes de los procesos donde se empleen.

El comportamiento de la enzima CaLB en medio líquido iónico se analiza considerando dos de sus propiedades: su carácter nucleófilo y su propiedades hidrófilas. Respecto a estas últimas, para líquidos iónicos basados en el catión imidazolio, su carácter hidrófilo aumenta conforme lo hace la longitud de la cadena del sustituyente alquílico [110]. De esta forma, la actividad sintética de la enzima aumenta con el carácter hidrófobo del líquido iónico inmiscible en agua, ya que preserva la hidratación de la enzima necesaria para el mantenimiento de su conformación activa. En lo que se refiere a su carácter nucleófilo, la actividad de la enzima CaLB es mayor en los líquidos iónicos que basados en el anión $[\text{PF}_6^-]$ menos nucleófilo que, por ejemplo, el anión $[\text{NTf}_2^-]$ [153]. Esta mayor actividad enzimática se debería a que un alto carácter nucleófilo del líquido iónico conlleva mayor interacción con la enzima y por tanto, una mayor modificación de la configuración activa de la proteína [15, 49]. Sin embargo, varios autores coincidieron al encontrar que la velocidad de reacción usando $[\text{bmim}^+][\text{NTf}_2^-]$ era mayor que al usar $[\text{bmim}^+][\text{PF}_6^-]$ [24, 25]. Se considera que la selectividad de los líquidos iónicos inmiscibles con agua se deben a la diferente capacidad de disminuir la actividad del agua en el microentorno de la enzima. Así pues, el aumento del carácter hidrófobo de los líquidos iónicos inmiscibles con agua provoca que la cantidad de agua libre en el medio sea mayor, pudiendo comportarse como aceptores nucleófilos en la reacción generando el ácido carboxílico correspondiente y disminuyendo la selectividad.

Por otro lado, la actividad de los líquidos iónicos solubles en agua es menor que la de los inmiscibles. El mayor carácter nucleófilo de los aniones que constituyen los

líquidos iónicos miscibles con agua y por tanto, su mayor carácter hidrófilo, hace que puedan fijar moléculas de agua del medio, con lo que la reacción de hidrólisis se ve atenuada.

Resumiendo, los líquidos iónicos más adecuados son los que disponen de un catión más hidrófobo y un anión menos nucleófilo. De acuerdo con los resultados de investigadores como *Pérez de los Ríos*, el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio proporcionó los mejores valores de selectividad y actividad y por tanto, fue elegido para la fabricación de los ionogel empleados en el presente trabajo. Este líquido iónico fue suministrado por la compañía alemana *Ionic Liquids Technologies* (io-li-tec). Su peso molecular es 340,29 g/mol y su pureza es de 99% v/v (figura 5.2(b)).

5.2.3 Preparación del derivado inmovilizado: inmovilización de la enzima CaLB libre en geles basados en líquido iónico (Ionogel)

La enzima CaLB libre se ha inmovilizado por oclusión en ionogel basados en el líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$. Los derivados enzimáticos ionogel fueron preparados usando PVC y líquido iónico al 50%. El procedimiento general de preparación fue el siguiente: un mililitro de THF fue añadido sobre 200 μL de líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ (donde era apropiado, ver tabla 5.1) y la mezcla se mantuvo en agitación a 600 rpm (figura 5.3(a)) hasta homogeneidad perceptible. Posteriormente, 100 μL del preparado comercial de CaLB (14,2 mg/mL) o de la disolución 1:4 en tampón fosfato (20 mM, pH = 7) fueron añadidos a la mezcla de líquido iónico disuelta en THF mientras continuaba la agitación.

Finalmente, se fueron aportando 200 mg de PVC muy lentamente mientras se mantenía la agitación. También se añadió un mililitro de THF para facilitar la disolución del PVC. Se dio por finalizado el proceso cuando el medio estaba homogéneo. En ese momento, el agitador magnético fue retirado del medio y todo el contenido fue vertido sobre unos anillos colocados sobre un soporte de vidrio (figura 5.3(b)). La mezcla se depositó durante 48 horas en una cámara de flujo controlado para evaporar el THF mientras el PVC iba ocluyendo al líquido iónico y a la enzima en

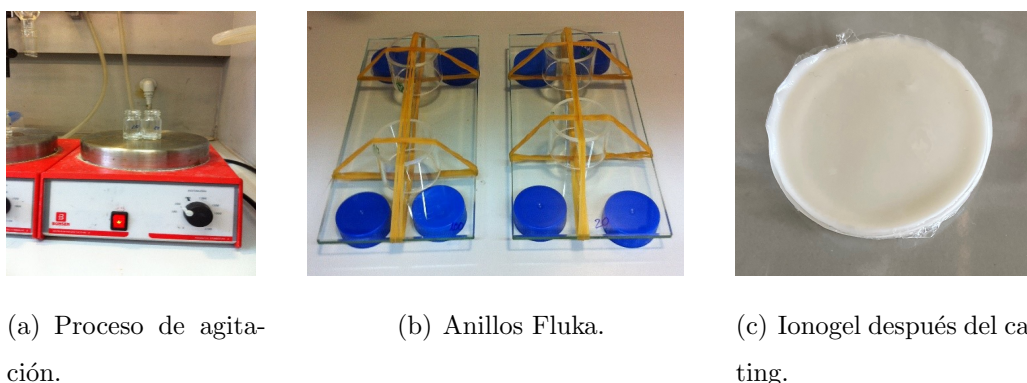


Figura 5.3. En estos anillos (b) colocados sobre una placa de vidrio se forman los derivados enzimáticos en un proceso de casting. Después de 48 horas en cámara de aspiración de flujo, los derivados se separan de los anillos, obteniéndose en su forma característica (c).

su seno. Después del tiempo de secado, la mezcla se encontraba gelificada sobre el vidrio y adaptada a la forma del anillo (figura 5.3(c)). Una vez retirada del anillo, el derivado enzimático ionogel mantiene la forma circular y fue triturada para usar en los reactores como se muestra en la figura 5.11(b). Los diferentes derivados enzimáticos preparados para experimentación a 30°C se muestran en la tabla 5.1.

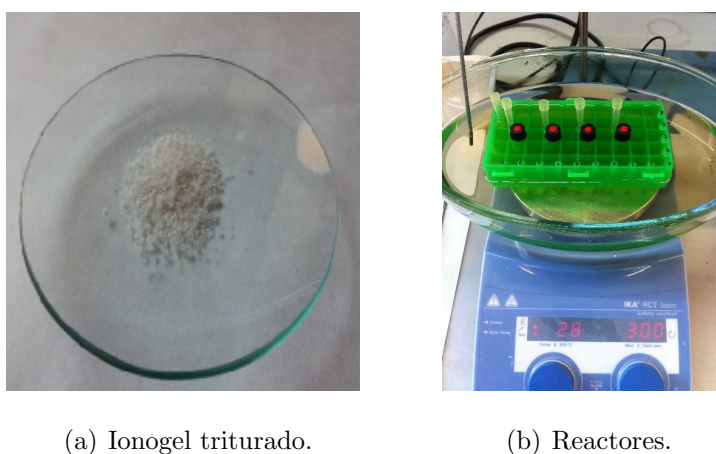


Figura 5.4. El Ionogel triturado (a) se coloca en los viales junto con los reactivos constituyendo los reactores (b) donde tiene lugar el proceso de reacción a temperatura controlada.

Tabla 5.1. Composición química de los diferentes derivados enzimáticos Ionogel probados a 30°C. Se muestra en negrita la designación que se ha asignado a cada uno de ellos.

Derivado	Enzima (μL)	Líquido iónico (mg)	PVC (mg)	Proteína en el reactor (80 mg del organogel)
Enzima libre Enz	100 (14.2 mg prot/mL)	0	0	1.420
Derivado enzimático PVC sin LI Enz-PVC	100 (14.2 mg prot/mL)	0	200	0.379
Derivado enzimático PVC con tampón (B) sin LI Enz-PVC-B	100 (3.55 mg prot/mL)*	0	200	0.095
Derivado enzimático Ionogel sin tampón Enz-Ionogel	100 (14.2 mg prot/mL)	200	200	0.227
Derivado enzimático Ionogel y tampón Enz-Ionogel-B	100 (3.55 mg prot/mL)*	200	200	0.057

* 1:4 en tampón fosfato

5.2.4 Actividad, conversión y estabilidad de los nuevos derivados enzimáticos de ionogel

Se ha usado la síntesis de butirato de butilo a partir de butirato de vinilo y 1-butanol como reacción modelo para la determinación de la actividad, conversión y estabilidad de los biocatalizadores (figura 5.5). Así pues, 0,5 mL de disolución de butirato de vinilo 300 mM y 0,5 mL de 1-butanol 300 mM se introdujeron en un vial de 2 mL de capacidad. La reacción comenzó en el momento en el que se produjo la adición de 80 mg de derivado de CaLB (Ionogel) o de enzima libre (1,42 o 0,355 mg

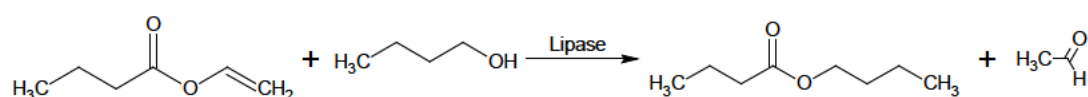


Figura 5.5. Síntesis de butirato de butilo a partir de butirato de vinilo y 1-butanol catalizada por CaLB.

de proteína, respectivamente) al vial con los reactivos. El proceso se desarrolló con

agitación durante 300 minutos a una temperatura de 30°C. A tiempos previamente establecidos, se tomaron alícuotas de 30 μL , que se añadieron a viales con 920 μL de hexano y 50 μL de ácido valérico 100 *mM* usado como estándar interno. La solución resultante fue analizada por GC. Todos los experimentos se llevaron a cabo, al menos, por duplicado y se trabajó con los valores medios encontrados. La eficacia de los ionogeles como catalizadores se analizó por medio de:

- La actividad sintética. Definida como la cantidad de milimoles de butirato de butilo por minuto y miligramo de proteína. Una unidad (U) producirá μmol de butirato de butilo por minuto.
- La conversión final a 300 minutos.

También se ensayaron soluciones de 100 μL de CaLB libre con el fin de establecer una comparativa entre la eficiencia de la enzima libre y la de la enzima inmovilizada.

5.2.5 Análisis cromatográfico

El análisis químico cuantitativo de las muestras se realizó en un cromatógrafo de gases modelo 450 GC Bruker que dispone de un detector de ionización de llama (FID) y un inyector automático de muestras. El modelo de la columna capilar empleada fue HP-INNOWAX (30 m longitud, 0,25 mm de diámetro nominal y 0,25 μm de espesor) de la firma J. and W. Scientific.

5.2.5.1 Condiciones de operación del cromatógrafo

El perfil de temperaturas para conseguir la resolución total en los picos correspondientes a cada uno de los componentes de la mezcla butirato de vinilo, 1-butanol, butirato de butilo y ácido butírico se muestra en la figura 5.6.

La muestra se inyecta en el GC a un flujo constante de 1 mL/min a una temperatura de 210°C en la cabeza de la columna. El split programado es 1:10. A título ilustrativo, se muestra un cromatograma tipo en la figura 5.7. Se aprecian con claridad los picos bien resueltos de cada una de las sustancias que participan en el análisis. Todos los picos están perfectamente separados, aislados e identificados. Así pues, el butirato de vinilo muestra un pico a 4 minutos de la inyección de la muestra.

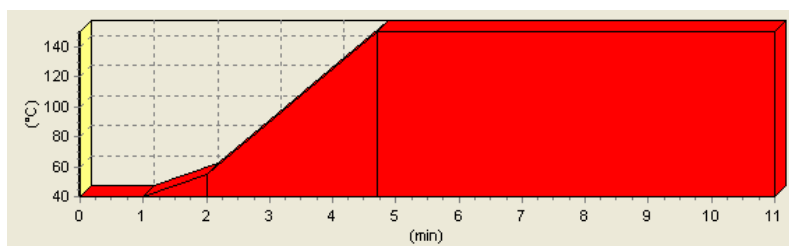


Figura 5.6. Perfil de temperaturas establecido en el horno del cromatógrafo de gases para el análisis de los diferentes componentes de las muestras.

Es seguido por otro a 4,6 minutos, 1-butanol. A continuación, el butirato de butilo, a 5 minutos. A 7,9 minutos, aparece el pico que corresponde al ácido butírico y, por último, a 9,4 minutos, el ácido valérico (usado como patrón interno).

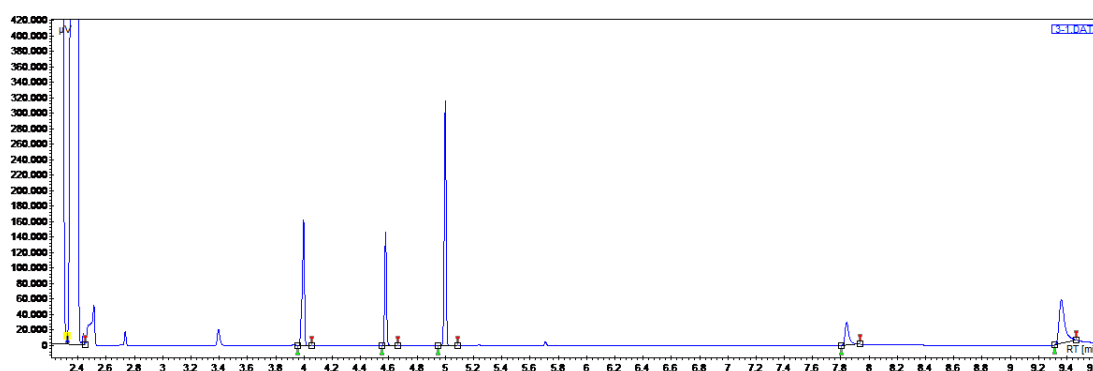


Figura 5.7. Cromatograma de la mezcla de reacción, butanol, vinil butirato, butirato de butilo y ácido butírico.

5.2.5.2 Calibración del método cromatográfico

El calibrado se realiza preparando disoluciones de concentración conocida y dentro del intervalo de trabajo: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mM en cada una de las especies químicas que intervienen en el proceso. Se fijó en 5 mM la concentración del estándar interno en todas las muestras.

De la representación de la relación de concentración de cada sustancia y del estándar interno frente a la relación de áreas de cada sustancia y del estándar interno se obtienen líneas rectas cuyas pendientes se representan en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Coeficientes de las regresiones lineales correspondientes al calibrado de las distintas especies químicas que intervienen en el proceso.

Especie química	Pendiente	R^2
Butirato de vinilo	0.514	0.9918
1-butanol	0.717	0.9899
Butirato de butilo	0.326	0.9880
Ácido butírico	1.357	0.9962

5.2.6 Determinación de la actividad y selectividad de la enzima

De las muestras tomadas de los viales de 2 mL (ver figura 5.11(b)), se obtuvieron las concentraciones de las especies químicas presentes a lo largo del tiempo de reacción. De esta forma, se construyeron los perfiles de reacción del proceso. En la figura se aprecia claramente cómo van disminuyendo las concentraciones de los dos reactivos, butirato de vinilo y butanol, al mismo tiempo que aumenta la concentración del producto, butirato de butilo. El ácido butírico, producto de reacción de hidrólisis, no ha sido detectado en ningún análisis. Este hecho es muy destacable y se considera provocado por la escasa o nula cantidad de agua presente en el medio de reacción.

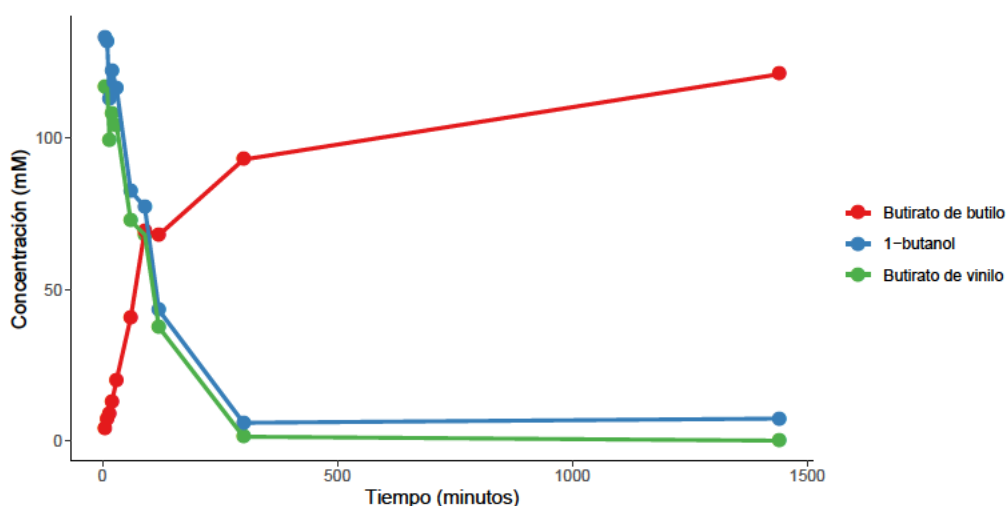


Figura 5.8. Ejemplo de evolución a lo largo de tiempo de reacción de las concentraciones de las especies químicas detectadas en los análisis cromatográficos de un reactor con ionogel a 30°C.

La acción enzimática de los ionogeles se ha cuantificado mediante dos magnitu-

des: la actividad sintética y la selectividad.

- La actividad específica de la enzima se puede definir como unidades de actividad sintética por miligramo de proteína. Se define una unidad de actividad sintética como la cantidad de enzima que es capaz de realizar la síntesis de $1\mu\text{mol}$ de éster alquílico (butirato de butilo) por minuto. Se calcula a través de la siguiente expresión:

$$A_e = \frac{m_{BB} \cdot V_R \cdot 10^6}{C_{CaLB} \cdot V_{CaLB}} \quad (5.1)$$

Donde m_{BB} es la pendiente inicial de la curva de síntesis de butirato de butilo expresada en $\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$; V_R es el volumen total de reacción (1 mL); C_{CaLB} es la concentración de proteína en el preparado enzimático ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); y V_{CaLB} es el volumen de preparado enzimático utilizado (μL).

La actividad residual se refiere al cociente de la actividad específica en un determinado tiempo y la actividad específica inicial.

- La selectividad de la reacción se puede definir como el porcentaje de sustrato consumido que se transforma en el producto principal de la reacción. Se puede calcular a partir de las pendientes iniciales del perfil de reacción:

$$Se(\%) = \frac{m_{BB}}{m_{BB} + m_{AB}} \cdot 100 \quad (5.2)$$

Siendo m_{BB} la pendiente inicial de la curva de síntesis de butirato de butilo y m_{AB} la pendiente inicial de la curva de síntesis del ácido butírico, ambas expresadas en $\text{mol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$.

Como se ha mencionado anteriormente, el ácido butírico no ha sido detectado en ningún análisis de las muestras del proceso, aunque ha sido identificado en los análisis de las rectas de calibrado. Este hecho junto a la escasa presencia de agua en el sistema nos lleva a considerar que la selectividad de la enzima es del 100%.

5.2.7 Determinación de la pendiente inicial de butirato de butilo

La pendiente de la curva de formación de butirato de butilo es un factor decisivo en la cuantificación del proceso de reacción. Este valor se encuentra en las expresiones 5.1 y 5.2 y su cálculo merece un epígrafe específico.

El procedimiento seguido para el cálculo de la pendiente inicial de la curva de formación de butirato de butilo se basa en la obtención de una expresión matemática mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados usando el algoritmo de Marquardt. Al tratarse de un ajuste no lineal es necesario proponer la expresión que se considera que mejor ajusta al proceso. El criterio seguido para la elección de la más adecuada de entre todas las propuestas es la que minimiza la suma de cuadrados de los residuos. También se ha observado el criterio de información de Akaike. De esta forma, la curva que ajusta mejor al perfil de formación de butirato de butilo es la que responde a una cinética de Michaelis-Menten:

$$\text{Concentración} = \frac{a \cdot \text{tiempo}}{b + \text{tiempo}} \quad (5.3)$$

Para la realización de estos cálculos se ha implementado un procedimiento con el lenguaje de programación R, usando *RStudio* como entorno de desarrollo integrado (IDE). Este software es libre y de código abierto, motivo por el que ha sido empleado en el tratamiento de datos y obtención de gráficos en esta tesis.

Una vez seleccionada la expresión que proporciona la concentración de butirato de butilo en función del tiempo de reacción, solo queda obtener su derivada y sustituir para cero minutos. Así, se obtiene la pendiente de la recta tangente a la curva en el mencionado tiempo. La figura 5.9 muestra un ejemplo del gráfico obtenido mediante el procedimiento relatado. En la mencionada figura, los datos experimentales de concentración frente a tiempo están representados por los puntos azules. La línea verde corresponde a la curva obtenida por ajuste no lineal por mínimos cuadrados (ecuación 5.3). Los valores de los coeficientes a y b obtenidos en el ejemplo son 118,916 y 67,851 respectivamente. Por último, la recta roja corresponde a la tangente a la curva para tiempo cero minutos y el valor de su pendiente es 1,7526.

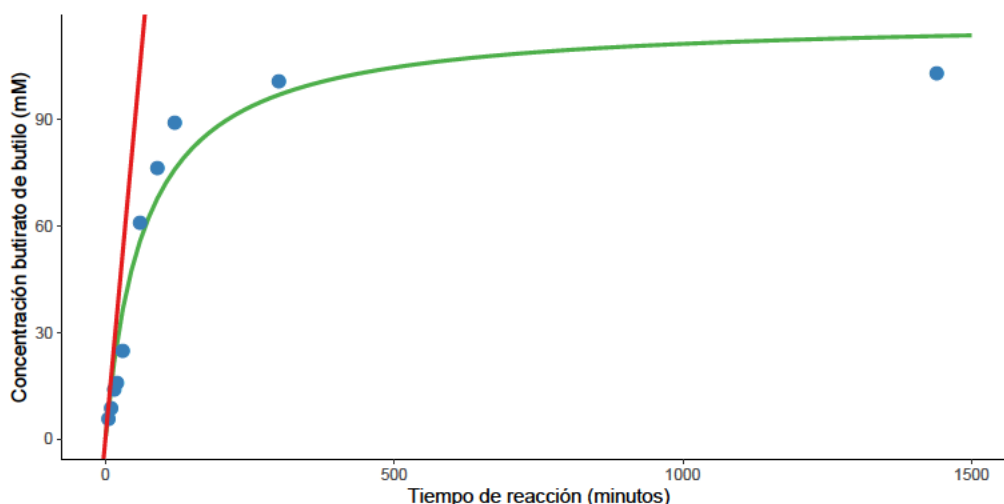


Figura 5.9. Obtención de la pendiente inicial de la curva de formación del butirato de butilo. Los datos experimentales de concentración frente a tiempo están representados por los puntos azules. La línea verde corresponde a la curva obtenida por ajuste no lineal por mínimos cuadrados. Los valores de los coeficientes a y b obtenidos en el ejemplo son 118,916 y 67,851 respectivamente. Por último, la recta roja corresponde a la tangente a la curva para tiempo cero minutos y el valor de su pendiente es 1,7526.

5.2.8 Conversión

La conversión se define como el porcentaje de butirato de vinilo convertido en butirato de butilo y ácido butírico en un determinado instante del proceso de reacción. A partir de las concentraciones de butirato de butilo y ácido butírico en un determinado instante y la concentración inicial de butirato de vinilo, se puede determinar la conversión alcanzada en ese preciso momento mediante la siguiente expresión:

$$\text{conversión (\%)} = \frac{C_{t,BB} + C_{t,AB}}{C_{o,BV}} \cdot 100 \quad (5.4)$$

Donde $C_{t,BB}$ y $C_{t,AB}$ son las concentraciones de butirato de butilo y ácido butírico respectivamente en el instante t y $C_{o,BV}$ es la concentración de butirato de vinilo inicialmente.

En la figura 5.10 se muestra un gráfico correspondiente a un ionogel del tipo *Enz-ionogel*, en el que se aprecia cómo va aumentando la conversión a medida que la reacción va transcurriendo. Llegado un momento, la reacción se puede dar por finalizada, no aumenta el nivel de conversión alcanzado.

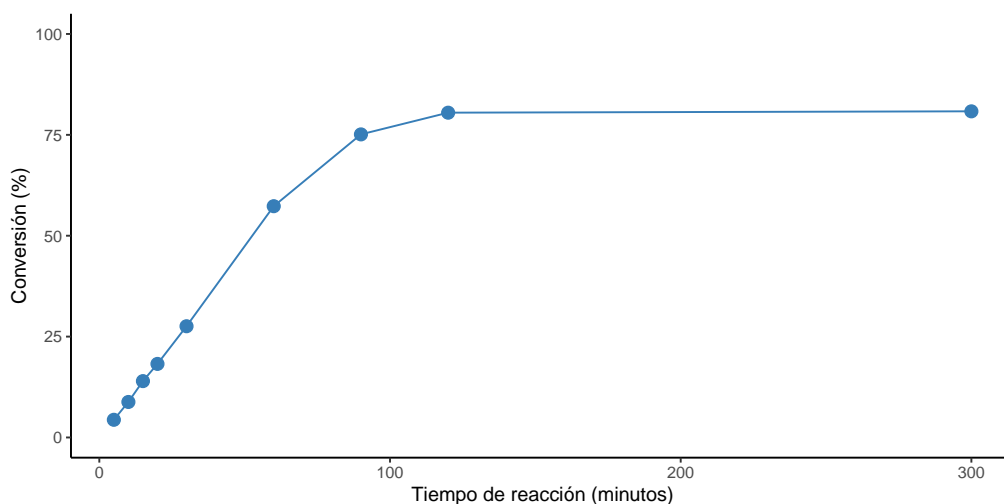
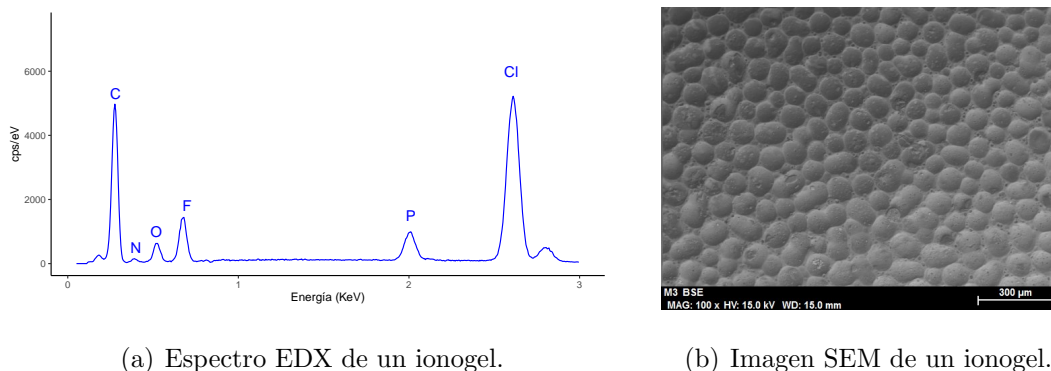


Figura 5.10. Porcentaje de conversión en un ionogel de tipo *Enz-ionogel* a lo largo del proceso de reacción.

5.2.9 Análisis SEM-EDX

La microscopía electrónica de barrido con espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (SEM-EDX) es una técnica muy poderosa aplicada a microimagen en ionogeles. Las imágenes SEM fueron capturadas por un equipo Hitachi S-3500N siguiendo el protocolo establecido por el SAIT (Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica de la Universidad Politécnica de Cartagena). El mismo equipo proporciona una inmensa base de datos para cada imagen que permite obtener el perfil EDX y la composición porcentual de cada derivado. Se muestran ejemplos de espectro e imagen en la figura 5.11.



(a) Espectro EDX de un ionogel.

(b) Imagen SEM de un ionogel.

Figura 5.11. Espectro EDX e imagen SEM de un ionogel capturados por un equipo Hitachi S-3500N.

5.3 Resultados y discusión

Como se ha ido comentando a lo largo del capítulo, la enzima CaLB ha sido inmovilizada por atrapamiento en una matriz polimérica de PVC junto con el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio ($[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$). Estos nuevos derivados enzimáticos han sido llamados ionogeles de CaLB. Como medio en esta reacción de transesterificación, se ha usado el líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ debido a que proporciona un microambiente muy adecuado a la enzima CaLB ya que le confiere una mayor actividad enzimática que el hexano (considerado como el disolvente orgánico de referencia) y otros líquidos iónicos basados en imidazolio con longitudes de cadena alquílicas más bajas [11, 17, 58, 148].

En este contexto, el método de atrapamiento con líquido iónico permite la inmovilización de la enzima por oclusión de CaLB dentro de un microambiente adecuado, haciendo posible la retención de la enzima y permitiendo la circulación de sustratos y productos de reacción. Así pues, si el líquido iónico fuera un buen disolvente de los sustratos de reacción, su concentración podría ser mayor en el microambiente que rodea a la enzima y la cinética del proceso se vería muy favorecida.

Todos los derivados enzimáticos, relacionados en la tabla 5.1, fueron empleados en la síntesis de butirato de butilo como reacción modelo. Como en todo proceso controlado cinéticamente y catalizado por una serina hidrolasa (CaLB), la transformación de butirato de vinilo es altamente dependiente de los aceptores nucleófilos presentes en el medio de reacción e implica una distribución competitiva de los rápidamente formados intermedios acil-enzima entre agua (hidrólisis) u otro agente nucleófilo, tal como 1-butanol (transesterificación) (figura 5.5).

Según se detalla en la figura 5.12, primero el butirato de vinilo forma con la enzima un complejo que puede evolucionar de forma diferente según la concentración de alcohol y agua en el medio (ambos actúan como segundo sustrato). El alcohol puede reaccionar con el complejo enzima sustrato dando lugar al producto de síntesis (éster alquílico), mientras que el agua presente en el medio también puede reaccionar con el complejo enzima-sustrato, dando lugar al producto de hidrólisis (ácido carboxílico), que disminuye el rendimiento de la reacción sintética y con ello, la selectividad. Como la constante de la reacción hidrólisis es mayor que la constante de la reacción

de síntesis, es necesario que la concentración de alcohol en el medio sea mucho mayor que la de agua. De esta forma, se obtiene una selectividad aceptable de la reacción.

El alcohol vinílico (forma enol) sintetizado a través de las dos rutas catalíticas evoluciona por tautomerización ceto-enol hacia la formación de acetaldehído (forma ceto). Este acetaldehído es muy volátil (punto de ebullición 20°C) y se evapora rápidamente. Al desaparecer uno de los productos de reacción, equilibrio se desplaza hacia la derecha y el resultado es un proceso irreversible *de facto*.

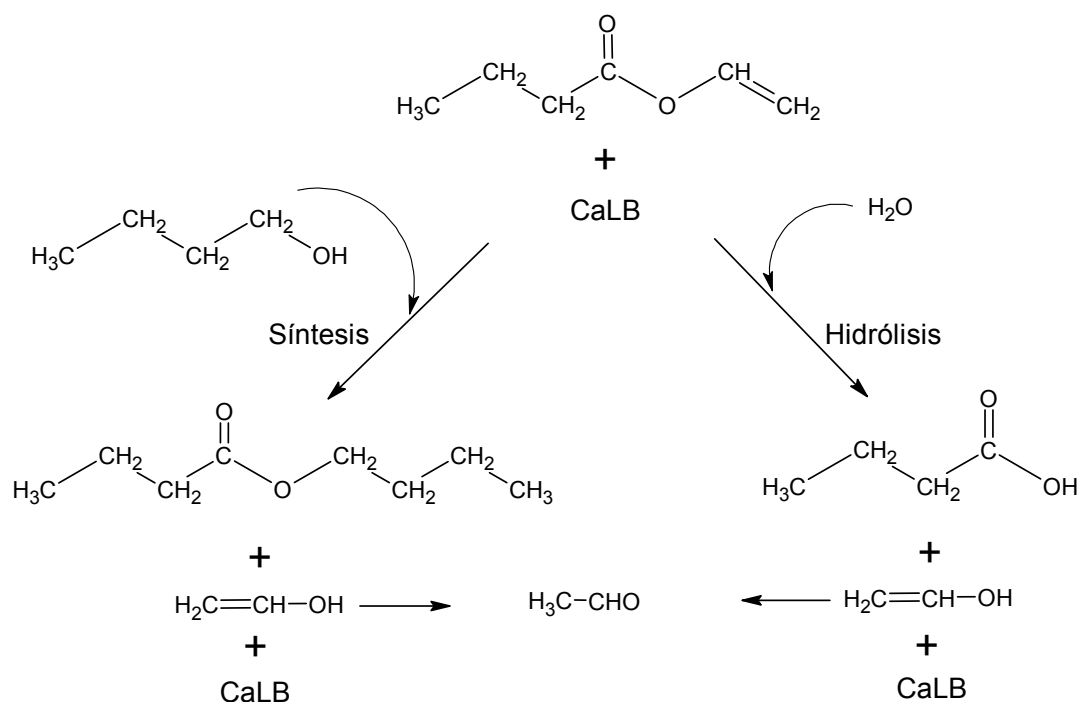


Figura 5.12. Esquema estequiométrico de la síntesis de ésteres controlada cinéticamente mediante transesterificación de vinilésteres y alcoholes catalizada por CaLB.

Concluyendo, para dar prioridad a la síntesis se hace necesario que:

$$K_h \times [H_2O] \ll K_s \times [\text{butanol}]$$

donde $[H_2O]$ es la concentración de agua en el medio, $[\text{butanol}]$ es la concentración del segundo sustrato, y K_h y K_s son las constantes de hidrólisis y de síntesis, respectivamente. Por lo tanto, si no hay agua, el butirato de butilo será el producto principal de la reacción.

Concretando, la vía de síntesis puede ser favorecida usando donadores de grupos acilo activados tales como vinil-ésteres, medios con bajo contenido en agua y alta

concentración de nucleófilo (por ejemplo, 1-butanol). La eficiencia de la acción catalítica puede ser medida a través de dos parámetros: la velocidad de síntesis y la conversión al final de la reacción (figura 5.13). La enzima libre también ha sido analizada para establecer unos valores de referencia con los que comparar los obtenidos con la enzima inmovilizada.

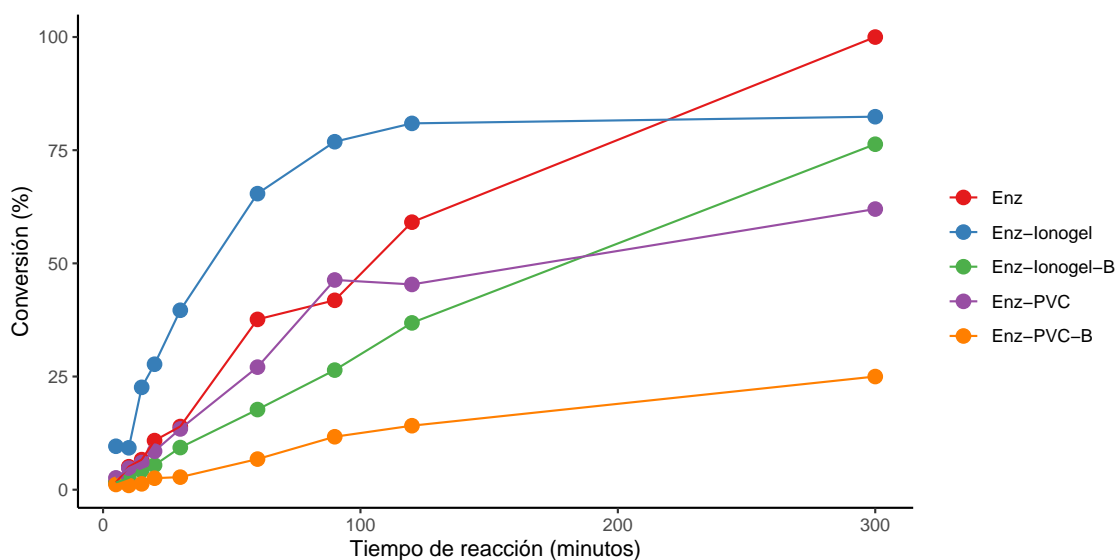


Figura 5.13. Transcurso de la reacción de síntesis de butirato de butilo a partir de butirato de vinilo 150 mM y 1-butanol 150 mM a 30°C para diferentes derivados enzimáticos. La actividad sintética fue calculada mediante la pendiente inicial y la conversión se obtuvo al final de la reacción (300 minutos).

Como se aprecia en la figura 5.14, el ionogel de CaLB con $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ y sin tapón fosfato (enzima sin diluir) muestra el mejor valor de actividad con un valor de conversión superior al 80 %, cifras que son superiores a las de la enzima libre.

De la comparación de los valores de actividad de los derivados *Enz-Ionogel* se desprende, como conclusión más importante, que la actividad de la enzima inmovilizada de esta forma es mayor que la de la enzima libre. Estos resultados son especialmente trascendentes ya que lo normal es que la inmovilización de la enzima sea un proceso que disminuye su actividad. El nuevo método de inmovilización que emplea líquidos iónicos ha logrado superar esta barrera, siempre presente en los derivados enzimáticos convencionales.

También se observa que la inmovilización de la enzima en soporte de PVC sin líquido iónico muestra los peores valores de actividad. Además, la comparación de

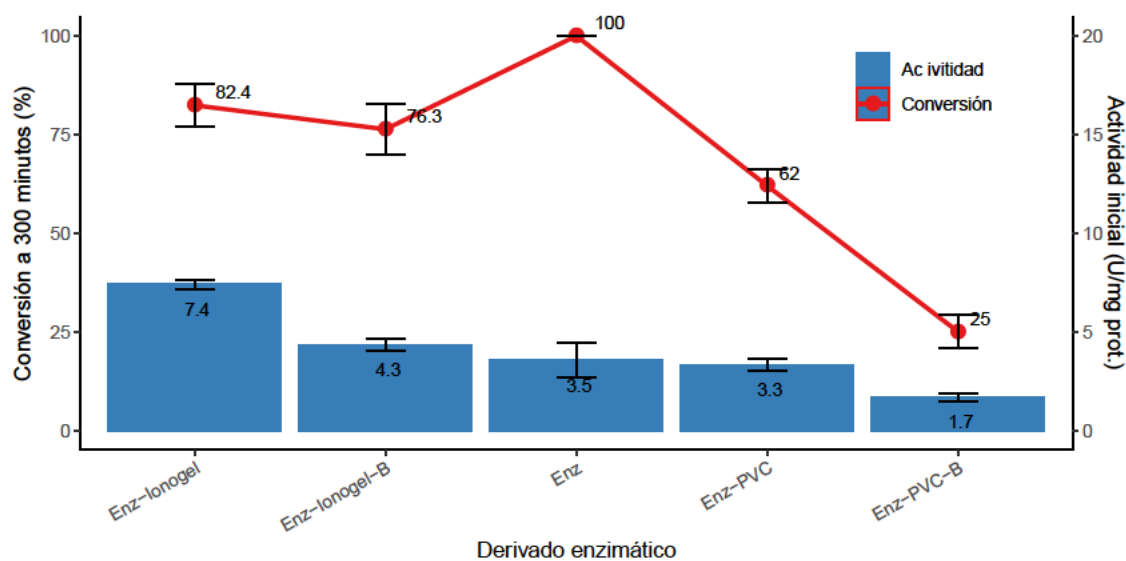
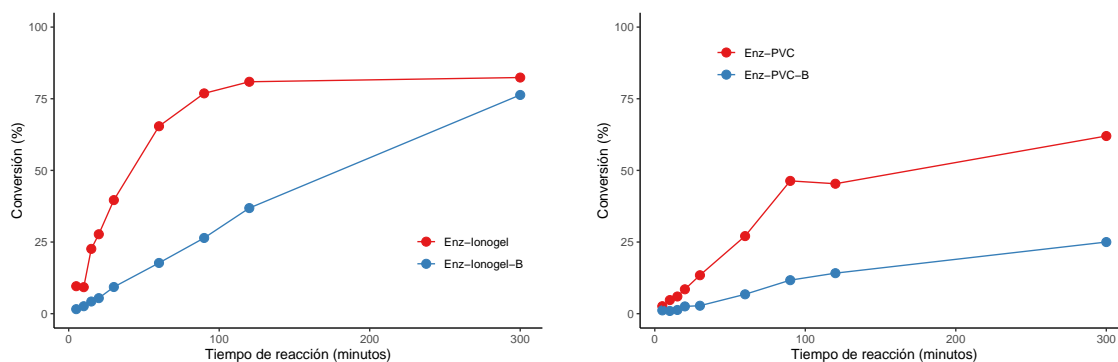


Figura 5.14. Actividad y conversión exhibidas por CaLB para la síntesis de butirato de butilo en diferentes derivados y con la enzima libre a 30°C.

derivados enzimáticos con líquidos iónicos y sin líquidos iónicos (por ejemplo, *Enz-PVC-B* frente a *Enz-Ionogel-B* y *Enz-PVC* frente a *Enz-Ionogel*) demuestran la importancia de usar líquido iónico en la preparación de los derivados inmovilizados. Como se comentó anteriormente, el aumento de la actividad podría deberse al adecuado microambiente alrededor de la enzima creado por el líquido iónico. Pero también, por un aumento en la concentración de sustratos en el microambiente del líquido iónico en la enzima. En este método de inmovilización, se debe considerar que la enzima está atrapada por el líquido iónico y el PVC. El líquido iónico podría absorber los sustratos incrementando la concentración de ellos en el microambiente de la enzima. Sobre este aspecto, la relación de distribución de butirato de vinilo, butanol y butirato de butilo entre líquido iónico y hexano fue estudiada por Hernández-Fernández et al. en 2010 [144]. Las constantes de reparto de butirato de vinilo, butanol y butirato de butilo entre $[omim^+][PF_6^-]$ y hexano fue de 0,68, 3,63 y 0,35, respectivamente. Al menos, estas constantes de reparto podrían aumentar la concentración del butanol en el microentorno de la enzima y eliminar el butirato de butilo (producto de reacción) del microambiente de la enzima. Estos hechos podrían mejorar la cinética de la biorreacción. Por otro lado, se ha demostrado en la bibliografía que el uso de la inmovilización enzimática implica enzimas más estables a cambio de una menor actividad. Como comentamos anteriormente, la principal

ventaja de este método es que permite crear más derivados activos que en el caso de la enzima libre como se puede observar en la figura 5.14.

De los resultados de porcentaje de conversión a 300 minutos, se desprende que en los ionogeles producidos con líquido iónico la conversión es mayor que en los que no contienen el líquido iónico. Los ionogeles con líquido iónico se comportaron mejor que sus homólogos sin $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$. La razón que se puede esgrimir es similar a la proporcionada para la actividad: el líquido iónico proporciona un microentorno óptimo para el desarrollo propio de la actividad enzimática.



(a) Conversión en ionogeles con líquido iónico. (b) Conversión en derivados sin líquido iónico.

Figura 5.15. Gráficos comparativos de conversión en ionogeles a 30°C.

También la forma de los perfiles de conversión de los derivados parecen confirmar que el microentorno creado alrededor de la enzima es un factor decisivo en el transcurso de la reacción. En la figura 5.15 se muestran agrupados por parejas los perfiles de reacción de los ionogeles con líquido iónico y los que no lo contienen. En ambos casos la mayor cantidad de enzima provoca que la reacción transcurra más rápido desde el inicio del proceso. La reacción avanza más lentamente (pendiente más suave) con menor dosis de enzima, sin embargo, los niveles de conversión alcanzados a los 300 minutos no difieren sustancialmente. De la misma forma, la presencia de líquido iónico hace que las pendientes y las conversiones finales sean más pronunciadas.

5.3.1 Caracterización SEM-EDX de los ionogeles

Los derivados enzimáticos ionogeles, hechos a partir de líquido iónico hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, PVC y enzima, fueron sometidos a análisis SEM-EDX antes y después de ser triturados y antes y después de ser usados.

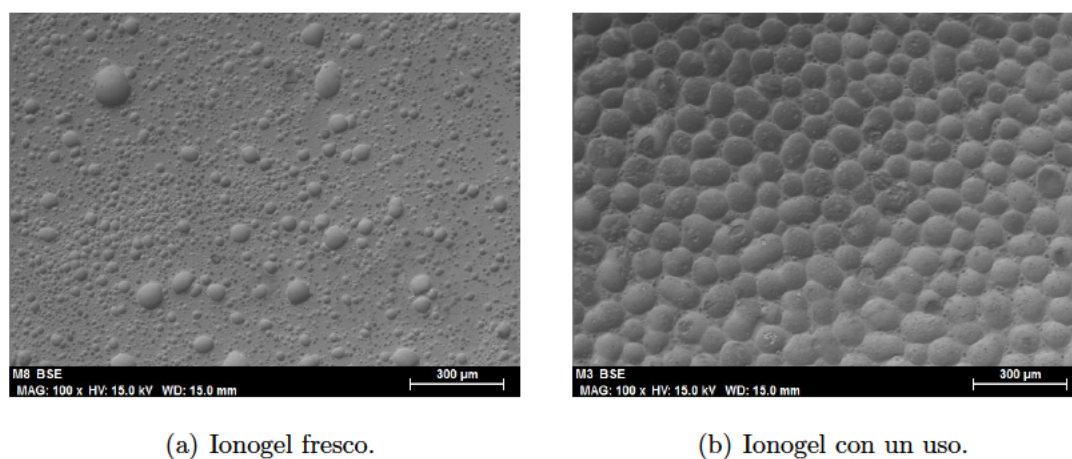


Figura 5.16. Imágenes del microscopio electrónico de barrido de derivados enzimáticos Enz-Ionogel-B (a) fresco y (b) sometido a un ciclo ($\times 100$) (escala = 300 μm).

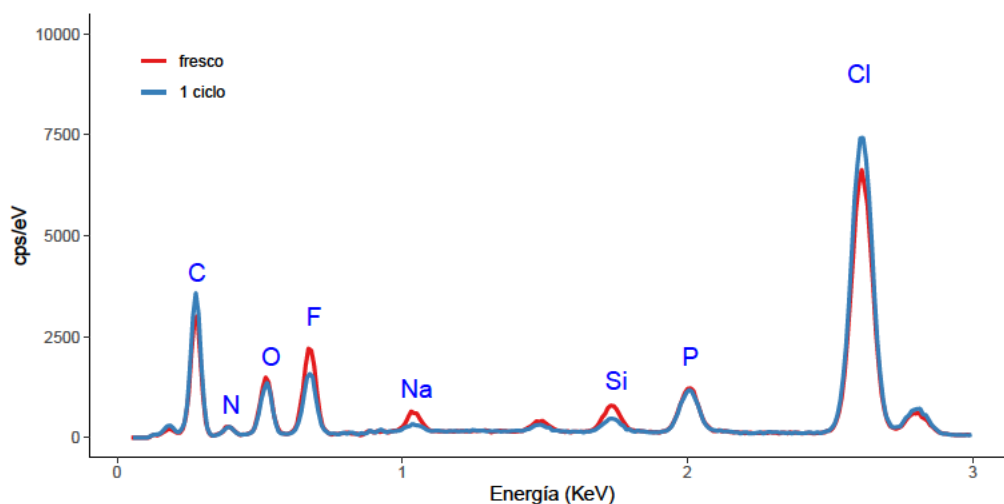


Figura 5.17. Espectro EDX del derivado enzimático Enz-Ionogel-B fresco (a) y un ciclo (b).

Las imágenes SEM de derivados con enzima diluida en tampón (Enz-Ionogel-B), frescas (sin triturar) y sometidas a un ciclo de reacción (24 horas cada una) a 30°C, se muestran en la figura 5.16. Pueden apreciarse diferencias morfológicas apreciables entre el ionogel fresco (figura 5.16(a)) y el sometida a un ciclo de reacción (figura 5.16(b)). Los granos distribuidos irregularmente presentes en la figura 5.16(a) se

convierten en una superficie completamente alterada y completamente reestructurada, con granos bien definidos, al final del primer ciclo (figura 5.16(b)). El cambio de la morfología podría deberse a la interacción del PVC del ionogel con el medio de reacción de hexano, traducido en la formación de *burbujas* que prácticamente cubren la superficie del ionogel tan pronto como se usa.

Con respecto a la composición, el espectro EDX de los ionogel frescos enteros (figura 5.17) refleja que la membrana ha mantenido su estabilidad durante el ciclo de operación, evidenciado por la superposición de los picos de los elementos representativos (F para $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ y Cl para PVC). Cabe señalar que la concentración de flúor medida en las muestras seleccionadas ha aumentado durante el proceso de reacción, del 6,59 % (fresco) al 7,94 % (1 ciclo) (ver tabla 5.3). Este aumento podría indicar una redistribución del líquido iónico en el ionogel, migrando hacia el exterior con el tiempo de operación. Debe considerarse que el análisis EDX puede proporcionar una composición elemental con una profundidad de muestreo de $1 - 2 \mu\text{m}$.

Tabla 5.3. Composición porcentual de ionogel de CaLB con tampón fosfato correspondientes a derivado fresco y después de un ciclo. Se corresponden con los espectros de la figura 5.17.

Elemento	Fresco	1 ciclo
Al		0.29
C	42.61	44.37
Ca		0.43
Cl	41.48	28.70
F	6.59	7.94
N	2.69	4.48
Na		0.41
O	4.05	9.83
P	2.57	2.80
Si		0.74

Por otro lado, cuando el ionogel se tritura (figura 5.18), su aspecto es diferente al que presenta intacto (figura 5.16(a)). Para usar el ionogel, se trituró con un molinillo, lo que provocó un aumento de la temperatura y una importante reestructuración de la superficie debido al estrés térmico. En capítulos posteriores se abordará este tema con más profundidad.

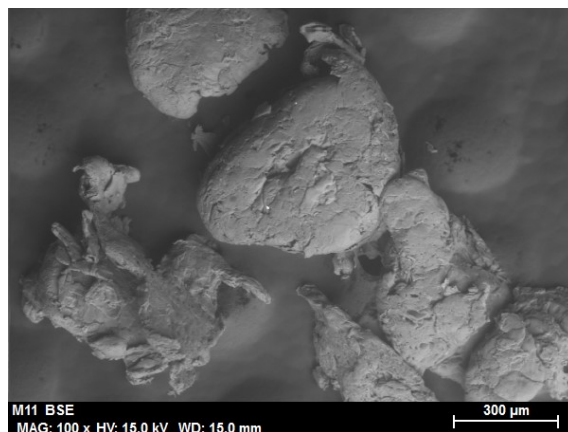


Figura 5.18. Imagen del microscopio electrónico de barrido de un derivado enzimático Enz-Ionogel-B triturado para su uso en un reactor biológico ($\times 100$) (escala = $300 \mu\text{m}$).

5.4 Conclusiones

Se ha probado con éxito un nuevo método para inmovilizar enzimas mediante el atrapamiento en gel a base de líquido iónico (Ionogel) para CaLB. El uso de ionogeles de CaLB basados en el líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ y el polímero orgánico PVC permite actividades enzimáticas más altas que CaLB libre.

6

Entrecruzamiento de ionogel de CaLB con glutaraldehído

6.1 Introducción

La inmovilización de la enzima CaLB en ionogel con líquidos iónicos ocluidos potencia la actividad catalítica de la proteína como se ha relatado en el capítulo anterior. Sin embargo, estos ionogel además de activos deben ser estables al forzar condiciones menos favorables estructuralmente pero que, al mismo tiempo, aumentan la actividad y la conversión del proceso. En el presente capítulo se aborda el desarrollo de nuevos ionogel de CaLB entrecruzados con glutaraldehído, su actividad y su estabilidad operacional a altas temperaturas.

El glutaraldehído permite el entrecruzamiento de las enzimas mediante la formación de enlaces covalentes con los grupos amino de las proteínas aumentando el entrecruzamiento y aportando una mayor estabilidad estructural al enzima.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Preparación de ionogel con glutaraldehído

La preparación de estos nuevos ionogel no difiere significativamente de los preparados inicialmente. Tan solo que, en un momento determinado del proceso de fabricación, se añade glutaraldehído en diferentes dosis. De cualquier forma, se relata el proceso de fabricación con las modificaciones oportunas en aras de proporcionar una mayor claridad.

El procedimiento de preparación fue el siguiente: un mililitro de THF fue añadido sobre 200 μL de líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ (donde era apropiado, ver tabla 6.1) y la mezcla se mantuvo en agitación a 600 rpm hasta homogeneidad perceptible de la suspensión. Posteriormente, 100 μL del preparado comercial de CaLB o de la disolución 1:4 en tampón fosfato fueron añadidos a la mezcla de líquido iónico disuelta en THF mientras continuaba la agitación.

A continuación se añadieron cien, veinte o cero μL de glutaraldehído (solución acuosa al 25 %). Finalmente, se fueron aportando 200 mg de PVC muy lentamente mientras se mantenía la agitación. También se añadió un mililitro de THF para facilitar la disolución del PVC. Se dio por finalizado el proceso cuando el medio estaba homogéneo. En ese momento, el agitador magnético fue retirado del medio y, todo el contenido fue vertido sobre unos anillos colocados sobre un soporte de vidrio. La mezcla se depositó durante 48 horas en una cámara de flujo controlado para evaporar el THF. Después del tiempo de secado, la mezcla se encontraba fundida sobre el vidrio y adaptada a la forma del anillo. Los diferentes derivados enzimáticos preparados para experimentación son relacionados en la tabla 6.1.

6.2.2 Actividad y conversión de los ionogeles con glutaraldehído

Se ha usado la síntesis de butirato de butilo a partir de butirato de vinilo y 1-butanol como reacción modelo para la determinación de la actividad, conversión y estabilidad de los catalizadores biológicos diseñados (figura 6.1). Así pues, 0,5 mL de disolución de butirato de vinilo 300 mM y 0,5 mL de 1-butanol 300 mM se introdujeron en un vial de 2 mL de capacidad. La reacción comenzó en el momento en el que se produjo la adición de 80 mg de derivado de CaLB (Ionogel) o de enzima libre (1,42 o 0,355 mg de proteína) al vial con los reactivos. El proceso se desarrolló con

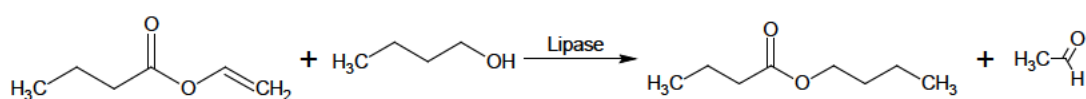


Figura 6.1. Síntesis de butirato de butilo a partir de butirato de vinilo y 1-butanol catalizada por CaLB.

Tabla 6.1. Composición química de los diferentes derivados enzimáticos (Ionogeles) preparados. Se muestra en negrita la designación que se ha asignado a cada uno de ellos.

Derivado	Enzima (μL)	Líquido iónico (mg)	PVC (mg)	Glutaraldehído al 25 % (μL)	Proteína en el reactor (80 mg del organogel)
Enzima libre Enz	100 (14.2 mg prot/mL)	0	0	0	1.420
Derivado enzimático PVC sin LI Enz-PVC	100 (14.2 mg prot/mL)	0	200	0	0.379
Derivado enzimático PVC con tampón (B) sin LI Enz-PVC-B	100 (3.55 mg prot/mL)*	0	200	0	0.095
Derivado enzimático Ionogel sin tampón Enz-Ionogel	100 (14.2 mg prot/mL)	200	200	0	0.227
Derivado enzimático Ionogel y tampón Enz-Ionogel-B	100 (3.55 mg prot/mL)*	200	200	0	0.057
Derivado enzimático Ionogel sin tampón con 20 μL glutaraldehído Enz-Ionogel-20G	100 (14.2 mg prot/mL)	200	200	20	0.218
Derivado enzimático Ionogel sin tampón con 100 μL glutaraldehído Enz-Ionogel-100G	100 (14.2 mg prot/mL)	200	200	100	0.189
Derivado enzimático Ionogel con tampón con 20 μL glutaraldehído Enz-Ionogel-B-20G	100 (3.55 mg prot/mL)*	200	200	20	0.055
Derivado enzimático Ionogel con tampón con 100 μL glutaraldehído Enz-Ionogel-B-100G	100 (3.55 mg prot/mL)*	200	200	100	0.047

* 1:4 en tampón fosfato

agitación durante 300 minutos a una temperatura de 30°C. A tiempos previamente establecidos, se tomaron alícuotas de 30 μL , que se añadieron a viales con 920 μL de hexano y 50 μL de ácido valérico 100 mM usado como estándar interno. La solución resultante fue analizada por GC. Todos los experimentos se llevaron a cabo, al menos, por duplicado y se trabajó con los valores medios encontrados. La eficiencia del biocatalizador se determinó por medio de:

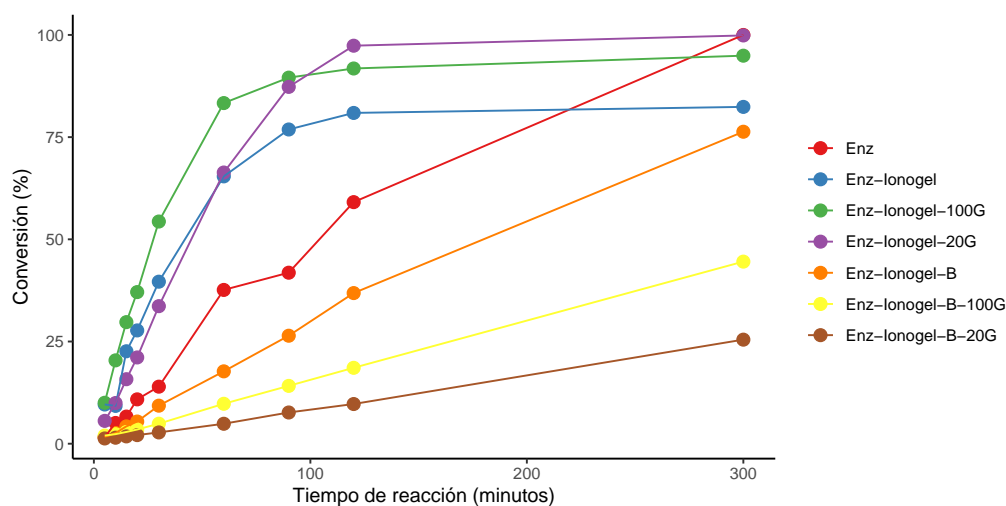
- La actividad sintética. Definida como la cantidad de milimoles de butirato de butilo por minuto y miligramo de proteína. Una unidad (U) producirá μmol de butirato de butilo por minuto.
- La conversión final a 300 minutos.

También se ensayaron soluciones de 100 μL de CaLB libre con el fin de establecer una comparativa entre la eficiencia de la enzima libre y la de la enzima inmovilizada.

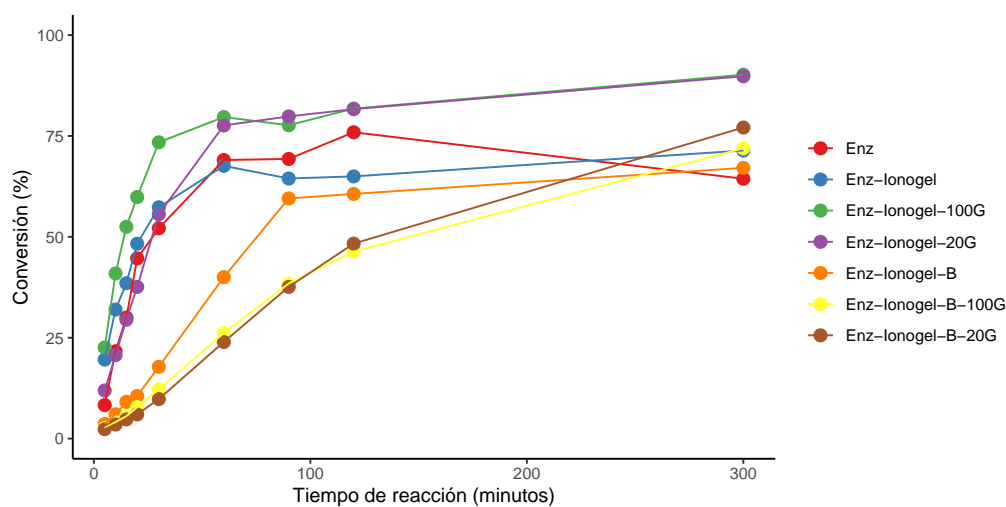
6.3 Resultados y discusión

A lo largo de todo este trabajo se ha ido comentando como la enzima CaLB ha sido inmovilizada por atrapamiento en una matriz polimérica de PVC junto con el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio ($[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$). Estos nuevos derivados enzimáticos han sido llamados ionogeles de CaLB. En el capítulo anterior, se ha usado, como medio en reacciones de transesterificación, el líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ debido a que da un adecuado microambiente a la enzima CaLB proporcionándole una mayor actividad enzimática que el hexano (considerado como el disolvente orgánico de referencia) y otros líquido iónico basados en imidazolio con longitudes de cadena alquílicas más bajas [11, 17, 58, 148]. Además, el método de atrapamiento con líquido iónico permite la inmovilización de la enzima de CaLB por oclusión dentro de un microambiente adecuado, haciendo posible la retención de la enzima y permitiendo la circulación de sustratos y productos de reacción. Así pues, como se ha confirmado en el capítulo anterior, el líquido iónico es un buen disolvente de los sustratos de reacción y de esta forma, la concentración de dichos sustratos es mayor en el microambiente que rodea a la enzima y la cinética del proceso se ve favorecida.

Al forzar las condiciones de temperatura de proceso hasta alcanzar los 70°C, se ha añadido glutaraldehído para mejorar las propiedades de los ionogel preparados. Estos nuevos ionogel con glutaraldehído también han sido probados a 30°C para establecer las comparaciones con sus homólogos preparados anteriormente..



(a) Conversión a 30°C.



(b) Conversión a 70°C.

Figura 6.2. Perfiles de conversión para la reacción de síntesis de butirato de butilo a partir de butirato de vinilo 150 mM y 1-butanol 150 mM a 30 y 70°C.

En la figura 6.2 se muestran los perfiles de conversión para la síntesis de butirato de butilo con diferentes ionogel y a 30 y 70°C. Al aumentar la temperatura, se confirma el aumento de la actividad y la conversión del proceso en todos los ionogel probados ya que las pendientes de las tangentes a las curvas obtenidas a 70°C son

más verticales en cualquier instante que las correspondientes a 30°C. Este resultado era de esperar debido a que un aumento de la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción.

Como se aprecia en la figura 6.3, a una temperatura de 30°C, el ionogel de CaLB con [omim⁺][PF₆⁻] y 100 μL de glutaraldehído muestra el mejor valor de actividad y cerca del 100 % de conversión, cifras estas muy superiores a las de la enzima libre. El segundo valor más alto sucedió cuando se añadieron 20 μL de glutaraldehído. En este último caso, se alcanzó el 100 % de conversión a los 300 minutos. Valores ligeramente más bajos (7,4 U/mg de proteína) se lograron sin glutaraldehído, concretamente en derivados sin tampón fosfato (sin diluir). La actividad de la enzima libre sin tampón fue considerablemente más baja que el resto de ionogeles de CaLB excepto para aquellos casos con tampón fosfato y 20 μL de glutaraldehído. Los valores de actividad más bajos se recogen para los casos de enzima inmovilizada en PVC diluida con tampón sin líquido iónico. Comparando los diferentes valores obtenidos, se puede considerar que cuando la enzima no diluida (sin tampón) forma el derivado, se suelen obtener mejores resultados de actividad y conversión que los producidos por ionogeles de CaLB con tampón fosfato. Por ejemplo: Enz-Ionogel-B-100G frente a Enz-Ionogel-100G, Enz-Ionogel-B-20G frente a Enz-Ionogel-20G y Enz-PVC-B frente a Enz-PVC. Por tanto, cuanto más alta es la concentración de enzima en el derivado enzimático, más alta es la actividad de la enzima por mg de proteína. Además, el aumento de la cantidad de glutaraldehído provoca un incremento de la actividad enzimática, como puede observarse comparando Enz-Ionogel-100G frente a Enz-Ionogel-20G y Enz-Ionogel-B-100G frente a Enz-Ionogel-B-20G. En estos casos, el incremento de la cantidad de glutaraldehído usado desde 20 a 100 μL supone una duplicación de la actividad de la enzima.

En trabajos previos del grupo de investigación, la enzima lacasa se inmovilizó en un ionogel basado en 50 % de PVC y 50 % de líquido iónico bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio[Omim][NTf₂]. Con el propósito de aumentar la actividad y la estabilidad del derivado enzimático, se añadió glutaraldehído a diferentes concentraciones (rango entre 0 y 1,5 %). Se observó un aumento en la actividad y la estabilidad en todas las concentraciones analizadas con un máximo al 0,5 % de concentración de glutaraldehído [152]. En experimentos con CaLB, se encontró un

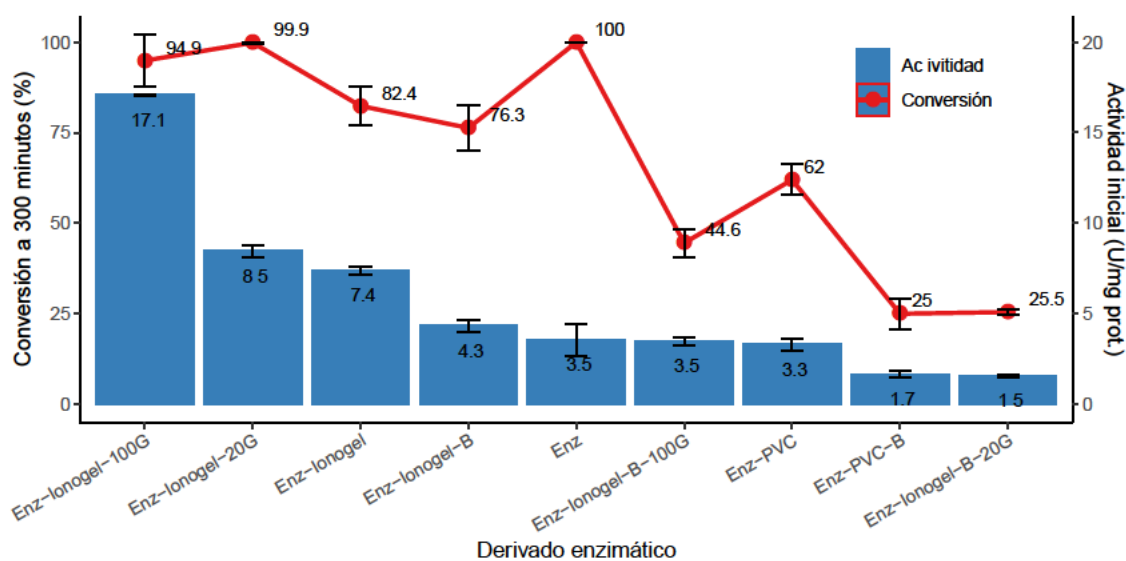


Figura 6.3. Actividad y conversión exhibidas por CaLB para la síntesis de butirato de butilo en diferentes derivados y con la enzima libre a 30°C.

aumento en la actividad en todas las concentraciones de glutaraldehído ensayadas (1 % y 4 %) a 30°C cuando la enzima se usó sin dilución con una disolución tampón. El uso de enzimas diluidas con tampón disminuyó la actividad con respecto a las no diluidas, hecho que podría justificarse debido a que la enzima diluida dificultaba el entrecruzamiento con glutaraldehído. En este trabajo, la mayor actividad de la lipasa se alcanzó a una concentración de glutaraldehído al 4 % sin dilución enzimática como se comentó anteriormente. El aumento de la actividad con la cantidad de glutaraldehído en ambos casos muestra la importancia del entrecruzamiento para mejorar la actividad del derivado inmovilizado.

También se observa que la inmovilización de la enzima en soporte de PVC sin líquidos iónicos muestra los peores valores de actividad. Además, la comparación de derivados enzimáticos con líquidos iónicos y sin líquidos iónicos (por ejemplo, Enz-PVC-B frente a Enz-Ionogel-B y Enz-PVC frente a Enz-Ionogel) demuestran la importancia de usar líquido iónico en la preparación de los derivados inmovilizados. Como se comentó anteriormente, el aumento de la actividad podría deberse al adecuado microambiente alrededor de la enzima creado por el líquido iónico. Pero también, por un aumento en la concentración de sustratos en el microambiente del líquido iónico en la enzima. En este método de inmovilización, se debe considerar que la enzima está atrapada por el líquido iónico y el PVC. El líquido iónico podría

absorber los sustratos incrementando la concentración de sustratos en el microambiente de la enzima. Estos hechos podrían mejorar la cinética de la biorreacción. Por otro lado, el uso de la inmovilización enzimática implica que las enzimas más estables a cambio de una menor actividad. Como se comentó anteriormente, la principal ventaja de este método es que permite crear más derivados activos que en el caso de la enzima libre como se puede observar en la figura 6.3.

La figura 6.4 muestra la actividad del primer ciclo de uso de los ionogel de CaLB y la enzima libre a 70°C. El comportamiento de la actividad de los diferentes derivados inmovilizados fue similar al de 30°C, lo que corrobora los resultados encontrados para los nuevos derivados enzimáticos. Además, en todos los casos y como cabía esperar, la actividad aumentó al aumentar la temperatura en dos o tres veces debido a la dependencia de la constante cinética con la temperatura.

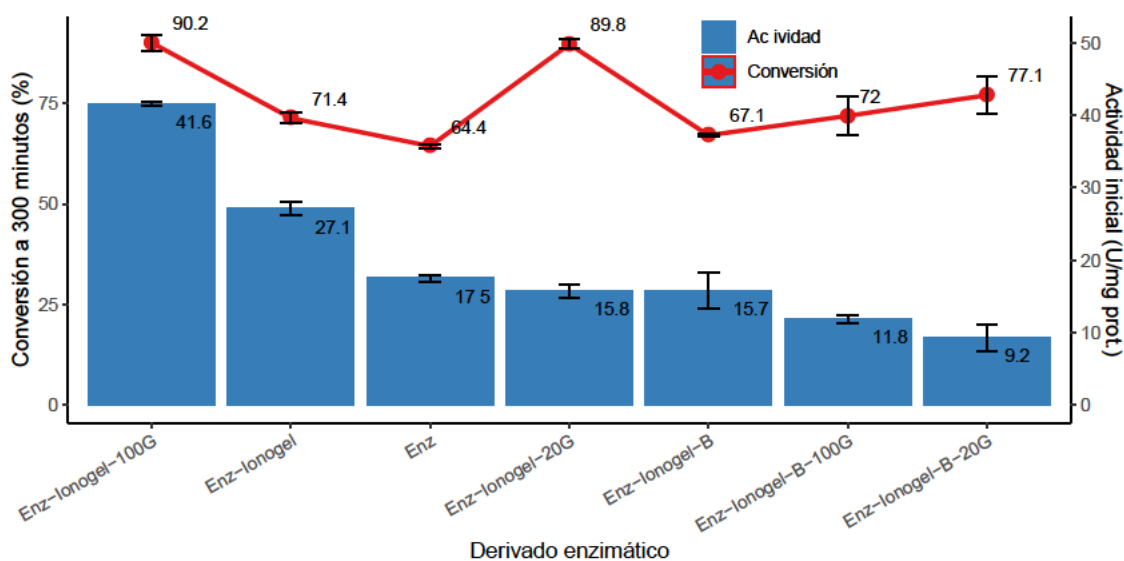


Figura 6.4. Actividad y conversión exhibidas por CaLB para la síntesis de butirato de butilo en diferentes derivados y con la enzima libre a 70°C.

La conversión varió en función del caso. La mayor actividad inicial podría implicar una mayor conversión y, por el contrario, la mayor temperatura también podría implicar una menor conversión debido a la desactivación de la enzima con el tiempo. Es importante señalar que en casi todos los casos la actividad de la enzima inmovilizada sin dilución fue mayor que la enzima libre. Además, a 70°C se observó nuevamente que al usar la enzima concentrada en el derivado inmovilizado se logra una mejor actividad y conversión que al usar la enzima diluida en tampón fosfa-

to. La concentración de glutaraldehído mostró el mismo comportamiento ya que se encontró mejor actividad conteniendo 100 μL que 20 μL . Se encontró el mismo comportamiento de la concentración de glutaraldehído sobre la estabilidad para la inmovilización de lacasa en un trabajo anterior, ya mencionado previamente cuando se hablaba sobre la actividad. En ese trabajo, se halló un máximo de estabilidad a una concentración de glutaraldehído del 0,5 % [152].

6.3.1 Caracterización SEM-EDX de ionogel con glutaraldehído

También se analizaron los SEM-EDX de ionogel preparados con glutaraldehído (Enz-Ionogel-B-20G y Enz-Ionogel-B-100G). El glutaraldehído se añadió al ionogel para lograr el entrecruzamiento de las unidades enzimáticas haciendo reaccionar los grupos funcionales del glutaraldehído con los grupos amino libres de las enzimas, formando bases de Schiff. Este entrecruzamiento proporciona estabilidad al derivado enzimático como se ha comentado en secciones anteriores.

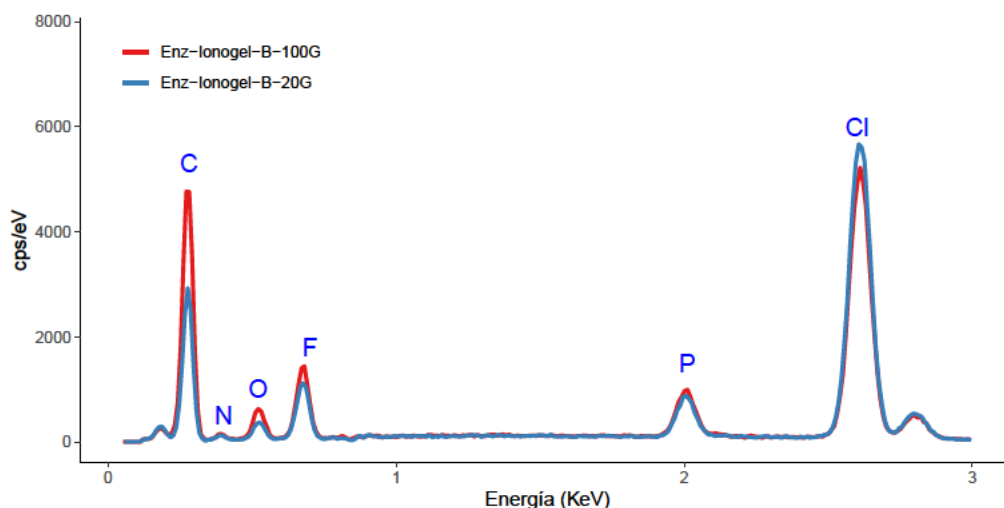


Figura 6.5. Espectro EDX de los derivados enzimáticos Enz-Ionogel-B-20 y Enz-Ionogel-B-100.

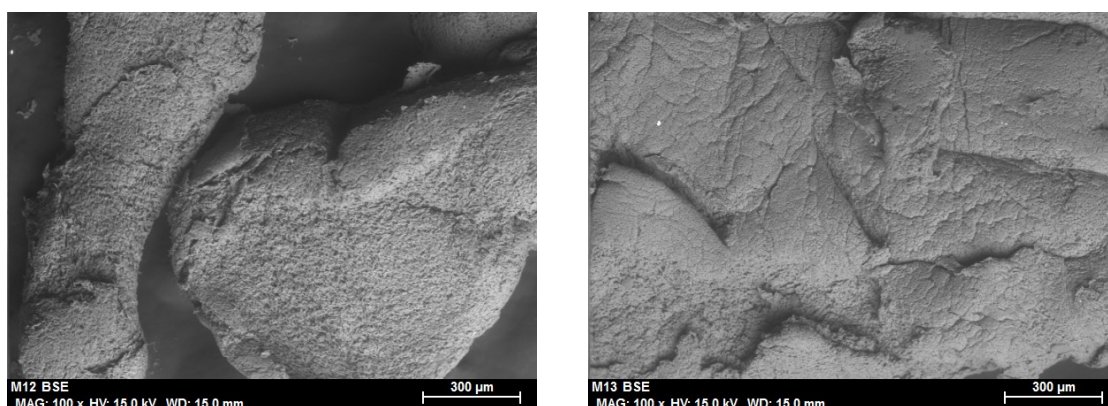
La figura 6.5 muestra los espectros de EDX correspondientes a ionogel fresco (sin emplear) con enzima diluida que incorpora glutaraldehído en forma de una solución acuosa al 25 % (20 μL o 100 μL). Se puede ver que el pico de carbono es significativamente mayor en el ionogel con 100 μL de glutaraldehído que cuando se usan 20 μL . Al comparar las imágenes SEM de ambos ionogel (figura 6.6(a) con

100 μL y figura 6.6(b) con 20 μL), se puede observar que con 100 μL es un poco más poroso que con 20 μL . Esta circunstancia favorece un aumento en la actividad

Tabla 6.2. Composición porcentual de derivados ionogel con glutaraldehído.

Elemento	Enz-Ionogel-B-100G	Enz-Ionogel-B-20G
C	57.99	51.79
Cl	22.58	30.32
F	7.91	7.58
N	3.31	3.35
O	5.51	4.01
P	2.72	2.95

catalítica, debido a la mayor superficie activa de contacto entre la enzima y los sustratos. Por lo tanto, cuanto mayor es la concentración de glutaraldehído, mayor entrecruzamiento y porosidad y, en consecuencia, mayor es la actividad específica y la conversión lograda. Esta hipótesis se corrobora comparando las actividades de los respectivos ionogel. En el primer caso la actividad específica alcanzada fue de 3,5 y en el segundo, de 1,5. Las conversiones respectivas fueron 45 % y 26 %. En un trabajo previo con lacasa, el grupo de *de los Ríos* propuso que la actividad y



(a) Enz-Ionogel-B-100

(b) Enz-Ionogel-B-20G

Figura 6.6. Imágenes del microscopio electrónico de barrido del ionogel con enzima diluida que incorpora glutaraldehído (solución acuosa al 25 %) (a) Enz-Ionogel-B-100 (100 μL) y (b) Enz-Ionogel-B-20G (20 μL)($\times 100$) (escala = 300 μm).

la estabilidad de la enzima están relacionadas con la porosidad del portador y al carácter hidrófilo de los líquidos iónicos, lo que permite un microentorno adecuado

para la enzima [151]. Además, un trabajo muy reciente demuestra que la adición de glutaraldehído a la mezcla de lacasa-PVC-líquido iónico podría contribuir no solo al entrecruzamiento de la enzima sino también a alguna modificación de la macroestructura de las superficies de la membrana [152]. Sin embargo, cuando se usó ionogel con tampón y sin glutaraldehído, la actividad fue mayor que en el caso de ionogel con tampón y glutaraldehído (20 μL o 100 μL). Se puede suponer, en este caso, que la adición de glutaraldehído en presencia de un tampón proporciona una dilución extraordinaria a la enzima que podría afectar a su actividad. Es importante señalar que este ionogel fue triturado para ser utilizado. Cuando el ionogel se tritura (figura 6.6(a) y figura 6.6(b)), su aspecto es diferente al que presenta cuando no se tritura (figura 5.16). Para usar los ionogeles, se trituran con un molinillo, que se traduce en un aumento de la temperatura y una importante reestructuración de la superficie debido al estrés térmico. La conclusión general es que los mejores resultados de actividades y conversiones específicas se logran usando glutaraldehído (100 μL) sin tampón, lo que confirma ampliamente la hipótesis de incompatibilidad entre la dilución y el glutaraldehído para usarse juntos en la preparación de derivados enzimáticos.

6.4 Conclusiones

Como se ha concluido en el capítulo anterior, un nuevo método para inmovilizar enzimas mediante el atrapamiento en gel a base de líquido iónico (Ionogel) para CaLB ha sido probado con éxito. El uso de ionogeles de CaLB basados en el líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ y el polímero orgánico PVC permiten actividades enzimáticas más altas que CaLB libre. En el presente capítulo se ha confirmado que el uso de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento mejoró la actividad del derivado enzimático, siendo la mayor actividad alcanzada con PVC, líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, CaLB y 100 μL de glutaraldehído.

Por otro lado, la porosidad del catalizador se encontró como un factor clave para la actividad de la enzima. Además, el líquido iónico utilizado podría desempeñar un doble papel, por un lado, crear un microentorno adecuado sobre la enzima, aumentando la actividad y la estabilidad y, por otro lado, hacer posible un aumento

de la concentración de sustratos en el microambiente enzimático, superando de esta forma, las limitaciones a la transferencia de materia y aumentando la cinética de la reacción.

Los resultados de este estudio son bastante alentadores y sugieren una nueva forma de diseñar fácilmente un biocatalizador. Al cambiar el líquido iónico utilizado, la actividad e incluso, la selectividad del catalizador podrían modificarse. Por ejemplo, para aumentar la actividad y la selectividad de un biocatalizador dado para un sustrato específico, solo debemos elegir un líquido iónico que sea un buen microambiente para el catalizador enzimático y también en el que el sustrato específico se absorberá preferentemente. De esta forma, este método abre nuevas y amplias expectativas para los biocatalizadores existentes.

7

Estabilidad operacional de ionogeles a altas temperaturas

7.1 Introducción

La inmovilización de enzimas en catalizadores biológicos para su uso en reactores químicos permite su reutilización con la finalidad de reducir los costes de operación. La reutilización de los catalizadores requiere que mantengan su actividad inicial durante la mayor cantidad posible de ciclos de trabajo. En el presente capítulo, se ha estudiado la estabilidad operacional de los nuevos derivados enzimáticos formulados con glutaraldehído en condiciones de temperatura adversas para el mantenimiento de la actividad enzimática (70°C).

7.2 Material y métodos

Se continúa empleando como reacción modelo la transesterificación de butirato de vinilo con butanol para producir butirato de butilo. Como líquido iónico ocluido en PVC se ha usado hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil-imidazolio [omim⁺][PF₆⁻]. Los derivados usados son los preparados para los ensayos de actividad de los capítulos anteriores, a los que se les añadió glutaraldehído y cuya composición y nomenclatura se detalla en la tabla 6.1. La experimentación consiste en realizar ciclos de biocatálisis a 70°C con los derivados enzimáticos preparados hasta que su actividad catalítica desaparezca o disminuya hasta hacerlos ineficaces.

7.3 Resultados y discusión

Para analizar la estabilidad operativa a alta temperatura (70°C), se llevaron a cabo seis ciclos de 300 minutos cada uno utilizando la misma enzima. Solo los ionogel que están compuestos con enzima concentrada (sin tampón) y 100 o $20\ \mu\text{L}$ de glutaraldehído fueron activos después del primer ciclo a 70°C . El resto de derivados enzimáticos se mantuvo inactivo después del primer ensayo. En la figura 7.1, se representa la estabilidad del *Enz-Ionogel-20G* y *Enz-Ionogel-100G* frente al número de ciclos al que han sido sometidos a una la temperatura de 70°C , observándose una disminución de la actividad residual. El tiempo de semivida del ionogel con $100\ \mu\text{L}$ y $20\ \mu\text{L}$ de glutaraldehído fue similar en unos 3 ciclos, lo que equivale a 60-72 horas. El tiempo medio de vida se calculó para estos dos derivados considerando que la duración de cada ciclo fue de 24 horas.

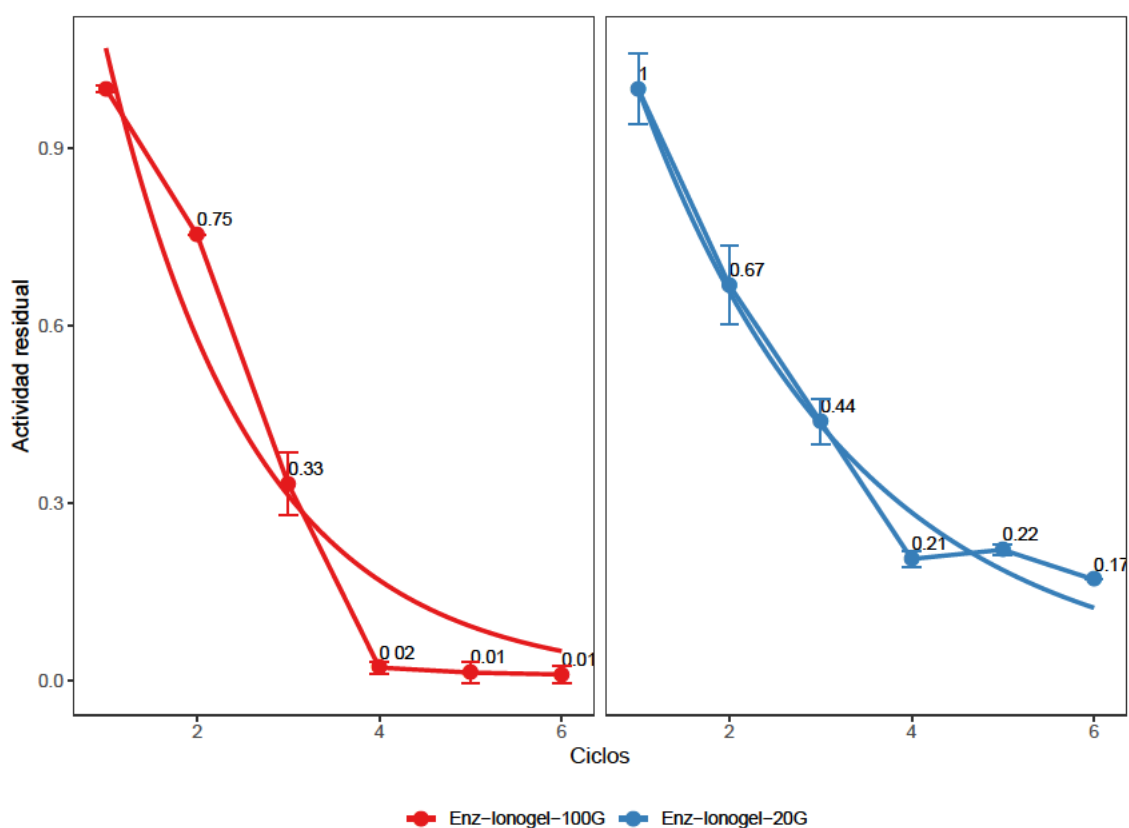


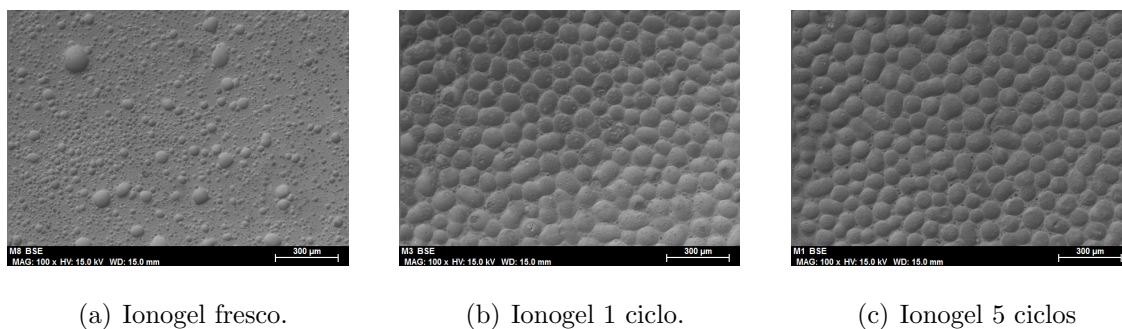
Figura 7.1. Perfil de desactivación de Enz-Ionogel-100G y Enz-Ionogel-20G a 70°C .

Como ejemplo, Jiang *et al.* (2009) inmovilizaron lipasa de *Candida rugosa* sobre nanopartículas magnéticas con líquidos iónicos soportados con cationes de diferen-

te longitud de cadena y aniones Cl^- , BF_4^- y PF_6^- [154]. La actividad de la lipasa inmovilizada de *Candida rugosa* fue mayor (118,3%) que la de lipasa nativa. La actividad de la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en líquidos iónicos soportados en nanopartículas magnéticas alcanzó un máximo a 37°C, después de lo cual disminuyó, permaneciendo en un valor constante de 60% cuando la temperatura alcanzó los 80°C. Para ionogel de CaLB inmovilizado, como se mencionó anteriormente, la actividad a 70°C aumentó de dos a tres veces sobre la actividad observada a 30°C, lo que se explicó por el aumento de la constante cinética con la temperatura. La lipasa de *Candida rugosa* retuvo el 60% de su actividad inicial después de ocho ciclos. Considerando que cada ciclo duró 5 horas, la lipasa retuvo el 60% de su actividad durante 40 horas. Como se mencionó anteriormente, se obtuvieron resultados similares con algunos derivados de ionogel de CaLB, siendo la vida media del ionogel con 100 y 20 μL de glutaraldehído alrededor de 60-72 horas. Otro ejemplo relacionado con CaLB analizó la enzima inmovilizada por adsorción sobre 12 diferentes soportes de sílice modificados con distintas longitudes de cadena alquílica y grupos funcionales. Las partículas de enzima inmovilizadas se recubrieron con líquidos iónicos (bistriflimida de butiltrimetilamonio o bistriflimida de trioctilmetilamonio) por adsorción. Los derivados inmovilizados se ensayaron para determinar la resolución cinética de rac-1-feniletanol en medios bifásicos líquido iónico/hexano y líquido iónico/dióxido de carbono supercrítico. Los mejores resultados se obtuvieron para los soportes modificados con cadenas de alquilo no funcionalizadas. La actividad de las partículas de enzima inmovilizadas recubiertas con líquidos iónicos fue menor en hexano que cuando se usó la enzima inmovilizada sin tal recubrimiento, lo que se explicó por la limitación de transferencia de materia más fuerte causada por los líquidos iónicos. Sin embargo, los tiempos de semivida aumentaron en medio hexano a 95°C [155, 156]. La lipasa pancreática porcina (PPL) también se inmovilizó utilizando líquidos iónicos en nanocompuestos magnéticos de quitosano modificados con un líquido iónico basado en imidazolio. La actividad de casi todos los derivados de PPL fue mayor que la de la enzima libre cuando se trabajaba por encima de 50°C. La estabilidad térmica de los derivados de PPL a 50°C osciló entre el 45% y el 80% a las 6 horas [157].

7.3.1 Caracterización SEM-EDX de ionogeles después de varios ciclos

Los derivados enzimáticos (ionogeles), hechos a partir de líquido iónico hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, PVC y enzima, fueron sometidos a análisis SEM-EDX antes y después de ser triturados y antes y después de ser usados en varios ciclos.



(a) Ionogel fresco.

(b) Ionogel 1 ciclo.

(c) Ionogel 5 ciclos

Figura 7.2. Imágenes del microscopio electrónico de barrido de derivados enzimáticos Enz-Ionogel-B (a) fresco, (b) sometido a un ciclo y (c) sometido a cinco ciclos ($\times 100$) (escala = $300 \mu m$).

Las imágenes SEM de derivados con enzima diluida en tampón (*Enz-Ionogel-B*), frescas (sin triturar) y sometidas a uno y cinco ciclos de reacción (24 horas cada una) a $30^\circ C$, se muestran en la figura 7.2. Pueden apreciarse diferencias morfológicas apreciables entre el ionogel fresco (figura 7.2(a)) y el sometido a 1 y 5 ciclos de reacción (figura 7.2(b) y 7.2(c), respectivamente). Los granos distribuidos irregularmente presentes en la figura 7.2(a) se convierten en una superficie completamente alterada y completamente reestructurada, con granos bien definidos, al final del primer ciclo (figura 7.2(b)), manteniendo la misma apariencia al final de los cinco ciclos (figura 7.2(c)). El cambio de la morfología podría deberse a la interacción del PVC del ionogel con el medio de reacción de hexano, traducido en la formación de *burbujas* que prácticamente cubren la superficie del ionogel tan pronto como se usa.

Con respecto a la composición de los derivados enzimáticos ionogeles frescos (sin triturar), el espectro EDX (figura 7.3) muestra que los ionogeles han mantenido su estabilidad durante todos los ciclos de operación, evidenciado por la superposición de los picos de los elementos representativos (F para $[omim^+][PF_6^-]$ y Cl para PVC).

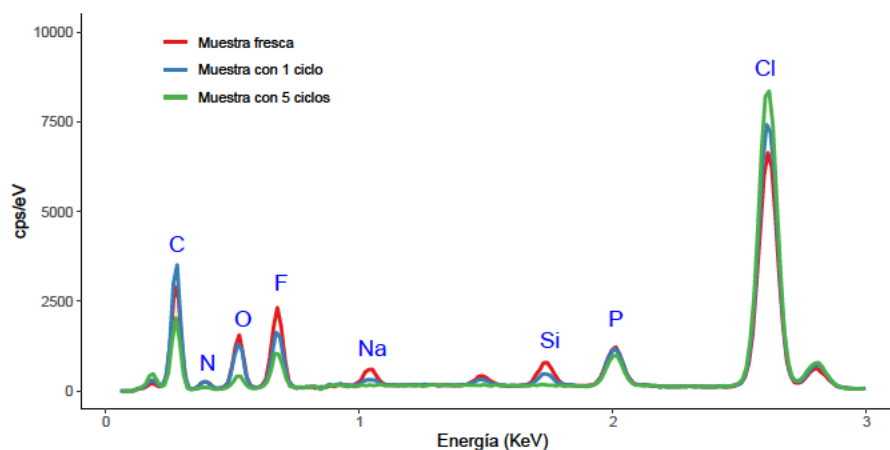


Figura 7.3. Espectro EDX del derivado enzimático Enz-Ionogel-B (a) fresco, (b) un ciclo y (c) cinco ciclos.

Cabe señalar que la concentración de flúor medida en las muestras seleccionadas ha aumentado con el número de ciclos de reacción, del 6,59 % (fresco) al 7,94 % (1 ciclo) y finalmente al 11,51 % (5 ciclos). Este aumento podría indicar una redistribución del líquido iónico en el ionogel, migrando hacia el exterior con el curso de la reacción. Debe considerarse que el análisis EDX puede proporcionar una composición elemental con una profundidad de muestreo de 1-2 μm .

Tabla 7.1. Composición porcentual de ionogel de CaLB con tampón fosfato correspondientes a derivado fresco, después de un ciclo y después de cinco ciclos. Se corresponden con los espectros de la figura 7.3.

Elemento	Fresco	1 ciclo	5 ciclos
Al		0.29	0.57
C	42.61	44.37	39.43
Ca		0.43	0.60
Cl	41.48	28.70	26.64
F	6.59	7.94	11.51
N	2.69	4.48	4.61
Na		0.41	1.29
O	4.05	9.83	10.89
P	2.57	2.80	2.93
Si		0.74	1.52

Se han analizado muestras preparadas solo con PVC y líquido iónico y sin enzima tanto frescas como después de cinco ciclos de operación. En la figura 7.4 se realizó

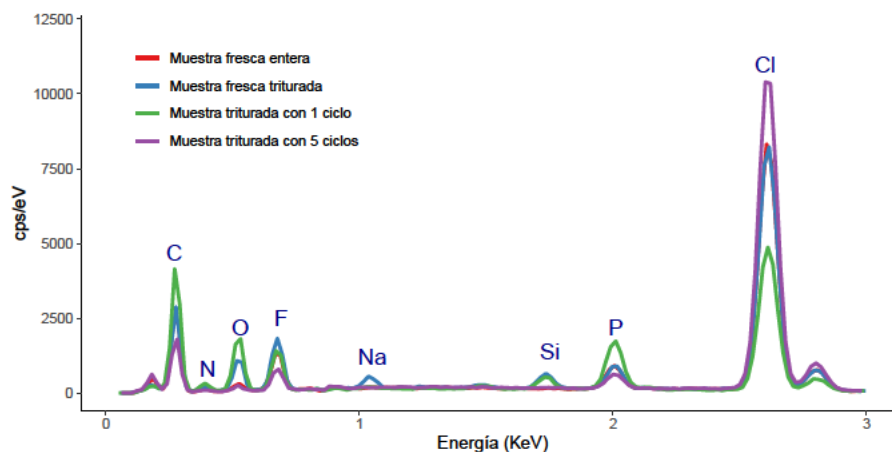


Figura 7.4. Espectro EDX de muestras preparadas con PVC y líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ en ausencia de enzima: (a) muestra fresca entera, (b) muestra fresca triturada, (c) muestra triturada sometida a un ciclo y (d) muestra triturada sometida a cinco ciclos.

Tabla 7.2. Composición porcentual de derivados sin enzima en función de los ciclos a los que han sido sometidos.

Elemento	Derivado		
	Fresco	1 ciclo	5 ciclos
C	25.90	46.18	41.18
Ca	1.35		
Cl	23.98	20.43	33.15
F	25.41	7.73	9.16
N	2.52	5.83	3.95
Na	4.15		0.87
O	10.49	14.25	8.80
P	2.29	4.64	1.92
Si	3.92	0.94	0.97

una comparación entre los espectros EDX de las muestras frescas, tanto enteras como trituradas. La superposición de los picos es prácticamente total, a excepción del cloro, más presente en la muestra entera, que puede deberse simplemente a la acumulación de este en algunas áreas de la superficie. El aspecto más relevante es la homogeneidad total que se puede observar en las imágenes SEM (figura 7.5), que no muestran ningún relieve, tanto en la muestra fresca entera (figura 7.5(a)) como en la triturada (figura 7.5(b)). Esta superficie completamente lisa solo se observa en ausencia de enzima ya que en presencia de ella la membrana es apreciablemente más porosa como se puede ver en la figura 7.2. Este hecho podría deberse a la

introducción de agua en la solución enzimática.

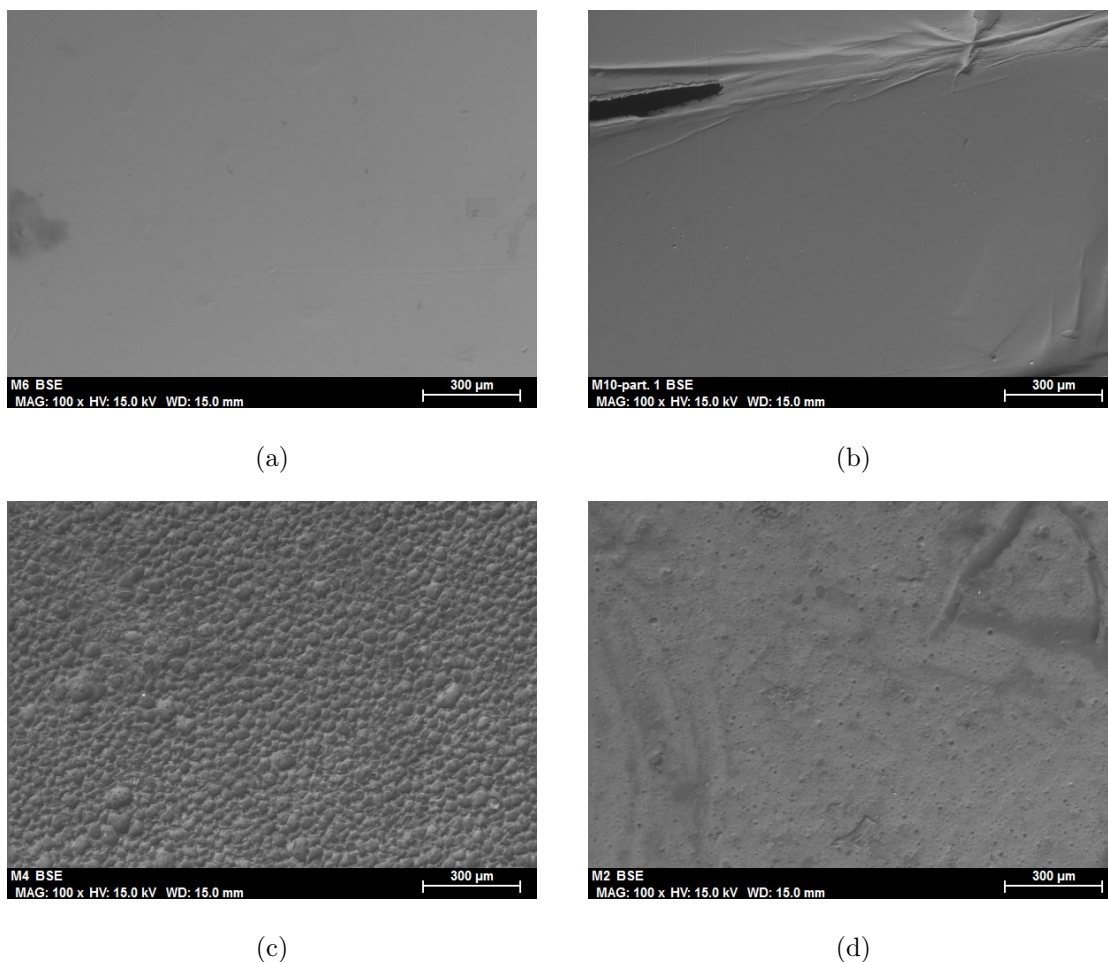


Figura 7.5. Imágenes del microscopio electrónico de barrido de muestras preparadas con PVC y líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ en ausencia de enzima: (a) muestra fresca entera, (b) muestra triturada fresca, (c) muestra triturada después de un ciclo y (d) muestra triturada después de cinco ciclos ($\times 100$) (escala = $300 \mu\text{m}$).

En las figuras 7.4 y 7.5 también se estudia la estabilidad de las muestras hechas de PVC y $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ desde un punto de vista acorde al análisis SEM. Es significativo notar que la proporción de líquido iónico (pico de flúor) disminuye significativamente de las muestras frescas (figura 7.5(b) 25.41 %) a las usadas un ciclo (figura 7.5(c) 7.73 %) y cinco ciclos (figura 7.5(d) 9,16 %). La composición porcentual de estos derivados ha quedado expuesta en la tabla 7.2. La pérdida de líquido iónico en el caso de derivados sin enzima contrasta claramente con el aumento del pico en ionogel con enzima (ver figura 7.2). La explicación radica en el aumento del carácter hidrófilo del líquido iónico (de naturaleza hidrófoba) cuando el derivado

enzimático se incorpora disuelto en agua; de esta manera se reduce la posibilidad de migración del mismo al medio de reacción hexano (hidrófobo). Las correspondientes imágenes SEM de la figura 7.5 muestran el cambio superficial que ha tenido lugar en las muestras, tanto en la muestra fresca (figura 7.5(a) y 7.5(b)) como después de cinco ciclos de operación (figura 7.5(d)). En ellas, se observa que han perdido toda la porosidad, quedando completamente despojadas de su estructura inicial. Un fenómeno similar ocurrió con los derivados ionogel, justificándose los abultamientos en aquel caso, por el comportamiento del PVC por el medio hexano.

7.4 Conclusiones

En el presente capítulo, se ha ensayado la estabilidad operativa a 70°C de todos los ionogeles de CaLB preparados. Se encontró que sólo los ionogeles preparados con glutaraldehído mantienen la actividad después de 2 ciclos (1440 minutos cada ciclo). Se comprobó que la porosidad del catalizador es un factor clave para la actividad de la enzima.

8

Conclusiones generales y perspectivas futuras

Se ha probado con éxito un nuevo método para inmovilizar enzimas mediante el atrapamiento en gel a base de líquido iónico (ionogel) para CaLB. El uso del ionogel de CaLB basado en el líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$ y el polímero orgánico PVC ha permitido obtener derivados inmovilizados con actividad mayor que en el caso de la enzima libre. El uso de glutaraldehído como agente de entrecruzamiento mejoró la actividad del derivado enzimático, siendo la mayor actividad alcanzada con PVC, líquido iónico $[\text{omim}^+][\text{PF}_6^-]$, CaLB y $100 \mu\text{L}$ de glutaraldehído. Se probó la estabilidad operativa a alta temperatura (70°C) de todos los derivados enzimáticos (llamados ionogeles de CaLB). Solo los ionogeles de CaLB preparados con glutaraldehído mantienen la actividad después de 2 ciclos (1440 minutos cada ciclo). La porosidad del catalizador se encontró como un factor clave para la actividad de la enzima. Además, el líquido iónico utilizado podría desempeñar un doble papel, por un lado, crear un microentorno adecuado sobre la enzima, aumentando la actividad y la estabilidad y, por otro lado, hacer posible un aumento de la concentración de sustratos en el microambiente enzimático, concentrándose en líquido iónico lo que disminuye las limitaciones a la transferencia de materia y aumenta la cinética de la reacción.

Los resultados de este estudio son bastante alentadores y sugieren una nueva forma de diseñar fácilmente un biocatalizador. Al cambiar el líquido iónico utilizado, la actividad e incluso, la selectividad del catalizador podrían modificarse. Por ejemplo, para aumentar la actividad y la selectividad de un biocatalizador dado para un sustrato específico, solo debemos seleccionar un líquido iónico que genere un buen

microambiente para el catalizador enzimático y en el que el sustrato específico se absorba preferentemente. De esta forma, este nuevo método abre nuevas y amplias expectativas para los biocatalizadores existentes.

Bibliografía

- [1] Victor M Balçao, Ana L Paiva, and F Xavier Malcata. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6):392–416, 1996.
- [2] Ole Kirk and Morten Würtz Christensen. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Organic Process Research & Development*, 6(4):446–451, 2002.
- [3] Mats Holmquist. Alpha beta-hydrolase fold enzymes structures, functions and mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, 1(2):209–235, 2000.
- [4] Jonas Uppenberg, Shamkant Patkar, Terese Bergfors, and T Alwyn Jones. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of molecular biology*, 235(2):790–792, 1994.
- [5] Jonas Uppenberg, Niklas Oehrner, Martin Norin, Karl Hult, Gerard J Kleywegt, Shamkant Patkar, Viggo Waagen, Thorleif Anthonsen, and T Alwyn Jones. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*, 34(51):16838–16851, 1995.
- [6] Christian Orrenius, Fredrik Hbffner, Didier Rotticci, Niklas öhrner, Torbjörn Norin, and Karl Hult. Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalysed by candida antarctica lipase b. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16(1):1–15, 1998.

-
- [7] Didier Rotticci, Fredrik Hæffner, Christian Orrenius, Torbjörn Norin, and Karl Hult. Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by candida antarctica lipase b. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5(1-4):267–272, 1998.
- [8] Anders Magnusson. Rational redesign of candida antarctica lipase b. 09 2020.
- [9] Uwe Theo Bornscheuer and Romas Joseph Kazlauskas. *Hydrolases in organic synthesis: regio-and stereoselective biotransformations*. John Wiley & Sons, 2006.
- [10] Yi Fong Wang, James J Lalonde, Milagros Momongan, David E Bergbreiter, and Chi Huey Wong. Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols, glycerol derivatives, sugars and organometallics. *Journal of the American Chemical Society*, 110(21):7200–7205, 1988.
- [11] Francisco J Hernández Fernández, Antonia Pérez de los Ríos, Manuel Rubio, Demetrio Gómez, and Gloria Vállora. Enhancement of activity and selectivity in lipase-catalyzed transesterification in ionic liquids by the use of additives. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 82(10):882–887, 2007.
- [12] Colja Laane, Sijf Boeren, Kees Vos, and Cees Veeger. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(1):81–87, 1987.
- [13] Roger Sheldon. Catalytic reactions in ionic liquids. *Chemical Communications*, (23):2399–2407, 2001.
- [14] Emily M Anderson, Karin M Larsson, and Ole Kirk. One biocatalyst—many applications: the use of candida antarctica b-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16(3):181–204, 1998.
- [15] R Madeira Lau, F Van Rantwijk, KR Seddon, and RA Sheldon. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organic Letters*, 2(26):4189–4191, 2000.

- [16] Pedro Lozano, Teresa De Diego, Daniel Carrié, Michel Vaultier, and José L Iborra. Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21(1):9–13, 2003.
- [17] Antonia Pérez de los Ríos, Francisco J Hernández-Fernández, Francisco A Martínez, Manuel Rubio, and Gloria VÍllora. The effect of ionic liquid media on activity, selectivity and stability of *Candida antarctica* lipase b in transesterification reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25(2-4):151–156, 2007.
- [18] Mahn-Joo Kim, Min Young Choi, Jae Kwan Lee, and Yangsoo Ahn. Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(3-6):115–118, 2003.
- [19] P Vidya and Anju Chadha. The role of different anions in ionic liquids on pseudomonas cepacia lipase catalyzed transesterification and hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1-4):145–148, 2009.
- [20] Susheel J Nara, Jitendra R Harjani, and Manikrao M Salunkhe. Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study. *Tetrahedron Letters*, 43(16):2979–2982, 2002.
- [21] Teresa De Diego, Pedro Lozano, Miguel A Abad, Katharina Steffensky, Michel Vaultier, and José L Iborra. On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis. *Journal of biotechnology*, 140(3-4):234–241, 2009.
- [22] Toshiyuki Itoh, Eri Akasaki, Kazutoshi Kudo, and Shohei Shirakami. Lipase-catalyzed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system: reaction of enzyme anchored to the solvent. *Chemistry Letters*, 30(3):262–263, 2001.
- [23] Piotr Kielbasiński, Małgorzata Albrycht, Jerzy Łuczak, and Marian Miokołajczyk. Enzymatic reactions in ionic liquids: lipase-catalysed kinetic resolution of racemic, p-chiral hydroxymethanephosphinates and hydroxymethylphosphine oxides. *Tetrahedron: Asymmetry*, 13(7):735–738, 2002.

- [24] Sonja H Schöfer, Nicole Kaftzik, Peter Wasserscheid, and Udo Kragl. Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. *Chemical Communications*, (5):425–426, 2001.
- [25] Mattias Persson and Uwe T Bornscheuer. Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(1-2):21–27, 2003.
- [26] Christina Vafiadi, Evangelos Topakas, Victoria R Nahmias, Craig B Faulds, and Paul Christakopoulos. Feruloyl esterase-catalysed synthesis of glycerol sinapate using ionic liquids mixtures. *Journal of biotechnology*, 139(1):124–129, 2009.
- [27] Sílvia Garcia, Nuno MT Lourenço, Diana Lousa, Ana F Sequeira, Paula Mimoso, Joaquim MS Cabral, Carlos AM Afonso, and Susana Barreiros. A comparative study of biocatalysis in non-conventional solvents: Ionic liquids, supercritical fluids and organic media. *Green Chemistry*, 6(9):466–470, 2004.
- [28] Marrit Eckstein, Martin Sesing, Udo Kragl, and Patrick Adlercreutz. At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents. *Biotechnology Letters*, 24(11):867–872, 2002.
- [29] Pedro Lozano, Teresa de Diego, Jean-Paul Guegan, Michel Vaultier, and José L Iborra. Stabilization of α -chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnology and bioengineering*, 75(5):563–569, 2001.
- [30] Shweta Shah and Munishwar N Gupta. Obtaining high transesterification activity for subtilisin in ionic liquids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(1):94–98, 2007.
- [31] Joseph A Laszlo and David L Compton. α -chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(2):181–186, 2001.
- [32] Kazunori Nakashima, Tatsuo Maruyama, Noriho Kamiya, and Masahiro Goto. Comb-shaped poly (ethylene glycol)-modified subtilisin carlsberg is soluble

- and highly active in ionic liquids. *Chemical communications*, (34):4297–4299, 2005.
- [33] Zhen Yang, Ya-Jun Yue, and Miao Xing. Tyrosinase activity in ionic liquids. *Biotechnology letters*, 30(1):153–158, 2008.
- [34] Teresa De Diego, Pedro Lozano, Said Gmouh, Michel Vaultier, and José L Iborra. Fluorescence and cd spectroscopic analysis of the α -chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis [(trifluoromethyl) sulfonyl] amide. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7):916–924, 2004.
- [35] Jason A Berberich, Joel L Kaar, and Alan J Russell. Use of salt hydrate pairs to control water activity for enzyme catalysis in ionic liquids. *Biotechnology progress*, 19(3):1029–1032, 2003.
- [36] Z Yang and AJ Russell. Fundamentals of non-aqueous enzymology. In *Enzymatic reactions in organic media*, pages 43–69. Springer, 1996.
- [37] Zhen Yang. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal of biotechnology*, 144(1):12–22, 2009.
- [38] Roxana Irimescu and Katsuya Kato. Lipase-catalyzed enantioselective reaction of amines with carboxylic acids under reduced pressure in non-solvent system and in ionic liquids. *Tetrahedron Letters*, 45(3):523–525, 2004.
- [39] Ahmed Kamal and Gagan Chouhan. Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure 1, 2-diols employing immobilized lipase in the ionic liquid [bmim] pf6. *Tetrahedron letters*, 45(48):8801–8805, 2004.
- [40] Rute Madeira Lau, Menno J Sorgedraeger, Giacomo Carrea, Fred van Rantwijk, Francesco Secundo, and Roger A Sheldon. Dissolution of candida antarctica lipase b in ionic liquids: effects on structure and activity. *Green Chemistry*, 6(9):483–487, 2004.
- [41] Yi Yuan, Shu Bai, and Yan Sun. Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of (\pm)-menthol in ionic liquids and organic solvents. *Food chemistry*, 97(2):324–330, 2006.

- [42] P Lozano, T De Diego, D Carrie, Michel Vaultier, and JL Iborra. Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnology Letters*, 23(18):1529–1533, 2001.
- [43] Fred van Rantwijk, Francesco Secundo, and Roger A Sheldon. Structure and activity of candida antarctica lipase b in ionic liquids. *Green Chemistry*, 8(3):282–286, 2006.
- [44] Susheel J Nara, Swapnil S Mohile, Jitendra R Harjani, Prashant U Naik, and Manikrao M Salunkhe. Influence of ionic liquids on the rates and regioselectivity of lipase-mediated biotransformations on 3, 4, 6-tri-o-acetyl-d-glucal. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28(1):39–43, 2004.
- [45] Seongsoon Park and Romas J Kazlauskas. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *The Journal of organic chemistry*, 66(25):8395–8401, 2001.
- [46] Kyoko Fujita, Douglas R MacFarlane, and Maria Forsyth. Protein solubilising and stabilising ionic liquids. *Chemical communications*, (38):4804–4806, 2005.
- [47] Adam J Walker and Neil C Bruce. Cofactor-dependent enzyme catalysis in functionalized ionic solvents. *Chemical Communications*, (22):2570–2571, 2004.
- [48] Adam J Walker and Neil C Bruce. Combined biological and chemical catalysis in the preparation of oxycodone. *Tetrahedron*, 60(3):561–568, 2004.
- [49] Teresa De Diego, Pedro Lozano, Said Gmouh, Michel Vaultier, and José L Iborra. Understanding structure-stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules*, 6(3):1457–1464, 2005.
- [50] Antonio Ruiz Toral, P Antonia, Francisco J Hernández, Michiel HA Janssen, Rob Schoevaart, Fred van Rantwijk, and Roger A Sheldon. Cross-linked candida antarctica lipase b is active in denaturing ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5):1095–1099, 2007.

- [51] Stewart A Forsyth, Douglas R MacFarlane, Robin J Thomson, and Mark Von Itzstein. Rapid, clean, and mild o-acetylation of alcohols and carbohydrates in an ionic liquid. *Chemical Communications*, (7):714–715, 2002.
- [52] Qingbin Liu, Michiel HA Janssen, Fred van Rantwijk, and Roger A Sheldon. Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations. *Green Chemistry*, 7(1):39–42, 2005.
- [53] Fred van Rantwijk and Roger A Sheldon. Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical reviews*, 107(6):2757–2785, 2007.
- [54] Sung Ho Ha, Mai Ngoc Lan, Sang Hyun Lee, Sung Mi Hwang, and Yoon-Mo Koo. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(4):480–483, 2007.
- [55] Fred Van Rantwijk, Rute Madeira Lau, and Roger A Sheldon. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *TRENDS in Biotechnology*, 21(3):131–138, 2003.
- [56] Joel L Kaar, Anita M Jesionowski, Jason A Berberich, Roger Moulton, and Alan J Russell. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *Journal of the American Chemical Society*, 125(14):4125–4131, 2003.
- [57] Pedro Lozano, Teresa de Diego, Said Gmouh, Michel Vaultier, and José L Iborra. Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems. *Biotechnology Progress*, 20(3):661–669, 2004.
- [58] A Pérez de los Rios, Francisco J Hernández Fernández, F Tomás-Alonso, Demetrio Gómez, and Gloria Villora. Synthesis of esters in ionic liquids: The effect of vinyl esters and alcohols. *Process Biochemistry*, 43(8):892–895, 2008.
- [59] AP De los Rios, FJ Hernández-Fernández, F Tomás-Alonso, D Gómez, and G Villora. Synthesis of flavour esters using free candida antarctica lipase b in ionic liquids. *Flavour and fragrance journal*, 23(5):319–322, 2008.

- [60] Franka Ganske and Uwe T Bornscheuer. Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-buoh. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 36(1-6):40–42, 2005.
- [61] Sang Hyun Lee, Hiep Minh Nguyen, Yoon-Mo Koo, and Sung Ho Ha. Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids. *Process Biochemistry*, 43(9):1009–1012, 2008.
- [62] Shogo Arai, Kazunori Nakashima, Takanori Tanino, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo, and Hideki Fukuda. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1):51–55, 2010.
- [63] Susheel J Nara, Jitendra R Harjani, Manikrao M Salunkhe, Ankush T Mane, and Prakash P Wadgaonkar. Lipase-catalysed polyester synthesis in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Tetrahedron letters*, 44(7):1371–1373, 2003.
- [64] Johnathan T Gorke, Krzysztof Okrasa, Andrew Louwagie, Romas J Kazlauskas, and Friedrich Sreenc. Enzymatic synthesis of poly (hydroxyalkanoates) in ionic liquids. *Journal of biotechnology*, 132(3):306–313, 2007.
- [65] Toshiyuki Itoh, Eri Akasaki, and Yoshihito Nishimura. Efficient lipase-catalyzed enantioselective acylation under reduced pressure conditions in an ionic liquid solvent system. *Chemistry letters*, 31(2):154–155, 2002.
- [66] Toshiyuki Itoh, Yoshihito Nishimura, Nozomi Ouchi, and Shuichi Hayase. 1-butyl-2, 3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate: the most desirable ionic liquid solvent for recycling use of enzyme in lipase-catalyzed transesterification using vinyl acetate as acyl donor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1-2):41–45, 2003.
- [67] Marilynne Noël, Pedro Lozano, Michel Vaultier, and José 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. *Biotechnology letters*, 26(4):301–306, 2004.

- [68] Maja Habulin and Željko Knez. Optimization of (r, s)-1-phenylethanol kinetic resolution over candida antarctica lipase b in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4):24–28, 2009.
- [69] Nicole Kaftzik, Wolfgang Kroutil, Kurt Faber, and Udo Kragl. Mandelate racemase activity in ionic liquids: scopes and limitations. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 214(1):107–112, 2004.
- [70] Olga Ulbert, Tamás Fráter, Katalin Bélafi-Bakó, and László Gubicza. Enhanced enantioselectivity of candida rugosa lipase in ionic liquids as compared to organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31(1-3):39–45, 2004.
- [71] Fabiano Jares Contesini and Patrícia de Oliveira Carvalho. Esterification of (rs)-ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(14):2069–2073, 2006.
- [72] E Fehér, V Illeová, I Kelemen-Horváth, K Bélafi-Bakó, M Polakovič, and L Gubicza. Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid–alcohol biphasic system. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 50(1):28–32, 2008.
- [73] Manfred T Reetz, Wolfgang Wiesenhöfer, Giancarlo Francio, and Walter Leitner. Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase. *Chemical Communications*, (9):992–993, 2002.
- [74] Pedro Lozano, Teresa de Diego, Daniel Carrié, Michel Vaultier, and José L Iborra. Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chemical Communications*, (7):692–693, 2002.
- [75] Manfred T Reetz, Wolfgang Wiesenhöfer, Giancarlo Francio, and Walter Leitner. Continuous flow enzymatic kinetic resolution and enantiomer separation using ionic liquid/supercritical carbon dioxide media. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345(11):1221–1228, 2003.

- [76] Francisco J Hernández, P Antonia, Demetrio Gómez, Manuel Rubio, and Gloria VÍllora. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Applied Catalysis B: Environmental*, 67(1-2):121–126, 2006.
- [77] P Antonia, Francisco J Hernández-Fernández, Demetrio Gómez, Manuel Rubio, Francisca Tomás-Alonso, and Gloria VÍllora. Understanding the chemical reaction and mass-transfer phenomena in a recirculating enzymatic membrane reactor for green ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43(2):303–309, 2007.
- [78] Lynnette A Blanchard and Joan F Brennecke. Recovery of organic products from ionic liquids using supercritical carbon dioxide. *Industrial & engineering chemistry research*, 40(1):287–292, 2001.
- [79] Sanjay Kamat, Glenn Critchley, Eric J Beckman, and Alan J Russell. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids: Iii. does carbon dioxide covalently modify enzymes? *Biotechnology and bioengineering*, 46(6):610–620, 1995.
- [80] Inês Borges de Carvalho, Teresa Corrêa de Sampaio, and Susana Barreiros. Solvent effects on the catalytic activity of subtilisin suspended in compressed gases. *Biotechnology and bioengineering*, 49(4):399–404, 1996.
- [81] P Lozano, G Villora, D Gómez, AB Gayo, JA Sánchez-Conesa, M Rubio, and JL Iborra. Membrane reactor with immobilized candida antarctica lipase b for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *The Journal of supercritical fluids*, 29(1-2):121–128, 2004.
- [82] B Al-Duri, R Goddard, and J Bosley. Characterisation of a novel support for biocatalysis in supercritical carbon dioxide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6):825–834, 2001.
- [83] Pedro Lozano, Teresa De Diego, Daniel Carrié, Michel Vaultier, and José L Iborra. Lipase catalysis in ionic liquids and supercritical carbon dioxide at 150 c. *Biotechnology progress*, 19(2):380–382, 2003.

-
- [84] FJ Hernández-Fernández, AP de los Ríos, F Tomás-Alonso, D Gómez, and G Vllora. Kinetic resolution of 1-phenylethanol integrated with separation of substrates and products by a supported ionic liquid membrane. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(3):337–342, 2009.
- [85] Francisco J Hernández Fernández, Antonia Pérez de los Ríos, Manuel Rubio, Francisca Tomás Alonso, Demetrio Gómez, and Gloria 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. *Journal of Membrane Science*, 293(1):73–80, 2007.
- [86] Antonia Pérez de los Ríos, Francisco J Hernández-Fernández, Francisca Tomás-Alonso, Manuel Rubio, Demetrio Gómez, and Gloria Vllora. 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. *Journal of Membrane Science*, 307(2):233–238, 2008.
- [87] P Antonia, Francisco J Hernández-Fernández, Manuel Rubio, Francisca Tomás-Alonso, Demetrio Gómez, and Gloria Vllora. Prediction of the selectivity in the recovery of transesterification reaction products using supported liquid membranes based on ionic liquids. *Journal of Membrane Science*, 307(2):225–232, 2008.
- [88] Francisco J Hernández Fernández, A Pérez de los Rios, Francisca Tomás Alonso, Demetrio Gómez, and Gloria Vllora. Improvement in the separation efficiency of transesterification reaction compounds by the use of supported ionic liquid membranes based on the dicyanamide anion. *Desalination*, 244(1):122–129, 2009.
- [89] P Antonia, Francisco J Hernández-Fernández, Hugo Presa, Demetrio Gómez, and Gloria Vllora. Tailoring supported ionic liquid membranes for the selective separation of transesterification reaction compounds. *Journal of Membrane Science*, 328(1-2):81–85, 2009.

- [90] P Antonia, Francisco J Hernández-Fernández, Manuel Rubio, Demetrio Gómez, and Gloria Víllora. Highly selective transport of transesterification reaction compounds through supported liquid membranes containing ionic liquids based on the tetrafluoroborate anion. *Desalination*, 250(1):101–104, 2010.
- [91] Luís C Branco, João G Crespo, and Carlos AM Afonso. Studies on the selective transport of organic compounds by using ionic liquids as novel supported liquid membranes. *Chemistry—A European Journal*, 8(17):3865–3871, 2002.
- [92] Ján Marták and Štefan Schlosser. Pertraction of organic acids through liquid membranes containing ionic liquids. *Desalination*, 199(1-3):518–520, 2006.
- [93] Eijiro Miyako, Tatsuo Maruyama, Noriho Kamiya, and Masahiro Goto. Use of ionic liquids in a lipase-facilitated supported liquid membrane. *Biotechnology letters*, 25(10):805–808, 2003.
- [94] Raquel Fortunato, Carlos A M Afonso, MAM Reis, and João G Crespo. Supported liquid membranes using ionic liquids: study of stability and transport mechanisms. *Journal of Membrane Science*, 242(1):197–209, 2004.
- [95] Raquel Fortunato, Carlos A M Afonso, Juana Benavente, E Rodriguez-Castellon, and João G Crespo. Stability of supported ionic liquid membranes as studied by X-ray photoelectron spectroscopy. *Journal of membrane science*, 256(1):216–223, 2005.
- [96] AP De los Rios, FJ Hernández-Fernández, F Tomás-Alonso, JM Palacios, D Gómez, M Rubio, and G Víllora. A sem-edx study of highly stable supported liquid membranes based on ionic liquids. *Journal of Membrane Science*, 300(1-2):88–94, 2007.
- [97] F J Hernández Fernández, A Pérez de los Rios, F Tomás Alonso, J M Palacios, and G Víllora. Preparation of supported ionic liquid membranes: influence of the ionic liquid immobilization method on their operational stability. *Journal of Membrane Science*, 341(1):172–177, 2009.

- [98] FJ Hernández-Fernández, AP de Los Rios, F Tomás-Alonso, D Gómez, and G Villora. On the development of an integrated membrane process with ionic liquids for the kinetic resolution of rac-2-pentanol. *Journal of Membrane Science*, 314(1-2):238–246, 2008.
- [99] Eijiro Miyako, Tatsuo Maruyama, Noriho Kamiya, and Masahiro Goto. Enzyme-facilitated enantioselective transport of (s)-ibuprofen through a supported liquid membrane based on ionic liquids. *Chemical communications*, (23):2926–2927, 2003.
- [100] Peter J Scammells, Janet L Scott, and Robert D Singer. Ionic liquids: the neglected issues. *Australian Journal of Chemistry*, 58(3):155–169, 2005.
- [101] Kenneth R Seddon, Annegret Stark, and María-José Torres. Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. *Pure and Applied Chemistry*, 72(12):2275–2287, 2000.
- [102] Sang Hyun Lee, Sung Ho Ha, Sun Bok Lee, and Yoon-Mo Koo. Adverse effect of chloride impurities on lipase-catalyzed transesterifications in ionic liquids. *Biotechnology letters*, 28(17):1335–1339, 2006.
- [103] Randall J Bernot, Michael A Brueseke, Michelle A Evans-White, and Gary A Lamberti. Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on daphnia magna. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(1):87–92, 2005.
- [104] A Romero, A Santos, J Tojo, and A Rodriguez. Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids. *Journal of hazardous materials*, 151(1):268–273, 2008.
- [105] Carlo Pretti, Cinzia Chiappe, Ilaria Baldetti, Sara Brunini, Gianfranca Monni, and Luigi Intorre. Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *daphnia magna* and *danio rerio*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(4):1170–1176, 2009.

- [106] Ángel Irabien, Aurora Garea, and Patricia Luis. Hybrid molecular qsar model for toxicity estimation: application to ionic liquids. In *Computer Aided Chemical Engineering*, volume 26, pages 63–67. Elsevier, 2009.
- [107] Johannes Ranke, Anja Müller, Ulrike Bottin-Weber, Frauke Stock, Stefan Stolte, Jürgen Arning, Reinhold Störmann, and Bernd Jastorff. Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(3):430–438, 2007.
- [108] Kathryn M Docherty and Charles F Kulpa Jr. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chemistry*, 7(4):185–189, 2005.
- [109] Dongbin Zhao, Yongcheng Liao, and Ziding Zhang. Toxicity of ionic liquids. *Clean-soil, air, water*, 35(1):42–48, 2007.
- [110] Laurie Ropel, Lionel S Belvèze, Sudhir NVK Aki, Mark A Stadtherr, and Joan F Brennecke. Octanol–water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids. *Green Chemistry*, 7(2):83–90, 2005.
- [111] Pierre Bonhote, Ana-Paula Dias, Nicholas Papageorgiou, Kuppuswamy Kalyanasundaram, and Michael Grätzel. Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorganic chemistry*, 35(5):1168–1178, 1996.
- [112] Matthew D Truppo, J David Rozzell, Jeffrey C Moore, and Nicholas J Turner. Rapid screening and scale-up of transaminase catalysed reactions. *Organic & biomolecular chemistry*, 7(2):395–398, 2009.
- [113] Linqiu Cao. *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*. John Wiley & Sons, 2006.
- [114] S Karboune, A Archelas, R Furstoss, and J Baratti. Immobilization of epoxide hydrolase from aspergillus niger onto deae-cellulose: enzymatic properties and application for the enantioselective resolution of a racemic epoxide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32(5-6):175–183, 2005.

- [115] Harald Gröger, Emine Capan, Anita Barthuber, and Klaus-Dieter Vorlop. Asymmetric synthesis of an (r)-cyanohydrin using enzymes entrapped in lens-shaped gels. *Organic Letters*, 3(13):1969–1972, 2001.
- [116] Antonella Petri, Patrizia Marconcini, and Piero Salvadori. Efficient immobilization of epoxide hydrolase onto silica gel and use in the enantioselective hydrolysis of racemic para-nitrostyrene oxide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32(5-6):219–224, 2005.
- [117] Abhijeet Borole, Sheng Dai, Catherine L Cheng, Miguel Rodriguez, and Brian H Davison. Performance of chloroperoxidase stabilization in mesoporous sol-gel glass using in situ glucose oxidase peroxide generation. In *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO*, pages 273–285. Springer, 2004.
- [118] Michaela Kreiner and Marie-Claire Parker. Protein-coated microcrystals for use in organic solvents: application to oxidoreductases. *Biotechnology letters*, 27(20):1571–1577, 2005.
- [119] Michaela Kreiner, Barry D Moore, and Marie Claire Parker. Enzyme-coated micro-crystals: a 1-step method for high activity biocatalyst preparation. *Chemical communications*, (12):1096–1097, 2001.
- [120] Alexander E Ivanov, Ewald Edink, Ashok Kumar, Igor Yu Galaev, Alexander F Arendsen, Alle Bruggink, and Bo Mattiasson. Conjugation of penicillin acylase with the reactive copolymer of n-isopropylacrylamide: a step toward a thermosensitive industrial biocatalyst. *Biotechnology progress*, 19(4):1167–1175, 2003.
- [121] Alain C Pierre and Gerard M Pajonk. Chemistry of aerogels and their applications. *Chemical Reviews*, 102(11):4243–4266, 2002.
- [122] Olivier Orçaire, Paulette Buisson, and Alain C Pierre. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42(3-4):106–113, 2006.

- [123] Marcela Ayala, Eduardo Horjales, Michael A Pickard, and Rafael Vazquez-Duhalt. Cross-linked crystals of chloroperoxidase. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(4):828–831, 2002.
- [124] L Cao, LM Van Langen, F Van Rantwijk, and RA Sheldon. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6):665–670, 2001.
- [125] HW Yu, H Chen, X Wang, YY Yang, and CB Ching. Cross-linked enzyme aggregates (cleas) with controlled particles: application to candida rugosa lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4):124–127, 2006.
- [126] Cesar Mateo, José M Palomo, Luuk M Van Langen, Fred Van Rantwijk, and Roger A Sheldon. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. *Biotechnology and bioengineering*, 86(3):273–276, 2004.
- [127] Loic Leclercq and Andreea R Schmitzer. Supramolecular effects involving the incorporation of guest substrates in imidazolium ionic liquid networks: Recent advances and future developments. *Supramolecular Chemistry*, 21(3-4):245–263, 2009.
- [128] Christian P Mehnert. Supported ionic liquid catalysis. *Chemistry—A European Journal*, 11(1):50–56, 2005.
- [129] Md Abu Bin Hasan Susan, Taketo Kaneko, Akihiro Noda, and Masayoshi Watanabe. Ion gels prepared by in situ radical polymerization of vinyl monomers in an ionic liquid and their characterization as polymer electrolytes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(13):4976–4983, 2005.
- [130] Neil Winterton. Solubilization of polymers by ionic liquids. *Journal of Materials Chemistry*, 16(44):4281–4293, 2006.
- [131] Anders Riisager, Rasmus Fehrmanna, Marco Haumannb, and Peter Wasserscheidb. Supported ionic liquids: versatile reaction and separation media. *Topics in catalysis*, 40(1-4):91–102, 2006.

- [132] Luís C Branco, João G Crespo, and Carlos A M Afonso. Highly selective transport of organic compounds by using supported liquid membranes based on ionic liquids. *Angewandte Chemie*, 114(15):2895–2897, 2002.
- [133] Natalia V Shvedene, Denis V Chernyshov, Maria G Khrenova, Andrey A Formanovsky, Vladimir E Baulin, and Igor V Pletnev. Ionic liquids plasticize and bring ion-sensing ability to polymer membranes of selective electrodes. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 18(13-14):1416–1421, 2006.
- [134] Bo Peng, Jingwei Zhu, Xiaojie Liu, and Yu Qin. Potentiometric response of ion-selective membranes with ionic liquids as ion-exchanger and plasticizer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133(1):308–314, 2008.
- [135] FJ Hernández-Fernández, A Pérez de los Ríos, F Mateo-Ramírez, MD Juarez, LJ Lozano-Blanco, and C Godínez. New application of polymer inclusion membrane based on ionic liquids as proton exchange membrane in microbial fuel cell. *Separation and Purification Technology*, 160:51–58, 2016.
- [136] Z Baicha, MJ Salar-García, VM Ortiz-Martínez, FJ Hernández-Fernández, AP de los Ríos, DP Maqueda Marín, JA Collado, F Tomás-Alonso, and M El Mahi. On the selective transport of nutrients through polymer inclusion membranes based on ionic liquids. *Processes*, 7(8):544, 2019.
- [137] Feng Shi, Qinghua Zhang, Dongmei Li, and Youquan Deng. Silica-gel-confined ionic liquids: a new attempt for the development of supported nanoliquid catalysis. *Chemistry—A European Journal*, 11(18):5279–5288, 2005.
- [138] Kenta Fukumoto, Masahiro Yoshizawa, and Hiroyuki Ohno. Room temperature ionic liquids from 20 natural amino acids. *Journal of the American Chemical Society*, 127(8):2398–2399, 2005.
- [139] Whitney L Hough, Marcin Smiglak, Héctor Rodríguez, Richard P Swatloski, Scott K Spear, Daniel T Daly, Juliusz Pernak, Judith E Grisel, Richard D Carliss, Morgan D Soutullo, et al. The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. *New Journal of Chemistry*, 31(8):1429–1436, 2007.

- [140] María Vallet-Regí, Francisco Balas, and Daniel Arcos. Mesoporous materials for drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(40):7548–7558, 2007.
- [141] Brian G Trewyn, Chad M Whitman, and Victor S-Y Lin. Morphological control of room-temperature ionic liquid templated mesoporous silica nanoparticles for controlled release of antibacterial agents. *Nano Letters*, 4(11):2139–2143, 2004.
- [142] Lydie Viau, Corine Tourné-Péteilh, Jean-Marie Devoisselle, and André Vioux. Ionogels as drug delivery system: one-step sol–gel synthesis using imidazolium ibuprofenate ionic liquid. *Chemical Communications*, 46(2):228–230, 2010.
- [143] A. P. de los Ríos, F. J. Hernández-Fernández, L. J. Lozano, S. Sánchez, J. I. Moreno, and C. Godínez. Removal of metal ions from aqueous solutions by extraction with ionic liquids. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(2):605–608, 2010.
- [144] FJ Hernández-Fernández, AP de Los Ríos, D Gómez, M Rubio, and G VÍllora. Selective extraction of organic compounds from transesterification reaction mixtures by using ionic liquids. *AIChE journal*, 56(5):1213–1217, 2010.
- [145] Antonia De los Ríos, Francisco Hernández-Fernández, Luis Lozano-Blanco, Sergio Sanchez, Anahí Ginestá Anzola, Carlos Godínez, Francisca Tomás-Alonso, and Joaquin Quesada-Medina. On the selective separation of metal ions from hydrochloride aqueous solution by pertraction through supported ionic liquid membranes. *Journal of Membrane Science*, 444, 10 2013.
- [146] F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, F. Tomás-Alonso, D. Gómez, and G. VÍllora. On the development of an integrated membrane process with ionic liquids for the kinetic resolution of rac-2-pentanol. *Journal of Membrane Science*, 314(1):238 – 246, 2008.
- [147] Z. Baicha, M.J. Salar-García, V.M. Ortiz-Martínez, F.J. Hernández-Fernández, A.P. de los Ríos, D.P. Maqueda Marín, J.A. Collado, F. Tomás-

- Alonso, and M. El Mahi. On the selective transport of nutrients through polymer inclusion membranes based on ionic liquids. *Processes*, 7(8), 2019.
- [148] Francisco J Hernández-Fernández, Antonia P de los Ríos, Luis J Lozano-Blanco, and Carlos Godínez. Biocatalytic ester synthesis in ionic liquid media. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(11):1423–1435, 2010.
- [149] Pedro Lozano, Eduardo García-Verdugo, Naima Karbass, Kimberley Montague, Teresa De Diego, M Isabel Burguete, and Santiago V Luis. Supported ionic liquid-like phases (sillps) for enzymatic processes: Continuous kr and dkr in sillp-scco 2 systems. *Green Chemistry*, 12(10):1803–1810, 2010.
- [150] Mònica Campàs and Jean-Louis Marty. Encapsulation of enzymes using polymers and sol-gel techniques. In *Immobilization of enzymes and cells*, pages 77–85. Springer, 2006.
- [151] Sihem Haj Kacem, Said Galai, Antonia Perez de los Rios, Francisco Jose Hernandez Fernandez, and Issam Smaali. New efficient laccase immobilization strategy using ionic liquids for biocatalysis and microbial fuel cells applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(1):174–183, 2018.
- [152] Sihem HajKacem, Said Galai, Francisco José Hernández Fernandez, Antonia Pérez de los Ríos, Issam Smaali, and Joaquín Quesada Medina. Bioreactor membranes for laccase immobilization optimized by ionic liquids and cross-linking agents. *Applied biochemistry and biotechnology*, pages 1–17, 2019.
- [153] Mark J. Muldoon, Charles M. Gordon, and Ian R. Dunkin. Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, pages 433–435, 2001.
- [154] Yangyang Jiang, Chen Guo, Hansong Xia, Iram Mahmood, Chunzhao Liu, and Huizhou Liu. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4):103–109, 2009.
- [155] Roger A Sheldon. The e factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chemistry*, 19(1):18–43, 2017.

- [156] Pedro Lozano, Teresa De Diego, Tanja Sauer, Michel Vaultier, Said Gmouh, and José L Iborra. On the importance of the supporting material for activity of immobilized candida antarctica lipase b in ionic liquid/hexane and ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic media. *The Journal of supercritical fluids*, 40(1):93–100, 2007.
- [157] Hongbo Suo, Lili Xu, Chao Xu, Hongyue Chen, Dinghua Yu, Zhen Gao, He Huang, and Yi Hu. Enhancement of catalytic performance of porcine pancreatic lipase immobilized on functional ionic liquid modified fe₃o₄-chitosan nanocomposites. *International journal of biological macromolecules*, 119:624–632, 2018.