

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LAURA MIRANDA SANTOS

ESTUDO DA TOXICIDADE DE LÍQUIDOS IÔNICOS CARBOXILADOS FRENTE À
Artemia salina

FRANCISCO BELTRÃO

2021

LAURA MIRANDA SANTOS

ESTUDO DA TOXICIDADE DE LÍQUIDOS IÔNICOS CARBOXILADOS FRENTE À
Artemia salina

Toxicity study of task ionic liquids with carboxyl groups in the *Artemia salina*

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado para obtenção do título de Bacharel no
Curso de Graduação em Engenharia Química da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tania Maria Cassol
Coorientadora Prof^a. Dr^a. Elisângela Düsman
Coorientadora Prof^a. Dr^a. Michele Di Domenico

FRANCISCO BELTRÃO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

LAURA MIRANDA SANTOS

ESTUDO DA TOXICIDADE DE LÍQUIDOS IÔNICOS CARBOXILADOS FRENTE À
Artemia salina

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado para obtenção do título de Bacharel no
Curso de Graduação em Engenharia Química da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 02 de Dezembro/ 2021

Tania Maria Cassol
Doutorado em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Michele Di Domenico
Doutorado em Engenharia Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Elisângela Düsman
Doutorado em Biologia das Interações Orgânicas
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

“A folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

FRANCISCO BELTRÃO

2021

Dedico este trabalho ao meu avô, José de Miranda,
a quem agradeço por todos ensinamentos.
Saudade eterna.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família que me deu todo o suporte necessário durante essa jornada. Em especial a minha mãe, Regina Miranda, minha avó, Isarina Miranda e meu pai, Roberto Santos, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e guiando em toda trajetória acadêmica, principalmente nos momentos mais conturbados.

A todos os professores, amigos e colegas que me apoiaram e estiveram presente durante minha graduação contribuindo para a minha formação pessoal e profissional.

A minha orientadora professora Tania Maria Cassol, por aceitar o desafio, por me ensinar e ajudar em todos os momentos sendo paciente e acessível.

As minhas coorientadoras professoras Michele Di Domenico e Elisângela Düsman por sempre estarem dispostas a me auxiliar e me acompanhar durante essa etapa.

RESUMO

Líquidos iônicos (LIs) são sais orgânicos formados a partir da combinação de um cátion e um ânion que exibem características específicas únicas. Eles apresentam ponto de fusão menor que 100°C, boa condutividade iônica, pressão de vapor desprezível e alta estabilidade térmica. Como os LIs indicam um grande potencial para diversas aplicações industriais, eles vêm sendo cada vez mais estudados e inseridos em diversos tipos de processos, podendo atuar como solventes e catalisadores. Entretanto, como se tem uma variação de seus efeitos tóxicos, para que seu descarte e utilização em processos industriais não venha a causar danos, é necessário ter-se o conhecimento sobre sua toxicidade. Nesse trabalho foi realizada a produção dos líquidos iônicos brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) e brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico, e, foi realizada a avaliação da toxicidade de diferentes concentrações (3,1% a 100%) dos mesmos para o bioindicador microcrustáceo *Artemia salina*, pelo teste de imobilidade/mortalidade. A partir da síntese dos líquidos iônicos verificou-se o rendimento de produção de 87,0% para o brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) e 86,7% para o brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico. Após a realização dos bioensaios toxicológicos, concluiu-se que ambos os líquidos iônicos foram tóxicos para *A. salina*, resultando em uma taxa de mortalidade de 100% dos organismos teste em todas as concentrações testadas. Esta toxicidade pode ser devido ao baixo pH dos LIs na solução tratamento (variando de 3,0 a 6,0) e, por estes serem muito viscosos a temperatura ambiente, dificultando a locomoção dos náuplios. Assim, sugere-se que sejam realizados mais testes de toxicidade com estes LIs, com outros bioindicadores e biomarcadores.

Palavras-chave: líquidos iônicos; aplicações; toxicidade; bioindicador.

ABSTRACT

Ionic liquids (ILs) are organic salts formed from the combination of a cation and an anion that exhibit unique specific characteristics. They have a melting point of less than 100°C, good ionic conductivity, negligible vapor pressure and high thermal stability. As ILs indicate a great potential for several industrial applications, they have been increasingly studied and inserted in different types of processes, acting as solvents and catalysts. However, since there is a variation in their toxic effects, so that their disposal and use in industrial processes will not cause damage, it is necessary to know about their toxicity. In this work, acid bromide 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) e do acid bromide 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico ionic liquids were produced, and the toxicity of different concentrations (3.1% to 100%) was evaluated for the microcrustacean bioindicator *Artemia salina*, using the immobility/mortality test. From the synthesis of the ionic liquids, the production yield of 87.0% for acid bromide 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) and 86.7% for acid bromide 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico was verified. After performing the toxicological bioassays, it was concluded that both ionic liquids were toxic to *A. salina*, resulting in a mortality rate of 100% of the test organisms at all tested concentrations. This toxicity may be due to the low pH of the ILs in the treatment solution (ranging from 3.0 to 6.0) and because they are very viscous at room temperature, making locomotion difficult for the nauplii. Thus, it is suggested further toxicity tests with these ILs, with other bioindicators and biomarkers.

Keywords: ionic liquids; applications; toxicity; bioindicator.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais aplicações dos Líquidos iônicos	15
Figura 2 - Fluxograma para a síntese dos Líquidos iônicos	20
Figura 3 - Reação da síntese do material de partida	21
Figura 4 - Aparato experimental utilizado para a síntese do material de partida e dos Líquidos iônicos	21
Figura 5 - Rotaevaporador em funcionamento	22
Figura 6 – Equação da síntese do brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico)	23
Figura 7 - Equação da síntese do Brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico	24
Figura 8 - Indução da eclosão dos cistos na estufa BOD	25
Figura 9 - Placa de 24 poços preparadas para o teste de imobilidade/mortalidade com <i>A. salina</i>	26
Figura 10 - Náuplios de <i>Artemia salina</i>	26
Figura 11 - Material de partida	29
Figura 12 - Brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico)	30
Figura 13 - Brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico	31
Figura 14 - Taxa de mortalidade pelo ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> das diferentes concentrações dos controles salino (CS) e doce (CD), e dos líquidos iônicos brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) (LIS) e brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico (LIF)	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos líquidos iônicos	14
Tabela 2 – Número médio e desvio padrão dos organismos <i>Artemia salina</i> mortos/imóveis do controle salino, controle doce e dos líquidos iônicos brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) e brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico em cada concentração avaliada	32
Tabela 3 - pHs dos líquidos iônicos avaliados nas concentrações dos testes de imobilidade/mortalidade com <i>A. salina</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LIs	Líquidos iônicos
MP	Material de partida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
pH	Potencial Hidrogeniônico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho
TGA	Análise Termogravimétrica
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1	Líquidos iônicos	14
3.2	Química verde	16
3.3	Toxicidade dos líquidos iônicos	17
3.4	Teste de imobilidade/mortalidade com <i>Artemia salina</i>	19
4	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	20
4.1	Síntese dos líquidos iônicos	20
4.1.1	Síntese do material de partida	20
4.1.2	Síntese do brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico)	22
4.1.3	Síntese do brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico	23
4.1.4	Bioensaio toxicológico frente à <i>Artemia salina</i>	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Síntese do material de partida	28
5.2	Síntese do brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) e do brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico	29
5.3	Bioensaio toxicológico frente à <i>Artemia salina</i>	31
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Líquidos iônicos (LIs) são definidos como sais orgânicos com características físico-químicas específicas que resultam em uma grande facilidade de serem ajustáveis a diversos processos industriais e em áreas distintas como as áreas química e biotecnológica. Estes se diferenciam de outros sais conhecidos por terem seu ponto de ebulição menor que 100°C e por apresentarem uma baixa pressão de vapor, tornando possível sua utilização em um amplo intervalo de temperatura (GILMORE, 2011).

Segundo Silva (2004), os ânions utilizados nos LIs devem ser simétricos e sua carga negativa deve ser distribuída nos outros átomos ligados ao átomo central, para que não ocorra um acúmulo de cargas na superfície e suceda o desenvolvimento do cristal. Seu ponto de fusão é diretamente influenciado pelo tamanho e simetria das moléculas. Com o aumento do seu tamanho, ocorrerá uma diminuição no ponto de fusão, e, combinado à assimetria do cátion, isso irá resultar em uma boa distribuição das cargas com baixa atração dos íons, limitando a interação intermolecular do cristal.

Geralmente, os LIs apresentam densidade superior a um, porém, podem ocorrer variações de acordo com a combinação do cátion e ânion. O mesmo ocorre com a viscosidade, que pode ser elevada quando os líquidos iônicos estão em temperatura ambiente. Estes podem ser ácidos ou básicos, dependendo da natureza do ânion (SILVA, 2004).

Atualmente, os LIs estão sendo muito estudados por apresentarem diversas aplicações em novas possibilidades de mercado, por serem facilmente ajustáveis apresentando as características desejadas a partir de sua síntese e também por realizarem diversos tipos de interações intermoleculares ocasionando uma ótima dissolução (HEJAZIFAR *et al.*, 2020).

Uma das novas aplicações dos LIs está no desenvolvimento de potenciais fármacos em diferentes âmbitos patológicos (FERRAZ, 2011). Este campo vem sendo inserido na chamada “química verde”, onde visa-se diminuir ou eliminar a presença de substâncias tóxicas e perigosas, tanto para o meio ambiente como para o manuseio. Então, para conter o uso de substâncias convencionais, opta-se

hoje por alternativas com a substituição da utilização de solventes por LIs onde consegue-se um rendimento equivalente e, também, possui como alternativa a reciclagem do mesmo (SILVEIRA, 2015).

Com esse aperfeiçoamento e utilizações dos LIs em processos industriais, sabe-se que, ambientalmente falando, esses processos podem ser falhos, pois o foco é normalmente voltado para maior eficiência e alta produtividade. Por mais que os LIs sejam considerados “verdes”, podem apresentar uma alta porcentagem tóxica, gerando diversas preocupações relacionadas ao seu descarte. Então, é necessário que se tenha conhecimento da toxicidade dos LIs, a fim de se implementar métodos adequados nos tratamentos desses resíduos, para que os componentes tóxicos presentes não contaminem o meio ambiente (AMBRÓSIO *et al.*, 2021), sendo necessário então a realização de estudos relacionados a biodegradabilidade, ecotoxicidade e citotoxicidade dos LIs, normalmente realizados a partir de bactérias, crustáceos e plantas, frizando suas interações com as diversas aplicações possíveis (SILVA, 2020).

Diante do aumento da necessidade de busca por soluções que visam causar o menor impacto ambiental possível, esse trabalho tem como objetivo central sintetizar Líquidos iônicos e avaliar sua toxicidade frente ao bioindicador *Artemia salina* a fim de analisar seu potencial de uso.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar líquidos iônicos carboxilados e estudar as suas propriedades toxicológicas frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, visando avaliar suas aplicações.

2.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos são citados:

- Sintetizar líquidos iônicos carboxilados a partir dos anidridos succínico e ftálico;
- Realizar bioensaios toxicológicos dos líquidos iônicos utilizando o teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*;
- Avaliar o potencial tóxico e possíveis impactos ambientais gerados pela aplicação dos líquidos iônicos estudados.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O presente tópico irá abordar em suas seções os líquidos iônicos, química verde, toxicidade dos líquidos iônicos e teste de imobilidade/mortalidade com *Artemia salina*.

3.1 Líquidos iônicos

Líquidos iônicos (LIs) são um agrupamento de íons positivos e negativos que podem ou não ser absorvidos facilmente na água. Eles apresentam diversas características que os permitem serem usados como solventes de limpeza apropriados em diversos processos como: catalíticos, de separação e fotoquímica. Suas principais características são: baixa volatilidade, caráter não-inflamável, alta estabilidade térmica e alta capacidade de hidratação. Esses líquidos podem chegar a uma temperatura de 300°C sem decomposição, possibilitando então o controle da reação cinética e uma grande facilidade de separação de moléculas orgânicas por destilação, sem que ocorra uma perda do LI (OLIVEIRA et al., 2010).

Quando se faz a alteração do ânion ou do comprimento da cadeia, ocorre a alteração de diversas propriedades físico-químicas como a viscosidade, a hidrofobicidade, a densidade e o poder de dissolução em outra substância polar sem que ocorra uma reação, oportunizando diversas possibilidades para adaptação, tornando-o muito adaptável (ÁLVAREZ, 2018). Na Tabela 1 são apresentadas algumas propriedades dos LIs.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos líquidos iônicos

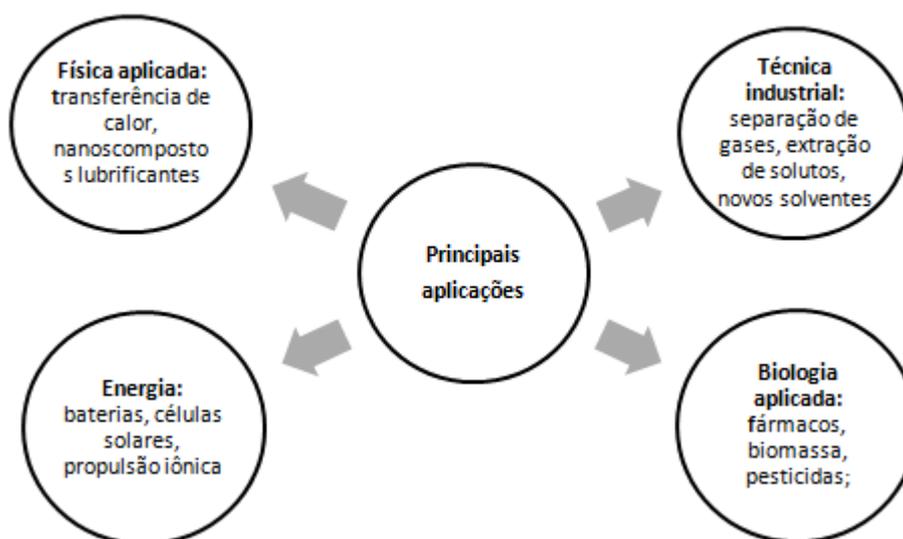
Propriedade físico-química	Líquido iônico
Condutividade	Boa condutividade iônica comparado a outros solventes orgânicos ou eletrolíticos.
Viscosidade	Determinada por forças de Van der Waals, normalmente mais viscoso que solventes comuns.
Densidade	Mais denso que a água
Ponto de fusão	<100°C
Solubilidade	Pode ser solúvel ou insolúvel, dependendo do ânion presente e da estrutura do cátion
Estabilidade térmica	Altamente estável
Estabilidade química	Estáveis

Fonte: Adaptado de Gilmore (2011)

Devido as características específicas dos LIs, eles podem ser empregados em várias áreas científicas, como a química analítica, engenharia química, biotecnologia e produção de fármacos. Podem ser utilizados como solventes, como lubrificantes, eletrólitos, em baterias e células solares. Na área biotecnológica e bioquímica, estes vêm sendo utilizados em processos de purificação de proteínas e isolamento de ácidos nucleicos para dissolução de biomateriais (GALAMBA, 2020). Pode-se observar outras aplicações dos líquidos iônicos na Figura 1.

Apesar da alta aplicabilidade de líquidos iônicos em fármacos, normalmente relacionados a síntese de ingredientes farmacêuticos ativos, poucos estudos foram publicados sobre sua utilização em cosméticos, mesmo que muitos líquidos iônicos tenham apresentado atividade antimicrobiana (DOBLER *et al.*, 2015).

Figura 1 – Principais aplicações dos líquidos iônicos



Fonte: Adaptado de Álvarez (2018)

Outro ponto importante a ser destacado sobre os líquidos iônicos é que, assim como enzimas microbianas, eles podem também ser utilizados como catalisadores. Estudos mostram resultados promissores em sua utilização em reações catalíticas apresentando altos rendimentos e boa conversão (ORLANDELLI, 2012; GILMORE, 2011).

Segundo Bubalo *et al.* (2017), cerca de dois terços de todas as emissões industriais são causadas por solventes orgânicos voláteis, causando diversos

efeitos no meio ambiente como mudanças climáticas e poluição atmosférica. Portanto, busca-se novos solventes que sejam inofensivos e ecológicos.

Os LIs estão cada vez mais presentes e evidenciados nas áreas científicas devido as suas diversas aplicações e capacidade de aperfeiçoar processos no ponto de vista econômico e ecológico. Como tem-se cada vez mais uma maior preocupação com problemas ambientais que solventes orgânicos possam vir a causar, além de problemas relacionados à saúde, uma alternativa para esse problema é trocar o uso desses solventes orgânicos comuns pelo uso de LIs (MATOS, 2007).

Muitas particularidades dos Líquidos iônicos vem sendo investigadas, visto que seu uso vem ganhando cada vez mais força devido suas propriedades notáveis. A toxicidade, é uma dessas características, por estudos revelarem que, por mais que a maioria dos LIs apresentem baixa toxicidade, alguns, ainda mostram uma alta porcentagem tóxica, gerando diversas preocupações relacionadas ao seu descarte e impactos ambientais que podem vir a causar (BUBALO et al., 2017; AMBRÓSIO et al., 2021).

3.2 Química verde

Os líquidos iônicos aplicados como solventes em reações químicas podem ser recuperáveis por alguns métodos, pois o produto da reação é solúvel e o LI não, então ocorre a separação do produto obtido com o meio reacional (MATOS, 2007). A biodegradação do líquido iônico não é desejada pois, caso ela ocorra, não há como realizar sua recuperação para posterior reutilização (QUIJANO *et al.*, 2010).

Por serem recuperáveis e ecologicamente viáveis, esses líquidos são classificados como “verdes”. A química verde tem como objetivo de reduzir ou eliminar o uso substâncias perigosas e nocivas, tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente, sendo uma atitude eficiente contra o aumento da poluição que apresenta soluções científicas para alguns dos problemas enfrentados pela humanidade (ÁLVAREZ, 2018). Outros fatores que os “tornam verdes” são suas propriedades de não inflamabilidade e volatilidade inexistente. A pressão de vapor nula também colabora para que não ocorra toxicidade por inalação, embora que

ainda exista a possibilidade enquanto ocorre a destilação de alguns líquidos iônicos (BYSTRZANOWSKA et al., 2019).

Chamada também de química sustentável, a química verde foi desenvolvida nos anos 90 com o intuito de proteger o meio ambiente e a saúde da população (FORTE, 2013). Ela segue princípios onde além de prevenção de resíduos poluentes, utilização de produtos não tóxicos e seguros, e de substâncias renováveis, trabalha para a melhoria do processo buscando uma eficiência energética, utilizando menos energia possível, preferivelmente realizando as sínteses em temperatura e pressão ambiente (ANASTAS, 2010).

Além dos impactos ambientais, a utilização de seus princípios influencia a economia de forma direta. Com a diminuição de poluentes descartados no meio ambiente, ocorre também uma diminuição significativa de gastos relativos a tratamentos de resíduos e descontaminações (SILVEIRA, 2015).

Contudo, não se pode afirmar que todos os líquidos iônicos são totalmente limpos de agentes tóxicos, e, para isso, é necessário empregar alguns métodos que estimem a toxicidade desses líquidos e garantam que não haverá efeitos tóxicos em bactérias, plantas, invertebrados, peixes e humanos, como já relatados em estudos anteriormente, a partir de seu descarte (ZHAO et al., 2007).

3.3 Toxicidade dos líquidos iônicos

A partir da química verde tem-se o conhecimento da baixa toxicidade dos Lis com os organismos vivos (GANSKE et al., 2006). Sabe-se também que, dependendo do organismo escolhido, após aplicados à líquidos iônicos, estes irão apresentar diferentes comportamentos pois, cada organismo possui propriedades específicas (SANTOS, 2013). Assim, por exemplo, adequando Lis a micro-organismos específicos, pode-se evitar a toxicidade microbiana, sendo então, uma alternativa para de aplicação na biotecnologia (QUIJANO et al., 2010).

Pode-se determinar a toxicidade através da inibição do crescimento celular, pela viabilidade celular ou pela inibição do metabolismo, sendo ele avaliado pela absorção do substrato ou por meio da formação do produto (QUIJANO et al., 2010).

As diferentes possibilidades de combinações de cátions e ânions causam uma grande variação no comprimento das estruturas dos líquidos iônicos gerando qualidades específicas como viscosidade, densidade, solubilidade e até mesmo características toxicológicas (FERREIRA, 2015).

Outro fator diretamente relacionado a toxicidade dos líquidos iônicos é o rompimento da membrana celular. A parte catiônica da cadeia aumenta o caráter lipofílico da molécula, ou seja, a capacidade de interagir com a camada fosfolipídica presente na membrana celular e a hidrofobicidade para com as proteínas aumenta, conseqüentemente, as interações causam vazamento do conteúdo celular levando a morte. Com o aumento do transporte de uma substância através da membrana, ocorre o aumento da sua concentração na célula, desencadeando efeitos tóxicos excessivos (BUBALO *et al.*, 2017).

Os LIs com caráter tóxico são divididos em grupos aromáticos e não aromáticos e neles apresentam diferentes dependências de toxicidade com a solubilidade em água. Normalmente, têm-se o aumento da hidrofobicidade diretamente ligado ao aumento da toxicidade (LIMA, 2014).

Mesmo que o uso de líquidos iônicos não cause diretamente poluição atmosférica, estes podem apresentar uma pequena parte tóxica, já que são solúveis em água (MONTALBÁNUMA *et al.*, 2018). Inevitavelmente, por serem solúveis, acabam sendo lançados ao meio ambiente após seu uso, sendo assim, a água ou o solo que houve descarte do líquido iônico apresentará poluentes persistentes, oferecendo riscos ambientais (ZHAO *et al.*, 2007).

Uma vez que esses componentes tóxicos presentes nos líquidos iônicos adentram no corpo humano ou animal, podem interagir com enzimas afetando suas atividades e causando alterações patológicas (BUBALO *et al.*, 2017).

Alguns estudos já tentaram prever a toxicidade de LIs na água através de modelos matemáticos que levam em conta o tamanho da cadeia alquílica, o ânion e o núcleo do cátion. No entanto, o modelo utilizado não era adequado para ser aplicado em estruturas complexas, pois, ainda era necessário informações específicas experimentais para incorporação na base de dados (MONTALBÁNUMA *et al.*, 2018).

Assim, é de extrema importância que se faça a distinção de líquidos iônicos tóxicos dos não tóxicos ao meio ambiente, visto que essas propriedades

auxiliariam na produção de líquidos iônicos sem propriedades toxicológicas sendo benéficos ao planeta (SAKAMOTO *et al.*, 2018).

3.4 Teste de imobilidade/mortalidade com *Artemia salina*

Os testes de toxicidade têm como objetivo estudar e quantificar os efeitos que uma substância pode causar em organismos vivos, desta forma, o teste possibilita ações preventivas de danos ou normas que restrinjam o lançamento de poluentes/substâncias no meio ambiente (MAIA *et al.*, 2018).

Estudos relacionados a análises toxicológicas normalmente são realizados utilizando crustáceos na tentativa de compreender os possíveis efeitos destrutivos de alguma substância. Esses crustáceos são considerados biomarcadores sensíveis para avaliação de possíveis efeitos tóxicos (AN *et al.*, 2019). Vários trabalhos já publicados tentam correlacionar a toxicidade sobre a *Artemia salina* com atividades antifúngicas, parasitocidas e antimicrobianas (GARCEZ *et al.*, 2018).

Os biomarcadores apresentam características passíveis de avaliação que indicam uma resposta ao sistema que é exposta, elas devem apresentar alta sensibilidade e exibir os efeitos desde o início. Deve-se também estabelecer uma relação bem definida entre as concentrações do produto estudado em relação ao biomarcador (VALENTE *et al.*, 2017).

A *A. salina* é um artrópode aquático invertebrado, encontrado em águas salgadas, normalmente em lagos. Suas larvas são utilizadas como organismo modelo em testes preliminares onde se visa determinar a toxicidade de algum produto por meio de bioensaios. Os efeitos de toxicidade podem variar de acordo com as condições do teste e da morfologia do organismo escolhido. Essa diferença ocorre devido a sensibilidade específica do organismo (SAKAMOTO *et al.*, 2018).

Como a *A. salina* é um organismo muito sensível a muitos produtos químicos e apresenta uma baixa tolerância a alterações ambientais, torna-se viável sua utilização para testes de toxicidade de solventes orgânicos usualmente empregados (GOUVEIA *et al.*, 2012).

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

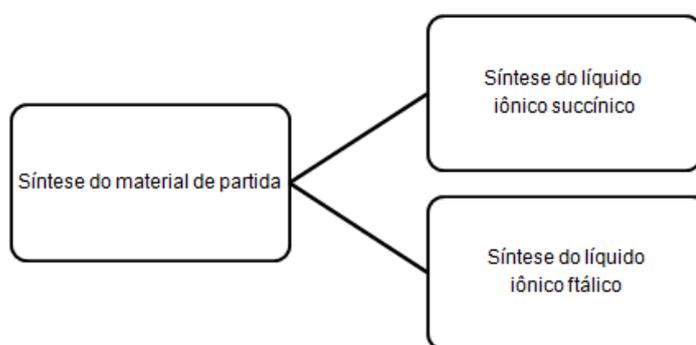
4.1 Síntese dos líquidos iônicos

Os líquidos iônicos escolhidos são inéditos e bem funcionalizados com grupos carboxilas, necessitando avaliações de toxicidade.

Para a síntese dos líquidos iônicos carboxilados foi utilizado o método experimental desenvolvido por Ramos et al. (2018). Foram sintetizados dois tipos de LIs, sendo eles o brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico e o brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico. Os dados foram obtidos a temperatura e pressão ambiente, 25°C e 1,0 atm.

A síntese foi realizada em duas etapas conforme apresentado na Figura 2.

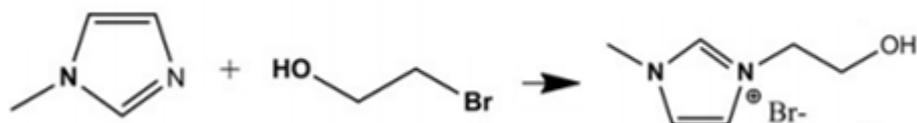
Figura 2 - Fluxograma para a síntese dos líquidos iônicos



Fonte: Autoria própria (2021)

4.1.1 Síntese do material de partida

Para a síntese do material de partida (MP) fez-se a combinação de 4,105 g de Metilimidazol (50 mmol) junto a 3,54 mL de 2-Bromoetanol (50 mmol) em um balão volumétrico de 50 mL. A reação é apresentada na equação da Figura 3.

Figura 3 - Reação da síntese do material de partida

Fonte: Autoria própria (2021)

A reação foi realizada em torno de 60-70°C, e, para isso, utilizou-se um aquecedor, banho de óleo mineral e agitação magnética durante todo processo. Montou-se então o esquema apresentado na Figura 4, onde a reação ocorreu durante 12 h aproximadamente (*overnight*).

Figura 4 - Aparato experimental utilizado para a síntese do material de partida e dos líquidos iônicos

Fonte: Autoria própria (2021)

Após esse tempo, o balão foi retirado e colocado em banho de gelo para que resfriasse e cristalizasse. Depois de cristalizado, o material foi lavado com acetato de etila, para que fosse retirada quaisquer impurezas presentes, agitado por 2 min, deixado decantar e retirado o solvente. Essa etapa de lavagem foi

repetida 3 vezes. Para a remoção do solvente restante, o MP foi levado ao rotaevaporador (Figura 5) durante 15 min com aquecimento de 60°C.

Figura 5 - Rotaevaporador em funcionamento



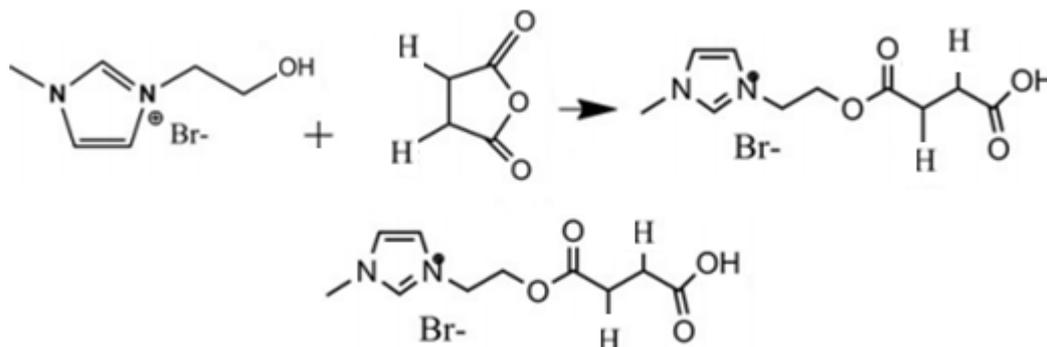
Fonte: Autoria própria (2021)

4.1.2 Síntese do brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico)

Para a síntese do brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico), foram colocados 4,70 g de anidrido succínico, 9,7370 g do MP, 20 mL de acetonitrila e 0,2870 g de DMAP (catalisador 4-dimetilaminopiridina) em um balão de fundo redondo de 100 mL, para a produção de 25 mmol. Um aparato idêntico à Figura 4 foi montado para sua síntese, onde permaneceu reagindo em torno de 12 h, a uma temperatura de 70°C. A equação de sua síntese é apresentada na Figura 6.

Ao final desse período, o balão foi retirado e colocado no rotaevaporador durante 30 min com uma temperatura de 50°C, para retirar a acetonitrila. Fez-se então a lavagem do produto com o solvente acetato de etila para a retirada de possíveis impurezas.

Figura 6 – Equação da síntese do brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico)



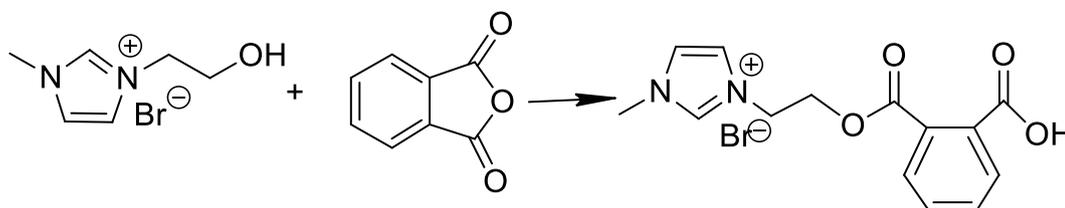
Fonte: Autoria própria (2021)

O brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) presente no balão de fundo redondo foi tampado com uma rolha de borracha para que não houvesse danos ao material e armazenado para posterior utilização nos testes de toxicidade. O processo de sua síntese foi realizado duas vezes e seu pH foi medido.

4.1.3 Síntese do brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico

Para a síntese do Brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico, foram utilizados 9,5390 g do MP e 6,83 g do anidrido ftálico, com 10 mL de acetonitrila, a fim de se produzir 25 mmol. Foi utilizado o mesmo esquema apresentado na Figura 4 para que ocorresse a reação. Após 12 h de reação, também realizada a temperatura de 70°C, introduziu-se o balão no rotaevaporador para retirada da acetonitrila e, após esse processo foi realizada a lavagem com acetato de etila para se obter um líquido iônico livre de impurezas. Seu pH foi medido e o balão também foi selado e armazenado. Sua equação de reação é apresentada na Figura 7.

Figura 7 - Equação da síntese do Brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico



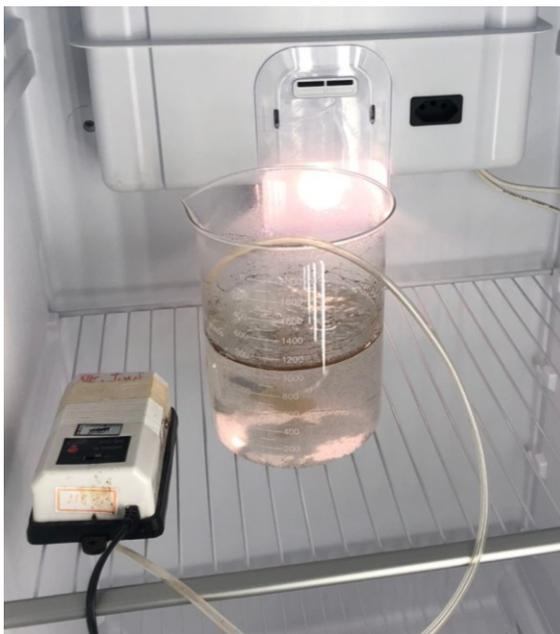
Fonte: Autoria própria (2021)

4.1.4 Bioensaio toxicológico frente à *Artemia salina*

O teste de imobilidade/mortalidade com a *A. salina* foi realizado para determinar se os líquidos iônicos apresentavam toxicidade. Para esse processo, foi utilizada a metodologia proposta por Guerra (2001), com modificações baseadas na ABNT NBR 13373 (2010).

Inicialmente, foi induzida a eclosão dos cistos do microcrustáceo em uma solução de sal marinho sintético (30 g L^{-1}), com aeração constante, luminosidade e temperatura controladas (25°C). Para manter essas condições específicas no processo, foi utilizada uma estufa incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) da marca Solab e modelo SL 225/364 (Figura 8), onde os cistos permaneceram aproximadamente 48 h, até sua eclosão.

Figura 8 - Indução da eclosão dos cistos na estufa BOD



Fonte: Autoria própria (2021)

Após a eclosão dos cistos, 10 náuplios foram introduzidos em cada poço de placas de cultivo de 24 poços (Figura 9), juntamente a 2,0 mL de cada líquido iônico, diluído em solução salina (30 g de sal marinho para cada litro de água destilada), nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,2% e 3,1%.

Foram realizados dois controles negativos. O controle doce foi realizado com as mesmas seis concentrações distintas apresentadas anteriormente, sendo realizada a diluição da água destilada em solução salina junto a 10 náuplios e, o controle salino foi realizado com a solução salina diluída também nas mesmas seis concentrações e com 10 náuplios (Figura 10).

Figura 9 - Placa de 24 poços preparadas para o teste de imobilidade/mortalidade com *A. salina*



Fonte: Autoria própria (2021)

Figura 10 - Náuplios de *Artemia salina*



Nota: Aumento de 20 vezes em lupa estereomicroscópica binocular.

Fonte: Autoria própria (2021)

Após 24 h de incubação, foi feita a contagem do número de indivíduos mortos, realizada a olho nú, considerando aqueles que permaneceram imóveis durante 20 s de observação. A estatística dos dados foi feita por análise de normalidade (Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e Ryan-Joiner) e variância (Levene), pelo programa Action Stat. Como os resultados não apresentaram normalidade e nem homoscedasticidade foi aplicado o teste de Seguimento de teste de comparação de médias adequado de Kruskal-Wallis, ($\alpha=0,05$; $n=4$).

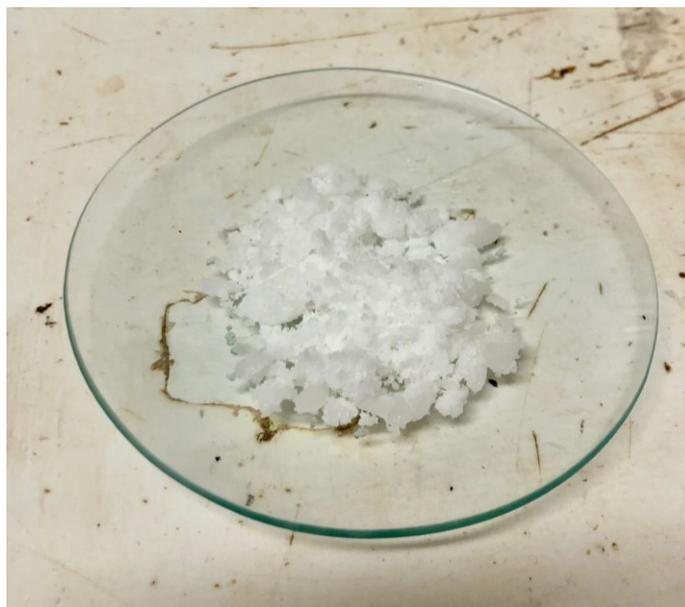
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese do material de partida

A partir das reações realizadas para a formação do material de partida (MP), percebeu-se que, quando sua temperatura de reação atingiu 70°C, ocorreu uma mudança da coloração para uma cor terrosa, quando o esperado era branco. Como previsto, ocorreu sua cristalização, porém, após a lavagem com acetato de etila para a retirada de impurezas seguida da passagem pelo rotaevaporador, não houve a formação de um sal, mas sim de um líquido escuro composto por duas fases. De acordo com Ramos *et al.* (2018), para a síntese dos líquidos iônicos carboxilados estes não devem apresentar coloração, devendo ser translúcidos e viscosos. Fez-se algumas tentativas para sua recuperação a partir de outros solventes a fim de se dissolver esse composto, todas sem sucesso.

Assim, optou-se pelo ajuste da temperatura para 55°C, onde a reação transcorreu da forma esperada. Após ser colocado no rotaevaporador, obteve-se 9,737 g de um sólido branco, como mostra a Figura 11. Esse processo foi realizado quatro vezes a fim de ser utilizado na próxima etapa da síntese para se obter 20 mL de cada líquido iônico. O MP apresentou um rendimento médio de 96,4%. Esse rendimento foi calculado a partir da massa molar do composto formado (206,9 g) e da massa obtida e pesada após a obtenção do MP (9,973 g).

Figura 11 - Material de partida

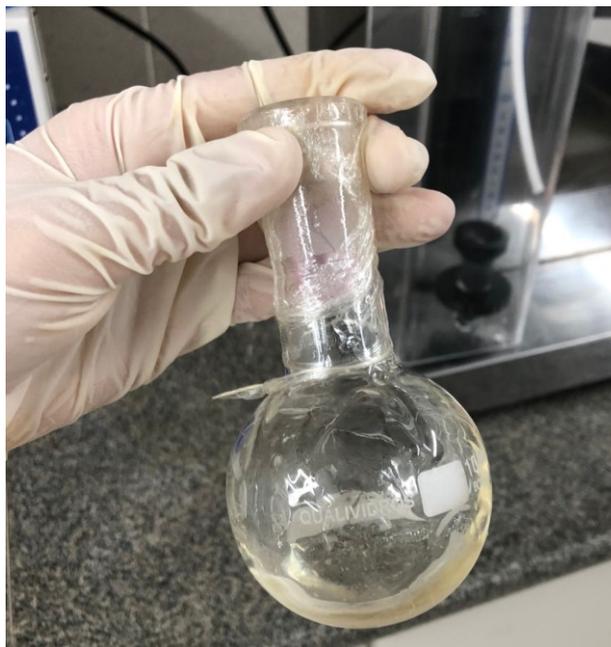


Fonte: Autoria própria (2021)

5.2 Síntese do brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) e do brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico

A partir do processo de síntese do material de partida, obteve-se o líquido iônico brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) com aspecto altamente viscoso e de difícil manuseio como pode-se observar na Figura 12. Esta reação apresentou um rendimento de 87,0%. Este resultado corrobora com o indicado por Ramos *et al.* (2018), que observa que é possível obter um rendimento entre 75 e 98% para este líquido iônico com a metodologia utilizada no presente estudo.

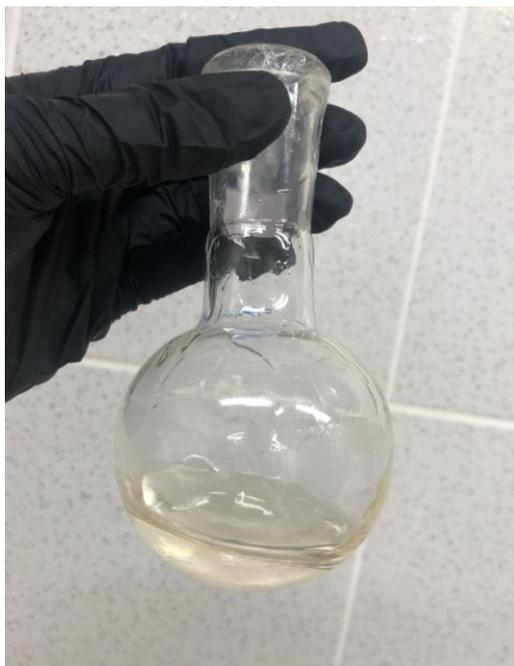
Figura 12 - Brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico)



Fonte: Aatoria própria (2021)

Após a síntese do brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico também obteve-se um LI viscoso e incolor (Figura 13), aparentemente mais puro quando comparado a coloração do LI brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico).

Figura 13 - Brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico



Fonte: Autoria própria (2021)

Na tentativa da utilização de menos compostos para a síntese, optou-se por não utilizar catalisador durante seu processo. A sua função do catalisador é aumentar a velocidade da reação química (até atingir seu equilíbrio), e, provavelmente, auxiliar na clivagem do anel do anidrido. Mesmo na ausência do catalisador, após aproximadamente 12 h, a reação já havia ocorrido de forma satisfatória e não utilizá-lo não acarretou nenhum dano ao processo. Logo, a qualidade deste líquido iônico não foi alterada ao compará-lo com o brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) sintetizado anteriormente, que apresentou um rendimento similar. O Brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico sintetizado apresentou um rendimento de 86,7%, também dentro do estabelecido por Ramos *et al.* (2018).

5.3 Bioensaio toxicológico frente à *Artemia salina*

Os resultados do teste de imobilidade/mortalidade utilizando o microcrustáceo *A. salina* (Tabela 2) mostram que as amostras dos dois LIs

(brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) e brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico) apresentaram efeito tóxico ao organismo teste, em todas as concentrações avaliadas (3,1% à 100%), sendo estatisticamente diferente do controle doce e salino. Inclusive, todas as concentrações dos dois LIs avaliados resultaram em taxa de mortalidade de 100% dos organismos teste (Figura 14).

Tabela 2 – Número médio e desvio padrão dos organismos *Artemia salina* mortos/imóveis do controle salino, controle doce e dos líquidos iônicos brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico) e brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico em cada concentração avaliada

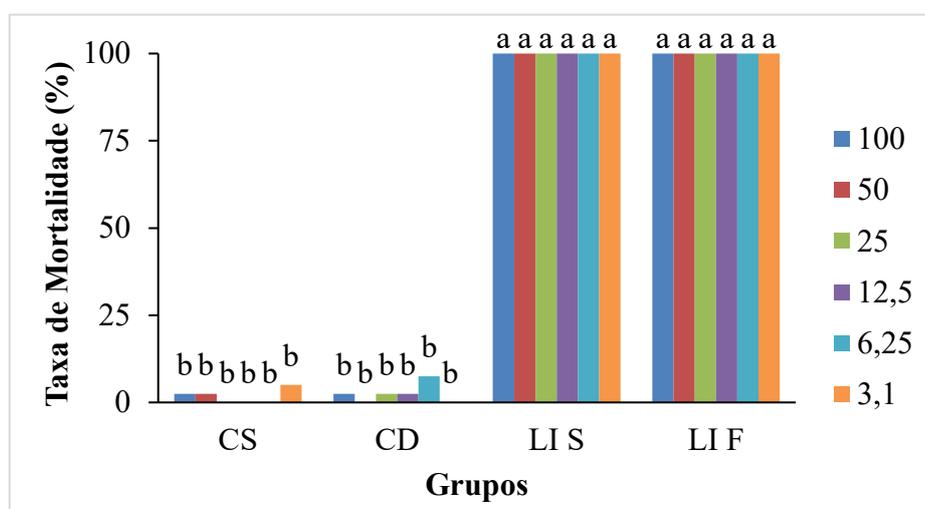
Grupos	Concentrações	Média ± DP
Controle Salino	100%	2,5 ± 5,0b
	50%	2,5 ± 5,0b
	25%	0,0 ± 0,0b
	12,5%	0,0 ± 0,0b
	6,2%	0,0 ± 0,0b
	3,1%	5,0 ± 10,0b
Controle Doce	100%	2,5 ± 5,0b
	50%	0,0 ± 0,0b
	25%	2,5 ± 5,0b
	12,5%	2,5 ± 5,0b
	6,2%	7,5 ± 9,57b
	3,1%	0,0 ± 0,0b
Brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletoxi-4-oxobutanóico)	100%	100,0 ± 0,0a
	50%	100,0 ± 0,0a
	25%	100,0 ± 0,0a
	12,5%	100,0 ± 0,0a
	6,2%	100,0 ± 0,0a
	3,1%	100,0 ± 0,0a

Brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico	100%	100,0 ± 0,0a
	50%	100,0 ± 0,0a
	25%	100,0 ± 0,0a
	12,5%	100,0 ± 0,0a
	6,2%	100,0 ± 0,0a
	3,1%	100,0 ± 0,0a

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si na comparação entre as respectivas concentrações dos diferentes grupos controles e tratados, pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Fonte: A autoria própria (2021)

Figura 14 - Taxa de mortalidade pelo ensaio de toxicidade com *Artemia salina* das diferentes concentrações dos controles salino (CS) e doce (CD), e dos líquidos iônicos brometo de ácido 2-(3-metilimidazolio-1-iletoxi-4-oxobutanóico) (LIS) e brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolio-1-il)etoxi)carboil)benzoico (LIF)



Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si na comparação entre as respectivas concentrações dos diferentes grupos controles e tratados, pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Fonte: A autoria própria (2021)

O pH ideal para eclosão e desenvolvimento dos náuplios de *A. salina* de acordo com suas condições fisiológicas é em torno de 7,8 à 8,2, onde consegue-se uma eclosão de 70% à 85% dos cistos (CORRÊA et al., 2010). Já para Lourenço

(2016), para se atingir uma excelente eclosão dos cistos, é necessário submetê-los à um pH entre 8 e 9.

Segundo o estudo de biocida realizado por Rangel (2012), também com o microcrustáceo *A. salina* como bioindicador, houve um grande aumento de toxicidade em valores de pH iguais a 3,0 e 5,0, sendo o biocida mais eficaz aquele com pH 3,0. Então, a toxicidade identificada no presente estudo pode ser devido ao baixo pH (ácido) dos LIs avaliados na solução tratamento aquosa, conforme Tabela 3, pois quando expostas às alterações ambientais bruscas os organismos podem morrer.

Outros fatores que pode ter corroborado para a toxicidade dos LIs é a viscosidade dos líquidos iônicos em temperatura ambiente, principalmente em concentrações elevadas, que pode ter dificultado a locomoção das *A. salina*, e, o rompimento da membrana celular, pois, a parte catiônica dos LIs interage com a camada fosfolipídica presente na membrana celular dos seres vivos, causando um vazamento do conteúdo celular, ocasionando assim sua morte (BUBALO et al., 2017; SAKAMOTO et al., 2018).

Tabela 3 - pHs dos líquidos iônicos avaliados nas concentrações dos testes de imobilidade/mortalidade com *A. salina*

Líquido iônico	Concentração					
	100%	50%	25%	12,5%	6,2%	3,1%
Brometo de ácido 2-(3-metilimidazolil-1-iletóxi-4-oxobutanóico)	Entre 5,0 e 6,0	Entre 3,0 e 4,0				
Brometo de ácido 2-((2-(3-metilimidazolil)etóxi)carboil)benzoico	Entre 4,0 e 5,0	Entre 3,0 e 4,0				

Fonte: Autoria própria (2021)

6 CONCLUSÃO

As diferentes características encontradas em cada líquido iônico como alta estabilidade térmica e química e sua volatilidade inexistente, tornou-se uma alternativa muito válida para sua utilização em processos industriais distintos, visto que podem ser escolhidos a partir de suas propriedades específicas de interesse. Além disso, também são muito desejáveis pois pode-se realizar sua recuperação para posterior reutilização, reduzindo custos e resíduos.

Por mais que sejam conhecidos como “verdes”, os líquidos iônicos não podem ser definidos como livres de agentes tóxicos sem a realização de testes que comprovem tal afirmação pois seus efeitos variam consideravelmente a partir de sua formação, podendo colocar em risco o meio ambiente e saúde humana.

O presente trabalho abordou o teste de toxicidade dos líquidos iônicos a partir dos anidridos succínico e ftálico frente ao microcrustáceo *Artemia salina* a fim de avaliar seu potencial de aplicação, por serem líquidos iônicos inéditos desenvolvidos a pouco tempo.

A partir desse estudo, conclui-se que os líquidos iônicos sintetizados e testados são altamente tóxicos ao microcrustáceo utilizado, sugerindo-se a realização de testes de toxicidade com outros bioindicadores e biomarcadores, a fim de obter maiores informações sobre estes LIs. Como os LIs sintetizados são parcialmente solúveis, podem, possivelmente, causar diversos problemas ambientais se descartados no meio ambiente sem tratamento prévio. Isso confirma que a toxicidade apresenta diferentes dependências com a solubilidade em água, e, normalmente quanto mais hidrofóbico um líquido iônico for, mais tóxico ele será.

Nem sempre consegue-se prever toxicidade de um líquido iônico, pois, depende da estrutura e da complexidade da molécula. Mesmo levando em conta o comprimento da cadeia alquílica e as escolhas de cátion e ânion a serem utilizados, os modelos matemáticos utilizados para prever a toxicidade dos LIs podem não ser suficiente por ainda apresentar a necessidade de informações experimentais específicas, tornando necessária a realização dos testes.

A princípio, esses LIs podem ser facilmente utilizados como solventes ou catalisadores em sínteses orgânicas, e, para serem empregados em processos de

formulação de fármacos, cosméticos e pesticidas, comumente implementados na biologia aplicada, deve-se realizar outros testes principalmente considerando seu pH.

Mesmo que os líquidos iônicos utilizados apresentem diferentes radicais em sua estrutura, não foi suficiente para modificar sua toxicidade. Para diminuir os níveis tóxicos consideravelmente, seria necessária a utilização de outro ânion, por estudos mostrarem ser o mais responsável pela presença tóxica ou realizar a correção de seu pH realizando testes para identificar se houve ou não alguma mudança em sua estrutura.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, V. H. **Termodinâmica e aplicações de líquidos iônicos**. 2018. Dissertação (Doutorado em Engenharia química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.
- AN, H. J.; SARKHEIL, M.; PARK, H. S.; YU, I. J.; JOHARI, S. A. Comparative toxicity of silver nanoparticles and silver nanowires on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology**, vol. 218, p. 62, 2019.
- AMBRÓSIO, N.; BERNARDI, J. L.; DALLAGO, R.; MIGNONI, M. L. Remoção de metais pesados de efluentes utilizando líquidos iônicos: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 07, n. 5, 2021.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia ssp* (Crustacea, Cladocera). 3a ed., 18 p., 2010.
- BUBALO, M. C.; RADOŠEVIĆ, K.; REDOVNIKović, I. R.; SLIVAC, I.; SRČEK, V. Toxicity mechanisms of ionic liquids. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 68(3), p.171(9), 2017.
- BYSTRZANOWSKA, M.; PEREIRA, F. P.; MARCINKOWSKI, L.; TOBISZEWSKI, M. How green are ionic liquids? – A multicriteria decision analysis approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 455-458, 2019.

CORRÊA, J. M. et al. Estimativa da eclosão e biomassa total no cultivo de *Artemia* sp. (CRUSTACEA, BRANCHIOPODA, ANOSTRACA) submetida a diferentes dietas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 1, Ed. 106, Art. 710, 2010.

DOBLER, D.; SCHMIDTS, T.; ZINECKER, C.; SCHLUPP, P.; SCHÄFER, J.; RUNKEL, F. Hydrophilic Ionic Liquids as Ingredients of Gel-Based Dermal Formulations. **AAPS PharmSciTech**. v.17, p.923, 2016.

FERRAZ, R.; Branco, L. C.; Prudencio, C.; Noronha, J. P.; Petrovski, Z. Ionic Liquids as Active Pharmaceutical Ingredients. **ChemMedChem**, v.6, p.975, 2011.

FERREIRA, J. A. G.; **Estudo da atividade biológica de líquidos iônicos baseados em bis-piridínios em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.** Dissertação (Mestrado em bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em bioquímica. Escola superior de tecnologia da saúde do porto, Instituto politécnico do porto, 2015.

FORTE, A. S. A. B. **Síntese e caracterização de novos líquidos iônicos biocompatíveis.** Dissertação (Mestrado em bioorgânica) - Programa de Pós-Graduação em bioorgânica. Universidade nova de Lisboa, Monte de Caparica, 2013.

GALAMBA, J. M. F.. **Desenvolvimento de líquidos iônicos antibacterianos e antimicrobianos para dissolução de biopolímeros.** Dissertação (Mestrado em Engenharia química e Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia química e Bioquímica. Universidade Nova de Lisboa. 2020.

GANSKE, F.; BORNSCHEUER, U. T. Growth of *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Bacillus cereus* in the presence of the ionic liquids [BMIM][BF₄] and [BMIM][PF₆] and Organic Solvents. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 7, p. 465-9, abr. 2006.

GARCEZ, B. B. D.; CARREIRO, E.; NOGUEIRA, M. C.; MACÊDO, N. S.; NASCIMENTO, S. L. S.; SILVA, J. N.; MARQUES, Rosemarie B. Toxicidade aguda da dipirona sódica in vitro utilizando o bioindicador de toxicidade *Artemia salina* Leach. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 11, n. 02, p. 114-119, 2018.

GILMORE, B. F. Antimicrobial ionic liquids: Applications and Perspectives, ed Kokorin A., InTech, Rijeka, Croatia. **School of Pharmacy**, Queen's University Belfast, UK., pp 587–604, 2011.

GOUVEIA, W.; ARAÚJO, M. E. M. Low toxicity ionic liquids prepared from biomaterials. **International Workshop on Ionic Liquids – Seeds for New Engineering Applications**, Lisbon, Portugal, 2012.

GUERRA, R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. **Chemosphere** (Oxford), Vol.44(8), pp.1737-1747, 2001.

HEJAZIFAR, M.; LANARID, O.; BICA-SCHRÖDER, K. Ionic liquid based microemulsions: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v.303, 2020.

LIMA, N. S. **Degradação oxidativa de líquidos iônicos baseados em imidazólio utilizando processos fenton, foto-fenton e foto-fenton solar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de processos) - Programa de Pós-Graduação em engenharia de processos, Universidade tiradentes, Aracaju, 2014.

LOURENÇO, F. B. **Síntese catalítica de diarilpirimidinas e dihidropirimidinonas via reação multicomponente do tipo biginelli-like**. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) - Programa de PósGraduação em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2016.

MAIA, A. B.; NASCIMENTO, A. R. A.; VIDAL, Y. P.; CAVALCANTE, R. F. **Testes de toxicidade com artêmia salina e sua importância no controle de parâmetros ambientais.** *In:* II Colóquio de Estudos Ambientais do Bioma Caatinga, 2018, Quixadá. Ceará: IFCE, 2018.

MATOS, R. A. F. **Síntese, caracterização e aplicação de novos líquidos iônicos quirais.** Dissertação (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

MONTALBÁNUMA, M. G.; VÍLLORA, G.; LICENÇA, P. Ecotoxicity assessment of dicationic *versus* monocationic ionic liquids as a more environmentally friendly alternative. **Ecotoxicology and environmental safety**, vol.150, pp.129-135, 2018.

OLIVEIRA; IGLESIAS; MATTEDI; BOAVENTURA. Síntese e caracterização de novos líquidos iônicos. **19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais.** Campos do Jordão, 2010. Disponível em:
https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/42/050/42050100.pdf.
Acesso em: 20 jun. 2021.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

QUIJANO, G.; COUVERT, A.; AMRANE, A. Ionic liquids: applications and future trends in bioreactor technology. **Bioresource technology**, v. 101, n. 23, p. 8923-30, dez. 2010.

RAMOS, T. J. S.; BERTON, G. H.; CASSOL, T. M.; ALVES, J. S. Carboxyl-functionalized ionic liquids: synthesis, characterization and synergy with rare-earth ions. *Journal of Materials Chemistry C*. **J. Mater. Chem. C**, v.6, p. 6270-6279, 2018.

RANGEL, T. C. **Avaliação ecotoxicológica do biocida grotan®ox mediante bioensaios de ecotoxicidade aguda utilizando artemia salina e lactuca sativa como bioindicadores.** Dissertação (Graduação). Programa de Graduação de Química Industrial. Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SANTOS, A. G. **Toxidade de líquidos iônicos para microrganismos de importância na indústria de alimentos.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência de alimentos. Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SILVA, A. B.; Pajote, M. S. **Solubilidade de princípios ativos em água através de líquidos iônicos biocompatíveis.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2020.

SILVA, T. B. **Líquidos iônicos – alguns aspectos sobre propriedade, preparação e aplicações.** Dissertação (Bacharelado). Programa de Graduação em Química. Universidade Federal de Pelotas, 2004.

SAKAMOTO, M.; OHAMA, Y.; AOKI, S.; FUKUSHI, K.; MORI, T.; YOSHIMURA, Y.; SHIMIZU, A. Effect of Ionic Liquids on the Hatching of Artemia salina Cysts. **Australian Journal of Chemistry**, v.71, p.492-496, 2018.

SILVEIRA, A. D. P. **Química verde: Princípios e aplicações.** Dissertação (Bacharelado). Programa de Graduação em Química. Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2015.

VALENTE, et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.42, 2017.

ZHAO, Y.; ZHAO, J. ; HUANG, Y. ; ZHOU, Q.; ZHANG, X.; ZHANG, S. Toxicity of ionic liquids. **Clean Soil, Air, Water**, v.35(1), pp.42-48, 2007.