

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 105**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2009 PCT/EP2009/065586**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2010 WO10057996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2009 E 09755915 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2347000**

54 Título: **Uso de líquidos iónicos para implementar un procedimiento para la preparación de biodiésel**

30 Prioridad:

21.11.2008 EP 08291101

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.07.2017

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE MURCIA (50.0%)

Avda. Teniente Flomesta N°5

30003 Murcia, ES y

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (50.0%)

72 Inventor/es:

LOZANO, PEDRO;

DE DIEGO, TERESA;

IBORRA, JOSÉ LUIS y

VAULTIER, MICHEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 626 105 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de líquidos iónicos para implementar un procedimiento para la preparación de biodiésel

La invención se refiere al uso de líquidos iónicos para implementar un procedimiento para la preparación de biodiésel.

5 El biodiésel es un combustible líquido que se origina a partir de recursos renovables, es decir, biomasa, como alternativa a los productos de combustibles fósiles, que contiene ésteres de alquilo (principalmente metilo y etilo) de ácidos grasos de cadena larga. Se obtienen mediante transesterificación catalítica de triacilglicéridos, presente en aceites vegetales (es decir, oliva, girasol, etc.) y/o grasas animales, con un alcohol alifático primario (es decir, usualmente metanol, etanol) que actúa como aceptor de acilo.

10 La producción industrial de biodiésel en Europa, EE.UU. y Japón se realiza mediante procedimientos químicos basados en la transesterificación catalizada por bases fuertes o tales como por ejemplo, NaOH, o KOH, que son tóxicos y corrosivos por naturaleza (véase la patente de Estados Unidos n.º 5.354.878; patente de Estados Unidos n.º 2003/0032826). La producción de biodiésel mediante esta tecnología muestra algunos problemas, tales como la dificultad de recuperar el subproducto glicerol, la necesidad de eliminar el catalizador básico del medio de reacción
15 lavando con agua, que produce grandes cantidades de residuos alcalinos. Adicionalmente, el contenido inicial de agua y de ácidos grasos libres en el aceite vegetal o la grase utilizada como sustrato es un serio inconveniente, debido a la disminución del rendimiento del biodiésel debida a los subproductos indeseables (es decir, jabón, emulsiones, etc.) generados, que hacen necesario utilizar aceites vegetales refinados.

20 Durante los últimos años, las ventajas de utilizar enzimas inmovilizadas sobre soportes sólidos como catalizadores para sintetizar productos con interés industrial se ha demostrado ampliamente. De esta forma, se ha descrito ampliamente la síntesis enzimática de biodiésel mediante transesterificación a partir de aceites vegetales (véase la patente de Estados Unidos 6.398.707 B1; patente WO 2006/050589 A1; patente WO 2007/055661 A1; patente EP 1 705 238 A1; Shimada, Y. y col., 1999, J. Am. Oil Chem. Soc., 76, 789-793; Shimada, Y. y col., 2002, J Mol. Catal B: Enzymatic, 17, 133-142; Soumanou M. y Bornscheuer U.T, 2003, Enzyme Microb. Technol., 33, 97-103; Mahabubur
25 M.D. y col., 2006, Biocatal. Biotrans., 24, 257-262; Royon D. y col., 2006, Biores. Technol., 98, 648-653; Al-Zuhair y col., 2006, Biochem. Eng. J., 30, 212-217). Las lipasas inmovilizadas utilizadas son por ejemplo Novozym 435, Lipozym TL, Lipozym RM.

30 Sin embargo, el interés industrial de un procedimiento enzimático en un medio no acuoso se basará mucho en la actividad, la estabilidad y la capacidad de reciclaje del biocatalizador que se use en la separación fácil del biodiésel de la mezcla de reacción y el glicerol. En este sentido, la síntesis del biodiésel utilizando lipasas inmovilizadas muestra algunas desventajas, que constituye un hándicap hacia su explotación a escala industrial. En primer lugar, es necesario apuntar la baja solubilidad y/o inmiscibilidad de los triacilglicéridos (es decir, aceite vegetal y/o grasas animales) y alcoholes alifáticos primarios (es decir, metanol, etanol, etc.) evaluados en la reacción de transesterificación, que dan como resultado sistemas bifásicos. En segundo lugar, la naturaleza hidrófila de estos
35 alcoholes es perjudicial para las lipasas inmovilizadas cuando se introducen en la mezcla de reacción, las partículas de catalizador que consiguen impregnarse con el alcohol, que limita gravemente la accesibilidad de los triacilglicéridos en el microentorno de la enzima e induce la desactivación enzimática. El resultado final es una pérdida importante en la eficacia de la enzima que limita la frecuencia de renovación y el número de operaciones de reciclado. Además, la reacción de transesterificación catalizada por la enzima da como resultado los ésteres de alquilo de ácido graso (biodiésel) y el subproducto de glicerol que provoca un envenenamiento continuo de biocatalizador hasta que se completa la desactivación.

40 Se han desarrollado algunas estrategias para superar todos los problemas anteriormente mencionados. Sin embargo, la estrategia más popular para mejorar la eficacia catalítica de las enzimas en la síntesis de biodiésel es la solubilización de sustratos (triacilglicéridos y metanol) en disolventes orgánicos que tienen polaridad media, tales como, terc-butanol, 2-propanol, 2-butanol o tetrahidrofurano, en una relación mayor del 30% en v/v con respecto a los sustratos. Estos sistemas conducen a un aumento claro en el precio global del procedimiento por el consumo del disolvente y la necesidad de purificar el producto de biodiésel mediante destilación.

45 El uso de disolventes orgánicos volátiles, como medio de reacción en los procedimientos enzimáticos, muestra algunas desventajas tales como, la necesidad de recuperación, como consecuencia del alto precio y del impacto ambiental. El uso de tecnologías limpias y sostenibles en la industria química, denominado también Química Verde, es uno de los principales desarrollos para el futuro próximo en nuestra sociedad. De esta forma, los líquidos iónicos (IL) han emergido recientemente como nuevos disolventes verdes y/o medios de reacción para los procedimientos químicos, debido a su capacidad de constituir una alternativa limpia, no contaminantes y reutilizables en comparación con los disolventes orgánicos volátiles (VOS).

55 El uso de IL como medio de reacción en transformaciones enzimáticas es muy reciente: la primera referencia se ha publicado en 2000 (véanse Erbedinger, M. y col., 2000, Biotechnol. Prog. 16, 1129-1131; Sheldon, R.A. 2005, Green Chem., 7, 267-278). Este descubrimiento ha tenido un gran impacto en los últimos seis años, como consecuencia de la excelente actividad y estabilidad presentadas por las numerosas enzimas evaluadas. Las lipasas son las más

citadas en las formas libre e inmovilizada (véase Madeira Lau R. y col., 2000, *Org Lett.* 2, 4189-4191; Lozano, P., y col 2001, *Biotechnol. Lett.* 23, 1529-1533; Lozano, P. y col., 2001, *Biotechnol. Bioeng.* 75, 563-569). Actualmente, Los IL son la alternativa verde más interesante a los disolventes orgánicos volátiles por el desarrollo de los procedimientos biocatalíticos en sistemas no acuosos, incluyendo a temperaturas extremadamente altas (es decir, 150 °C) (véase Lozano, P. y col., 2003, *Biotechnol. Prog.* 19, 380-382).

Se ha descrito recientemente el uso de algunos IL para la síntesis de biodiésel utilizando la catálisis química o enzimática. En todos los casos, Los IL evaluados se basaron en cationes 1,3-dialquilimidazolio de cadena corta (por ejemplo, 1-etil-3-metilimidazolio [Emim], 1-butil-3-metilimidazolio [Bmim], o 1-hexil-3-metilimidazolio [Hmim]). Así pues, el IL 1-butil-3-metilimidazolio tetracloro-indato [Bmim][InCl₄] (Neto. y col., 2007, *J. Catal.* 249, 154-161) se ha ensayado para la síntesis de biodiésel a partir de aceites vegetales utilizando un complejo estannoso [Sn(3-hidroxi-2-metil-4-pirona)₂(H₂O)₂] como catalizador químico. Se observó una rápida desactivación completa del sistema tras el primer ciclo de uso. De la misma forma, se han evaluado los IL ácidos de Brønsted (por ejemplo, sulfato de 1-butilsulfónico-3-metilimidazolio) como catalizador químico para producir biodiésel mediante la transesterificación del aceite de semillas de algodón con metanol a temperaturas superiores a 150 °C (Wu, Q. y col., 2007, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 7955-7960). Para el caso de la catálisis enzimática, el uso de los IL basados en el catión 1,3-dialquilimidazolio (es decir, hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio [Bmim][PF₆] o tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio [Bmim][BF₄]) mostró que eran medios de reacción no completamente adecuados para la síntesis de biodiesel (Shunitha, S., y col., 2007, *Biotechnol. Lett.*, 29, 1881-1885; Ha, S.H. y col., 2007, *Enzyme Microb. Technol.*, 41, 480-483; Gamba, M. y col., 2008, *Adv. Synth. Catal.*, 350, 160-164). En todos los casos, la baja solubilidad de los triacilglicéridos en los IL evaluados dio como resultado un medio de reacción en dos fases que proporcionó una baja actividad enzimática, finalizando en 24 horas los tiempos de reacción hasta alcanzar la conversión completa de los triglicéridos en FAME. Miyawaki y col. 2008, *J. Biosci. Bioeng.* 105, 61-64, desvelan la butanolisis catalizada por lipasas de la trioleína en el líquido iónico de trifluoroacetato de metiltrietilamonio, que es miscible con 1-butanol, y trioleína.

Uno de los objetivos de la invención es proporcionar un procedimiento para la producción de biodiésel usando disolvente reciclable con un bajo impacto ambiental (química verde).

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para la producción de biodiésel con una cinética de reacción mejorada.

Uno de los objetivos de la invención es proporcionar un procedimiento para la producción de biodiésel, permitiendo una fácil separación de los productos de reacción.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para la producción de biodiésel que evite el envenenamiento del catalizador.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para la producción de biodiésel en el que se puedan usar diferentes tipos de aceites, grasas o ácidos grasos en el mismo procedimiento.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para la producción de biodiésel en el cual una presencia de agua y/o de ácidos carboxílicos libres en el aceite o la grasa bruta no deterioran gravemente el procedimiento.

De acuerdo con la reivindicación 1, la presente invención se refiere al uso de una combinación de

- al menos un líquido iónico que es lipófilo, y no miscible con agua, y
- al menos una enzima,

en la que el líquido iónico lipófilo está constituido por un catión lipófilo y un anión hidrófobo, estando constituido dicho catión por una cabeza catiónica, y estando constituido dicho anión por una cabeza aniónica, y en el que dicha cabeza catiónica y/o cabeza aniónica están sustituidas por una o varias cadenas secundarias de carbono que pueden ser similares o diferentes entre sí, y en el que la cadena secundaria de carbono en la cabeza catiónica y/o la cabeza aniónica son cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o no saturadas, suponiendo que al menos una de las cadenas secundarias comprenda al menos 10 átomos de carbono, en la que la enzima es una lipasa o una esterasa,

para la implementación de un procedimiento de esterificación y/o transesterificación de un sustrato con al menos un alcohol, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas, en el que dicho líquido iónico, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación.

En la presente invención, los inventores han identificado de forma sorprendente líquidos iónicos con cadenas de carbono adecuadas, que muestran una buena lipofilia y una adecuada temperatura de fusión que permite al líquido iónico ser líquido a una temperatura adecuada para un procedimiento de esterificación enzimática y/o un procedimiento de transesterificación. Esto no era obvio debido a que las cadenas de carbono largas aumentan la temperatura de fusión de los líquidos iónicos y debido a que las enzimas se degradan a mayores temperaturas.

Así pues, a través de la invención, se consigue inesperadamente un equilibrio entre la lipofiliidad y la temperatura de fusión del líquido iónico por una parte y la estabilidad y reactividad de las enzimas por la otra.

5 La buena lipofiliidad del líquido iónico permite la formación de una única fase homogénea que contiene dicho líquido iónico, alcohol y sustrato. En otras palabras, la invención se refiere al uso de un líquido iónico que solubiliza los reactivos, es decir, los sustratos (aceites, grasas, ácidos grasos) y el alcohol a fin de generar una fase líquida homogénea. La fase líquida homogénea y la enzima forman la fase de reacción. La fase de reacción:

- es homogénea, si la enzima (soportada o no) es soluble en el líquido iónico, o
- es una suspensión de enzimas en una fase homogénea, si la enzima (soportada o no) no es soluble en el líquido iónico.

10 Esta fase líquida homogénea presenta una ventaja en términos de cinética de reacción, debido a que la reacción puede producirse en cualquier parte en la fase de reacción y no solo en una interfase, como es en el caso de las fases de reacción heterogéneas.

Esta única fase líquida homogénea presenta otra ventaja debido a que reduce la cinética de transferencia de masas que se produce en un sistema bifásico líquido - líquido.

15 Al comienzo de la reacción, solo está presente una fase líquida homogénea, posiblemente con una enzima soportada o no en suspensión en esta fase o soluble en esta fase.

La expresión "fase líquida homogénea" significa que el líquido que constituye dicha fase es uniforme a través de su composición o su estructura; en otras palabras, las propiedades de una parte más pequeña de la disolución se aplican a la totalidad.

20 Los términos "aceites" y "grasas" describen composiciones químicas que contienen principalmente triacilglicéridos y/o diacilglicéridos y/o monoacilglicéridos y/u otros ésteres grasos (es decir, fosfolípidos), y ácidos carboxílicos y alcoholes de cadenas largas, producidas por vegetales o animales y/ por transformación de productos naturales, siendo comestibles o no comestibles. Normalmente, los aceites y las grasas son sustancias lipófilas, inmiscibles con agua.

25 El término "líquido iónico" (IL significa un líquido que es una sal formada por la asociación de un catión ([C]⁺) y un anión ([A]⁻), estando en estado líquido a temperaturas generalmente inferiores a 100 °C y sustancialmente iguales o inferiores a la temperatura ambiente. Esta se ha comparado, por ejemplo, con NaCl, que, cuando se calienta a una temperatura superior a su punto de fusión (>800 °C), es un líquido conocido como sal fundida que puede considerarse como un líquido iónico (IL), mientras que una solución de esta sal es una solución iónica (véase Waterscheid, P. and Welton T. Eds., 2003, *Ionic Liquids in Synthesis*. Wiley-VCH Verlag). Los IL comunes son sales de onio tales como cationes de fosfonio, sulfonio, tetraalquilamonio o cualquier catión resultante de la cuaternización de un heterociclo tal como, por ejemplo, cationes de imidazolio o piridinio, combinados con aniones que tienen una fuerte deslocalización de carga (es decir, PF₆⁻, BF₄⁻, bis[(trifluorometil)sulfonil]imida, es decir, -NTf₂), u otros tales como Cl⁻, Br⁻, I⁻, CF₃-CO₂⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻ etc. Desde un punto de vista tecnológico, Los IL muestran interesantes propiedades físicas y químicas que les permiten utilizarlos como disolventes en una gran variedad de procedimientos químicos (es decir, extracción, medios de reacción, catalizadores, etc...). Estas propiedades incluyen una presión de vapor poco importante de tal manera que no se evaporan; una excelente estabilidad térmica (estable a temperaturas > 300 °C en algunos casos), así como su capacidad para disolver una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo gases y polímeros. Adicionalmente, otras propiedades de los IL, tales como, densidad, punto de fusión, polaridad o miscibilidad con agua o disolventes orgánicos, pueden sintonizarse finamente como una función del anión y el catión, cuyas estructuras pueden diseñarse a voluntad de acuerdo con los sustituyentes y/o los grupos funcionales unidos.

45 La combinación puede comprender un único líquido iónico o una mezcla de líquidos iónicos. Una combinación que contiene un líquido iónico es más fácil de implementar, pero si no se pueden conseguir las propiedades de temperatura de fusión de solubilización del reactivo deseadas con un líquido iónico, se puede diseñar una mezcla de líquidos iónicos para alcanzar finamente las propiedades deseadas.

50 La expresión "lipófilo" caracteriza un compuesto que tiene una afinidad por los lípidos, tiende a combinarse con lípidos, o es capaz de disolverse en lípidos. Los compuestos lipófilos tienen invariablemente grandes coeficientes de partición de aceite/agua. El coeficiente de partición es la relación de concentración de un compuesto (soluta) en las dos fases de una mezcla de dos disolventes inmiscibles en equilibrio. De este modo, este coeficiente es una medida de la solubilidad diferencial del compuesto entre estos dos disolventes, que son generalmente agua y octanol. El logaritmo de la relación de las concentraciones del soluto desionizado en los disolventes se denomina log P:

$$\log P_{oct/agua} = \log \left(\frac{[soluta]_{octanol}}{[soluta]_{agua\ desionizada}} \right)$$

En otras palabras, los líquidos iónicos implicados en la invención son hidrófobos.

La expresión "hidrófobo" caracteriza un compuesto que no tiene afinidad por agua; o que tiende a repeler y no absorber el agua; o que tiende a no disolverse en agua, o a no mezclarse con agua, o a no humedecerse con agua.

En la práctica común, todos los líquidos iónicos contienen una pequeña cantidad de agua.

5 El término "esterificación" designa la reacción química general en la que dos reactivos (normalmente un alcohol y un ácido) forman un éster y agua, como productos de la reacción. En la presente invención, la esterificación se produce entre los ácidos grasos y el alcohol (tal como metanol o etanol) para producir ésteres de alquilo de ácidos grasos y agua. Dicha esterificación se cataliza por una enzima seleccionada entre lipasas y esterasas.

10 El término "transesterificación" designa la reacción química en la que el grupo alcoxi de un compuesto éster se intercambia con otro grupo alcoxi mediante la reacción de dicho éster con un alcohol, normalmente en presencia de un catalizador. En la presente invención, la transesterificación se produce entre triglicéridos, o diglicéridos, o monoglicéridos y un alcohol (tal como metanol o etanol) catalizada por una enzima seleccionada entre una lipasa o una esterasa, para producir ésteres de alquilo de ácidos grasos y glicerol.

Se desvela en el presente documento una

15 combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que dicho líquido iónico es

- hidrófobo,
- sólido a temperatura ambiente,
- no miscible con glicerol,

20 en el que dicho líquido iónico, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación.

A medida que la reacción transcurre, se forman nuevos compuestos, sustancialmente biodiésel y glicerol. Al final de la reacción, cuando todos los reactivos se han consumido por la reacción, se han formado nuevas fases, que contienen respectivamente los productos de reacción que se han formado, dichas nuevas fases son distintas de la fase que contiene el líquido iónico.

25 De acuerdo con una realización, la invención se refiere al uso de una combinación, como se define en la reivindicación 1, en el que se forman tres fases al final de dicho procedimiento de esterificación y/o transesterificación,

- una primera fase que contiene al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
- una segunda fase que consiste sustancialmente en glicerol,
- 30 - una tercera fase que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

De acuerdo con otra realización, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en el que se forman tres fases al final de dicho procedimiento de esterificación y transesterificación,

- 35 - *una primera fase que contiene al menos un líquido iónico y al menos una enzima,*
- *una segunda fase que consiste sustancialmente en glicerol,*
- *una tercera fase que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.*

Al final de la reacción, Cuando al menos uno de los reactivos se ha consumido en la reacción, se forman nuevos productos. Estos nuevos productos son:

40 ésteres de alquilo de ácidos grasos, o una mezcla de ésteres de alquilo de ácidos grasos, resultante de la transesterificación de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos con un alcohol, y de la esterificación de un ácido graso con un alcohol, y
agua y
glicerol.

45 El glicerol y los ésteres de alquilo de ácidos grasos no son solubles entre sí, y ambos no son solubles en la fase que contiene el líquido iónico. Así pues, se forman tres fases al final de la reacción,

- una fase de líquido iónico que comprende la enzima,
- una fase de glicerol,
- una fase de éster de alquilo de ácido graso.

50 La expresión "primera fase que contiene" significa que la primera fase considerada está constituida por el líquido iónico, la enzima, y el sustrato y/o el alcohol que permanece sin consumir al final de la reacción. Si la cantidad es estequiométrica con respecto a la cantidad de sustrato, entonces, la primera fase está compuesta de al menos 90%,

o 95%, o 99% de líquido iónico y enzima, al final de la reacción.

La expresión "segunda fase que consiste esencialmente de glicerol" significa que la segunda fase considerada está compuesta de al menos un 90% o 95% o 99% de glicerol al final de la reacción. el resto puede estar constituido por agua, alcohol, o impurezas polares (el sustrato puede originarse a partir de residuos y de esta manera puede contener trazas de compuestos desconocidos).

La posible presencia de alcohol da como resultado un exceso de alcohol que no ha reaccionado con el sustrato.

La expresión "tercera fase que consiste sustancialmente de ésteres de alquilo de ácidos grasos" significa que la tercera fase considerada está compuesta de al menos 90%, o 95%, o 99% de ésteres de alquilo de ácidos grasos al final de la reacción. El resto puede estar constituido por ácidos grasos o impurezas apolares (el sustrato puede originarse a partir de residuos y de esta manera puede contener trazas de compuestos desconocidos).

La expresión "miscible" significa la propiedad de los líquidos de mezclarse en todas las proporciones, formando una solución homogénea. Por el contrario, se dice que dos líquidos son inmiscibles se en cualquier proporción, no forman una solución. La miscibilidad es diferente de la solubilidad.

La expresión "solubilidad" se refiere a la capacidad de una sustancia dada, el soluto, de disolverse en un disolvente. Se mide en términos de cantidad máxima de soluto disuelta en un disolvente en equilibrio. Algunos líquidos se solubles en cualquier proporción en un disolvente dado; se conoce esto como miscibilidad. Así pues, los líquidos miscibles son solubles entre sí, pero los líquidos que son solubles entre sí no son necesariamente miscibles.

El líquido iónico utilizado puede ser

- sólido o líquido a 0 °C, o
- sólido o líquido a temperatura ambiente.

De acuerdo con una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en el que el mencionado líquido iónico es líquido o sólido a temperatura ambiente, preferentemente sólido a temperatura ambiente.

De acuerdo con otra realización ventajosa, la invención se refiere al uso de una combinación, tal como se ha definido anteriormente aquí, en la que el líquido iónico es sólido a 0 °C.

El líquido iónico es ventajosamente líquido a la temperatura de reacción (generalmente aproximadamente 50 a aproximadamente 60 °C) y sólido a 0 °C. El líquido iónico puede ser sólido o líquido entre estas dos temperaturas, por ejemplo, a temperatura ambiente.

La expresión "temperatura ambiente" significa un intervalo de temperatura que se encuentra comúnmente en los edificios situados en regiones templadas, variando este desde aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, normalmente desde aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C.

Si el líquido iónico es sólido a 0 °C y sólido a temperatura ambiente, es necesario el calor a fin de alcanzar la temperatura de fusión del líquido iónico de tal manera que la reacción pueda continuar en una fase líquida. Si el líquido iónico es sólido a 0 °C y líquido a temperatura ambiente,

- la reacción puede continuar sin calentamiento, para la cinética de reacción será menor y los ésteres de alquilo de ácidos grasos se producirán lentamente, o
- la reacción se puede calentar a fin de aumentar la cinética de reacción y para aumentar la velocidad de producción de los ésteres de alquilo de ácidos grasos.

La expresión "temperatura de fusión" significa el intervalo de temperatura al cual cambia el estado del compuesto de sólido a líquido. Aunque esto sugeriría una temperatura específica, los compuestos más cristalinos se funden realmente en un intervalo de unos pocos grados o menos. En la temperatura de fusión, o punto de fusión, las fases sólida y líquida coexisten en equilibrio.

La temperatura de reacción puede variar desde la temperatura ambiente (es decir, 30 °C) a 50 °C. Este intervalo es menos ventajoso, ya que el procedimiento de reacción será más largo debido a la baja energía de calentamiento y de esta manera a la baja cinética de la reacción.

La temperatura de reacción puede variar desde 50 °C a 70 °C. Este intervalo es ventajoso, ya que no implica demasiada energía, y el calentamiento aumentará la cinética de reacción sin producir demasiada degradación de la enzima.

La temperatura de reacción puede variar desde 70 °C a 100 °C. Este intervalo es menos ventajoso, ya que implica más energía y la temperatura puede reducir la estabilidad de la enzima.

Se desvela también en el presente documento el uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, con un disolvente orgánico o un líquido iónico, en el que dicha combinación tiene una temperatura de fusión superior a la temperatura ambiente y dicha combinación es líquida a temperatura ambiente.

Pueden añadirse uno o varios disolventes orgánicos (por ejemplo, acetonitrilo, tetrahidrofurano) a la mencionada combinación a fin de modificar la temperatura de fusión del líquido iónico. En general, la temperatura de fusión disminuirá, y de esta manera se puede usar líquidos iónicos, que no son líquidos por sí mismos a la temperatura de reacción.

- 5 Se pueden añadir uno o varios líquidos iónicos a la mencionada combinación a fin de modificar la temperatura de fusión de los líquidos iónicos y la mezcla de enzimas obtenida de esta manera. La temperatura de fusión disminuirá, y de esta manera, se pueden usar líquidos iónicos, que no son líquidos por sí mismos a la temperatura de reacción.

De acuerdo con una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en el que dicho líquido iónico, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea, a temperatura ambiente, preferentemente a una temperatura superior a 30 °C.

Una fase líquida homogénea es ventajosa, ya que asegura una buena repartición homogénea tridimensional de los componentes de reacción a través de la fase de reacción, y una óptima probabilidad de contacto entre los componentes de la reacción. De esta manera, la reacción puede continuar en las mejores condiciones para conseguir un rendimiento elevado.

La invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, para la implementación de un procedimiento de producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos mediante una reacción de esterificación y/o transesterificación del sustrato.

Los ésteres de alquilo de ácidos grasos se producen a través de una esterificación de los ácidos grasos, y a través de una transesterificación de los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos presentes en los aceites y grasas utilizados en la reacción. Estos ésteres pueden utilizarse como biodiésel.

De acuerdo con una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que la enzima está soportada y dicha enzima soportada está en suspensión, o en forma soluble, en dicha única fase líquida homogénea.

25 La expresión "enzima soportada" significa que la enzima está combinada con un transportador, estando inerte dicho transportador con respecto a los compuestos (alcohol, sustrato, líquido iónico) presente en la fase líquida homogénea, y estando la enzima generalmente unida física o químicamente (es decir, mediante adsorción, enlace covalente, etc.) sobre la superficie del transportador.

La expresión "suspensión" significa que las partículas están inmersas en un líquido homogéneo y forman de esta manera una mezcla heterogénea. Dichas partículas pueden ser suficientemente grandes para la sedimentación.

Una enzima soportada es generalmente fácil de retirar de la fase líquida iónica, ya que no es soluble en el líquido iónico y permanece en suspensión en la fase líquida homogénea.

De acuerdo con otra realización, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que la enzima no está soportada, y dicha enzima no soportada está en suspensión, o en forma soluble, en la mencionada única fase líquida homogénea.

Las enzimas no soportadas pueden ser solubles en el líquido iónico y de esta manera la fase de reacción permanece completamente homogénea.

Se desvela también en el presente documento el uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que la temperatura de fusión del líquido iónico es inferior a la temperatura del procedimiento de esterificación y/o transesterificación, y preferentemente la temperatura de fusión del líquido iónico está comprendida en el intervalo de temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 100 °C, particularmente de 0 °C a 40 °C y de 40 °C a 60 °C y de 60 °C a 100 °C.

Se desvela además el uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que la temperatura de fusión de una mezcla de dicha combinación en un sustrato es superior al del punto de ebullición de dicho sustrato solo, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos, o una de sus mezclas

De forma interesante y sorprendente, se ha observado que puede aumentarse el punto de fusión de un líquido iónico cuando solubiliza en aceite (por ejemplo [C₁₆MIM][PF₆] en trioleína y [C₁₈MIM][PF₆] en trioleína). Un aumento en el punto de fusión requeriría más energía para obtener la fase inicial de un líquido homogéneo. La enzima es menos estable a una temperatura elevada, por tanto, es preferible no aumentar demasiado la temperatura de reacción.

En la siguiente tabla se indican los puntos de fusión de algunos líquidos iónicos para su uso en la presente invención:

Nombre corto	Nombre	Punto de fusión (°C)
C₁₂mim BF₄	Tetrafluorborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio	30
C₁₄mim BF₄	Tetrafluorborato de 1-tetradecil-3-metilimidazolio	36
C₁₆mim BF₄	Tetrafluorborato de 1-hexadecil-3-metilimidazolio	49
C₁₈mim BF₄	Tetrafluorborato de 1-octadecil-3-metilimidazolio	60
C₁₂mim PF₆	Hexafluorofosfato de 1-dodecil-3-metilimidazolio	58
C₁₄mim PF₆	Hexafluorofosfato de 1-tetradecil-3-metilimidazolio	67
C₁₆mim PF₆	Hexafluorofosfato de 1-hexadecil-3-metilimidazolio	74
C₁₈mim PF₆	Hexafluorofosfato de 1-octadecil-3-metilimidazolio	82
C₁₄mim NTf₂	Bistriflimida de 1-tetradecil-3-metilimidazolio	33
C₁₆mim NTf₂	Bistriflimida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio	46
C₁₈mim NTf₂	Bistriflimida de 1-octadecil-3-metilimidazolio	53

La invención se refiere al uso de una combinación, como se define en la reivindicación 1, en la que el líquido iónico lipófilo está constituido por un catión y un anión, estando constituido dicho catión por una cabeza catiónica y estando constituido dicho anión por una cabeza aniónica y en el que dicha cabeza catiónica y/o cabeza aniónica están sustituidas por una o varias cadenas secundarias de carbono que pueden ser similares o diferentes entre sí.

La expresión "cabeza" significa la parte del ion que transporta la carga eléctrica, dependiendo del ion considerado, este puede ser:

- * un único átomo (es decir, cationes de tipo litio, sodio, potasio, cesio, o aniones de tipo fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro), o
- * un grupo de átomos (es decir, PF₆⁻, bis(trifluorometilsulfonil)imida (NTf₂⁻) BF₄⁻, tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato (FAP), alquilsulfatos, un grupo alquilo incluyendo 1 a 10 átomos de carbono, o
- * un anillo heteroaromático (es decir, imidazolio, piridinio, triazolio)
- * cationes onio tales como cationes pirrolidinio, guanidinio, sulfonio, fosfonio o amonio.

La expresión "cadena secundaria de carbono" describe una cadena de átomos de carbono, lineal o ramificada, unida covalentemente a la cabeza, dichas cadenas secundarias de carbono no transportan la carga eléctrica del ion (es decir, cadenas de alquilo).

Por ejemplo, en el catión de tetrabutil amonio (Bu₄N⁺), la cabeza catiónica es el átomo de nitrógeno y las cuatro cadenas de butilo son cuatro cadenas secundarias de carbono.

El líquido iónico está constituido por un catión hidrófobo (es decir, 1,3-Dialquilimidazolio, Tetraalquilamonio) y un anión hidrófobo (es decir, PF₆⁻, BF₄⁻, NTf₂⁻, FAP).

La lipofilidad está relacionada con la sustitución de la cabeza aniónica o la cabeza catiónica por las cadenas secundarias de carbono.

Un catión hidrófobo, la cabeza catiónica del cual está sustituida por una o varias cadenas secundarias de carbono, como se ha definido anteriormente, es hidrófoba y lipófila (es decir, amonio, imidazolio, piridinio).

Un anión hidrófobo, la cabeza aniónica del cual está sustituida por una o varias cadenas secundarias de carbono, como se ha definido anteriormente, es hidrófoba y lipófila (es decir, RSO₃⁻, R representa la cadena secundaria de carbono).

De acuerdo con la invención, el líquido iónico está constituido por un catión lipófilo y un anión hidrófobo, en el que la cadena secundaria de carbono en la cabeza catiónica y/o la cabeza aniónica son cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o no saturadas, suponiendo que al menos una de las cadenas secundarias comprenda al menos 10 átomos de carbono, preferentemente, al menos 12, 13, 14, 15 átomos de carbono, y en particular al menos 16, 17, 18 átomos de carbono.

Las cadenas de carbono largas aumentan la lipofilidad del líquido iónico, pero aumentan también su temperatura de fusión. No es obvio encontrar un equilibrio adecuado entre estos dos criterios, y mantener el punto de fusión del líquido iónico en un intervalo de temperatura adecuado para una reacción enzimática.

En la presente invención, los inventores han identificado de forma inesperada que los líquidos iónicos concadenas secundarias de carbono que comprenden 12 a 15, o preferentemente 16 a 18 átomos de carbono, muestran una buena lipofilidad y una adecuada temperatura de fusión.

Es importante señalar que la longitud de la cadena secundaria de carbono preferible puede variar dependiendo de la naturaleza del sustrato. Los aceites más naturales producidos a escala industrial tienen 16 o 18 cadenas secundarias de carbono largas. Para este tipo de sustrato, se prefieren los líquidos iónicos con cadenas secundarias de 16 a 18 átomos de carbono debido a sus buenas propiedades de solubilización del sustrato. Los sustratos con cadenas de carbono cortas, tales como 15, 14, 13 o 12 átomos de carbono, pueden ser más solubles en líquidos iónicos con cadenas secundarias de carbono más cortas que los 18 átomos de carbono, tales como 15, 14, 13 o 12 átomos de carbono.

La expresión "saturadas e insaturadas" significa que las cadenas secundarias de carbono pueden incluir enlace(s) únicos, dobles enlace(s), triples enlace(s), ciclos, ciclo(s) aromáticos, ciclo(s) heteroaromáticos. La insaturación se refiere a cualquier estructura que se puede someter a reducción.

Opcionalmente, la cadena secundaria de carbono puede sustituirse por al menos un grupo funcional seleccionado entre alquiléter, nitrilo, cianoalquilo, alquilsulfonilo, alquiltioéter.

De acuerdo con otra realización ventajosa, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que el catión del líquido iónico es lipófilo y se selecciona entre cationes imidazolio, piridinio, triazolio, pirrolidinio, guanidinio, sulfonio, fosfonio o amonio, sustituidos por al menos una cadena secundaria de carbono lipófila que comprende al menos 10 átomos de carbono.

De acuerdo con una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que el anión del líquido iónico es hidrófobo y se selecciona entre PF_6^- , bis(trifluorometilsulfonil)imida (NTf_2^-) BF_4^- , tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato (FAP), alquilsulfato con una cadena de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, alquilsulfonato con una cadena de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, o dialquilsulfato con cadenas de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono. Preferentemente, los aniones de líquidos iónicos son hidrófobos y se seleccionan entre NTf_2^- , PF_6^- , alquilsulfatos con una cadena de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, preferentemente NTf_2^- o FAP, y en particular NTf_2^- .

De acuerdo con otra realización ventajosa, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que el líquido iónico se selecciona entre bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio, bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio.

Los líquidos iónicos descritos en la presente invención son neutros con respecto a su pH. El término "pH neutro" designa un pH que varía desde aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4. El intervalo de pH que varía desde 6,8 a 7,4 corresponde a un pH fisiológico.

El pH de la combinación final es importante. Los ésteres de alquilo de ácidos grasos producidos (*es decir*, el biodiésel) deben contener tan pocos ácidos o bases como sea posible y están por debajo del 2%, preferentemente por debajo del 1%, preferentemente deben estar exentos de ácidos o bases. La presencia de grandes cantidades de ácidos o bases requeriría lavados adicionales del producto final (ésteres de alquilo de ácidos grasos) con agua, y por tanto, aumenta el contenido de los ésteres de alquilo de ácidos grasos, y aumenta el coste del procedimiento.

De acuerdo con otra realización, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que la enzima es una lipasa o una esterasa, preferentemente una lipasa seleccionada entre el grupo que consiste en *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, páncreas de cerdo, *Aspergillus subtilis*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Chromobacterium viscosum*, *Yarrowia lipolytica*, *Thermus lanuginosa*, hígado de cerdo, particularmente, una lipasa B de *Candida Antartica*.

Las expresiones "lipasa" y "esterasa" designan enzimas que catalizan las reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación de lípidos u otros ésteres que se producen naturalmente. Si la reacción es una hidrólisis o una esterificación (o transesterificación) depende de la concentración de agua y alcohol que están presentes. En organismos vivos, el agua está presente en grandes cantidades de tal manera que la reacción catalizada es principalmente la hidrólisis. En la presente invención, el agua está presente en cantidades mínimas en comparación con la cantidad de alcohol; por lo tanto, la reacción catalizada es principalmente la esterificación de los ácidos grasos presentes y la transesterificación de los ésteres.

De acuerdo con una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que el sustrato se selecciona entre grasas animales, aceite de semilla de girasol, aceite de soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de lino, aceite de colza, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de jatrofa, aceites residuales comestibles y no comestibles (es decir, residuos de aceites vegetales y grasas animales procedentes de procedimientos de cocina, residuos grasos procedentes de la industria porcina, residuos grasos procedentes de factorías piscícolas), y sus mezclas.

Ventajosamente, el sustrato puede estar en asociación con al menos dos sustratos diferentes.

ventajosamente, el sustrato puede contener triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos, y sus mezclas.

Los aceites y grasas residuales y los aceites y grasas naturales contienen una mezcla de glicéridos (es decir, triglicéridos, diglicéridos, y monoglicéridos). Por tanto, es ventajoso ser capaces de proceder con aceites y grasas a granel en vez de aceites y grasas refinadas que contienen solo un tipo de glicéridos.

La presente invención permite procesar una mezcla de diferentes glicéridos y ácidos grasos en biodiésel.

- 5 Ventajosamente, el sustrato puede contener en volumen al menos 30%, en particular 50%, preferentemente más de 70% de triglicéridos.

La proporción de triglicéridos en la mezcla de glicéridos y ácidos grasos que componen el sustrato puede variar, dependiendo de la fuente del sustrato.

- 10 Los aceites y las grasas sin refinar, tales como residuos de aceites y grasas a granel, son baratos. Así pues, es comercialmente ventajoso para un procedimiento de producción de biodiésel proceder con aceites y grasas brutas que contienen diferentes componentes, eventualmente en una proporción grande.

El rendimiento del biodiésel será proporcional al contenido de las cadenas de acilos grasos (esterificados con glicerol en el caso de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos, y no esterificados en el caso de ácidos grasos) de los sustratos evaluados.

- 15 Ventajosamente, el sustrato contiene un contenido de agua en volumen menor del 10% de agua, en particular 2% de agua, preferentemente 0,5% de agua.

El agua es un producto indeseable en la esterificación descrita en la presente invención, debido a que el agua puede interactuar con la enzima y reducir su actividad catalítica.

- 20 El agua puede producir también ácidos grasos tras la hidrólisis de los glicéridos o el biodiésel. A medida que la proporción de agua aumenta, esta reacción secundaria se vuelve más importante y puede aumentar la longitud del procedimiento y/o reducir el rendimiento del procedimiento. Los ácidos grasos pueden generar también micelas y/o actuar como compuestos tensioactivos, que perturban la separación de fases.

De acuerdo con otra realización, la invención se refiere al uso de una combinación, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, en la que el alcohol se selecciona entre el grupo que consiste en alcoholes que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, en particular metanol, etanol, propanol, butanol, sus isómeros, y sus mezclas, particularmente metanol.

- 30 Ventajosamente, en la combinación que se ha definido aquí anteriormente, el líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación, el líquido iónico es miscible con el sustrato, el líquido iónico es miscible con dicho alcohol, y el líquido iónico es miscible con una mezcla del sustrato y el mencionado alcohol.

Es ventajoso tener una buena separación entre las tres diferentes fases al final de la reacción, debido a que la separación de las tres fases por decantación es más fácil. Esta característica de inmiscibilidad está relacionada con la estructura concreta del líquido iónico.

- 35 Ventajosamente, el líquido iónico es inmiscible con el glicerol formado durante la reacción de esterificación y/o transesterificación del sustrato con al menos un alcohol, y el líquido iónico es inmiscible con los ésteres de alquilo de ácidos grasos.

En la presente invención, el líquido iónico es miscible con el alcohol y el sustrato, de esta manera, se genera una fase líquida homogénea al comienzo del procedimiento.

- 40 El líquido iónico es inmiscible con glicerol y el éster de alquilo de ácido graso (FAAE) producido por la reacción enzimática, y el FAAE y el glicerol generados recientemente son también inmiscibles entre sí, de esta manera, se forman las tres fases. Durante la reacción de esterificación y/o transesterificación se obtienen algunos compuestos intermedios tales como monoglicéridos, diglicéridos o ácidos grasos. Estos compuestos intermedios pueden solubilizar pequeñas cantidades de glicerol o FAAE entre sí, o en el líquido iónico. Al final de la reacción, cuando se consumen todos los compuestos intermedios, las tres fases se definen claramente y se pueden separar fácilmente.

- 45 La mayoría de grasas y aceites naturales están compuestos por triglicéridos; estos triglicéridos se transesterifican a diglicéridos y FAAE, a continuación los diglicéridos a monoglicéridos y FAAE, y a continuación los monoglicéridos a FAAE y glicerol.

- 50 Las trazas de agua presentes en la reacción pueden generar algunos ácidos grasos mediante la hidrólisis de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos o FAAE. Ya que el alcohol está presente en una cantidad muy grande en comparación con el agua, el equilibrio entre la hidrólisis y la esterificación (y la transesterificación) está a favor de la reacción de esterificación (y transesterificación). Además, las enzimas catalizan la reacción de esterificación de los ácidos grasos en FAAE, de esta manera, los ácidos grasos se generan en cantidades mínimas y se convierten en FAAE.

- 55 Cuando se completa la reacción, todos los triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos se convierten en FAAE, por tanto, los triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos se pueden considerar como productos intermedios entre los triglicéridos y los FAAE.

Se desvela también en el presente documento una combinación final, que comprende las siguientes tres fases, a temperatura ambiente,

- una primera fase, en un estado sólido, que contiene al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
- una segunda fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en glicerol,
- 5 - una tercera fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

El término "combinación final" designa la combinación que permanece cuando todo el sustrato que se ha introducido en la mezcla de reacción se esterifica o transesterifica en ésteres de alquilo de ácidos grasos

En la combinación final, dicho líquido iónico puede ser

- hidrófobo,
- 10 - sólido a temperatura ambiente,
- no miscible con glicerol,
- que comprende las siguientes tres fases, a temperatura ambiente,
- una primera fase, en un estado sólido, que contiene al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
- una segunda fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en glicerol,
- 15 - una tercera fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

En la combinación final, dicho líquido iónico puede ser

- hidrófobo,
- sólido a temperatura ambiente,
- 20 en el que dicho líquido iónico, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación, que comprende las siguientes tres fases, a temperatura ambiente,
- una primera fase, en un estado sólido, que contiene al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
- una segunda fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en glicerol,
- una tercera fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

25 En la combinación final, dicho líquido iónico puede ser

- hidrófobo,
- no miscible con glicerol,
- en el que dicho líquido iónico, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación, que comprende
- 30 las siguientes tres fases, a temperatura ambiente,
- una primera fase, en un estado sólido, que contiene al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
- una segunda fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en glicerol,
- una tercera fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

En la combinación final, dicho líquido iónico puede ser

- 35 - sólido a temperatura ambiente,
- no miscible con glicerol,
- en el que dicho líquido iónico, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación, que comprende las siguientes tres fases, a temperatura ambiente,
- 40 - una primera fase, en un estado sólido, que contiene al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
- una segunda fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en glicerol,
- una tercera fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

En la combinación final, dicho líquido iónico puede ser

- 45 - hidrófobo,
- sólido a temperatura ambiente,
- no miscible con glicerol,
- en el que dicho líquido iónico, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación, que comprende las siguientes tres fases, a temperatura ambiente,
- 50 - una primera fase, en un estado sólido, que contiene al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
- una segunda fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en glicerol,
- una tercera fase, en un estado líquido, que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

La invención se refiere también a un procedimiento para la esterificación y/o la transesterificación de un sustrato, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas, en ésteres que comprenden una etapa de inicialización que consiste en:

55

- reunir al menos un sustrato, al menos un alcohol y al menos una enzima en al menos un líquido iónico, formando dicho sustrato, alcohol y líquido iónico una única fase líquida homogénea a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación, estando dicho alcohol y sustrato en la cantidad adecuada para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, en el que dicho líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento,
- 5
- en el que el líquido iónico es hidrófobo y está constituido por un catión lipófilo y un anión hidrófobo, estando constituido dicho catión por una cabeza catiónica, y estando constituido dicho anión por una, cabeza aniónica, y en el que dicha cabeza catiónica y/o dicha cabeza aniónica están sustituidas por una o varias cadenas secundarias de carbono que pueden ser similares o diferentes entre sí, y
- 10
- en el que la cadena secundaria de carbono en la cabeza catiónica y/o la cabeza aniónica son cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o no saturadas, suponiendo que al menos una de las cadenas secundarias comprenda al menos 10 átomos de carbono, preferentemente, al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 átomos de carbono, en la que la enzima es una lipasa o una esterasa.
- 15
- El sustrato, el alcohol, la enzima y el líquido iónico son los cuatro componentes de la reacción. pueden introducirse en cualquier orden. Sin embargo, la persona experta en la materia sabe que los alcoholes (es decir, metanol o etanol) deterioran la actividad catalítica de las enzimas. Así pues, cuando la enzima y el alcohol son los primeros componentes que se reúnen juntos, deben diluirse rápidamente en otro componente (es decir, sustrato, líquido iónico) a fin de proteger la enzima del efecto perjudicial del alcohol.
- 20
- Preferentemente, se introduce en primer lugar el líquido iónico, a continuación el alcohol, a continuación el sustrato, y, por último, la enzima. Esta secuencia permite una buena solubilización del alcohol en el líquido iónico antes de que se añada el sustrato, los que puede reducir la viscosidad del sistema, puede reducir el punto de fusión del IL y puede evitar una inactivación de la enzima por el alcohol.
- Como se ha indicado anteriormente, el procedimiento comprende una etapa de inicialización que consiste en:
- 25
- reunir al menos un sustrato, al menos un alcohol y al menos una enzima en al menos un líquido iónico, formando dicho sustrato, alcohol y líquido iónico una única fase líquida homogénea, estando dicho alcohol y sustrato en cantidades adecuadas para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, en la que dicho líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento.
- 30
- La expresión "cantidades adecuadas" significa que la relación molar de alcohol y sustrato es adecuada para la esterificación o transesterificación completa del sustrato. Normalmente, se considera que el sustrato va a estar formado principalmente por triglicéridos, requiriendo por tanto tres equivalentes de alcohol para una esterificación o transesterificación completa. Sin embargo, se requiere a menudo alcohol en exceso en comparación con el sustrato a fin de potenciar la reacción cinética. Una relación molar de alcohol a sustrato inferior a 1: 1 (menos alcohol que sustrato en moles) conduce a una esterificación o transesterificación incompleta, por tanto una reacción incompleta.
- 35
- El procedimiento anterior puede comprender una etapa de recuperación adicional que consiste en:
- recuperar los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados en la reacción de esterificación y/o transesterificación y recuperar posiblemente el glicerol formado en la reacción de esterificación y/o transesterificación
- 40
- La expresión "recuperar" significa que los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados en la reacción de esterificación y/o transesterificación y posiblemente el glicerol formado en la reacción de transesterificación, se aíslan de la fase de reacción. Este aislamiento, o separación, puede llevarse a cabo por cualquier medio conocido por la persona experta en la materia para llevar a cabo una separación líquido-líquido.
- 45
- De acuerdo con otra realización ventajosa, la invención se refiere a un procedimiento, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende una etapa de restauración adicional que consiste en recuperar y posiblemente purificar la combinación de líquido iónico y enzimas.
- 50
- La expresión "restauración" significa aislar, y si es necesario purificar, el líquido iónico y la combinación de enzimas. La combinación puede reciclarse al final de la reacción a fin de reutilizarla en otra reacción. A tal fin, la combinación ha de separarse de otros productos (es decir, impurezas) que podrían disminuir el rendimiento de la reacción en la siguiente reacción de esterificación y/o transesterificación.
- 55
- De acuerdo con una realización ventajosa, la invención se refiere a un procedimiento, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende:
- una etapa de inicialización, que consiste en reunir al menos un sustrato, al menos un alcohol y al menos una enzima en al menos un líquido iónico, formando dicho sustrato, alcohol y líquido iónico una única fase líquida homogénea a temperatura ambiente o

preferentemente a una temperatura superior a 30 °C, estando dicho alcohol y sustrato en cantidades adecuadas para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, y

- una etapa de recuperación, que consiste en recuperar:

- 5 * la fase que consiste sustancialmente en los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados en la reacción de esterificación y/o transesterificación y
- * la fase que consiste sustancialmente en el glicerol formado en la reacción de esterificación y/o transesterificación y
- * la fase que consiste esencialmente en un líquido iónico y una enzima, estando dicho líquido iónico tanto líquido como sólido, preferentemente sólido a temperatura ambiente, y

- 10 - una etapa de restauración, que consiste en recuperar y purificar la combinación de líquido iónico y enzimas, para obtener una combinación purificada de líquido iónico y enzimas.

De acuerdo con otra realización ventajosa, la invención se refiere a un procedimiento, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende:

- 15 - una etapa de reacción, que consiste en reunir al menos un sustrato, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas, al menos un alcohol, en una combinación de al menos un líquido iónico y al menos una enzima, formando dicho sustrato, alcohol y líquido iónico una única fase líquida homogénea, estando dicho alcohol y sustrato en la cantidad adecuada para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, en la que dicho líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento y
- 20

- una etapa de recuperación, que consiste en recuperar:

- 25 * la fase que consiste sustancialmente en los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados en la reacción de esterificación y/o transesterificación y
- * la fase que consiste sustancialmente en el glicerol formado en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

- una etapa de restauración, que consiste en recuperar y purificar la combinación de líquido iónico y enzimas, para obtener una combinación purificada de líquido iónico y enzimas,

con las tres mencionadas etapas definidas anteriormente formando un ciclo.

- 30 La expresión "ciclo" significa un procedimiento de reacción completo, que comprende:

- * mezclar los componentes de la reacción (líquido iónico, enzima, sustrato, alcohol) juntos, y
- * llevar a cabo la reacción durante un tiempo suficientemente largo para obtener lo más posible, con respecto a los materiales de partida, ésteres de alquilo de ácidos grasos, y
- * separar los productos de reacción de la fase líquida iónica, y
- 35 * procesar el líquido iónico y la combinación de enzimas, a fin de reutilizar la combinación en otra reacción.

Se puede reutilizar el líquido iónico y la combinación de enzimas. Solo la combinación puede estar o está en común de un ciclo a otro, añadiéndose el alcohol y el sustrato durante cada ciclo.

La numeración de un ciclo corresponde al número de veces en el que se usa la combinación anteriormente definida más uno.

- 40 Por ejemplo, el cuarto ciclo corresponde a una combinación anteriormente mencionada que se ha reciclado 3 veces.

- De acuerdo con una realización ventajosa, la invención se refiere a un procedimiento, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende una etapa de implementar al menos un ciclo, repitiendo preferentemente dicho ciclo al menos 7 veces, y en cada ciclo dado, la combinación del líquido iónico y de al menos una enzima utilizada en la etapa de reacción es la combinación purificada del líquido iónico y de la enzima obtenida al final de la etapa de restauración implicada en el ciclo precedente a un ciclo dado.
- 45

Cuando finaliza la reacción, se aíslan los ésteres de alquilo de ácidos grasos y el glicerol, y se purifica el líquido iónico y la combinación de enzimas. A continuación comienza otro ciclo utilizando el líquido iónico purificado y la combinación de enzimas, y nuevos lotes de sustrato y alcohol.

- 50 Para cada nuevo ciclo, la combinación se recicla a partir de la combinación del ciclo anterior, y se añaden nuevos lotes de sustrato y alcohol a fin de producir ésteres de alquilo de ácidos grasos y glicerol.

De acuerdo con otra realización, la invención se refiere a un procedimiento, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos en la que dichos ciclos se repiten hasta que se agota la actividad catalítica de la enzima, conduciendo a una enzima agotada.

5 La expresión "actividad catalítica" significa la capacidad de la enzima de catalizar una transformación química. Virtualmente, las enzimas pueden transformar un número infinito de reactivos (o conjunto de reactivos) de acuerdo con un tipo de reacción. Debido a condiciones externas tales como temperatura, o a las impurezas que interactúan con las enzimas, las enzimas se desnaturalizan lentamente y la conformación de su sitio activo está deteriorada, y por tanto su capacidad para catalizar la reacción química. en el tiempo, y debido a que están expuestas a condiciones duras, las enzimas pierden su actividad.
10 cuando no se pueden encontrar más enzimas activas, o si una gran proporción de las enzimas ha perdido su actividad, se consideran "agotadas". La distinción entre enzimas activas y enzimas agotadas está sujeta a la apreciación de la persona que ejecuta el procedimiento catalizado por las mencionadas enzimas.

15 Normalmente, la mayoría de enzimas en el procedimiento están agotadas, cuanto más largo es el tiempo de reacción. En un determinado momento, la reacción será demasiado lenta y las enzimas se considerarán agotadas.

Ventajosamente, el procedimiento comprende la etapa de descartar la enzima agotada del líquido iónico para dar un líquido iónico regenerado.

20 La expresión "descartar" significa la retirada de las enzimas de la combinación del líquido iónico y de las enzimas. es una purificación del líquido iónico de las enzimas agotadas. El líquido iónico regenerado obtenido se puede reutilizar en el siguiente ciclo, y tras la adición de enzimas activas, se forma una nueva combinación con el líquido iónico regenerado.

Ventajosamente, se forman tres fases al final de dicho procedimiento de esterificación y/o transesterificación,

- una primera fase que consiste sustancialmente en al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
- una segunda fase que consiste sustancialmente en glicerol,
- 25 - una tercera fase que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

En dicho procedimiento, dicho líquido iónico puede ser sólido a temperatura ambiente.

En dicho procedimiento, dicho líquido iónico puede ser sólido a 0 °C.

Como alternativa, en dicho procedimiento, dicho líquido iónico puede ser líquido a temperatura ambiente.

30 Ventajosamente, dicha combinación con una temperatura de fusión superior a la temperatura ambiente se mezcla con un disolvente orgánico o un líquido iónico, para dar una mezcla que es líquida a temperatura ambiente.

En dicho procedimiento, dicho líquido iónico, dicho sustrato y dicho alcohol pueden formar una única fase líquida homogénea, a temperatura ambiente.

Opcionalmente, en dicho procedimiento, dicha enzima es soportada, y dicha enzima soportada está en suspensión, o en forma soluble, en la mencionada única fase líquida homogénea.

35 Como alternativa, dicha enzima no está soportada, y dicha enzima no soportada está en suspensión, o en forma soluble, en la mencionada única fase líquida homogénea.

Opcionalmente, en dicho procedimiento, la temperatura de fusión del líquido iónico es menor que la temperatura de esterificación y/o transesterificación, y preferentemente la temperatura de fusión del líquido iónico está comprendida en el intervalo de temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 100 °C, particularmente por encima de 40 °C, en particular por encima de aproximadamente 40 °C y por debajo de aproximadamente 80 °C.
40

Dicha cabeza catiónica y/o cabeza aniónica puede sustituirse por al menos un ciclo aromático o alifático, un alcano, alqueno, o alquino.

Opcionalmente, en dicho procedimiento, la cabeza catiónica del líquido iónico se selecciona entre imidazolio, piridinio, triazolío, pirrolidinio, guanidinio, sulfonio, fosfonio o amonio, sustituidos por al menos una cadena secundaria de carbono lipófila que comprende al menos 10 átomos de carbono.
45

Opcionalmente, en dicho procedimiento, la cabeza aniónica del líquido iónico hidrófobo se selecciona entre PF_6^- , bis(trifluorometilsulfonil)imida (NTf_2^-), BF_4^- , tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato (FAP), alquilsulfatos con una cadena de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, alquilsulfonatos con una cadena de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, o dialquifosfatos con cadenas de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, se selecciona preferentemente entre NTf_2^- , FAP, PF_6^- , alquilsulfatos.
50

Opcionalmente, los líquidos iónicos se seleccionan entre bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolío, bis(trifluorometil)sulfonylimida de 1-hexadecil-3-metilimidazolío, bis(trifluorometil)sulfonylimida de trimetiloctadecilamonio.

5 Opcionalmente, en dicho procedimiento, la enzima es una lipasa o una esterasa, preferentemente una lipasa seleccionada entre el grupo que consiste en *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, *páncreas de cerdo*, *Aspergillus subtilis*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, *Chromobacterium viscosum*, *Thermus lanuginosa*, hígado de cerdo, particularmente, una lipasa B de *Candida Antartica*.

10 Opcionalmente, en dicho procedimiento, en la que el sustrato se selecciona entre grasas animales, aceite de semilla de girasol, aceite de soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de linaza, aceite de colza, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de jatrofa, grasas y aceites residuales comestibles y no comestibles, y sus mezclas.

El sustrato está en asociación con al menos dos sustratos diferentes.

El sustrato puede contener triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos, y sus mezclas.

15 Opcionalmente, el sustrato contiene en volumen al menos 30%, en particular 50%, preferentemente más de 70% de triglicéridos.

Opcionalmente, el sustrato contiene un contenido de agua en volumen menor del 10% de agua, en particular 2% de agua, preferentemente 0,5% de agua.

20 Opcionalmente, en dicho procedimiento, el alcohol se selecciona entre el grupo que consiste en alcoholes que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, en particular metanol, etanol, propanol, butanol, sus isómeros, y sus mezclas, particularmente metanol.

Opcionalmente, el líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación, el líquido iónico es miscible con los sustratos, el líquido iónico es miscible con dicho alcohol, y el líquido iónico es miscible con una mezcla del sustrato y dicho alcohol.

Opcionalmente, el líquido iónico es inmisible con el glicerol formado durante la reacción de esterificación y/o transesterificación del sustrato con al menos un alcohol, y el líquido iónico es inmisible con los ésteres de alquilo de ácidos grasos.

30 De acuerdo con una realización ventajosa, la invención se refiere a un procedimiento, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende:

- una etapa de inicialización, que consiste en reunir al menos un sustrato, metanol y novozima 435 en bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolío, formando dicho sustrato, metanol, y 1-metil-3-octadecilimidazolío bis(trifluorometilsulfonyl)imida una única fase líquida homogénea, agitar la reacción a 60 °C durante 24 horas, y

- una etapa de recuperación, que consiste en decantar:

* la fase que consiste sustancialmente en los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

40 * la fase que consiste sustancialmente en el glicerol formado en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

- una etapa de restauración, que consiste en recuperar y purificar (bajo vacío) la combinación de bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolío y novozima 435, para obtener una combinación purificada de bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolío y novozima 435.

45 Novozima 435 es una marca comercial que designa una lipasa (lipasa B) de *Candida antarctica* (Novosym® 435, NovoNordisk, Dinamarca)

De acuerdo con otra realización, la invención se refiere a un procedimiento, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende:

50 - una etapa de reacción, que consiste en reunir al menos un sustrato, metanol, en una combinación de bis(trifluorometilsulfonyl)imida 1-metil-3-octadecilimidazolío y novozima 435, formando dicho sustrato, metanol, y 1-metil-3-octadecilimidazolío

bis(trifluorometilsulfonyl)imida una única fase líquida homogénea, agitar la reacción a 60 °C durante 24 horas, y

- una etapa de recuperación, que consiste en decantar:

- * la fase que consiste sustancialmente en los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

5 * la fase que consiste sustancialmente en el glicerol formado en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

- una etapa de restauración, que consiste en

10 recuperar y purificar (bajo vacío) la combinación de bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio y novozima 435, para obtener una combinación purificada de bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio y novozima 435.

con las tres mencionadas etapas definidas anteriormente formando un ciclo.

Se describe también en el presente documento una mezcla de reacción que comprende una enzima y una única fase líquida homogénea a la temperatura, a la cual se lleva a cabo el procedimiento, que contiene,

15 al menos un líquido iónico, al menos un sustrato, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas y al menos un alcohol.

Los cuatro componentes de la reacción son el sustrato, el alcohol, la enzima y el líquido iónico. La mezcla de reacción se obtiene tras reunir los cuatro componentes, a medida que comienza la esterificación y/o la transesterificación del sustrato y el alcohol en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

20 La invención se refiere a una mezcla de reacción que comprende una enzima y una única fase líquida homogénea a temperatura ambiente, que contiene, al menos un líquido iónico, al menos un sustrato, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas y al menos un alcohol.

25 Los cuatro componentes de la reacción son el sustrato, los alcoholes, la enzima y el líquido iónico. La mezcla de reacción se obtiene tras reunir los cuatro componentes, a medida que comienza la esterificación y/o la transesterificación del sustrato y el alcohol en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

30 Opcionalmente, en la mezcla de reacción, el alcohol y el sustrato (es decir, los triacilglicéridos) tienen una relación molar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, preferentemente de aproximadamente el 3:1 a aproximadamente 6:1.

Considerando la relación estequiométrica entre el sustrato y el alcohol, son posibles tres casos:

- el sustrato está compuesto solo por triglicéridos, entonces, la relación estequiométrica para alcanzar la conversión completa es 3:1,
- el sustrato está compuesto solo por ácidos grasos y/o monoglicéridos, entonces, la relación molar estequiométrica es 1:1,
- el sustrato está compuesto por una mezcla de glicéridos y ácidos grasos, entonces la relación molar estequiométrica varía de 1:1 a 3:1.

40 En otras palabras, la relación molar entre el sustrato y el alcohol se puede expresar con respecto al número de cadenas de acilos grasos producidos por el sustrato. Monoglicéridos (monoacilglicerol) y ácidos grasos que tienen una cadena de acilo graso, diglicéridos (diacilglicerol) que tienen 2 cadenas de ácidos grasos, y triglicéridos (triacilglicerol) que tienen 3 cadenas de acilos grasos. Teniendo en cuenta que 1 mol de alcohol reacciona con 1 mol de una cadena secundaria de acilo graso, si el alcohol y los sustratos (es decir, triacilgliceroles) tienen una relación molar menor de 3:1 (en otras palabras, menos de 1 equivalente molar de alcohol con respecto a cada mol de cadenas de acilo del sustrato cuando el sustrato es un triacilglicerol), es cierto que sea la que sea la composición exacta del sustrato, la reacción no está completa con respecto al sustrato. Además, los alcoholes son compuestos volátiles, y, con el fin de proporcionar un buen desplazamiento del equilibrio de reacción hacia la conversión completa del sustrato en biodiésel, se recomienda alcohol en exceso con respecto a la concentración molar global de la cadena de acilo graso. De esta manera, se recomienda en todos los casos una relación molar entre el alcohol y las cadenas de acilos grasos de 2:1. Sin embargo, una relación molar entre el alcohol y la cadena de acilo graso mayor de 3:1 reducirá la actividad enzimática mediante los fenómenos de desactivación. Como los alcoholes (es decir, metanol) no son caros, y se pueden reciclar en el presente procedimiento, es ventajoso desde un punto de vista industrial utilizar más equivalentes de alcohol que la relación molar estequiométrica máxima posible.

55 Opcionalmente, en la mezcla de reacción la enzima y su soporte tienen una relación en peso al sustrato de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:200, preferentemente 1:10 para la enzima soportada, o una relación en peso de enzima a sustrato de 1:50 a aproximadamente 1: 20000, preferentemente 1:500 para una

enzima no soportada.

la cantidad de enzima debe optimizarse como una función de la actividad observada en la producción de biodiésel en las condiciones de reacción evaluadas con respecto al sustrato evaluado. El aumento en la cantidad de enzima implica siempre una disminución en el tiempo de reacción y un aumento en el coste global, y viceversa.

5 Se pueden usar dos tipos diferentes de enzimas, enzimas soportadas o no soportadas. Cuando se usan enzimas soportadas, la relación de enzima a sustrato debe tener en cuenta el peso molar de las enzimas así como el peso molar de las partículas que soportan las enzimas, y la cantidad de enzimas presentes en cada partícula. Esta información se proporciona por el fabricante de enzimas soportadas, y de esta manera, el cálculo de la relación es sencillo para la persona experta en la materia.

10 Las enzimas no soportadas no tienen partículas de soporte y solo se tiene en cuenta su peso molecular para el cálculo de la relación enzima a sustrato.

Opcionalmente en la mezcla de reacción, el líquido iónico y el sustrato tienen una relación volumétrica de aproximadamente 20: 1 a aproximadamente 1:20, preferentemente de 3:1.

15 La relación IL: volumen de sustrato es dependiente del comportamiento de fase del sistema, y, obviamente, se recomienda usar la cantidad más baja de IL que disuelva la mayor cantidad de triglicéridos manteniendo a la vez una única fase líquida homogénea.

Opcionalmente, en la mezcla de reacción, el líquido iónico y el alcohol tienen una relación volumétrica de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, preferentemente de 8:1.

20 Opcionalmente, la relación entre el volumen del líquido iónico y la suma de los volúmenes del alcohol y el sustrato es de aproximadamente 90/10 a aproximadamente 10/90, preferentemente de aproximadamente 70/30 a aproximadamente 50/50, preferentemente de 66/33.

los líquidos iónicos son compuestos caros, por lo tanto, es económicamente ventajoso usar la mínima cantidad de líquido iónico a fin de solubilizar la máxima cantidad de sustrato y alcohol preservando a la vez la única fase homogénea.

25 Opcionalmente, la mezcla de reacción comprende agua en una cantidad de entre aproximadamente 0% a aproximadamente 5%, en particular de aproximadamente 0% a aproximadamente 2%, preferentemente, de aproximadamente 0% a aproximadamente 0,5%, de la suma del líquido iónico, el sustrato y los volúmenes de alcohol.

30 el agua puede perturbar la reacción dado que puede tener efectos perjudiciales sobre las enzimas, y puede reducir la actividad enzimática. Así pues, el contenido de agua en la mezcla de reacción debe ser tan bajo como sea posible.

Se desvela también una mezcla de reacción que consiste sustancialmente en 3 fases:

- una primera fase que consiste sustancialmente en al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
- una segunda fase que consiste sustancialmente en glicerol,
- 35 - una tercera fase que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos,

en la que dicho líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento.

Se desvela además una mezcla de reacción que consiste sustancialmente en 3 fases:

- una primera fase que consiste sustancialmente en al menos un líquido iónico, al menos una enzima, al menos una enzima y al menos un alcohol,
- 40 - una segunda fase que consiste sustancialmente en glicerol y al menos un alcohol,
- una tercera fase que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos,

en la que dicho líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento.

Se desvela además una mezcla de reacción que consiste sustancialmente en 3 fases:

- una primera fase que consiste sustancialmente en al menos un líquido iónico, al menos una enzima, al menos una enzima y al menos un sustrato, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas,
- 45 - una segunda fase que consiste sustancialmente en glicerol,
- una tercera fase que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos,

en la que dicho líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento.

50

Se desvela además una mezcla de reacción que consiste sustancialmente en 3 fases:

- una primera fase que consiste sustancialmente en al menos un líquido iónico, al menos una enzima, al menos un sustrato, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas y al menos un alcohol,
- 5 - una segunda fase que consiste sustancialmente en glicerol y al menos un alcohol.
- una tercera fase que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos,

en la que dicho líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento.

Se desvela además una mezcla de reacción que consiste sustancialmente en 3 fases:

- 10 - una primera fase que consiste sustancialmente en al menos un líquido iónico, al menos una enzima, al menos un sustrato, al menos un alcohol, al menos un ácido graso, al menos un monoglicérido, al menos un diglicérido y al menos un triglicérido,
- una segunda fase que consiste sustancialmente en glicerol, al menos un alcohol, al menos un ácido graso, al menos un monoglicérido, y al menos un diglicérido,
- 15 - una tercera fase que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos, al menos un diglicérido y al menos un triglicérido.

El líquido iónico, el glicerol y los ésteres de alquilo de ácidos grasos son inmiscibles y forman tres fases.

20 Durante el procedimiento de reacción, se forman productos intermedios tales como diglicéridos, monoglicéridos y posiblemente ácidos grasos. Estos productos intermedios pueden ser miscibles en dos o más de las tres fases inmiscibles (líquido iónico, glicerol y ésteres de alquilo de ácidos grasos) e inducen una modificación en los coeficientes de partición.

Así pues, la solubilidad del líquido iónico, el glicerol y los ésteres de alquilo de ácidos grasos unos hacia otros puede modificarse, y las tres fases inmiscibles descritas anteriormente pueden no separarse claramente mientras prosigue la reacción.

La mezcla de reacción, como se ha definido aquí anteriormente puede estar exento de ácidos y bases inorgánicas.

25 Es ventajoso no utilizar ácidos o bases, debido a que se requerirá una extracción acuosa para eliminar las trazas de ácidos o bases que estarán presentes en el biodiésel obtenido, y será necesario secar adicionalmente el biodiésel para eliminar las trazas de agua. Los procedimientos industriales serían más largos y más costosos. Además, los ácidos y las bases son perjudiciales para los motores. Por lo tanto, deberían evitarse las trazas de ácidos o bases en el biodiésel.

30 Los ácidos y bases inorgánicas se definen como ácidos y bases que no son orgánicos. Los ácidos y bases orgánicas son compuestos que contienen carbono.

La mezcla de reacción, como se ha definido aquí anteriormente puede estar exenta de sales y cosolventes.

La expresión "sal" significa cualquier tipo de sal inorgánica, y sal no carbonácea.

35 La expresión "cosolvente" significa un disolvente que no es el disolvente principal utilizado en la reacción en proporción volumétrica, pero

- * contribuye a la solubilidad de todos, o una parte, de los siguientes componentes: sustrato, el alcohol, la enzima en el líquido iónico, y/o

- * contribuye a reducir la temperatura de fusión del líquido iónico.

40 La mezcla de reacción, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, puede contener un alcohol y un cosolvente, siendo dicho cosolvente capaz de reaccionar con el sustrato para producir ésteres de alquilo de ácidos grasos.

El cosolvente, es decir, f-butanol, puede ser capaz de reaccionar con el sustrato para formar un éster de alquilo de ácido graso, pero la reactividad del cosolvente es inferior a la reactividad del alcohol utilizado como un componente de reacción en el procedimiento de esterificación y/o transesterificación.

45 La proporción de la cantidad de cosolvente que reacciona es mínima en comparación con la cantidad total del alcohol que se ha definido como un componente de la reacción.

Como alternativa, la mezcla de reacción, como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, puede contener un alcohol y un cosolvente, no siendo dicho cosolvente capaz de reaccionar con el sustrato para producir ésteres de alquilo de ácidos grasos.

50 El cosolvente (es decir, acetonitrilo) no es capaz de reaccionar con el sustrato para formar un éster de alquilo de ácido graso. El cosolvente se añade al líquido iónico a fin de modificar la temperatura de fusión del líquido iónico, o para aumentar la solubilidad de uno, o varios, reactivos en el líquido iónico.

Figuras

5 La Figura 1 es un cromatograma de HPLC, obtenido del ejemplo 1.2 al comienzo de la reacción ($t = 0$). Los parámetros de elución y las características de la columna son como se describe en el ejemplo 1.2. El tiempo de retención es el siguiente indicado al del pico. El pico a los 6,8 min es el patrón interno (decanoato de etilo). Los picos de los triglicéridos son la trinoleína a los 23,5 min y la trioleína a los 27,8 min. No se puede observar un pico para el éster de alquilo de ácido graso.

10 La Figura 2 es un cromatograma de HPLC, obtenido del ejemplo 1.2 después de 2 horas de reacción ($t = 2$ h). Los parámetros de elución y las características de la columna son como se describe en el ejemplo 1.2. El tiempo de retención es el siguiente indicado al del pico. El pico a los 6,8 min es el patrón interno (decanoato de etilo). Aparecieron algunos picos nuevos. Las intensidades de los triglicéridos (trinoleína a los 23,5 min y trioleína a los 27,8 min) han disminuido en comparación con la referencia, indicando que se han consumido los triglicéridos. Aparecen dos nuevos picos intensos de ésteres de alquilo de ácidos grasos a los 9,7 min (linoleato de metilo) y 12,0 min (oleato de metilo).

15 La Figura 3 es un cromatograma de HPLC, obtenido del ejemplo 1.2 después de 6 horas de reacción ($t = 6$ h). Los parámetros de elución y las características de la columna son como se describe en el ejemplo 1.2. El tiempo de retención es el siguiente indicado al del pico. El pico a los 6,8 min es el patrón interno (decanoato de etilo). Los picos de los triglicéridos (trinoleína a los 23,5 min y trioleína a los 27,8 min) casi han desaparecido, indicando que se han consumido casi todos los triglicéridos. Permanecen los dos picos intensos de ésteres de alquilo de ácidos grasos (linoleato de metilo a los 9,7 min, y oleato de metilo a los 12,0 min).

20 La Figura 4 es un cromatograma de HPLC, obtenido del ejemplo 1.2 después de 24 horas de reacción ($t = 24$ h). Los parámetros de elución y las características de la columna son como se describe en el ejemplo 1.2. El tiempo de retención es el siguiente indicado al del pico. El pico a los 6,8 min es el patrón interno (decanoato de etilo). Los picos de los triglicéridos (trinoleína a los 23,5 min y trioleína a los 27,8 min) desaparecieron, indicando que se han consumido todos los triglicéridos. Excepto para las referencias internas, solo permanecen los dos picos intensos de los ésteres de alquilo de ácidos grasos (linoleato de metilo a los 9,7 min, y oleato de metilo a los 12,0 min). Se completa la reacción.

25 La Figura 5 representa dos diagramas.

30 * la parte de la izquierda representa el porcentaje de cada tipo de compuestos presente en la reacción, concretamente triglicéridos (TG) (círculo negro), diglicéridos (DG) (cuadrado negro), monoglicéridos (MG) (triángulo negro) y ésteres de alquilo de ácidos grasos (FAME) (círculo hueco), en función del tiempo de reacción.

* la parte derecha representa la suma del área del pico de los FAME normalizada por el área interna del pico patrón, representada gráficamente frente al porcentaje de concentración de los FAME. Se muestra el buen acuerdo entre el área normalizada de los compuestos FAME y su concentración en porcentaje.

35 Estos datos son como se recogen en el ejemplo 1.2. Se determinan las cantidades usando un protocolo de cálculo basado en el área de integración del pico del HPLC (véanse las figuras 1 a 4) y la suposición de que cada compuesto MG genera un FAME, cada compuesto DG genera dos FAME, y cada compuesto TG genera tres FAME.

40 Mediante este procedimiento, se puede observar claramente la extensión de la etapa biocatalítica de acuerdo con el tiempo de detección, que permite calcular cuando se ha producido la conversión completa del aceite en biodiésel.

Las Figuras 6a, 6b, 6c y 6d son cuatro fotografías.

45 Cada una de estas cuatro fotografías representa un tubo de ensayo con tapón roscado (1,5 ml) semicargado con una mezcla consistente en: un líquido iónico (0,672 g de $[C_{14}MIM][NTf_2]$), trioleína (222 μ l, 0,202 g) y metanol (48 μ l, 0,038 g).

Las cuatro figuras muestran una mezcla líquida homogénea monofásica.

Se tomó cada fotografía a una temperatura diferente.

50 * figura 6a: la figura se tomó a 30 °C,

* figura 6b: la figura se tomó a 40 °C,

* figura 6c: la figura se tomó a 50 °C,

* figura 6d: la figura se tomó a 60 °C.

Las Figuras 7a, 7b, 7c y 7d son cuatro fotografías.

55 Cada una de estas cuatro fotografías representa un tubo de ensayo con tapón roscado (1,5 ml) semicargado con una mezcla consistente en: un líquido iónico (0,672 g de $[C_{16}MIM][NTf_2]$), trioleína (222 μ l, 0,202 g) y metanol (48 μ l, 0,038 g).

Las cuatro figuras muestran una mezcla líquida homogénea monofásica.

Se tomó cada fotografía a una temperatura diferente.

- * figura 7a: la figura se tomó a 30 °C,
- * figura 7b: la figura se tomó a 40 °C,
- * figura 7c: la figura se tomó a 50 °C,
- * figura 7d: la figura se tomó a 60 °C.

5 Las Figuras 8a, 8b, 8c, 8d y 8e son cinco fotografías.

Cada una de estas cinco fotografías representan tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla que varía para cada tubo.

Primer tubo de la izquierda: un líquido iónico (0,295 g de $[C_{18}MIM][NTf_2]$), trioleína (595 μ l, 0,541 g) y metanol (150 μ l, 0,118 g).

Segundo tubo de la izquierda: un líquido iónico (0,448 g de $[C_{18}MIM][NTf_2]$), trioleína (444 μ l, 0,404 g) y metanol (112 μ l, 0,088 g).

Tercer tubo de la izquierda: un líquido iónico (0,590 g de $[C_{18}MIM][NTf_2]$), trioleína (302 μ l, 0,275 g) y metanol (76 μ l, 0,06 g).

Cuarto tubo de la izquierda. un líquido iónico (0,672 g de $[C_{18}MIM][NTf_2]$), trioleína (222 μ l, 0,202 g) y metanol (48 μ l, 0,038 g).

Se tomó cada fotografía a una temperatura diferente.

- * figura 8a: la figura se tomó a 30 °C, los cuatro tubos contienen mezclas sólido-líquido bifásicas,
- * figura 8b: la figura se tomó a 40 °C, el primer tubo de la izquierda contiene una mezcla líquida homogénea monofásica, los otros tres tubos contienen mezclas sólido-líquido bifásicas,
- * figura 8c: la figura se tomó a 50 °C, los cuatro tubos contienen mezclas líquidas homogéneas monofásicas,
- * figura 8d: la imagen se tomó a 60 °C, los cuatro tubos contienen mezclas líquidas homogéneas monofásicas,
- * figura 8e: la fotografía se tomó a 70 °C, Los cuatro tubos contienen mezclas líquidas homogéneas monofásicas.

Las Figuras 9a, 9b, 9c y 9d son cuatro fotografías.

Cada una de estas cuatro fotografías representa un tubo de ensayo con tapón roscado (1,5 ml) semicargado con una mezcla consistente en: un líquido iónico (0,448 g de $[C_{18}MIM][PF_6]$), trioleína (444 μ l, 0,404 g) y metanol (112 μ l, 0,088 g).

Se tomó cada fotografía a una temperatura diferente.

- * figura 9a: la fotografía se tomó a 60 °C, el tubo contiene una mezcla sólido-líquido bifásica,
- * figura 9b: la fotografía se tomó a 70 °C, el tubo contiene una mezcla sólido-líquido bifásica,
- * figura 9c: la fotografía se tomó a 80 °C, el tubo contiene una mezcla líquida homogénea monofásica,
- * figura 9d: la fotografía se tomó a 90 °C, el tubo contiene una mezcla líquida homogénea monofásica.

Las Figuras 10a, 10b y 10c son tres fotografías.

Cada una de estas cinco fotografías representan seis tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico ($[OMIM][NTf_2]$, 375 μ l), trioleína (375 μ l) y metanol.

El volumen de metanol varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: 32 μ l de metanol,
- * Segundo tubo de la izquierda: 47 μ l de metanol,
- * Tercer tubo de la izquierda: 64 μ l de metanol,
- * Cuarto tubo de la izquierda: 94 μ l de metanol,
- * Quinto tubo de la izquierda: 128 μ l de metanol,
- * Sexto tubo de la izquierda: 160 μ l de metanol.

Se tomó cada fotografía a una temperatura diferente.

- * figura 10a: la fotografía se tomó a 40 °C, los seis tubos contienen mezclas líquido-líquido bifásicas,
- * figura 10b: la figura se tomó a 50 °C, los seis tubos contienen mezclas líquido-líquido bifásicas,
- * figura 10c: la imagen se tomó a 60 °C, los seis tubos contienen mezclas líquido-líquido bifásicas.

La Figura 11 es una fotografía.

La fotografía representa cuatro tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico (250 mg) dicho líquido iónico es diferente para cada tubo) y glicerol (600 mg). La fotografía se tomó a temperatura ambiente (22 °C).

El líquido iónico varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: $[C_{12}MIMpF_4]$,
- * Segundo tubo de la izquierda: $[C_{14}MIMpF_4]$,
- * Tercer tubo de la izquierda: $[C_{16}MIMpF_4]$,
- * Cuarto tubo de la izquierda: $[C_{18}MIMpF_4]$.

Los cuatro tubos contienen una mezcla bifásica.

La Figura 12 es una fotografía.

La fotografía representa cuatro tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico (250 mg) dicho líquido iónico es diferente para cada tubo) y glicerol (600 mg). La fotografía se tomó a temperatura ambiente (22 °C).

El líquido iónico varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: [C₁₂MIMpF₆],
- * Segundo tubo de la izquierda: [C₁₄MIM][PF₆],
- * Tercer tubo de la izquierda: [C₁₆MIMpF₆],
- * Cuarto tubo de la izquierda: [C₁₈MIMpF₆].

Los cuatro tubos contienen una mezcla bifásica.

La Figura 13 es una fotografía.

La fotografía representa cuatro tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico (250 mg) dicho líquido iónico es diferente para cada tubo) y glicerol (600 mg). La fotografía se tomó a temperatura ambiente (22 °C).

El líquido iónico varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: [C₁₂MIM][NTf₂],
- * Segundo tubo de la izquierda: [C₁₄MIM][NTf₂],
- * Tercer tubo de la izquierda: [C₁₆MIM][NTf₂],
- * Cuarto tubo de la izquierda: [C₁₈MIM][NTf₂].

Los cuatro tubos contienen una mezcla bifásica.

La Figura 14 es una fotografía.

La fotografía representa cuatro tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico (250 mg) (dicho líquido iónico es diferente para cada tubo) y oleato de metilo (600 mg) (biodiésel). La fotografía se tomó a 30 °C.

El líquido iónico varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: [C₁₂MIM][BF₄],
- * Segundo tubo de la izquierda: [C₁₄MIM][BF₄],
- * Tercer tubo de la izquierda: [C₁₆MIM][BF₄],
- * Cuarto tubo de la izquierda: [C₁₈MIM][BF₄].

Los cuatro tubos contienen una mezcla bifásica.

La Figura 15 es una fotografía.

La fotografía representa cuatro tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico (250 mg) (dicho líquido iónico es diferente para cada tubo) y oleato de metilo (600 mg) (biodiésel). La fotografía se tomó a 30 °C.

El líquido iónico varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: [C₁₂MIM][PF₆],
- * Segundo tubo de la izquierda: [C₁₄MIM][PF₆],
- * Tercer tubo de la izquierda: [C₁₆MIM][PF₆],
- * Cuarto tubo de la izquierda: [C₁₈MIM][PF₆].

Los cuatro tubos contienen una mezcla bifásica.

La Figura 16 es una fotografía.

La fotografía representa tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico (250 mg) (dicho líquido iónico es diferente para cada tubo) y oleato de metilo (600 mg) (biodiésel). La fotografía se tomó a 30 °C.

El líquido iónico varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: [C₁₄MIM][NTf₂],
- * Segundo tubo de la izquierda: [C₁₆MIM][NTf₂],
- * Tercer tubo de la izquierda: [C₁₈MIM][NTf₂].

Los tres tubos contienen una mezcla bifásica.

La Figura 17 es una fotografía.

La fotografía representa una pipeta graduada cargada con una mezcla consistente en un líquido iónico ([C₁₈MIM][NTf₂], 400 mg), oleato de metilo (800 mg) y glicerol (800 mg). La fotografía se tomó a temperatura

ambiente (22 °C).

La fotografía muestra tres fases.

- * parte superior: oleato de metilo líquido,
- * parte intermedia: $[C_{18}MIM][NTf_2]$,
- * parte inferior: glicerol líquido.

5

La Figura 18 es una fotografía.

La fotografía representa cuatro tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico (2,50 g) (dicho líquido iónico es diferente para cada tubo), oleato de metilo (500 mg) (biodiésel) y glicerol (500 mg). La fotografía se tomó a temperatura ambiente (22 °C).

10

El líquido iónico varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: $[C_{12}MIMpF_4]$,
- * Segundo tubo de la izquierda: $[C_{14}MIM][BF_4]$,
- * Tercer tubo de la izquierda: $[C_{16}MIM][BF_4]$,
- * Cuarto tubo de la izquierda: $[C_{18}MIM][BF_4]$.

15

Los cuatro tubos contienen una mezcla trifásica (oleato de metilo líquido en la parte superior, líquido iónico sólido en la parte intermedia, glicerol líquido en la parte inferior).

La Figura 19 es una fotografía.

La fotografía representa cuatro tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico (2,50 g) (dicho líquido iónico es diferente para cada tubo), oleato de metilo (500 mg) (biodiésel) y glicerol (500 mg). La fotografía se tomó a temperatura ambiente (22 °C).

20

El líquido iónico varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: $[C_{12}MIM][PF_6]$,
- * Segundo tubo de la izquierda: $[C_{14}MIM][PF_6]$,
- * Tercer tubo de la izquierda: $[C_{16}MIM][PF_6]$,
- * Cuarto tubo de la izquierda: $[C_{18}MIM][PF_6]$.

25

Los cuatro tubos contienen una mezcla trifásica (oleato de metilo líquido en la parte superior, líquido iónico sólido en la parte intermedia, glicerol líquido en la parte inferior).

La Figura 20 es una fotografía.

La fotografía representa tres tubos de ensayo con tapones roscados (1,5 ml) semicargados con una mezcla consistente en un líquido iónico (2,5 g) (dicho líquido iónico es diferente para cada tubo), oleato de metilo (500 mg) (biodiésel) y glicerol (500 mg). La fotografía se tomó a temperatura ambiente (22 °C).

30

El líquido iónico varía para cada tubo:

- * Primer tubo de la izquierda: $[C_{14}MIM][NTf_2]$,
- * Segundo tubo de la izquierda: $[C_{16}MIM][NTf_2]$,
- * Tercer tubo de la izquierda: $[C_{18}MIM][NTf_2]$.

35

El primer tubo contiene una mezcla trifásica (oleato de metilo líquido en la parte superior, líquido iónico líquido en la parte intermedia, glicerol líquido en la parte inferior).

El segundo y el tercer tubos de la izquierda contienen una mezcla trifásica (oleato de metilo líquido en la parte superior, líquido iónico sólido en la parte intermedia, glicerol líquido en la parte inferior).

40 **I Condiciones y procedimientos de reacción normalizados**

Los líquidos iónicos utilizados en la presente invención son neutros (pH 6,8 a 7,4). El pH del líquido se comprueba con un papel de pH (es decir Neutralit® pH 5,5 - 9,0, Merck, Ref 109560; o Acilit® pH 0,5 - 13,0, Merck Ref. 109565). A fin de medir el pH del líquido iónico debería haber algunas trazas de agua en el líquido iónico. si el líquido iónico es seco, entonces, una alícuota de dicho líquido iónico se mezcla en agua y se comprueba el pH de la solución acuosa.

45

El procedimiento para la producción biocatalítica de biodiésel en líquido iónico (IL) se produce en dos etapas diferentes, del siguiente modo:

1. Etapa biocatalítica

La reacción se produce en cualquiera de las condiciones descritas anteriormente, del siguiente modo, relación de concentración entre aceite y metanol, relación volumétrica entre IL y aceite, relación en peso entre aceite y una enzima, a una temperatura comprendida entre 40-80 °C. El reactor biocatalítico es cualquier recipiente equipado con un sistema de cierre que evite la evaporación, en particular, de alcoholes de bajo peso molecular. Preferentemente, las etapas de calentamiento y de mezcla se llevan a cabo en un baño termostático con agitación mediante un sistema rotatorio o un agitador termostático que oscila automáticamente, o cualquier otro sistema adecuado para la

50

mezcla termostática.

2. Recuperación de biodiésel y etapas de reciclado de IL

Una vez que la reacción ha terminado, la mezcla de reacción completa se puede someter a diferentes técnicas de separación tales como evaporación mediante calor y/o a presión reducida, extracción líquido-líquido, extracción de fluidos supercríticos, destilación, centrifugación, separación mediante membrana, pervaporación, cromatografía para separar los diferentes componentes.

La recuperación del biodiésel y el reciclado del sistema de reacción se produce en varias etapas, del siguiente modo:

2.1. Recuperación de la enzima.

Opcionalmente, la mezcla de reacción se centrifuga a la temperatura más baja que permite la mezcla de reacción para mantenerla líquida, y a continuación las partículas de enzima inmovilizadas se recuperan mediante decantación simple. Las partículas de enzima inmovilizadas se almacenan en un desecador que contiene gel de sílice a temperatura ambiente hasta el siguiente ciclo catalítico.

2.2. Retirada de los alcoholes alifáticos primarios residuales

Los alcoholes alifáticos primarios residuales se retiran de la mezcla de reacción a vacío a 50-70 °C durante 2 a 10 min.

2.3. Eliminación del glicerol.

Se añade un volumen equivalente de agua a la mezcla de reacción resultante, y el sistema bifásico se mezcla en un sistema rotatorio a 50-70 °C y 100 rpm durante 30 min. A continuación, la fase acuosa que contiene el glicerol se elimina mediante decantación simple. Este procedimiento puede repetirse 3 veces.

2.4. Recuperación del biodiésel.

La mezcla de reacción resultante se enfría a una temperatura comprendida entre 0 y 15 °C, a fin de inducir la solidificación de la fracción del IL que está presente en los medios de reacción. El biodiésel puede separarse del IL sólido mediante decantación simple. A continuación, la fase sólida del IL restante se puede lavar con un disolvente orgánico (no miscible con el IL) a fin de extraer cualquier cantidad restante de biodiésel. Se pueden aplicar también procedimientos alternativos para extraer el biodiésel restante (es decir, destilación) procedente del IL.

2.5. Secado del líquido iónico.

La fracción sólida del IL restante se mantiene a una presión reducida por debajo de 1 bar (100 kPa) y 80 °C y 100 rpm, durante 10 min a 1 hora (como una función de su volumen) para eliminar todos los disolventes moleculares restantes (por ejemplo, agua, el disolvente orgánico, biodiésel, etc.). El IL limpio resultante está listo para comenzar un nuevo ciclo catalítico.

II Sistema de reacción

1- Mezcla de reacción inicial homogénea monofásica

Ejemplo 1

Se mezclaron líquido iónico ($[C_{14}MIM][NTf_2]$, 0,672 g), trioleína (0,202 g, 222 μ l) y metanol (0,038 g, 48 μ l). Se aumentó la temperatura de 30 °C a 60 °C y se observó el estado de la mezcla a 30 °C, 40 °C, 50 °C y 60 °C.

Para cada temperatura, la mezcla es monofásica (figuras 6a, 6b, 6c y 6d).

Ejemplo 23

Se mezclaron líquido iónico ($[C_{16}MIM][NTf_2]$, 0,672 g), trioleína (0,202 g, 222 μ l) y metanol (0,038 g, 48 μ l). Se aumentó la temperatura de 30 °C a 60 °C y se observó el estado de la mezcla a 30 °C, 40 °C, 50 °C y 60 °C.

Para cada temperatura, la mezcla es monofásica (figuras 7a, 7b, 7c y 7d).

Ejemplo 3

Se mezclaron líquido iónico ($[C_{18}MIM][NTf_2]$, 0,295 g), trioleína (0,541 g, 595 μ l) y metanol (0,118 g, 150 μ l). Se aumentó la temperatura de 30 °C a 70 °C y se observó el estado de la mezcla a 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C.

A 30 °C el líquido iónico es sólido, por tanto, la mezcla es bifásica sólido/líquido. A 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C, el líquido iónico es líquido y la mezcla es monofásica (figuras 8a, 8b, 8c y 8d).

Ejemplo 4

Se mezclaron líquido iónico ($[\text{C}_{18}\text{MIM}][\text{NTf}_2]$, 0,448 g), trioleína (0,404 g, 444 μl) y metanol (0,088 g, 112 μl). Se aumentó la temperatura de 30 °C a 70 °C y se observó el estado de la mezcla a 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C.

5 A 30 °C y 40 °C el líquido iónico es sólido, por tanto, la mezcla es bifásica sólido/líquido. A 50 °C, 60 °C y 70 °C, el líquido iónico es líquido y la mezcla es monofásica (figuras 8a, 8b, 8c y 8d).

Ejemplo 5

Se mezclaron líquido iónico ($[\text{C}_{18}\text{MIM}][\text{NTf}_2]$, 0,590 g), trioleína (0,275 g, 302 μl) y metanol (0,060 g, 76 μl). Se aumentó la temperatura de 30 °C a 70 °C y se observó el estado de la mezcla a 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C.

10 A 30 °C y 40 °C el líquido iónico es sólido, por tanto, la mezcla es bifásica sólido/líquido. A 50 °C, 60 °C y 70 °C, el líquido iónico es líquido y la mezcla es monofásica (figuras 8a, 8b, 8c y 8d).

Ejemplo 6

Se mezclaron líquido iónico ($[\text{C}_{18}\text{MIM}][\text{NTf}_2]$, 0,672 g), trioleína (0,202 g, 222 μl) y metanol (0,038 g, 48 μl). Se aumentó la temperatura de 30 °C a 70 °C y se observó el estado de la mezcla a 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C y 70 °C.

15 A 30 °C y 40 °C el líquido iónico es sólido, por tanto, la mezcla es bifásica sólido/líquido. A 50 °C, 60 °C y 70 °C el líquido iónico es líquido y la mezcla es monofásica (figuras 8a, 8b, 8c y 8d).

Ejemplo 7

Se mezclaron líquido iónico ($[\text{C}_{18}\text{MIM}]\text{PF}_6$, 0,448 g), trioleína (0,404 g, 444 μl) y metanol (0,088 g, 112 μl). Se aumentó la temperatura de 60 °C a 90 °C y se observó el estado de la mezcla a 60 °C, 70 °C, 80 °C y 90 °C.

20 A 60 °C y 70 °C el líquido iónico es sólido, por tanto, la mezcla es bifásica sólido/líquido. A 80 °C y 90 °C, el líquido iónico es líquido y la mezcla es monofásica (figuras 9a, 9b, 9c y 9d).

2- Comportamiento de fase**Ejemplo 8**

Se ha probado el comportamiento de fase del glicerol hacia diferentes líquidos iónicos.

25 En todos los experimentos, se mezclaron 250 mg de líquido iónico y 600 mg de glicerol y se agitaron fuertemente durante 2 minutos, a continuación se incubaron durante 1 hora a 22 °C (temperatura ambiente).

Se probaron cuatro diferentes líquidos iónicos con el contraanión BF_4^- : $[\text{C}_{12}\text{MIM}][\text{BF}_4]$, $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{BF}_4]$, $[\text{C}_{16}\text{MIM}][\text{BF}_4]$, $[\text{C}_{18}\text{MIM}][\text{BF}_4]$.

En todas las condiciones experimentales, se observaron dos fases. El glicerol y los líquidos iónicos probados no son miscibles (figura 11).

Ejemplo 9

Se ha probado el comportamiento de fase del glicerol hacia diferentes líquidos iónicos.

En todos los experimentos, se mezclaron 250 mg de líquido iónico y 600 mg de glicerol y se agitaron fuertemente durante 2 minutos, a continuación se incubaron durante 1 hora a 22 °C (temperatura ambiente).

35 Se probaron cuatro diferentes líquidos iónicos con el contraanión PF_6^- : $[\text{C}_{12}\text{MIM}][\text{PF}_6]$, $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{PF}_6]$, $[\text{C}_{16}\text{MIM}][\text{PF}_6]$, $[\text{C}_{18}\text{MIM}][\text{PF}_6]$.

En todas las condiciones experimentales, se observaron dos fases. El glicerol y los líquidos iónicos probados no son miscibles (figura 12).

Ejemplo 10

Se ha probado el comportamiento de fase del glicerol hacia diferentes líquidos iónicos.

40 En todos los experimentos, se mezclaron 250 mg de líquido iónico y 600 mg de glicerol y se agitaron fuertemente durante 2 minutos, a continuación se incubaron durante 1 hora a 22 °C (temperatura ambiente).

Se probaron cuatro diferentes líquidos iónicos con el contraanión NTf_2^- : $[\text{C}_{12}\text{MIM}][\text{NTf}_2]$, $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{NTf}_2]$, $[\text{C}_{16}\text{MIM}][\text{NTf}_2]$, $[\text{C}_{18}\text{MIM}][\text{NTf}_2]$.

En todas las condiciones experimentales, se observaron dos fases. El glicerol y los líquidos iónicos probados no son miscibles (figura 13).

Ejemplo 11:

Se ha probado el comportamiento de fase del oleato de metilo hacia diferentes líquidos iónicos.

- 5 En todos los experimentos, se mezclaron 250 mg de líquido iónico y 600 mg de oleato de metilo y se agitaron fuertemente durante 2 minutos, a continuación se incubaron durante 1 hora a 30 °C.

Se probaron cuatro diferentes líquidos iónicos con el contraanión BF₄: [C₁₂MIM] [BF₄], [C₁₄MIM] [BF₄], [C₁₆MIM] [BF₄], [C₁₈MIM] [BF₄].

- 10 En todas las condiciones experimentales, se observaron dos fases. El oleato de metilo y los líquidos iónicos probados no son miscibles (figura 14).

Ejemplo 12:

Se ha probado el comportamiento de fase del oleato de metilo hacia diferentes líquidos iónicos.

En todos los experimentos, se mezclaron 250 mg de líquido iónico y 600 mg de oleato de metilo y se agitaron fuertemente durante 2 minutos, a continuación se incubaron durante 1 hora a 30 °C.

- 15 Se probaron cuatro diferentes líquidos iónicos con el contraanión PF₆: [C₁₂MIM] [PF₆], [C₁₄MIM] [PF₆], [C₁₆MIM] [PF₆], [C₁₈MIM] [PF₆].

En todas las condiciones experimentales, se observaron dos fases. El oleato de metilo y los líquidos iónicos probados no son miscibles (figura 15).

Ejemplo 13:

- 20 Se ha probado el comportamiento de fase del oleato de metilo hacia diferentes líquidos iónicos.

En todos los experimentos, se mezclaron 250 mg de líquido iónico y 600 mg de oleato de metilo y se agitaron fuertemente durante 2 minutos, a continuación se incubaron durante 1 hora a 30 °C.

Se probaron tres diferentes líquidos iónicos con el contraanión NTf₂⁻: [C₁₄MIM] [NTf₂], [C₁₆MIM] [NTf₂], [C₁₈MIM] [NTf₂].

- 25 En todas las condiciones experimentales, se observaron dos fases. El oleato de metilo y los líquidos iónicos probados no son miscibles (figura 16).

Ejemplo 14

Comportamiento de fase del sistema de tres miembros de oleato de metilo, se han probado el glicerol y [C₁₈MIM] [NTf₂].

- 30 [C₁₈MIM] [NTf₂] (400 mg) se añadió a oleato de metilo (800 mg) y glicerol (800 mg). La mezcla se agitó durante 2 minutos a temperatura ambiente (22 °C).

Se formaron tres fases:

- Glicerol en la parte inferior (fase inferior del líquido),
- [C₁₈MIM] [NTf₂] en la parte intermedia (fase sólida),
- 35 - Oleato de metilo en la parte superior (fase superior del líquido).

[C₁₈MIM] [NTf₂], oleato de metilo y glicerol no son miscibles a temperatura ambiente (figura 17).

Ejemplo 25

Se ha probado el comportamiento de fase del oleato de metilo y del glicerol hacia diferentes líquidos iónicos.

- 40 En todos los experimentos, se mezclaron 2,5 g de líquido iónico, 500 mg de oleato de metilo y 500 mg de glicerol y se agitaron fuertemente durante 2 minutos, a continuación se incubaron durante 1 hora a 22 °C (temperatura ambiente).

Se probaron cuatro diferentes líquidos iónicos con el contraanión BF₄: [C₁₂MIM] [BF₄], [C₁₄MIM] [BF₄], [C₁₆MIM] [BF₄], [C₁₈MIM] [BF₄].

- 45 Para cada líquido iónico probado, se observó un sistema de tres fases. El glicerol (fase inferior), los líquidos iónicos probados (fase intermedia), y el oleato de metilo (fase superior) no son miscibles (figura 18).

Ejemplo 16

Se ha probado el comportamiento de fase del oleato de metilo y del glicerol hacia diferentes líquidos iónicos.

5 En todos los experimentos, se mezclaron 2,5 g de líquido iónico, 500 mg de oleato de metilo y 500 mg de glicerol y se agitaron fuertemente durante 2 minutos, a continuación se incubaron durante 1 hora a 22 °C (temperatura ambiente).

Se probaron cuatro diferentes líquidos iónicos con el contraanión PF₆: [C₁₂MIM] [PF₆], [C₁₄MIM] [PF₆], [C₁₆MIM] [PF₆], [C₁₈MIM] [PF₆].

Para cada líquido iónico probado, se observó un sistema de tres fases. El glicerol (fase inferior), los líquidos iónicos probados (fase intermedia), y el oleato de metilo (fase superior) no son miscibles (figura 19).

10 Ejemplo 17

Se ha probado el comportamiento de fase del oleato de metilo y del glicerol hacia diferentes líquidos iónicos.

En todos los experimentos, se mezclaron 2,5 g de líquido iónico, 500 mg de oleato de metilo y 500 mg de glicerol y se agitaron fuertemente durante 2 minutos, a continuación se incubaron durante 1 hora a 22 °C (temperatura ambiente).

15 Se probaron tres diferentes líquidos iónicos con el contraanión NTf₂⁻: [C₁₄MIM] [NTf₂], [C₁₆MIM] [NTf₂], [C₁₈MIM] [NTf₂].

Para cada líquido iónico probado, se observó un sistema de tres fases. El glicerol (fase inferior), los líquidos iónicos probados (fase intermedia), y el oleato de metilo (fase superior) no son miscibles. [C₁₄MIM] [NTf₂] es líquido a temperatura ambiente (figura 20).

20 3- Experimentos comparativos**Ejemplo 18**

el líquido iónico ([OMIM][NTf₂], 1,5 ml), aceite de soja refinado (1,5 ml) y metanol (la relación molar preferida del metanol con respecto al aceite es de 4:1 y 6:1) se agitaron a 50 °C (Ha y col. 2007, *Enz. Microb. Technol.*).

25 Las cantidades de reactivos como se describen por Ha y col. se han reducido en 4 y la mezcla de reacción se ha reproducido para investigar el estado de la fase reactiva inicial cuando se usa un aceite sin refinar (trioleína).

Se mezclaron líquido iónico [OMIM] [NTf₂] (0,375 ml), trioleína (0,375 ml) y metanol a diferentes temperaturas (40 °C, 50 °C y 60 °C). Se probaron seis volúmenes diferentes de metanol. las relaciones molares con respecto al aceite son 2:1, 3:1, 4:1, 6:1, 8:1 y 10:1 (respectivamente 32 µl, 47 µl, 64 µl, 94 µl, 128 µl y 160 µl de metanol).

todas las mezclas de reacción iniciales obtenidas son bifásicas (figuras 10a, 10b y 10c).

30 Las condiciones de reacción descritas en el artículo por Ha y col. no producen una mezcla de reacción inicial monofásica.

III Ejemplos de reacción**1. Etapa biocatalítica****1.1 Medio de reacción****35 Ejemplo 19****Síntesis enzimática de biodiésel en bis[(trifluorometil)sulfoniil]imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio**

se llevaron a cabo las reacciones de transesterificación en viales con tapón de rosca de 3 ml con septos revestidos con teflón, que contenían 1,6 ml de bis[(trifluorometil)sulfoniil]imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio, calentado previamente a 55 °C, 0,18 ml (3,88 mmol) de metanol y 0,62 ml (0,64 mmol) de trioleína. A continuación, La mezcla se agitó magnéticamente a 50 rpm durante 3 min a 60 °C, dando como resultado una solución homogénea. La síntesis del biodiésel comenzó con la adición de 0,056 g de Novozym 435 (Novozymes, Novonordisk, Dinamarca), y la mezcla de reacción resultante se mantuvo en agitación (50 rpm) y temperatura (60 °C) constantes. La reacción se vigiló mediante HPLC (véase Holapek, *M. y col.*, 1999, Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *J. Chromatogr. A*, 858, 13-31). los rendimientos del biodiésel fueron del 95.3 % a las 6 h y del 99.0 % después de 24 h.

Ejemplo 20Síntesis enzimática de biodiésel en bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de trioctilmetilamonio

5 se llevaron a cabo las reacciones de transesterificación en viales con tapón de rosca de 3 ml con septos revestidos con teflón, que contenían 1,6 ml de bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de trioctilmetilamonio, calentado previamente a 55 °C, 0,24 ml (5,16 mmol) de metanol y 0,56 ml (0,58 mmol) de trioleína. A continuación, La mezcla se agitó magnéticamente a 50 rpm durante 3 min a 60 °C, dando como resultado una solución homogénea. La síntesis de biodiésel comenzó con la adición de 0,052 g de novozima 435 y la mezcla de reacción resultante se mantuvo con agitación constante (50 rpm) a 60 °C. Se vigiló el progreso de la síntesis de biodiésel mediante HPLC. Los rendimientos del biodiésel fueron del 80,0 % después de 6 h y 97,5% después de 24 h.

10 Ejemplo 21Síntesis enzimática de biodiésel en los líquidos iónicos [C₁₂MIM] [NTf₂], [C₁₄MIM] [NTf₂], [C₁₆MIM] [NTf₂], [C₁₈MIM] [NTf₂].

Se llevaron a cabo cuatro experimentos, cada uno con un líquido iónico diferente, [C₁₂MIM] [NTf₂], [C₁₄MIM] [NTf₂], [C₁₆MIM] [NTf₂], o [C₁₈MIM] [NTf₂].

15 Se mezclaron el líquido iónico seleccionado (0,4 g), metanol (95 mg, 2,95 mmol), y trioleína (437 mg, 0,49 mmol) en un tubo de ensayo con tapón roscado de 1,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y se agitaron fuertemente.

Para cada experimento, La reacción se inició añadiendo una lipasa (lipasa B) de *Candida antartica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca), (150 mg). La reacción se agitó durante 8 horas a 65 °C.

El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC.

20 Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15 µl) de la solución ensayada y se disolvieron en CH₂Cl₂ (450 µl). Se tomaron 350 µl de la solución resultante y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en CH₂Cl₂ (150 µl, 100 mM) (Patrón interno). Se analizaron alícuotas (1 µl) de la solución final mediante GC.

Los resultados del biodiésel observados mediante GC, fueron del 100,0% después de 6 h para los cuatro líquidos iónicos ensayados.

25 Ejemplo 22Síntesis enzimática de biodiésel en los líquidos iónicos [C₁₂MIM] [NTf₂], [C₁₄MIM] [NTf₂], [C₁₆MIM] [NTf₂], [C₁₈MIM] [NTf₂].

Se llevaron a cabo cuatro experimentos, cada uno con un líquido iónico diferente, [C₁₂MIM] [NTf₂], [C₁₄MIM] [NTf₂], [C₁₆MIM] [NTf₂], o [C₁₈MIM] [NTf₂].

30 El líquido iónico seleccionado (0,8 g), metanol (360 µl, 285 mg, 8,89 mmol), y trioleína (1.44 ml, 1,31 g, 1.48 mmol) se mezclaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 3,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y se agitaron fuertemente.

Para cada experimento, La reacción se inició añadiendo una lipasa (lipasa B) de *Candida antartica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca), (200 mg). La reacción se agitó durante 8 horas a 65 °C.

35 El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC.

Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15 µl) de la solución ensayada y se disolvieron en una solución de dodecano y 2-propanol (485 µl, relación volumétrica de dodecano: 2-propanol 95:5). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 2 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se tomaron 350 µl de la fase superior y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en CH₂Cl₂ (150 µl, 100 mM) (Patrón interno). Se analizaron alícuotas (1 µl) de la solución final mediante GC.

Los resultados del biodiésel observados mediante GC, fueron del siguiente modo:

- * Para [C₁₂MIM] [NTf₂], 59,4% después de 2 horas, 70% después de 6 horas, 70% después de 8 horas.
- * Para [C₁₄MIM] [NTf₂], 69,8 % después de 2 horas, 72,8% después de 6 horas, 75,4% después de 8 horas.
- * Para [C₁₆MIM] [NTf₂], 68,61 % después de 2 horas, 72,8% después de 6 horas, 81,05% después de 8 horas.
- 45 * Para [C₁₈MIM] [NTf₂], 58,7 % después de 2 horas, 76% después de 6 horas, 87% después de 8 horas.

Ejemplo 23Síntesis enzimática de biodiésel en los líquidos iónicos [C₁₂MIM] [PF₆], [C₁₄MIM] [PF₆], [C₁₆MIM] [PF₆].

Se llevaron a cabo tres experimentos, cada uno con un líquido iónico diferente, [C₁₂MIM] [PF₆], [C₁₄MIM] [PF₆] o [C₁₆MIM] [PF₆].

5 El líquido iónico seleccionado (0,8 g), metanol (360 µl, 285 mg, 8,89 mmol), y trioleína (1.44 ml, 1,31 g, 1.48 mmol) se mezclaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 3,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y se agitaron fuertemente.

Para cada experimento, La reacción se inició añadiendo una lipasa (lipasa B) de *Candida antarctica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca), (200 mg). La reacción se agitó durante 8 horas a 65 °C.

El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC.

10 Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15µl) de la solución probada y se disolvieron en una solución de dodecano y 2-propanol (485 µl, relación volumétrica de dodecano: 2-propanol 95:5). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 2 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se tomaron 350 µl de la fase superior y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en dodecano (150 µl, 100 mM) (Patrón interno). Se analizaron alícuotas (1 µl) de la solución final mediante GC.

Los resultados del biodiésel observados mediante GC, fueron del siguiente modo:

- 15 * Para [C₁₂MIM] [PF₆], 30% después de 6 horas.
 * Para [C₁₄MIM] [PF₆], 38,6% después de 6 horas.
 * Para [C₁₆MIM] [PF₆], 49,4% después de 6 horas.

Ejemplo 24

Síntesis enzimática de biodiésel en los líquidos iónicos [C₁₈MIM] [PF₆].

20 El líquido iónico ([C₁₈MIM] [PF₆], 0,8 g), metanol (720 µl, 570 mg, 17,77 mmol), y trioleína (1.44 ml, 1,31 g, 1.48 mmol) se mezclaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 3,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y se agitaron fuertemente.

La reacción se inició añadiendo una lipasa (lipasa B) de *Candida antarctica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca), (200 mg). La reacción se agitó durante 8 horas a 65 °C.

25 El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC.

30 Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15µl) de la solución probada y se disolvieron en una solución de dodecano y 2-propanol (485 µl, relación volumétrica de dodecano: 2-propanol 95:5). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 2 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se tomaron 350 µl de la fase superior y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en dodecano (150 µl, 100 mM) (Patrón interno). Se analizaron alícuotas (1 µl) de la solución final mediante GC.

Ejemplo 25

Síntesis enzimática de biodiésel en los líquidos iónicos [C₁₄MIM] [NTf₂], [C₁₆MIM] [NTf₂], [C₁₈MIM] [NTf₂].

Se llevaron a cabo tres experimentos, cada uno con un líquido iónico diferente, [C₁₄MIM] [NTf₂], [C₁₆MIM] [NTf₂], o [C₁₈MIM] [NTf₂].

35 El líquido iónico seleccionado (0,2 g), una lipasa (lipasa B) de *Candida antarctica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca) (200 mg), y trioleína (1,44 ml, 1,31 g, 1,48 mmol) se mezclaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 3,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 3 minutos y se agitaron fuertemente.

Para cada experimento, la reacción se inició añadiendo metanol (360 µl, 285 mg, 8,89 mmol). La reacción se agitó durante 24 horas a 65 °C.

40 El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC después de 2, 8 y 24 horas de tiempo de reacción.

45 Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15µl) de la solución probada y se disolvieron en una solución de dodecano y 2-propanol (485 µl, relación volumétrica de dodecano: 2-propanol 95:5). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 2 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se tomaron 350 µl de la fase superior y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en dodecano (150 µl, 100 mM) (Patrón interno).

Los resultados del biodiésel observados mediante GC, fueron del siguiente modo:

- * Para [C₁₄MIM] [NTf₂], 11 % después de 2 horas, 12,89% después de 8 horas, 15,96% después de 24 horas.
 * Para [C₁₆MIM] [NTf₂], 15,9 % después de 2 horas, 17,1% después de 8 horas, 18,9% después de 24 horas.
 * Para [C₁₈MIM] [NTf₂], 16,8 % después de 2 horas, 18,9% después de 8 horas, 25,7% después de 24 horas.

Ejemplo 26

Síntesis enzimática de biodiésel en los líquidos iónicos [C₁₄MIM] [PF₆], [C₁₆MIM] [PF₆].

Se llevaron a cabo dos experimentos, uno con [C₁₄MIM] [PF₆], el otro con [C₁₆MIM] [PF₆].

5 El líquido iónico seleccionado (0,2 g), una lipasa (lipasa B) de *Candida antartica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca) (200 mg), y trioleína (1,44 ml, 1,31 g, 1,48 mmol) se mezclaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 3,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 3 minutos y se agitaron fuertemente.

Para cada experimento, la reacción se inició añadiendo metanol (360 µl, 285 mg, 8,89 mmol). La reacción se agitó durante 24 horas a 65 °C.

El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC después de 2, 8 y 24 horas de tiempo de reacción.

10 Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15µl) de la solución probada y se disolvieron en una solución de dodecano y 2-propanol (485 µl, relación volumétrica de dodecano: 2-propanol 95:5). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 2 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se tomaron 350 µl de la fase superior y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en dodecano (150 µl, 100 mM) (Patrón interno).

15 Ejemplo 27

Síntesis enzimática de biodiésel en los líquidos iónicos [C₁₄MIM] [PF₄], [C₁₆MIM] [PF₄].

Se llevaron a cabo dos experimentos, uno en [C₁₄MIM] [PF₄], el otro en [C₁₆MIM] [PF₄].

20 El líquido iónico seleccionado (0,2 g), una lipasa (lipasa B) de *Candida antartica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca) (200 mg), y trioleína (1,44 ml, 1,31 g, 1,48 mmol) se mezclaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 3,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 3 minutos y se agitaron fuertemente.

Para cada experimento, la reacción se inició añadiendo metanol (360 µl, 285 mg, 8,89 mmol). La reacción se agitó durante 24 horas a 65 °C.

El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC después de 2, 8 y 24 horas de tiempo de reacción.

25 Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15µl) de la solución probada y se disolvieron en una solución de dodecano y 2-propanol (485 µl, relación volumétrica de dodecano: 2-propanol 95:5). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 2 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se tomaron 350 µl de la fase superior y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en dodecano (150 µl, 100 mM) (Patrón interno).

Los resultados del biodiésel observados mediante GC, fueron del siguiente modo:

30 * Para [C₁₄MIM] [PF₄], 12,1 % después de 2 horas, 15,42% después de 8 horas, 19,6% después de 24 horas.
* Para [C₁₆MIM] [PF₄], 9,1 % después de 2 horas, 16,0% después de 8 horas, 24,15% después de 24 horas.

Ejemplo 28

Síntesis enzimática de biodiésel en [C₁₈MIM] [FAP].

35 El líquido iónico ([C₁₈MIM] [FAP], 0,2 g), una lipasa (lipasa B) de *Candida antartica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca) (200 mg), y trioleína (1,44 ml, 1,31 g, 1,48 mmol) se mezclaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 3,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 3 minutos y se agitaron fuertemente.

Para cada experimento, la reacción se inició añadiendo metanol (360 µl, 285 mg, 8,89 mmol). La reacción se agitó durante 24 horas a 65 °C.

El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC después de 2, 8 y 24 horas de tiempo de reacción.

40 Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15µl) de la solución probada y se disolvieron en una solución de dodecano y 2-propanol (485 µl, relación volumétrica de dodecano: 2-propanol 95:5). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 2 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se tomaron 350 µl de la fase superior y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en dodecano (150 µl, 100 mM) (Patrón interno).

45

Ejemplo 29Síntesis enzimática de biodiésel en [C₁₈MIM] [NTf₂].

5 El líquido iónico ([C₁₈MIM] [NTf₂], 0.2 g), una lipasa (lipasa B) de *Candida antarctica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca) (200 mg), y trioleína (1,44 ml, 1,31 g, 1,48 mmol) se mezclaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 3,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 3 minutos y se agitaron fuertemente.

Para cada experimento, la reacción se inició añadiendo etanol (518 µl, 409 mg, 8,89 mmol). La reacción se agitó durante 24 horas a 65 °C.

El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC después de 2, 8 y 24 horas de tiempo de reacción.

10 Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15µl) de la solución probada y se disolvieron en una solución de dodecano y 2-propanol (485 µl, relación volumétrica de dodecano: 2-propanol 95:5). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 2 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se tomaron 350 µl de la fase superior y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en dodecano (150 µl, 100 mM) (Patrón interno).

Ejemplo 30

15 Síntesis enzimática de biodiésel en [C₁₈MIM] [NTf₂].

El líquido iónico ([C₁₈MIM] [NTf₂], 0.2 g), una lipasa (lipasa B) de *Candida antarctica* (Novosym® 435, Novo-Nordisk Dinamarca) (200 mg), y trioleína (1,44 ml, 1,31 g, 1,48 mmol) se mezclaron en un tubo de ensayo con tapón de rosca de 3,5 ml, se incubaron a 65 °C durante 3 minutos y se agitaron fuertemente.

20 Para cada experimento, la reacción se inició añadiendo 1-propanol (666 µl, 533 mg, 8,89 mmol). La reacción se agitó durante 24 horas a 65 °C.

El progreso de la síntesis de biodiésel se vigiló mediante GC después de 2, 8 y 24 horas de tiempo de reacción.

25 Vigilancia mediante GC: Se tomaron muestras (15µl) de la solución probada y se disolvieron en una solución de dodecano y 2-propanol (485 µl, relación volumétrica de dodecano: 2-propanol 95:5). Las mezclas bifásicas resultantes se agitaron fuertemente durante 2 minutos y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se tomaron 350 µl de la fase superior y se añadieron a una solución de decanoato de entilo en dodecano (150 µl, 100 mM) (Patrón interno).

1.2 Análisis de las muestras**Ejemplo 31**Medio de reacción:

30 800 µl de bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio (Ocdmim NTf₂) + 90 µl de metanol de Merck (1,93 mmol) + 310 µl de trioleína (Calidad técnica, <60 % de contenido de trioleína mediante GC, de Fluka) (0,32 mmol = 0,96 mmol de cadenas de ácidos grasos) + 28 mg de novozima 435 (Novozymes, Novonordisk, Dinamarca). La incubación se inició en viales de vidrio con tapón de rosca en un baño de glicerol a 60 °C.

35 En diferentes momentos, muestras de 30 µl se retiraron del medio de reacción, a continuación se mezclaron con 470 ml de acetona en un vial Eppendorf. La mezcla monofásica resultante se centrifugó a 2.500 rpm durante 15 min, para precipitar cualquier partícula de enzima. A continuación, 400 µl de solución transparente se mezclaron con 100 µl de decanoato de entilo 100 mM (patrón interno). Finalmente, 30 µl de la solución resultante se inyectaron en un sistema HPLC Shimadzu, equipado con una bomba LC20AD, un inyector automático SIL 20AC y un detector de matriz de diodos SPD M20A.

40 Las muestras se eluyeron a través de una columna C18 LichroCart RP (25 mm de longitud, Merck), utilizando el siguiente gradiente ternario, y se vigilaron a una longitud de onda de 210 nm.

Tiempo (min)	Fase A Acetonitrilo:agua (80:20 v/v)	Fase B Acetonitrilo	Fase C Isopropanol: Hexano 50:40 v/v	Flujo global (ml/min)
0	100	0	0	1,2
5	0	100	0	1,2
7	0	100	0	1,2
20	0	50	50	1,2
28	0	100	0	1,2
30	0	100	0	1,2

(continuación)

Tiempo (min)	Fase A Acetonitrilo:agua (80:20 v/v)	Fase B Acetonitrilo	Fase C Isopropanol: Hexano 50:40 v/v	Flujo global (ml/min)
33	100	0	0	1,2
35	100	0	0	1,2

Se identificaron los tiempos de retención de los picos utilizando diferentes patrones comerciales, como se indica en la siguiente tabla

Familia	Compuesto	Tiempo de retención (min)
Ácidos grasos	Ácido palmítico	1,8
	Ácido oleico	1,9
Patrón interno	Decanoato de etilo	6,8
Monoglicéridos (MG)	Monopalmitina	2,1
	Monolinoleína	6,4
	Monooleína	8,2
	Monoestearina	11,8
FAME (Biodiésel)	Palmitoleato de metilo	9,1
	Linoleato de metilo	9,6
	Oleato de metilo	12,1
	Palmitato de metilo	12,6
	Estado de metilo	15,0
Diglicéridos (DG)	1,3-Dilinoeína	15,8
	1,2-Diestearina	16,4
	1,3-Dioleína	19,3
	1,3-Diestearina	19,5
Triglicéridos	Trinoleína	23,5
	Trioleína	27,8

5 Es necesario tener en cuenta que no están disponibles todos los patrones de TAG, DAG o MAG, que el sustrato no es un compuesto puro, y que la columna cromatográfica no es capaz de separar todos los compuestos específicamente. Sin embargo, todos los compuestos de la misma familia, por ejemplo, TAG, DAG, MAG o FAME tiene un tiempo de retención en el mismo intervalo en el cromatograma, y pueden cuantificarse juntos por su potencial de transferir grupos acilo. La presencia del IL en la muestra de inyección (se disolvieron las muestras en acetona) provoca un gran pico de elución de 1,5 a 4 min de tiempo de retención, que hace imposible cuantificar cualquier compuesto en este intervalo de tiempo.

2. Recuperación de biodiésel y etapas de reciclado de IL

Ejemplo 32

2.1. Recuperación de la enzima

15 Al final de la reacción, la mezcla de reacción se centrifugó durante 10 min a 2500 rpm y 40 - 50 °C (una capacidad de mantener líquida la mezcla de reacción), a continuación, las partículas de enzima inmovilizadas se recuperaron mediante decantación simple. Las partículas de enzima inmovilizadas se almacenaron en un desecador que contenía gel de sílice a temperatura ambiente hasta el siguiente ciclo catalítico.

2.2. Eliminación del metanol.

20 La mezcla de reacción se colocó en un reactor, un matraz rotatorio o cualquier otro sistema capaz de permitir el vacío (es decir, un sistema rotatorio Buchi). El metanol en exceso se eliminó mediante evaporación de la mezcla de

reacción a presión reducida a 50-70 °C (utilizando un baño de agua) y 100 rpm, durante 10 min a 1 hora. el tiempo de evaporación depende del volumen global de la mezcla de reacción.

2.3. Eliminación del glicerol.

5 La eliminación del glicerol se lleva a cabo mediante extracción líquido-líquido con agua. La cantidad añadida de agua varía de 2:1 a 5:1 v/v con respecto al volumen completo de reacción, dando como resultado un sistema bifásico que se agita suavemente a 25 - 100 rpm durante 10 a 60 min a 30 to 90 °C. Tras el periodo de agitación, el reactor se introduce en un baño de hielo, durante 3-5 min para disminuir la temperatura por debajo de 20 °C, lo que puede producir la solidificación del líquido iónico que contiene el biodiésel. A continuación, la fracción acuosa se separa mediante decantación simple. Este procedimiento podría repetirse de 3 a 5 veces.

10 2.4. Recuperación del biodiésel.

La extracción del biodiésel se lleva a cabo en el mismo reactor mediante extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico. Los disolventes orgánicos preferidos no son miscibles con los líquidos iónicos utilizados en el procedimiento, normalmente alcanos alifáticos de cadena corta, tales como pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, y sus mezclas. Se puede usar tolueno, una mezcla de xilenos, también se puede usar clorobenceno. La cantidad añadida de disolvente orgánico varía de 2:1 a 5:1 v/v con respecto al volumen total de reacción, dando como resultado un sistema bifásico de disolvente orgánico-líquido iónico que se mantiene sacudiendo o agitando suavemente (25 - 100 rpm) durante un periodo de 10 a 60 min a una temperatura de 30 a 90 °C. Tras el periodo de agitación, la fase del disolvente orgánico que contiene el biodiésel se puede separar mediante decantación simple. este procedimiento de extracción podría repetirse de 3 a 5 veces hasta la extracción completa del biodiésel.

20 2.5. Secado del IL

Una vez que se consigue la extracción y separación del alcohol alifático primario, glicerol y biodiésel en exceso, el IL y la enzima restantes pueden a continuación utilizarse en ciclos catalíticos adicionales.

25 Preferentemente, la mezcla de enzima-IL restante que se mantiene después de la extracción del biodiésel se trata a vacío durante un periodo de 2 a 10 min a una temperatura de 50 a 70 °C a fin de eliminar todo el disolvente orgánico residual. La mezcla enzima-IL está lista a continuación para un nuevo ciclo biocatalítica.

3. Ejemplo de un ciclo catalítico completo y procedimiento de reciclado

Ejemplo 33

30 4 ml de bis[(trifluorometil)sulfonil]imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio, calentado previamente a 55 °C y se añadieron 0,45 ml (9,68 mmol) de metanol a un matraz de 25 ml con vacío. La solución resultante se agitó a 100 rpm en un sistema rotatorio durante 3 min a 60 °C. A continuación, se añadieron 1,55 ml (1,6 mmol) de trioleína, y la mezcla se agitó de nuevo a 100 rpm durante 3 min a 60 °C, volviéndola una solución homogénea y transparente. La síntesis de biodiésel comenzó con la adición de 0,2 g de novozima 435 y la mezcla de reacción resultante se mantuvo con agitación constante (150 rpm) durante 24 h a 60 °C. Se vigiló el progreso de la síntesis de biodiésel mediante HPLC. Cuando finalizó la etapa biocatalítica, se llevaron a cabo tres extracciones consecutivas para obtener productos.

En primer lugar, la mezcla de reacción se colocó al vacío durante 5-10 min a 60 °C para eliminar el exceso de metanol, que puede reutilizarse posiblemente en ciclos catalíticos adicionales.

40 En segundo lugar, se añadieron 10 ml de agua a la mezcla de reacción y la mezcla bifásica resultante se agitó a 100 rpm durante 30 min a 60 °C a presión atmosférica. A continuación, el matraz se introdujo en un baño de hielo durante 5 min para disminuir la temperatura por debajo 20 °C, que indujo la solidificación de la fase de líquido iónico, siendo la fase acuosa la fase superior que contenía el glicerol. La fracción acuosa se recogió mediante decantación simple. Esta etapa se puede llevar a cabo dos veces más para asegurar la extracción completa del glicerol si es necesario.

45 En tercer lugar, se añadieron 10 ml de hexano al matraz que contenía la mezcla de reacción solidificada, y la mezcla se agitó a 100 rpm y 60 °C durante 30 min, dando como resultado una mezcla líquida bifásica. A continuación, la fase hexano que contenía biodiésel se recogió mediante decantación simple. Esta etapa se llevó a cabo dos veces más para asegurar la extracción del biodiésel.

50 después de la última etapa de lavado con hexano, la fase de líquido iónico restante que contenía la enzima inmovilizada se colocó a presión de vacío durante 10 min a 60 °C para extraer las trazas restantes de hexano. Así pues, la mezcla de líquido iónico-enzima estaba lista para iniciar un nuevo ciclo.

Los rendimientos obtenidos en la síntesis del biodiésel tras ciclos de operación consecutivos fueron del siguiente modo,

ES 2 626 105 T3

CICLO	Rendimiento a las 6 h (%)	Rendimiento a las 24 h (%)
1	96,7	96,6
2	95,4	98,6
3	93,8	96,8
4	97,5	98,8
5	92,5	95,3
6	92,9	95,9
7	92,1	93,1

REIVINDICACIONES

1. Uso de una combinación de
- al menos un líquido iónico que es lipófilo, y no miscible con agua, y
 - al menos una enzima,
- 5 en la que el líquido iónico lipófilo está constituido por un catión lipófilo y un anión hidrófobo, estando constituido dicho catión por una cabeza catiónica y estando constituido dicho anión por una cabeza aniónica y en la que dicha cabeza catiónica y/o cabeza aniónica están sustituidas por una o varias cadenas secundarias de carbono que pueden ser similares o diferentes entre sí, y
- 10 en la que la cadena secundaria de carbono en la cabeza catiónica y/o la cabeza aniónica son cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o no saturadas, suponiendo que al menos una de las cadenas secundarias comprenda al menos 10 átomos de carbono, en la que la enzima es una lipasa o una esterasa, para la implementación de un procedimiento de esterificación y/o transesterificación de un sustrato con al menos un alcohol, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas, en el que dicho líquido
- 15 iónico, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento de esterificación y/o transesterificación.
2. Uso de una combinación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que se forman tres fases al final de dicho procedimiento de esterificación y/o transesterificación,
- una primera fase que contiene al menos un líquido iónico y al menos una enzima,
 - 20 - una segunda fase que consiste sustancialmente en glicerol,
 - una tercera fase que consiste sustancialmente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.
3. Uso de una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el mencionado líquido iónico es líquido o sólido a temperatura ambiente.
4. Uso de una combinación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho líquido iónico, dicho sustrato y dicho alcohol forman una única fase líquida homogénea, a temperatura ambiente.
5. Uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la enzima está soportada y dicha enzima soportada está en suspensión, o en forma soluble, en la mencionada única fase líquida homogénea o
- 30 en la que la enzima no está soportada, y dicha enzima no soportada está en suspensión, o en forma soluble, en la mencionada única fase líquida homogénea.
6. Uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la temperatura de fusión del líquido iónico está comprendida en el intervalo de temperaturas de 0 °C a 100 °C, o de 0 °C a 40 °C, y de 40 °C a 60 °C y de 60 °C a 100 °C.
7. Uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
- 35 en la que el catión del líquido iónico lipófilo se selecciona entre cationes de imidazolio, piridinio, triazolío, pirrolidinio, guanidinio, sulfonio, fosfonio o amonio, sustituidos por al menos una cadena secundaria de carbono lipófila que comprende al menos 10 átomos de carbono y en la que el anión del líquido iónico hidrófobo se selecciona entre PF_6^- , bis(trifluorometilsulfonil)imida (NTf_2^-) BF_4^- , tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato (FAP), alquilsulfatos con una cadena de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono,
- 40 alquilsulfonatos con una cadena de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono, o dialquilsulfato con cadenas de alquilo de 1 a 20 átomos de carbono.
8. Uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el líquido iónico se selecciona entre bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-metil-3- octadecilimidazolio y bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-hexadecil-3-metilimidazolio.
- 45 9. Uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la lipasa o la esterasa se seleccionan entre el grupo que consiste en *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Pseudomonas cepacia*, *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, páncreas de cerdo, *Aspergillus subtilis*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Chromobacterium viscosum*, *Yarrowia lipolitica*, *Thermus lanuginosa*, hígado de cerdo, particularmente, una lipasa B de *Candida Antartica*.
- 50 10. Uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el sustrato se selecciona entre grasas animales, aceite de semilla de girasol, aceite de soja, aceite de palma, aceite de coco, aceite de linaza, aceite de colza, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de jatrofa, aceites residuales comestibles y sus mezclas.

11. Uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el alcohol se selecciona entre el grupo que consiste en alcoholes que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, en particular metanol, etanol, propanol, butanol, sus isómeros, y sus mezclas.

5 12. Un procedimiento para la esterificación y/o la transesterificación de un sustrato, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas, en ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprenden una etapa de inicialización que consiste en:

- reunir al menos un sustrato, al menos un alcohol y al menos una enzima en al menos un líquido iónico, formando dicho sustrato, alcohol y líquido iónico una única fase líquida homogénea, estando dicho alcohol y sustrato en cantidades adecuadas para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, en el que dicho líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento,

10 en el que el líquido iónico es hidrófobo y está constituido por un catión lipófilo y un anión hidrófobo, estando constituido dicho catión por una cabeza catiónica y

estando constituido dicho anión por una cabeza aniónica y

15 en la que dicha cabeza catiónica y/o cabeza aniónica están sustituidas por una o varias cadenas secundarias de carbono que pueden ser similares o diferentes entre sí, y

en la que la cadena secundaria de carbono en la cabeza catiónica y/o la cabeza aniónica son cadenas de carbono lineales o ramificadas, saturadas o no saturadas, suponiendo que al menos una de las cadenas secundarias comprenda al menos 10 átomos de carbono,

en la que la enzima es una lipasa o una esterasa.

20 13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende:

- una etapa de inicialización, que consiste en reunir al menos un sustrato, al menos un alcohol y al menos una enzima en al menos un líquido iónico, formando dicho sustrato, alcohol y líquido iónico una única fase líquida homogénea, a temperatura ambiente, estando dicho alcohol y sustrato en cantidades adecuadas para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, y

25 - una etapa de recuperación, que consiste en recuperar:

* la fase que consiste sustancialmente en los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

30 * la fase que consiste sustancialmente en el glicerol formado en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

* la fase que consiste esencialmente en un líquido iónico y una enzima, siendo dicho líquido iónico tanto líquido como sólido y

- una etapa de restauración, que consiste en recuperar y purificar la combinación de líquido iónico y enzimas, para obtener una combinación purificada de líquido iónico y enzimas.

35 14. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende:

- una etapa de reacción, que consiste en reunir al menos un sustrato, consistiendo dicho sustrato de aceites, grasas, ácidos grasos o una de sus mezclas, al menos un alcohol, en una combinación de al menos un líquido iónico y al menos una enzima, formando dicho sustrato, alcohol y líquido iónico una única fase líquida homogénea, estando dicho alcohol y sustrato en la cantidad adecuada para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, en la que dicho líquido iónico es líquido a la temperatura a la cual se lleva a cabo el procedimiento y

40 - una etapa de recuperación, que consiste en recuperar:

45 * la fase que consiste sustancialmente en los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

* la fase que consiste sustancialmente en el glicerol formado en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

- una etapa de restauración, que consiste en recuperar y purificar la combinación de líquido iónico y enzimas, para obtener una combinación purificada de líquido iónico y enzimas,

50

con las tres mencionadas etapas definidas anteriormente formando un ciclo.

15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende una etapa de implementar al menos un ciclo y en cada ciclo dado la combinación del líquido iónico y de al menos una enzima utilizada en la etapa de reacción es la combinación purificada del líquido iónico y de la enzima obtenida al final de la etapa de restauración implicada en el

55

ciclo precedente a un ciclo dado.

5 16. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos en la que dichos ciclos se repiten hasta que se agota la actividad catalítica de la enzima, cuando no se pueden encontrar más enzimas activas, o si una gran proporción de las enzimas ha perdido su actividad.

17. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, para la esterificación y/o la transesterificación del sustrato en ésteres de alquilo de ácidos grasos que comprende:

10 - una etapa de inicialización, que consiste en reunir al menos un sustrato, metanol y novozima 435 en bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio, formando dicho sustrato, metanol y bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio una única fase líquida homogénea, agitar la reacción a 60 °C durante 24 horas, y

- una etapa de recuperación, que consiste en decantar:

15 * la fase que consiste sustancialmente en los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

* la fase que consiste sustancialmente en el glicerol formado en la reacción de esterificación y/o transesterificación y

20 - una etapa de restauración, que consiste en recuperar y purificar bajo vacío la combinación de bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio y novozima 435, para obtener una combinación purificada de bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-metil-3-octadecilimidazolio y novozima 435.

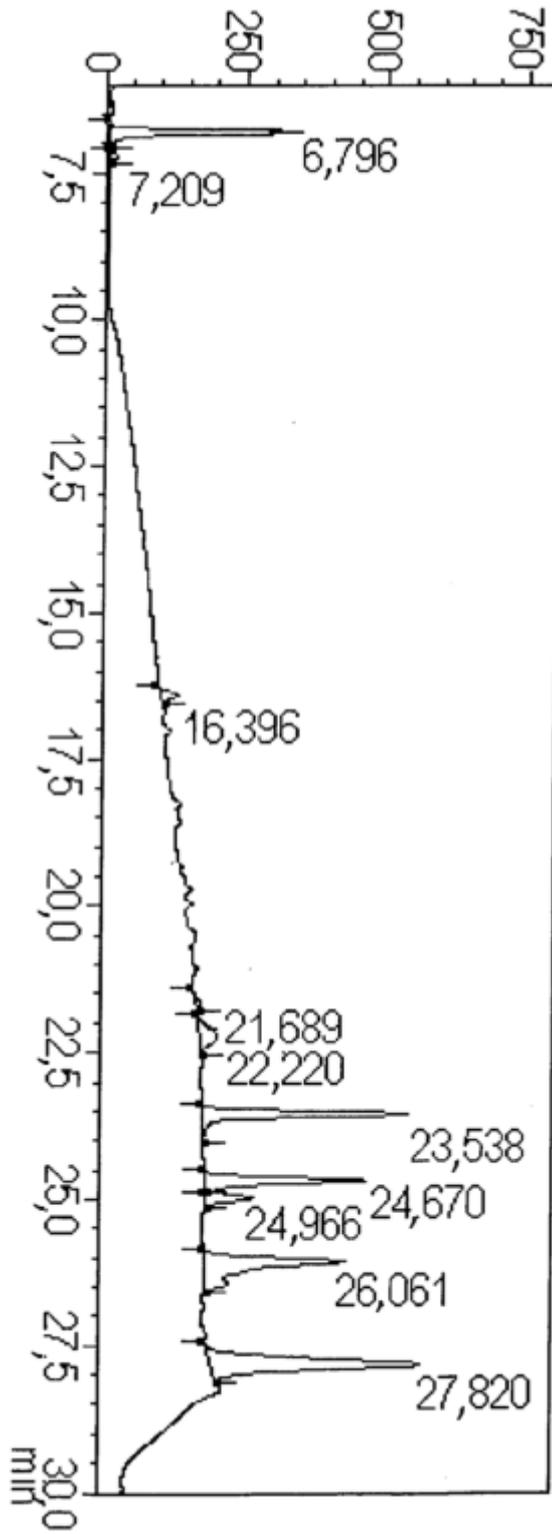


Figura 1

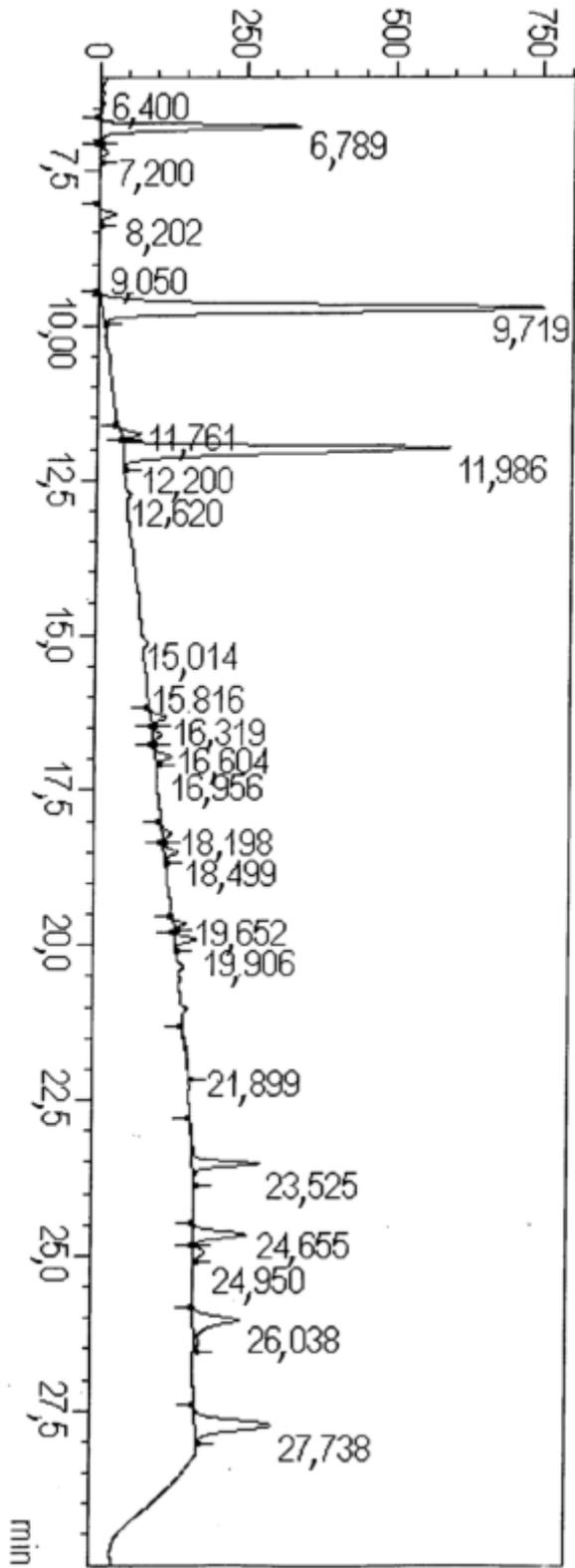


Figura 2

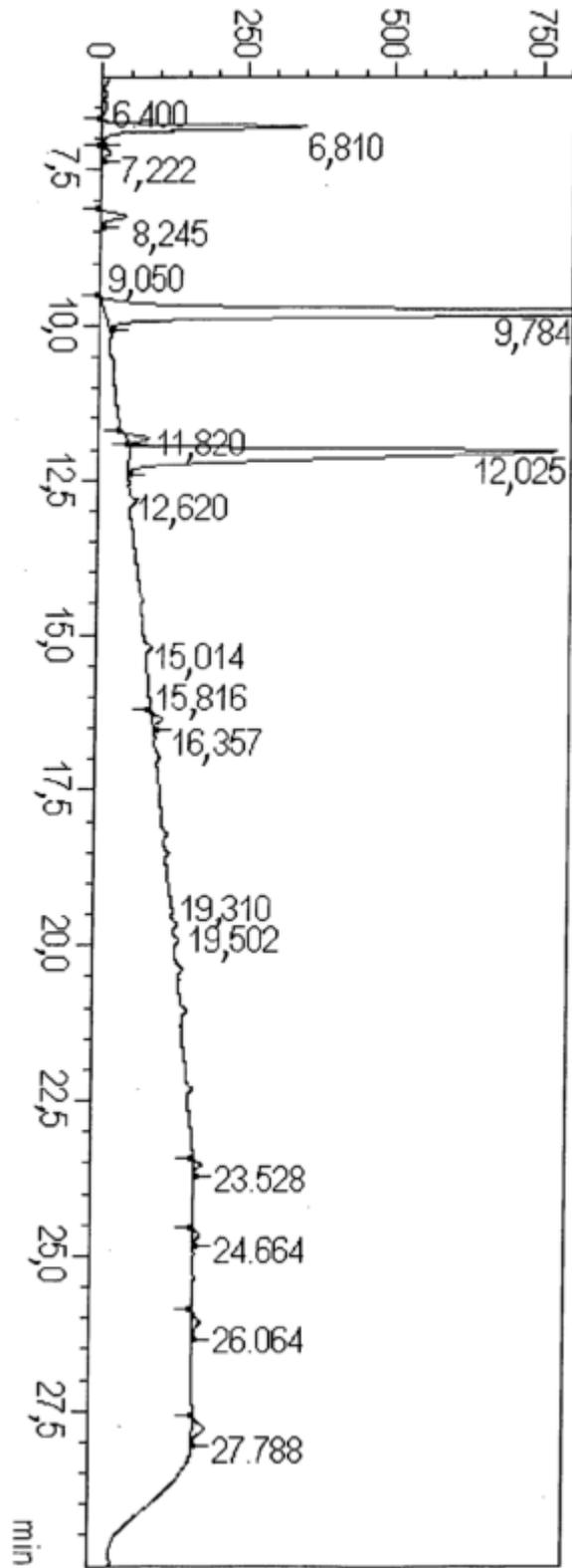


Figura 3

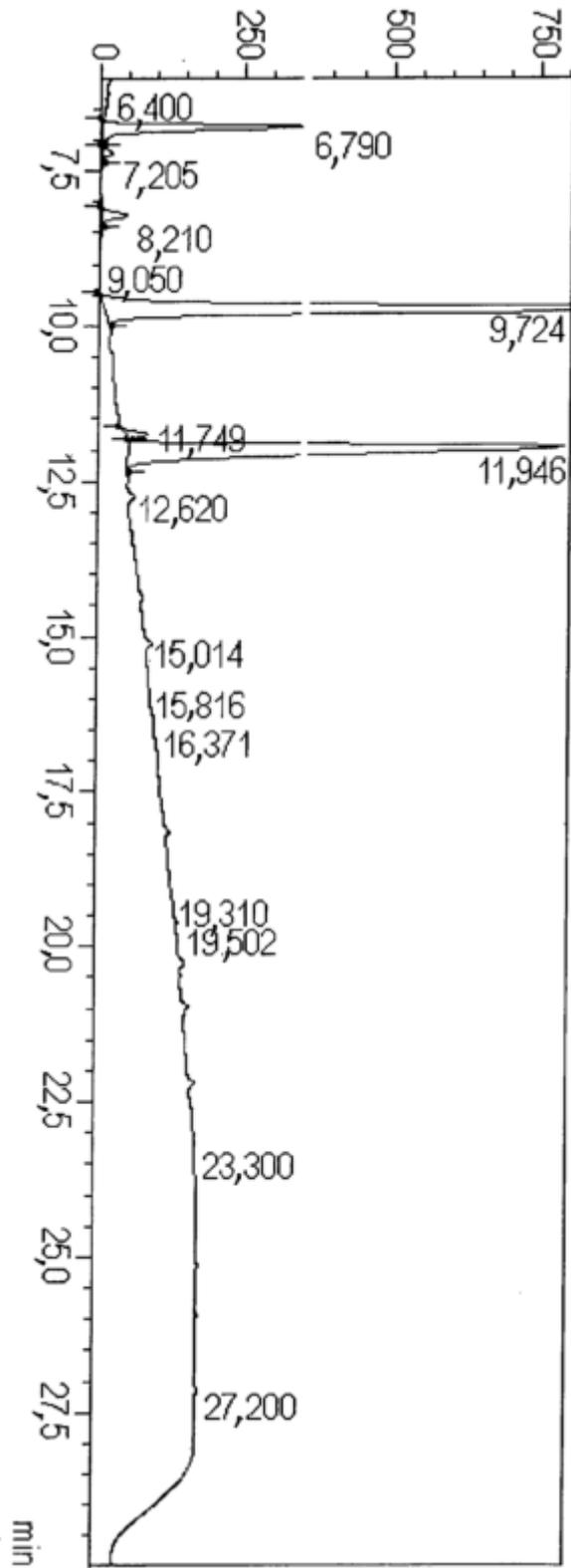


Figura 4

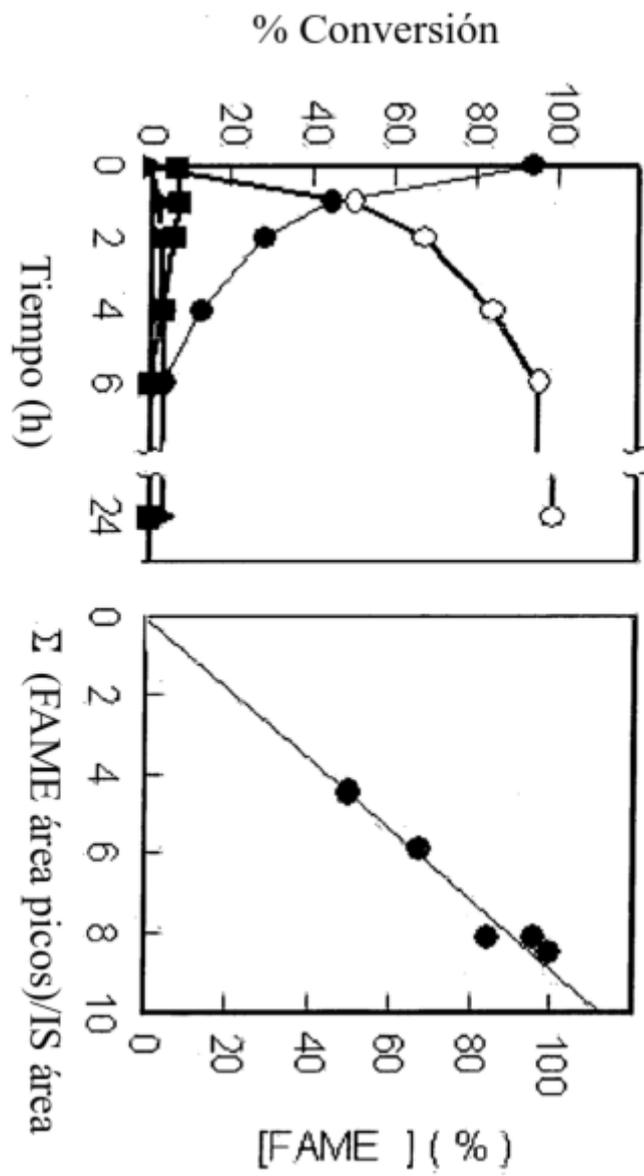


Figura 5



Figura 6a

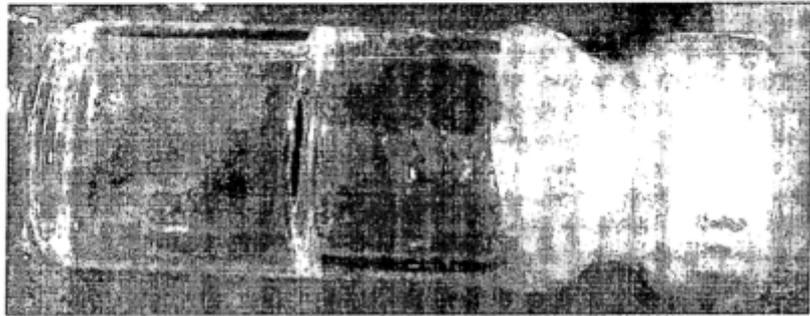


Figura 6b

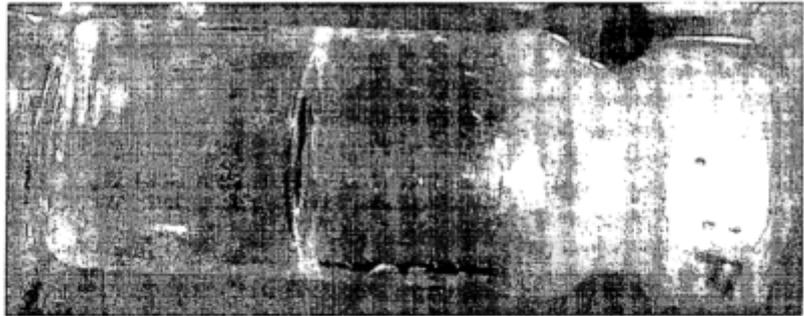


Figura 6c



Figura 6c

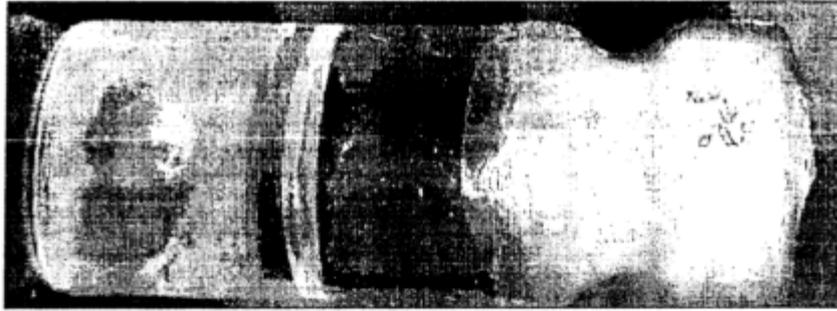


Figura 7a

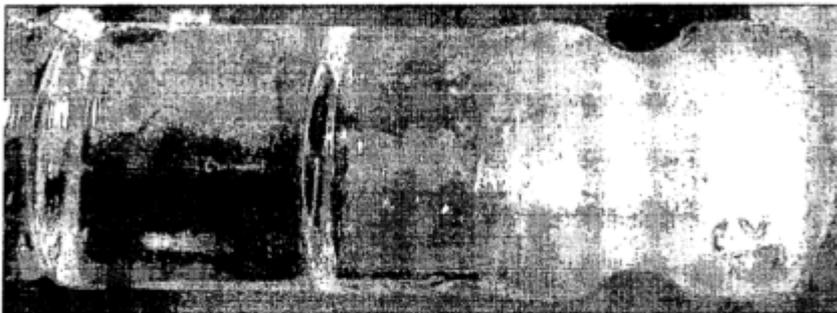


Figura 7b

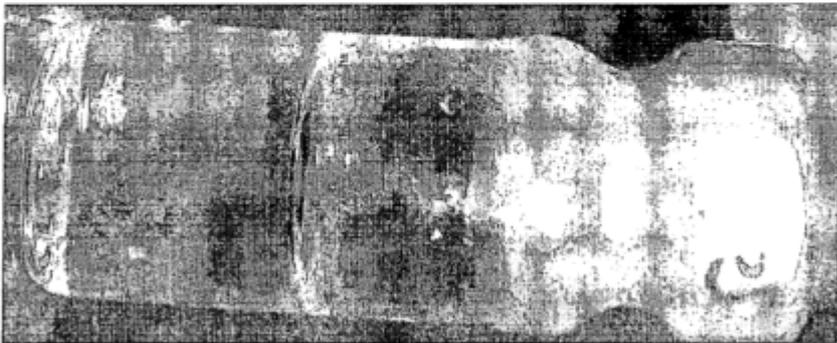


Figura 7c



Figura 7c

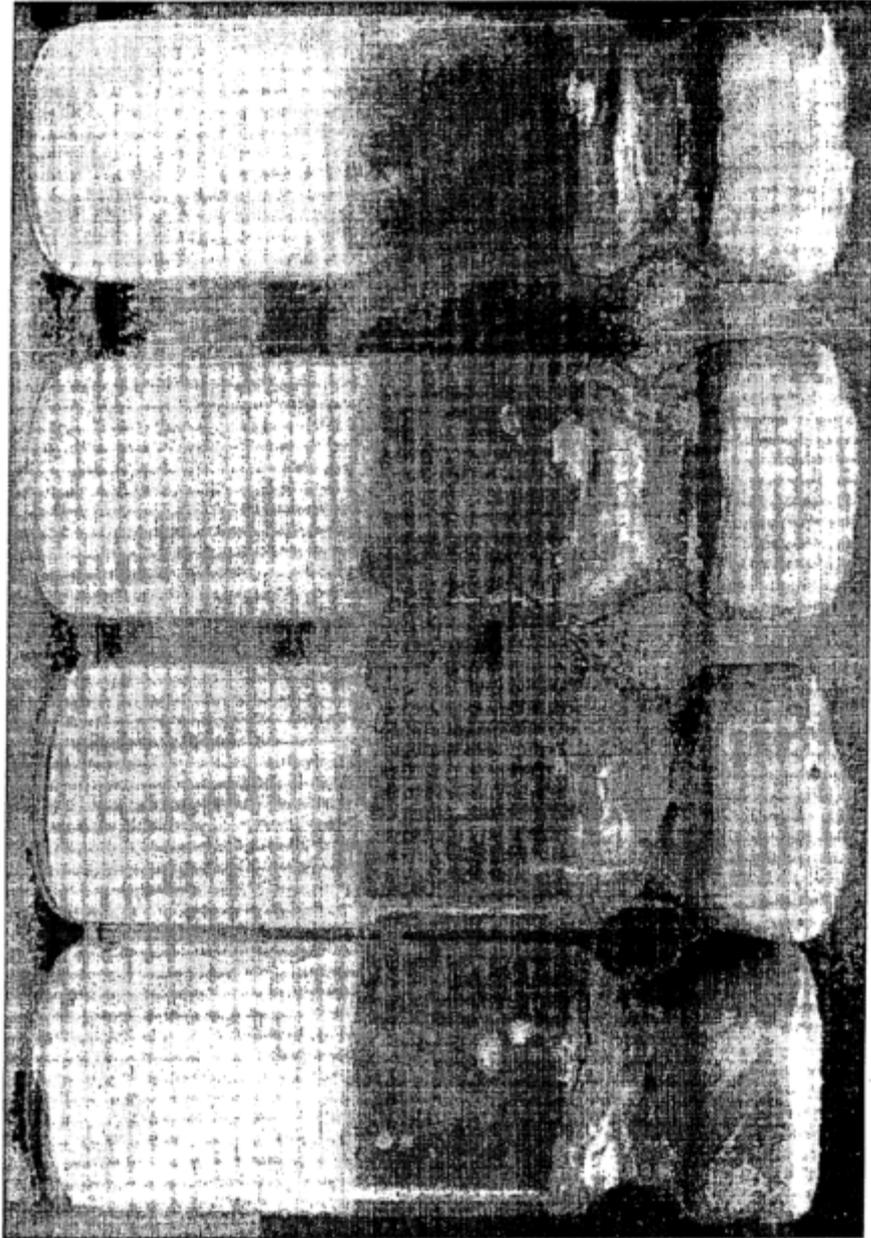


Figura 8a

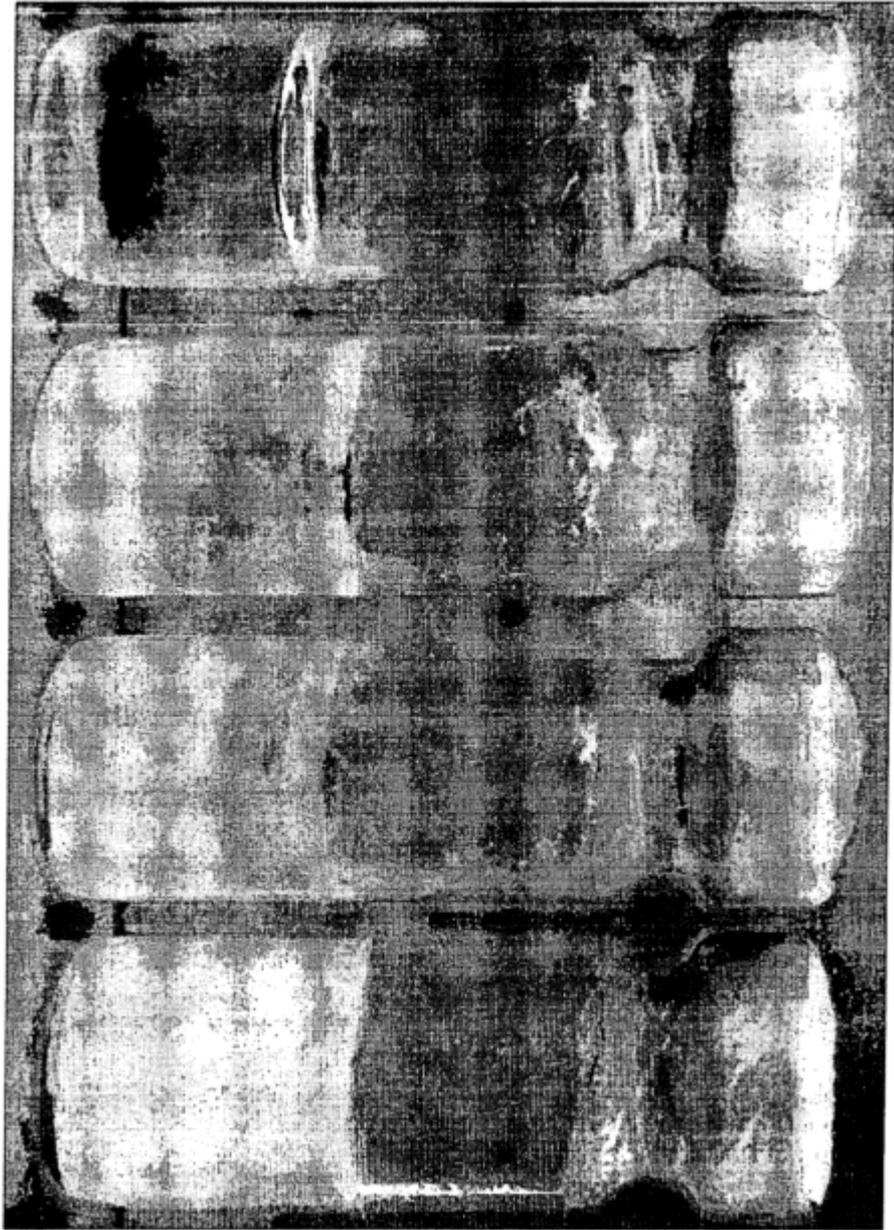


Figura 8b

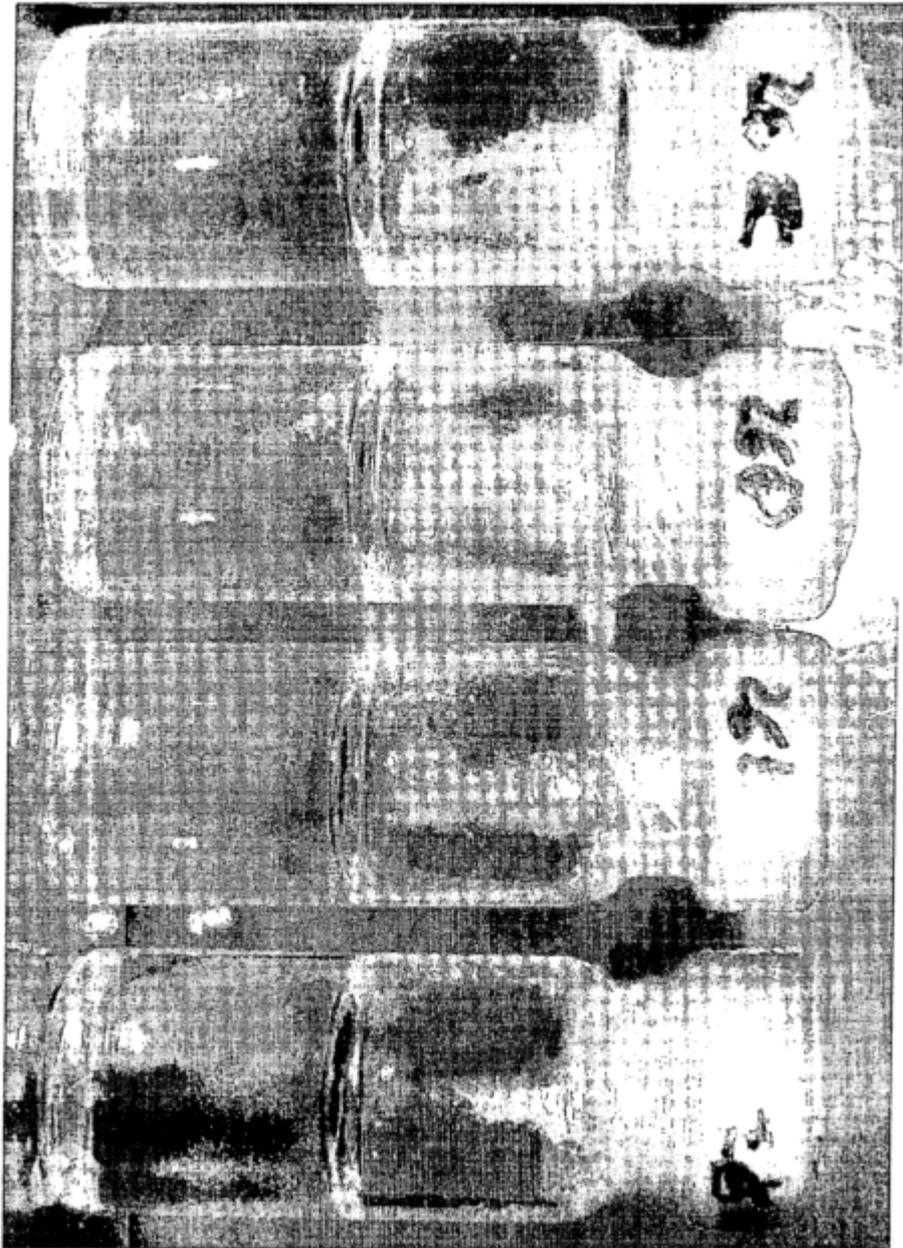


Figura 8c



Figura 8d

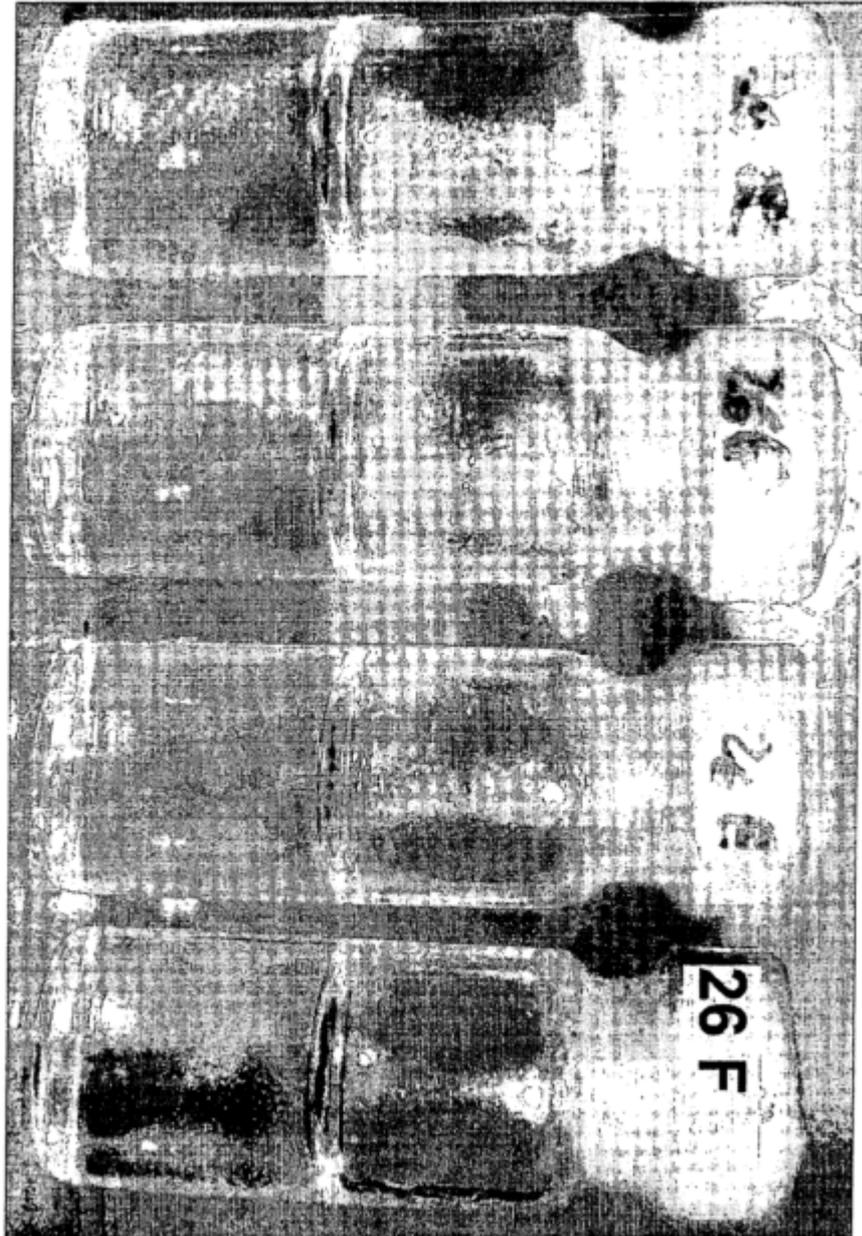


Figura 8c



Figura 9a



Figura 9b



Figura 9c



Figura 9d

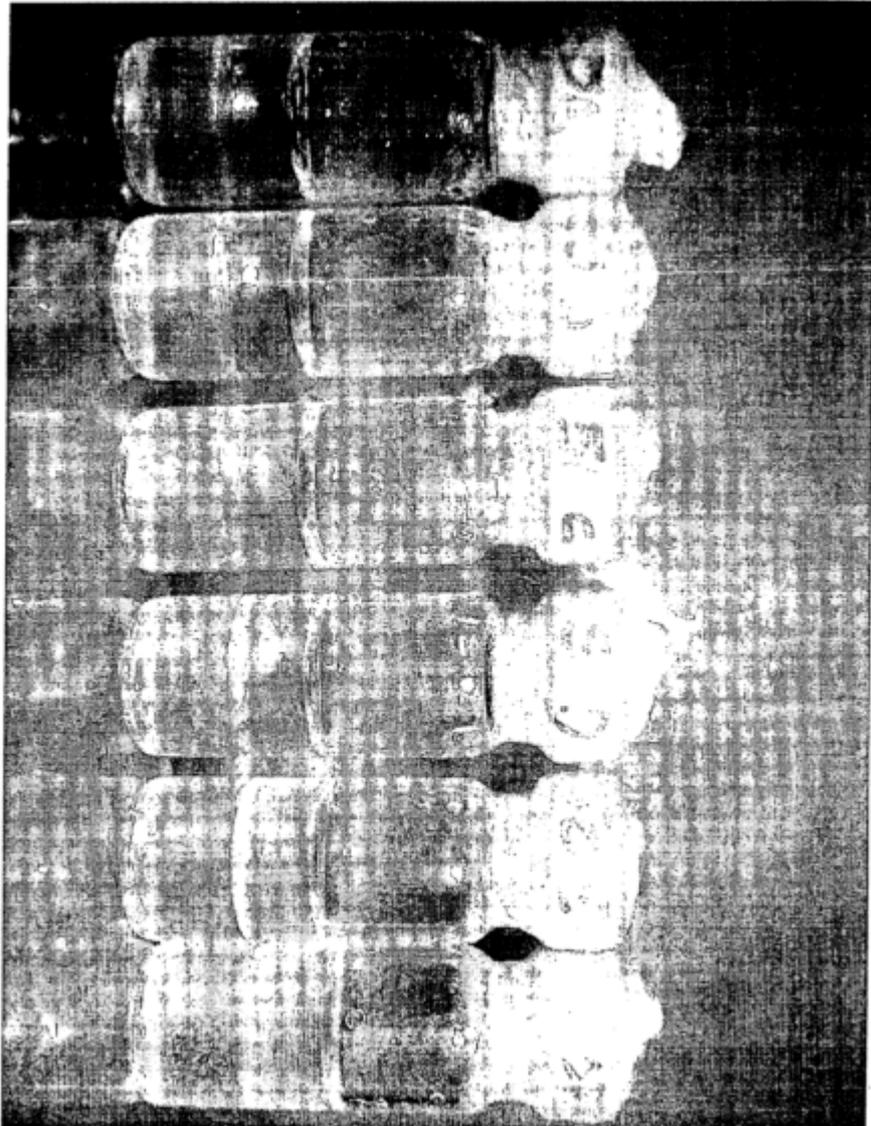


Figura 10a

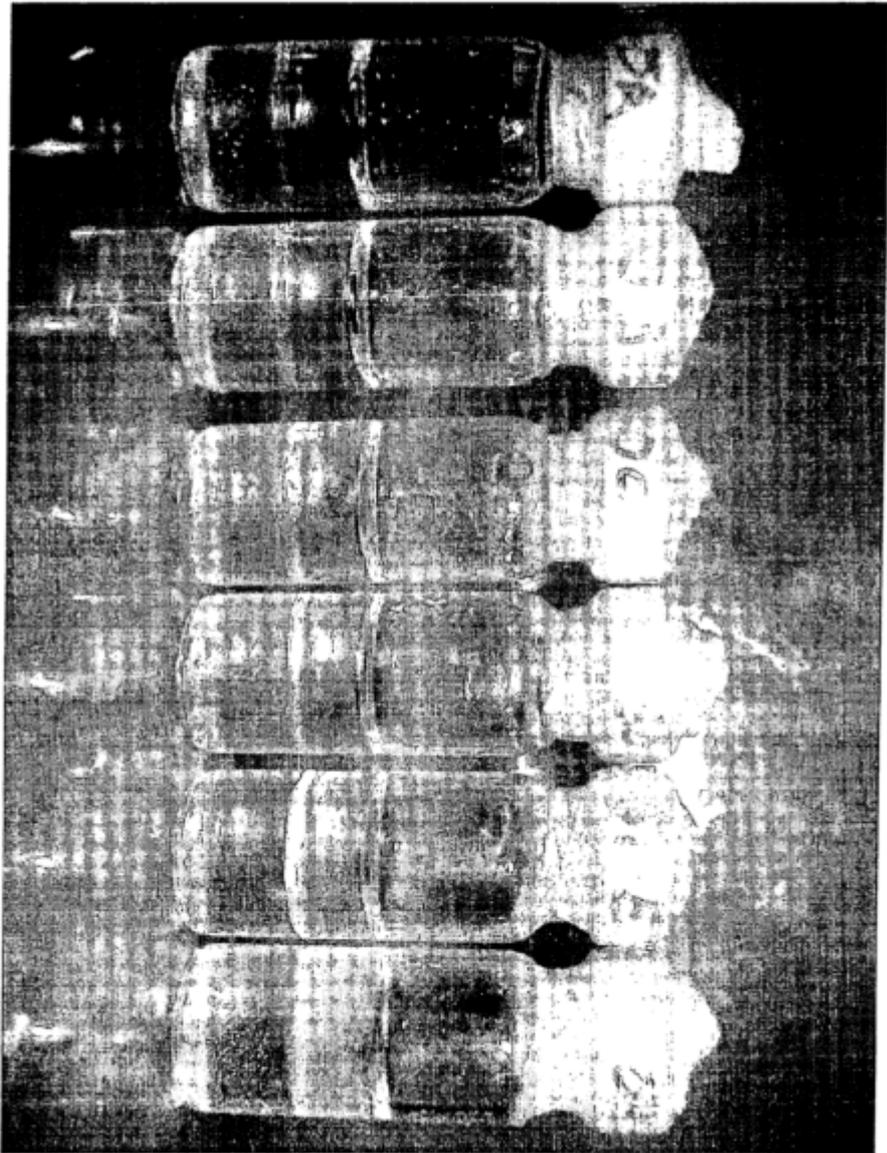


Figura 10b

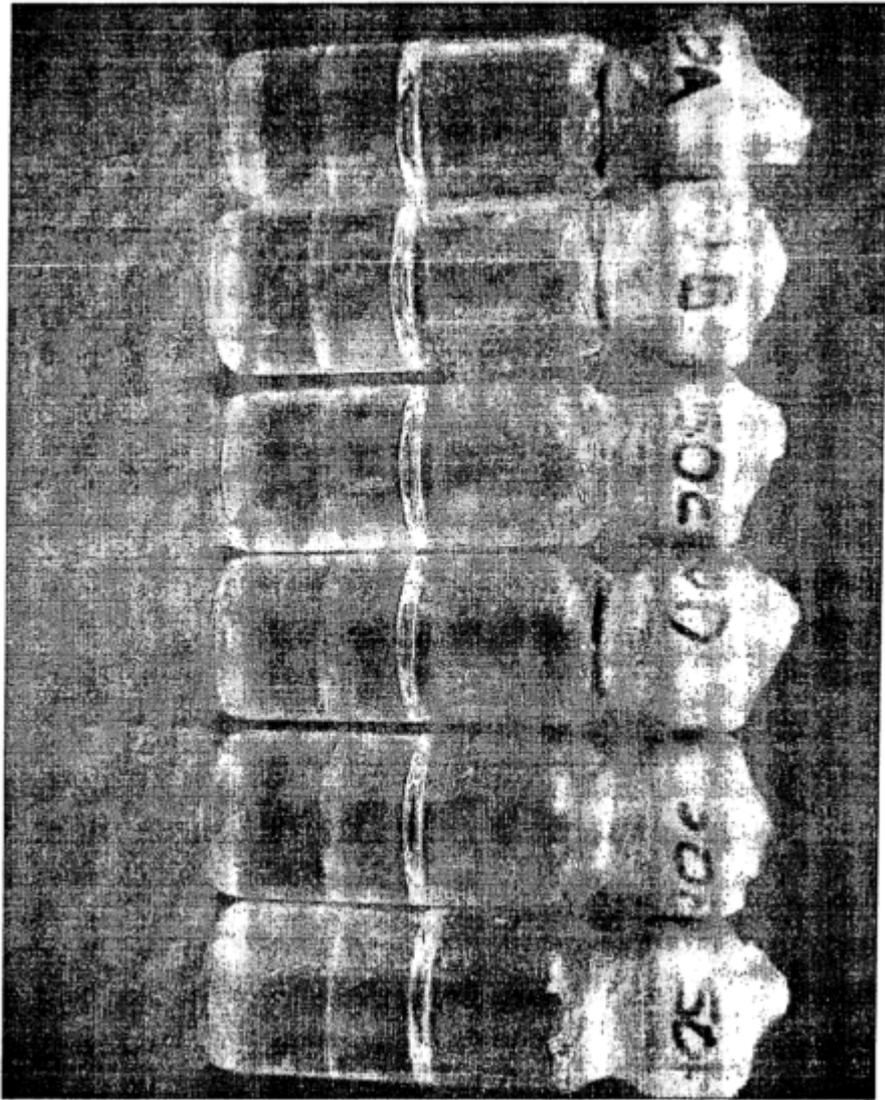


Figura 10c

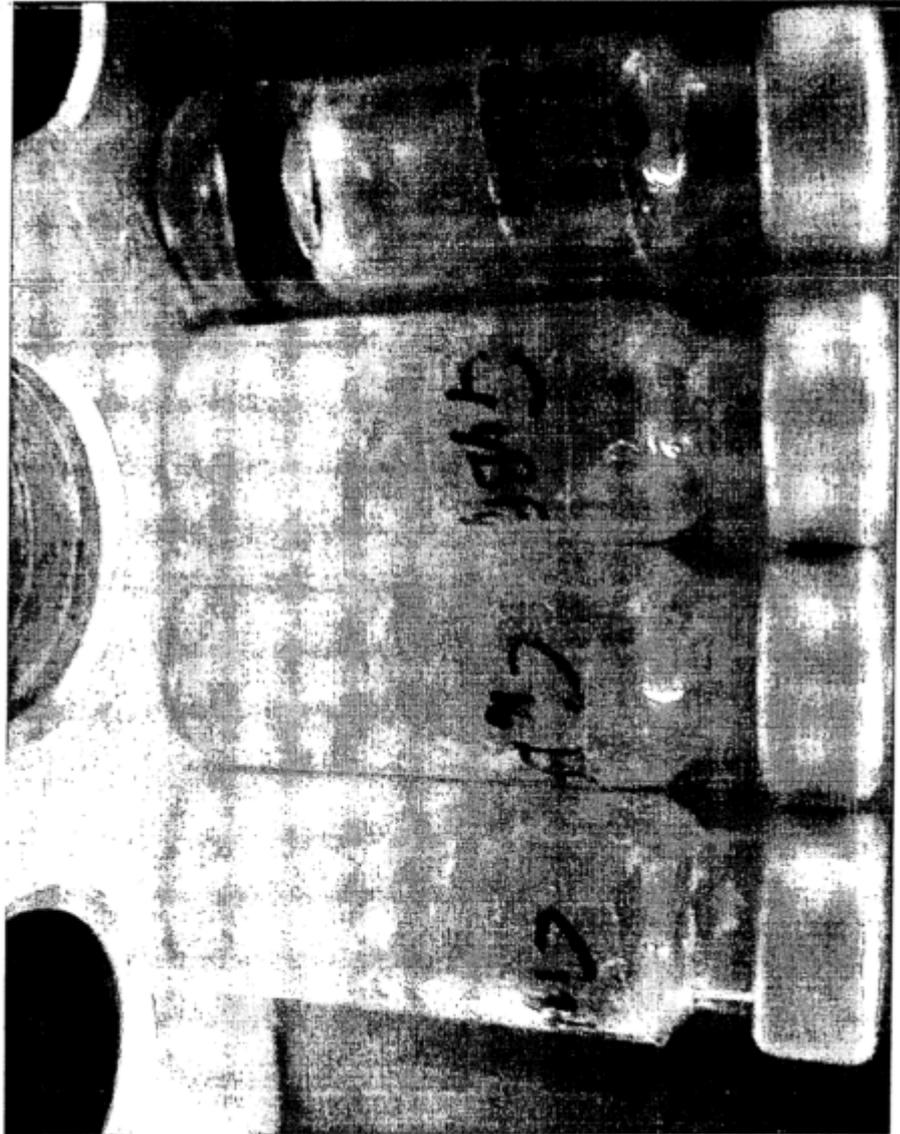


Figura 11



Figura 12

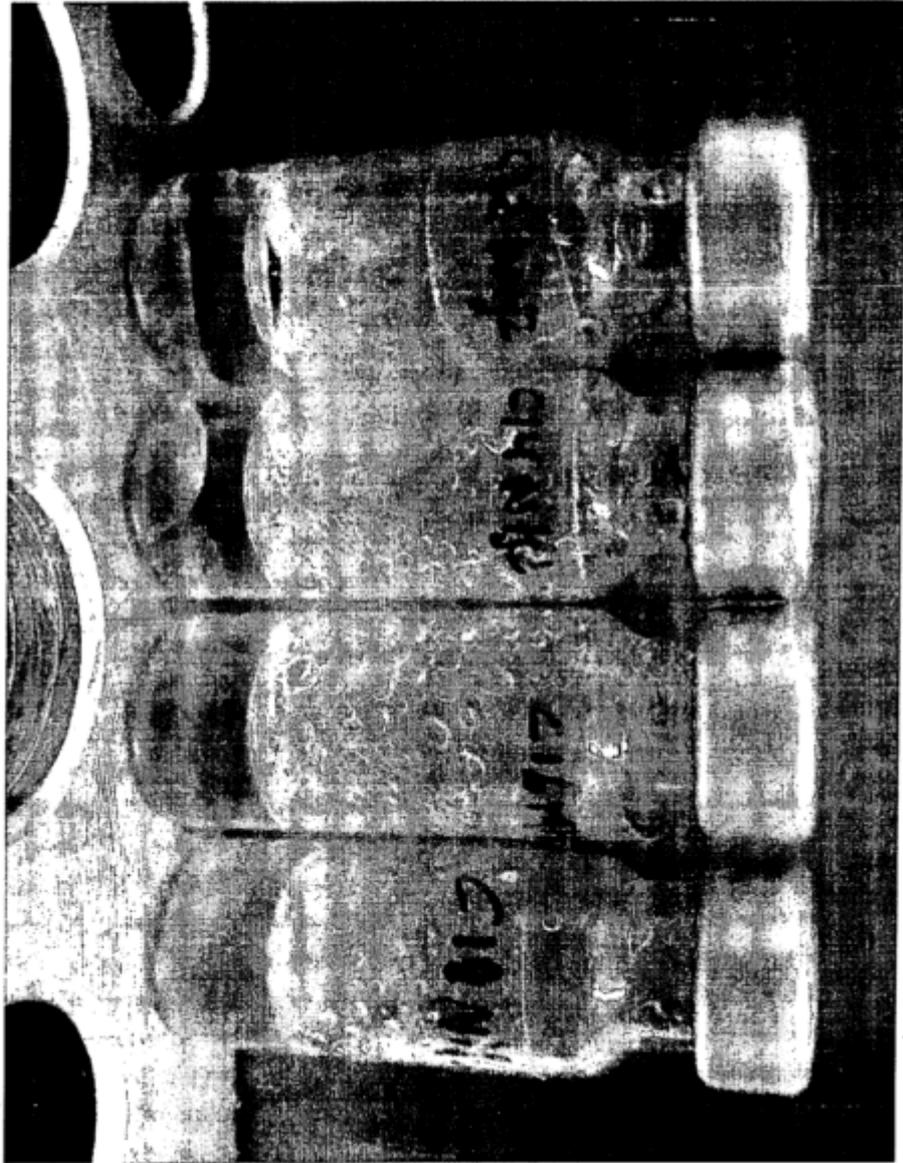


Figura 13



Figura 14



Figura 15



Figura 16

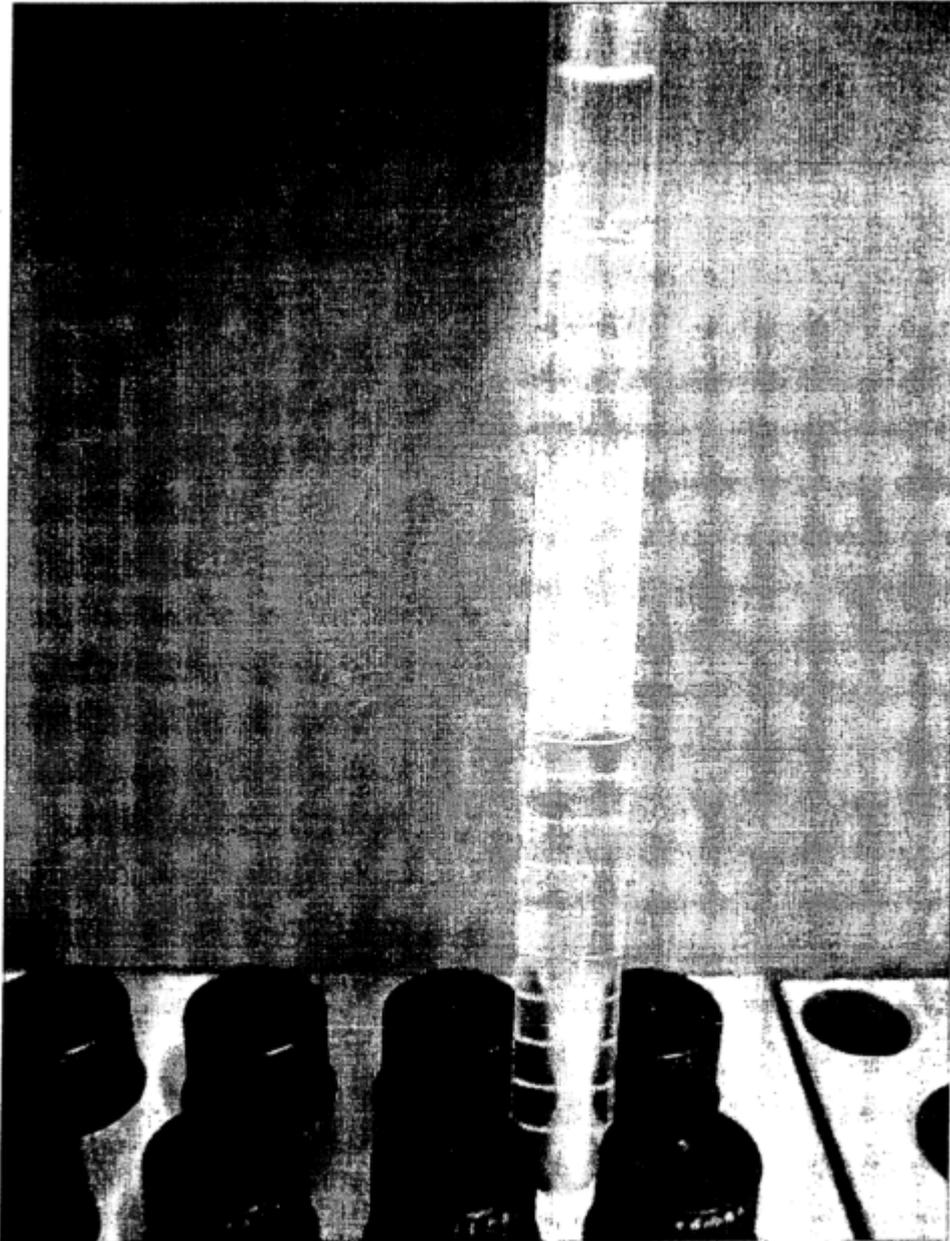


Figura 17

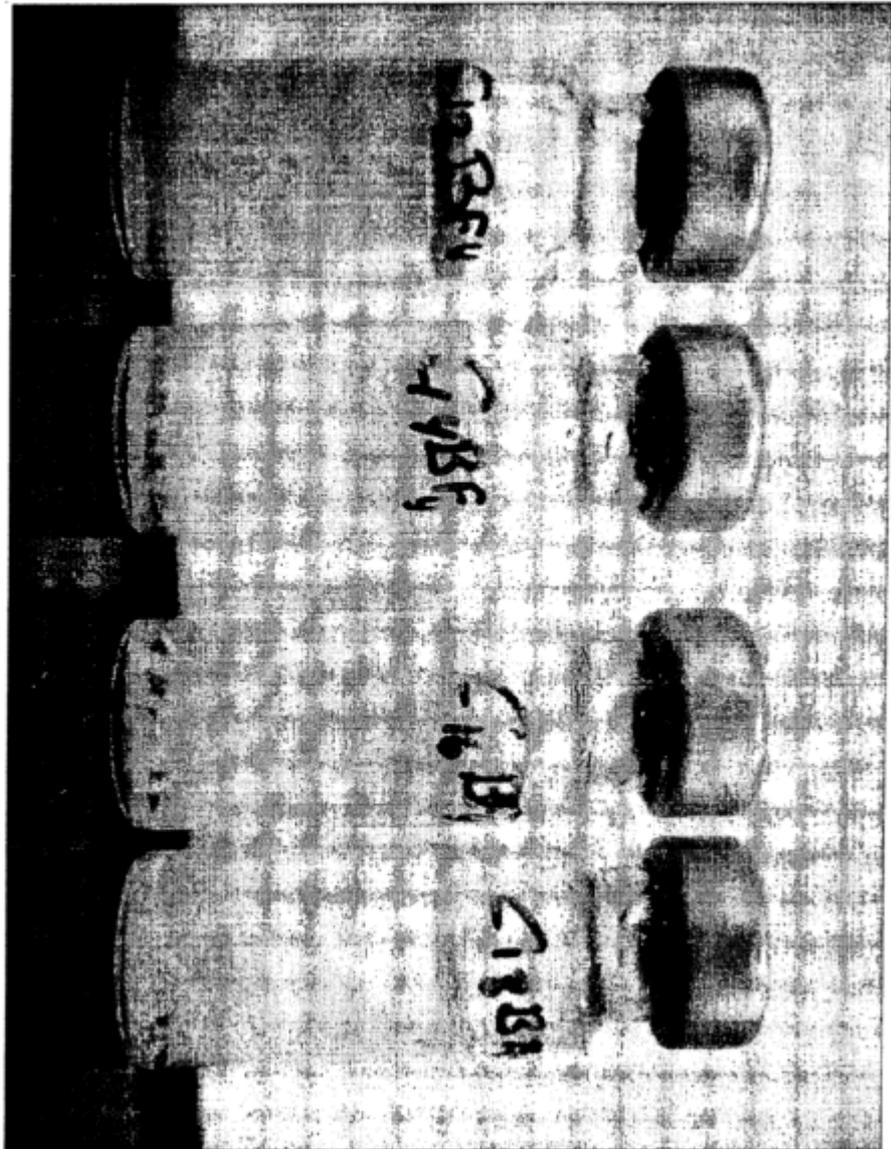


Figura 18

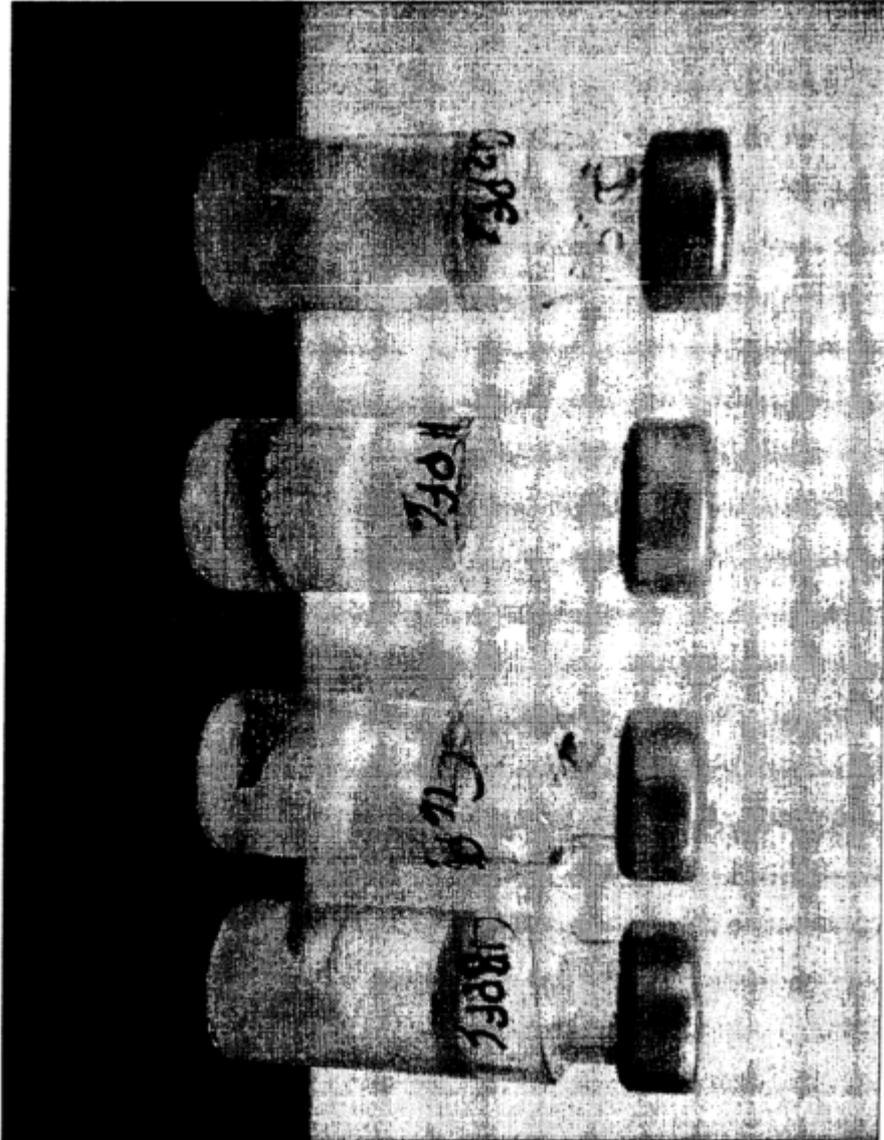


Figura 19

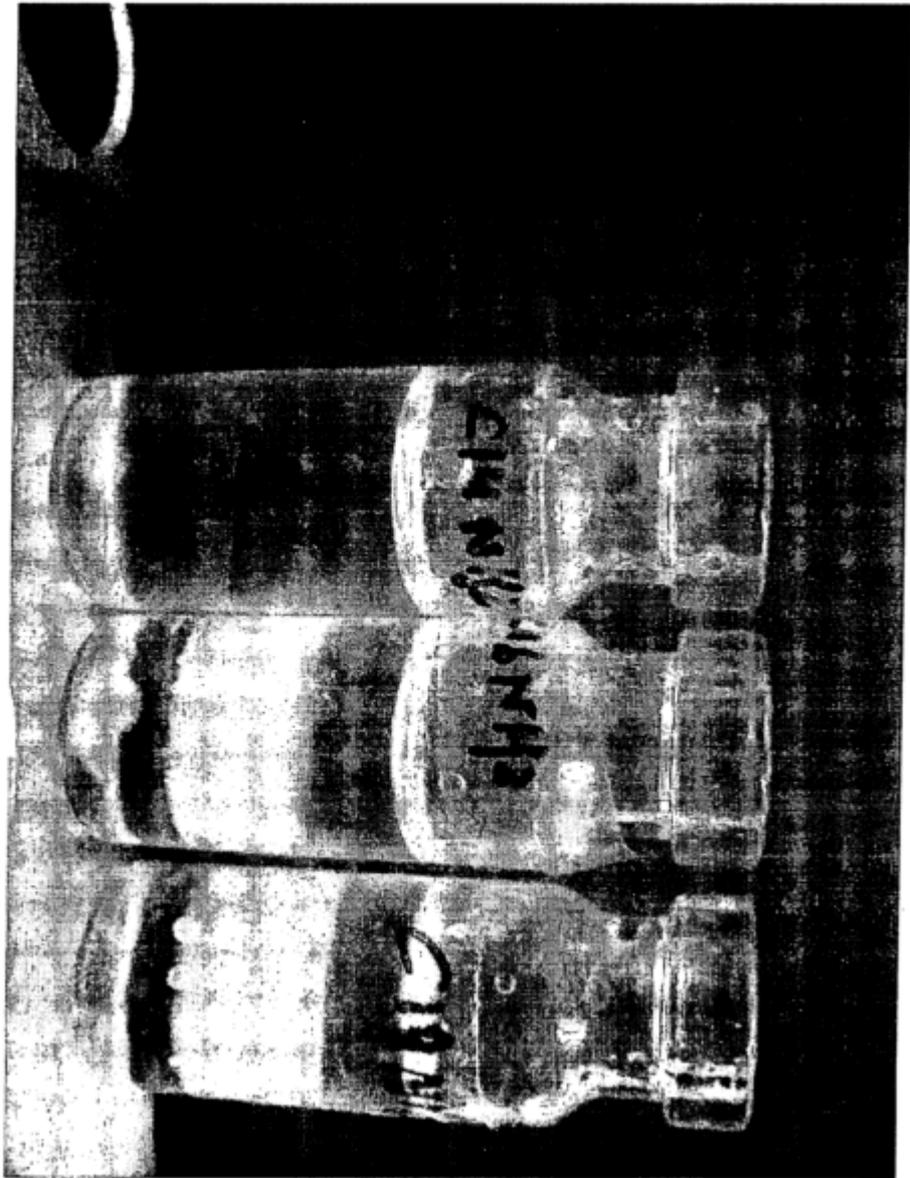


Figura 20