



# UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

DOUTORADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

GABRIELA BRASIL ROMÃO VELOSO

ESTUDO DE SEGURANÇA DE LÍQUIDOS IÔNICOS  
PRÓTICOS À SAÚDE HUMANA:  
UMA ALTERNATIVA AOS SOLVENTES CONVENCIONAIS



SALVADOR  
2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL**

**GABRIELA BRASIL ROMÃO VELOSO**

**ESTUDO DE SEGURANÇA DE LÍQUIDOS IÔNICOS  
PRÓTICOS À SAÚDE HUMANA: UMA ALTERNATIVA AOS  
SOLVENTES CONVENCIONAIS**

Salvador  
2022

**GABRIELA BRASIL ROMÃO VELOSO**

**ESTUDO DE SEGURANÇA DE LÍQUIDOS IÔNICOS  
PRÓTICOS À SAÚDE HUMANA: UMA ALTERNATIVA AOS  
SOLVENTES CONVENCIONAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, Área de Desenvolvimento Sustentável de Processos e Produtos, da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia, campus de Salvador como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Doutora em Engenharia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angel Iglesias Duro

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bruna Galdorfini Chiari Andréo

Salvador  
2022

---

V443 Veloso, Gabriela Brasil Romão

Estudo de segurança de líquidos iônicos próticos à saúde humana: uma alternativa aos solventes convencionais/ Gabriela Brasil Romão Veloso. – Salvador, 2022.

98 f. : il. color.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angel Iglesias Duro.

Coorientadora: Profa. Dra. Bruna Galdorfini Chiari Andréo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Escola Politécnica, 2022.

1. Líquidos iônicos próticos. 2. Toxicidade. 3. Células. 4. Cicatrização. I. Duro, Miguel Angel Iglesias. II. Andréo, Bruna Galdorfini Chiari. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

---

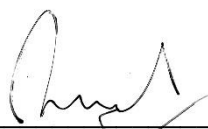
CDD: 541.3

# ESTUDO DE SEGURANÇA DE LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS À SAÚDE HUMANA: UMA ALTERNATIVA AOS SOLVENTES CONVENCIONAIS


**GABRIELA BRASIL ROMÃO VELOSO**

Tese submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutora em Engenharia Industrial.

Examinada por:

Prof. Dr. Miguel Iglesias Duro   
Doutor em Simulação e controle de processos químicos, pela Universidade de Vigo, ESPANHA, 2000

Profª. Drª Rebecca Da Silva Andrade   
Doutora em Engenharia Industrial, pela Universidade Federal da Bahia, BRASIL, 2017

Profª. Drª. Eliane Trovatti   
Doutora em Biotecnologia, pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, BRASIL, 2006

Profª. Drª. Mariana Rillo Sato   
Doutora em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, BRASIL, 2020

Prof. Dr. João Augusto Oshiro   
Doutor em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, BRASIL, 2017

Salvador, BA - BRASIL  
Outubro/2022

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu marido que estão sempre ao meu lado para me apoiar.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Irandir (em memória) e Lisete, por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionaram. Meu pai participou apenas do início do Doutorado, ficou extremamente feliz com o caminho que eu estava traçando e como sempre me ajudou e apoiou muito. Minha mãe, minha melhor amiga, sempre esteve ao meu lado e eu serei eternamente grata por tudo o que fez e faz por mim, sempre me apoiando e acreditando nos meus sonhos. Agradeço também ao meu irmão Rodrigo que sempre se interessou pelo meu trabalho, me apoiando nas minhas decisões. Eu os amo muito.

Também agradeço ao meu amado marido, Henrique, que também seguiu a estrada acadêmica e sempre me ajudou muito tanto no aspecto emocional quanto na prática, além de ter me auxiliado bastante com a parte química do trabalho. Eu serei eternamente grata ao seu apoio e por ter passado este processo ao meu lado.

Agradeço imensamente à minha co-orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Bruna Galdorfini Chiari Andréo, que se dedicou ao máximo para que este trabalho se realizasse e, também, admiro a sua conduta que estabelece uma relação de amizade com seus alunos, tornando o trabalho muito mais produtivo.

Agradeço enormemente à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rebecca da Silva Andrade, que me ajudou muito durante todo o processo do Doutorado. No início, quando ela ainda era aluna da Universidade, me auxiliou em tudo que eu precisei, sendo eu uma aluna nova, desbravando o novo universo em que eu estava entrando, e esse apoio foi muito importante para mim. Agradeço também às inúmeras parcerias em trabalhos e a extrema dedicação.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Miguel Iglesias que tornou possível a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Regina Cicarelli por ter me acolhido em seu laboratório, e os resultados coletados ali foram extremamente importantes para a construção deste trabalho.

À Universidade Federal da Bahia, em especial a Escola Politécnica e o programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, agradeço por apoiar o desenvolvimento deste trabalho, juntamente com a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pela bolsa concedida (processo N<sup>o</sup> BOL2808/2016).

E por último, mas não menos importante, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”

Marie Curie



VELOSO, Gabriela Brasil Romão. Estudo de segurança de líquidos iônicos próticos à saúde humana: uma alternativa aos solventes convencionais. 92 f. il. 2022. Tese de Doutorado – Pós-Graduação em Engenharia Industrial, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2022.

## RESUMO

Líquidos iônicos são sais orgânicos não voláteis que, em condições normalizadas, permanecem em estado líquido e são compostos por cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos. Apresentam uma vasta aplicação industrial e perfil sustentável e, geralmente, são chamados de “solventes verdes”, porém, apesar desta denominação, ainda há informações insuficientes sobre seus aspectos relacionados à sua toxicidade ao meio ambiente e aos seres humanos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar os aspectos toxicológicos de alguns líquidos iônicos através de bioensaios *in vitro*, além de tentar compreender seus efeitos em células, buscando possíveis aplicações biológicas. Para isso foram sintetizados dezessete líquidos iônicos próticos e analisados em ensaios *in vitro* de: citotoxicidade em células metabolizadoras (HepG2) e células de pele (HaCat e HDFa); de observação morfológica de células HaCat em exposição a esses líquidos; e de irritação ocular em membrana córneo-alantóide de ovos fecundados de galinha (HET-CAM). Visando estudar uma possível aplicação biológica, o potencial de cicatrização em células HDFa também foi avaliado. Os resultados obtidos foram promissores, uma vez que, em geral, os líquidos mostraram baixo efeito citotóxico, obtendo valores de  $CI_{50}$  entre 8 e 390 mM, aproximadamente. Além disso, foi possível observar seu efeito sobre as células, ocasionando aumento ou diminuição de volume e/ou ruptura da membrana celular em linhagem HaCat, devido à pressão osmótica. O ensaio de irritação ocular demonstrou que os líquidos iônicos compostos de ácido cítrico, não ocasionaram irritação ocular, enquanto treze deles foram caracterizados como irritantes leves ou moderados, sendo possível sugerir, baseando-se neste teste, a sua utilização com segurança em organismos vivos, apesar de haverem ressalvas. Também foi possível confirmar, a partir de uma análise quantitativa pelo *software* ImageJ, a classificação de irritação ocular a partir da análise das imagens em escala de cinza. Além disso, nenhuma amostra testada foi capaz de impedir o processo de cicatrização avaliado *in vitro*, sendo este mais um indício de segurança e, ainda, o líquido iônico composto por ácido oxálico se destacou por ser capaz de favorecer a proliferação celular. Portanto, foi possível concluir que os líquidos iônicos próticos avaliados neste trabalho são, de maneira geral, seguros, menos tóxicos às células humanas do que solventes convencionalmente usados e os resultados coletados contribuem significativamente com a ciência, pois indicam parâmetros de segurança destes compostos, relacionados às suas características químicas e concentrações e reforçam a necessidade da continuidade destes estudos. Também, neste trabalho, sugere-se um novo rumo das pesquisas empregando líquidos iônicos próticos, buscando efeitos biológicos para os mesmos.

Palavras-chave: Líquidos iônicos próticos. Toxicidade. Células. Cicatrização.

VELOSO, Gabriela Brasil Romão. Safety study of protic ionic liquids to human health: an alternative to conventional solvents. 92 f. il. 2022. Doctoral Thesis – Postgraduate Degree in Industrial Engineering, Federal University of Bahia, Salvador, 2022.

### ABSTRACT

Ionic liquids are non-volatile organic salts that, under standardized conditions, remain in a liquid state and are composed of organic cations and organic or inorganic anions. They have a wide industrial application and sustainable profile and, generally, they are called as "green solvents", however, despite this denomination, there is insufficient information about their aspects related to their toxicity to the environment and to humans. In this context, this work aimed to evaluate the toxicological aspects of some ionic liquids through *in vitro* bioassays, in addition to trying to understand their effects on cells, seeking possible biological applications. For this purpose, seventeen protic ionic liquids were synthesized and analyzed by *in vitro* assays of: cytotoxicity in metabolizing cells (HepG2) and skin cells (HaCat and HDFa); morphological observation of HaCat cells exposed to these liquids; and eye irritation in chicken egg's chorioallantoic membrane (HET-CAM). In order to study a possible biological application, the wound healing potential in HDFa cells was also evaluated. The results obtained were promising, since, in general, the ionic liquids showed a low cytotoxic effect, obtaining IC<sub>50</sub> values between 8 and 390 mM, approximately. In addition, it was possible to observe its effect on cells, causing an increase or decrease in volume and/or rupture of cell membrane in HaCat cells, due to osmotic pressure. The eye irritation test showed that the ionic liquids composed of citric acid did not cause eye irritation, while thirteen of them were characterized as mild or moderate irritants, and it is possible to suggest, based on this test, their safe use in living organisms, although there are reservations. It was also confirmed, from a quantitative analysis by the ImageJ software, the classification of eye irritation by the analysis of grayscale images. In addition, no sample tested was able to prevent the healing process evaluated *in vitro*, which is another indication of safety and, still, the ionic liquid based on oxalic acid stands out for being able to improve cell migration. Therefore, it was possible to conclude that the protic ionic liquids evaluated in this work are, in general, safe, less toxic to human cells than conventionally used solvents and the collected results contribute significantly to science, as they indicate safety parameters of these compounds, related to their chemical characteristics and concentrations and reinforce the need to continue these studies. Also, in this work, a new direction of research is suggested using protic ionic liquids, seeking biological effects for them.

Keywords: Ionic liquids. Protic ionic liquids. Toxicity. Cells. Wound healing.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Quantidade de publicações referentes à toxicidade dos líquidos iônicos nas últimas duas décadas. ....	13
<b>Figura 2.</b> Quantidade de publicações em geral sobre líquidos iônicos nas últimas duas décadas. ....	13
<b>Figura 3.</b> Alguns cátions e ânions comumente utilizados para síntese de líquidos iônicos. ...	15
<b>Figura 4.</b> Aparência dos líquidos iônicos próticos. ....	36
<b>Figura 5.</b> Comparação da citotoxicidade de líquidos iônicos e solventes convencionais. ....	41
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografias de células HaCat durante 8 h de exposição aos líquidos iônicos próticos. ....	43
<b>Figura 7.</b> Sequência de fotografias ilustrando o efeito do PBS (controle negativo), NaOH 1,0M (controle positivo) e diferentes LIPs nas membranas cório-alantoides nos tempos 0,0 min, 0,5 min, 2,0 min e 5,0 min.....	48
<b>Figura 8.</b> Exemplo do perfil de valores de escala de cinza utilizando o <i>software</i> ImageJ, evidenciando a correlação entre vasos sanguíneos escuros e valores de escala de cinza.....	53
<b>Figura 9.</b> Correlação entre vasos sanguíneos escuros (hemorragia e hiperemia) e valores de escala de cinza dos controles negativo (A) e positivo (B) nos tempos 0s, 30s, 120s e 300s....	54
<b>Figura 10.</b> Exemplos dos perfis de escala de cinza de LIPs não irritante (2-HDEACi, A), irritante leve (2-HDEAOx, B), irritante moderado (2-HEAAAd, C) e irritante severo (2-HEAF, D).....	55
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografias do ensaio de migração celular durante 24h de monitoramento. ....	59
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografias da cultura celular sem amostra (A) e após a adição do LIP 2-HDEAOx (B) evidenciando a precipitação. ....	600
<b>Figura 13.</b> Migração celular (%) do controle negativo e dos líquidos iônicos próticos durante 24h. ....	611
<b>Figura 14.</b> Análise da variação da escala de cinza do controle negativo e do 2-HDEAOx referente à migração celular. ....	622
<b>Figura A1.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HEAA.....	84
<b>Figura A2.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAA.....	84
<b>Figura A3.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HEAPr.....	85
<b>Figura A4.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HEAL.....	85
<b>Figura A5.</b> Variação da escala de cinza pela distância do HDEAL.....	86
<b>Figura A6.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEABe.....	86

<b>Figura A7.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEASa.....	87
<b>Figura A8.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAMa.....	87
<b>Figura A9.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAAAd.....	88
<b>Figura A10.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HEACi.....	88
<b>Figura A11.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAPr.....	89
<b>Figura A12.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAF.....	89
<b>Figura A13.</b> Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEASu.....	90
<b>Figura B1.</b> Viabilidade celular promovida pelos tecidos tratados com os LIPs.....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Ácidos e bases de Brønsted utilizados para a síntese dos líquidos iônicos próticos. ....	29
<b>Tabela 2.</b> Escala de pontuação para as mudanças observadas na membrana cório-alantoide do ovo embrionado de galinha no ensaio HET-CAM. ....	33
<b>Tabela 3.</b> Escala de pontuação quanto ao potencial de irritabilidade no ensaio HET-CAM...	33
<b>Tabela 4.</b> Massa molar e densidade dos líquidos iônicos próticos. ....	37
<b>Tabela 5.</b> Valores de $CI_{50}$ de líquidos iônicos próticos deste trabalho e de outros estudos.....	38
<b>Tabela 6.</b> Pontuação (média e desvio-padrão) e descrição do tipo de irritação obtidos do ensaio HET-CAM para os líquidos iônicos próticos e controles positivo e negativo. ....	522

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- (CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N<sup>-</sup> – ânion trifluorometilimida
- (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>-</sup> – ânion bis(trifluorometilsulfonil)imida
- [2EteimPS][CS] – 2-etil-imidazólio
- [2MeimPS][CS] – 2-metil-imidazólio
- [2PhimPS][CS] – 2-fenil-imidazólio
- [AH] – ácido de Brönsted
- [B] – base de Brönsted
- [BH<sup>+</sup>][A<sup>-</sup>] – sal de Brönsted
- [BMPY] [TFSI] – bis(trifluorometanosulfonil)imida de 1-butil-1-metilpirrolidina
- [BzimPS][CS] – 2-benzil-imidazólio
- [C<sub>16</sub>mim] Cl – cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio
- [C<sub>8</sub>mim] Br – brometo de 1-octil-3-metilimidazólio
- [Chol] – líquidos iônicos a base de colina
- [DMEtA] [Oct] – octanoato de N,N-dimetiletanolamônio
- [emim (Ms)] – 1-ethyl-3-methylimidazolium methanesulfonate
- [EMIM] [BF<sub>4</sub>] – tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio
- [EMIM] [DCA] – dicianamido de 1-etil-3-metilimidazólio
- [EMIM] [PF<sub>6</sub>] – hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazólio
- [EMIM] [TFSI] – 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometanosulfonil)imida
- [H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] – ácido monofosfato
- [Mim] Ac – acetato de 1-metilimidazólio
- [OAc] – acetato
- [TBA] [TFSI] – bis(trifluorometanosulfonil)imida de tributilmetilamônio
- [tbph (Ms)] – tetrabutylphosphonium methanesulfonate
- [Zn] [TFSI]<sub>2</sub> – di[bis(trifluorometanosulfonil)imida de zinco
- 2-HDEAA – acetato de 2-hidroxidietanolamina
- 2-HDEAAAd – adipato de 2-hidroxidietanolamina
- 2-HDEABe – benzoato de 2-hidroxidietanolamina
- 2-HDEACi – citrato de 2-hidroxidietanolamina
- 2-HDEAL – lactato de 2-hidroxidietanolamina
- 2-HDEAMa – maleato de 2-hidroxidietanolamina
- 2-HDEAPr – propionato de 2-hidroxidietanolamina

2-HDEASa – salicilato de 2-hidroxi-dietanolamina  
2-HEAA – acetato de 2-hidroxi-etanolamina  
2-HEAA<sub>d</sub> – adipato de 2-hidroxi-etanolamina  
2-HEAC<sub>i</sub> – citrato de 2-hidroxi-etanolamina  
2-HEAF – formiato de 2-hidroxi-etanolamina  
2-HEAL – lactato de 2-hidroxi-etanolamina  
2-HEAP<sub>r</sub> – propionato de 2-hidroxi-etanolamina  
2-HTEAP<sub>e</sub> – pentanoato de 2-hidroxi-trietanolamina  
8-OhDG – 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina  
*A. hydrophilla* – *Aeromonas hydrophilla*  
Al<sub>2</sub>Cl<sub>7</sub><sup>-</sup> – ânion heptaclorodialuminato  
AlCl<sub>4</sub><sup>-</sup> – ânion tetracloroaluminato  
BDO – demanda bioquímica de oxigênio  
BF<sub>4</sub><sup>-</sup> – ânion tetrafluoroborato  
BmPy-Cl – 1-butil-1-metilpirrolidínio  
Br<sup>-</sup> – ânion brometo  
*C. albicans* – *Candida albicans*  
CaCo-2 – células do carcinoma colônico humano  
CAM – membrana cório-alantoide  
CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> – ânion trifluoroacetato  
CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> – ânion trifluorometanosulfonato  
CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> – ânion acetato  
CI<sub>50</sub> – concentração inibitória média  
Cl<sup>-</sup> – ânion cloreto  
CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono  
DCA – ânion dicloanoamida  
DEA – dietanolamina  
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*  
DMSO – dimetilsulfóxido  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
DQO – demanda química de oxigênio  
*E. coli* – *Escherichia coli*  
EAN – nitrato de etilamônio  
EC<sub>50</sub> – concentração efetiva mediana

FeCl<sub>4</sub><sup>-</sup> – ânion tetracloroferrato  
H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-</sup> – ânion dihidrogenofosfato  
HaCat – células da epiderme humana  
HDFa – fibroblastos humanos primários  
HEK – células embrionárias de rim humano  
HeLa – células de carcinoma cervical humano  
HepG2 – células de hepatocarcinoma humano  
HET-CAM – *hen's egg test chorionallantoic membrane*  
Hs68 – fibroblastos dérmicos humanos  
HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> – ânion hidrogenossulfito  
HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> – ânion hidrogenossulfato  
I<sup>-</sup> – ânion iodeto  
IPC-81 – células leucêmicas de ratos  
*L. minor* – *Lemna minor*  
LI – líquido iônico  
LIA – líquido iônico aprótico  
LIP – líquido iônico prótico  
m-2-HEAA – acetato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio  
m-2-HEAB – butirato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio  
m-2-HEAP – pentanoato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio  
m-2-HEAPr – propionato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio  
MCF7 – células de câncer de mama  
MEA – monoetanolamina  
MIC – concentração inibitória mínima  
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio  
NaOH – hidróxido de sódio  
NBEC – células normais do epitélio bronquial humano  
NTf<sub>2</sub> – ânion bistriflimida  
*P. subcapitata* – *Pseudokirchneriella subcapitata*  
PBS – solução salina tamponada de fosfato  
PF<sub>6</sub><sup>-</sup> – ânion hexafluorofosfato  
QSAR – relação quantitativa estrutura-atividade  
R – radical  
REACH – *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*



rMSC – células-tronco mesenquimais de rato

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

SIA – análise de injeção sequencial

T98G – células de glioma humano

TA100 – cepa de *Salmonella typhimurium*

TA98 – cepa de *Salmonella typhimurium*

TEA – trietanolamina

*V. fischeri* – *Vibrio fischeri*

WST-1 – sal monossódico de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio

$\text{ZnCl}_4^{2-}$  – ânion tetracloreto de zinco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 LÍQUIDOS IÔNICOS .....	14
2.2 (ECO)SEGURANÇA DE LÍQUIDOS IÔNICOS.....	17
2.3 LÍQUIDOS IÔNICOS E A SEGURANÇA AOS SERES HUMANOS .....	21
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
4.1 SÍNTESE DOS LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS.....	27
4.2 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE CITOTOXICIDADE.....	30
4.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS LIPs .....	32
4.4 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR (HET-CAM) .....	32
4.5 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE MIGRAÇÃO CELULAR ( <i>SCRATCH ASSAY</i> ) .....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
5.1 SÍNTESE DOS LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS.....	35
5.2 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE .....	36
5.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS LIP.....	42
5.4 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR (HET-CAM).....	47
5.5 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	588
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>633</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>655</b>
<b>8 APÊNCIDE A – Figuras suplementares</b> .....	<b>84</b>
<b>9 APENDICE B – Resultados adicionais</b> .....	<b>90</b>
B1. SIMULAÇÃO DE TINGIMENTO DE TECIDOS.....	90
B2. CITOTOXICIDADE DOS TECIDOS.....	91

## 1 INTRODUÇÃO

O conceito de sustentabilidade relaciona a tecnologia e os processos industriais às políticas que visam à redução do impacto ambiental decorrente das atividades econômicas (COLLIN; COLLIN, 2010). Nos últimos anos, o interesse neste campo tem avançado e, também, tem-se ditado normativas orientadas a projetar e melhorar produtos e processos químicos que reduzam ou eliminem o uso de substâncias potencialmente tóxicas ao ambiente e aos seres vivos, como, por exemplo, os solventes orgânicos, convencionalmente empregados em processos industriais.

Em sua grande maioria, os solventes orgânicos são compostos lipossolúveis, voláteis e inflamáveis, que oferecem riscos ao ambiente. Mas, além disso, é importante ressaltar que a ação destes solventes no corpo humano também é deletéria. Relata-se efeito semelhante ao dos anestésicos, ou seja, são capazes de inibir a atividade do cérebro e da medula espinal, diminuindo a capacidade funcional do sistema nervoso central, tornando-o menos sensível aos estímulos. Por serem, geralmente, substâncias lipofílicas, ultrapassam facilmente barreiras biológicas e acumulam-se em órgãos e tecidos do corpo que possuem adiposidades, interagindo com alvos moleculares e celulares. Uma vez depositados, os solventes alteram a excitabilidade das células, suprimindo a condução normal dos impulsos nervosos, tornando o sistema nervoso sensível à toxicidade desses solventes (THRIEL, 2014; SCHWARZENBACH, GSCHWEND, 2016).

Em decorrência disso, iniciativas com o objetivo de evitar esta situação têm sido desenvolvidas, como, por exemplo, a busca por solventes alternativos que se enquadram nos princípios da Química Verde e que sejam seguros à população (LENARDÃO et al., 2003).

Neste contexto estão inseridos os líquidos iônicos (LIs) que são caracterizados como sais orgânicos não-voláteis, impedindo sua dispersão por evaporação, o que já se apresenta como uma vantagem em relação aos solventes convencionalmente empregados. São divididos em duas classes, os líquidos iônicos apróticos (LIA), que tendem a ser lipofílicos e os líquidos iônicos próticos (LIP), também chamados de sais de Brønsted, que são extremamente hidrofílicos e apresentam excelente estabilidade térmica e química, pressão de vapor desprezível e muitos deles com custo 75 a 100 vezes menores que os LIA. A diferença entre essas duas categorias é o seu método de síntese e sua estrutura (DOCHERTY; KULPA, 2005; PERIC et al., 2013).

Variados estudos evidenciaram a diversidade de aplicações de interesse industrial de LIs, como a sua utilização em técnicas de separação e extração (LI et al., 2014; LARRIBA et

al., 2016; SHANG et al., 2017; BERTHOD et al., 2018; HOU, LIN, ZHANG, 2022; ROUT, RAMANATHAN, 2022), de catálise (MUZALEVSKIY et al., 2016; VEKARIYA, 2017; LI et al., 2018), como elementos de aplicações óticas e eletrônicas (BORRA et al., 2007; HAGIWARA, 2007; LI et al., 2011; LIU et a., 2012; ZHANG et al., 2016), em nanotecnologia e bioprocessos (HE, ALEXANDRIDIS, 2017; GREWAL, KHARE, 2018), em energia (CHANG et al., 2014; FORSYTH et al., 2016; ZHANG et al., 2018), em técnicas de uso analítico e aplicações em química fina (RIDUAN, ZHANG, 2013; CLARK et al., 2016; NAWATA et al., 2018), como meio de tingimento têxtil (YUAN et al., 2010a, 2010b; ROUETTE, 2001; CHENG, 2011; DONG, 2011; KANTOUCH et al., 2011a; QINGDAO UNIVERSITY, 2012; ZHUANG et al., 2014; BIANCHINI et al., 2015; ANDRADE et al., 2017; BARROS et al., 2022), em aditivos para compostos poliméricos (KOSINSK et al., 2022), entre outras. Vale ressaltar que a recuperação dos LIs é uma grande vantagem, pois podem ser isolados de forma eficaz, através da destilação ou extração e reutilizados, diminuindo significativamente o custo de suas aplicações (BUBALO et al., 2017; RYKOWSKA; ZIEMBLIŃSKA; NOWAK, 2018).

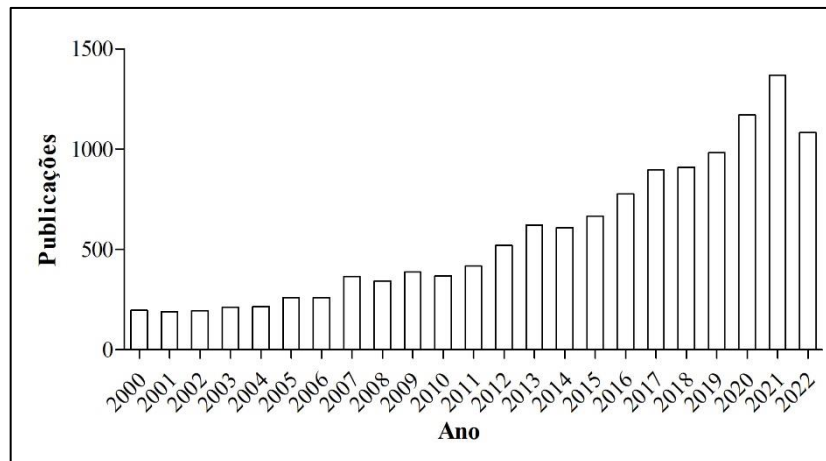
Nos últimos anos, iniciaram-se os estudos sobre a atividade biológica dos LIs referente a suas possíveis aplicações na biotecnologia e indústria farmacêutica (LE BIDEAU, VIAU, VIOUX, 2011; BALK, HOLZGRABE, MEINEL, 2015; EGOROVA, GORDOEV, ANANIKOV, 2017, EGOROVA, ANANIKOV, 2018b; HAN et al., 2022; TARANNUM, RAO, FATHIMA, 2022); e o conhecimento sobre a sua interação com sistemas biológicos começou com a determinação de vários efeitos tóxicos dos LIs (RANKE et al., 2007; PETKOVIC et al., 2011; EGOROVA, ANANIKOV, 2014; THANKE et al., 2019; CHU et al., 2021). A sua utilização como solventes ou co-solventes eficientes em processos de bio-catálise e na liberação de fármacos, ganhou interesse dos pesquisadores (ADAWIYAH et al., 2016; EGOROVA, GORDOEV, ANANIKOV, 2017; KUNOV-KRUSE et al., 2017; CLAUS, SOMMER, KRAGL, 2018; EGOROVA, ANANIKOV, 2018b; ELGHARBAWY et al., 2018).

Considerando a utilização dos LIs em processos industriais, para importação e exportação, é necessário seguir normas de agências regulamentadoras, a exemplo da REACH “*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*” (Registro, Avaliação e Autorização de Substâncias Químicas), que vigora na União Europeia desde 2010 e exige dos fabricantes e usuários de produtos químicos, o registro de informações de caracterização físico-química de novos materiais, bem como de análises de ecotoxicidade e de possíveis impactos à saúde humana. Sem este registro não é autorizada a importação, exportação, fabricação, circulação e uso industrial de qualquer produto. O principal objetivo é ter maior nível de informação sobre os produtos químicos presentes, de modo que os riscos possam ser

controlados e, o uso de químicos tóxicos, minimizado (REACH, 2006).

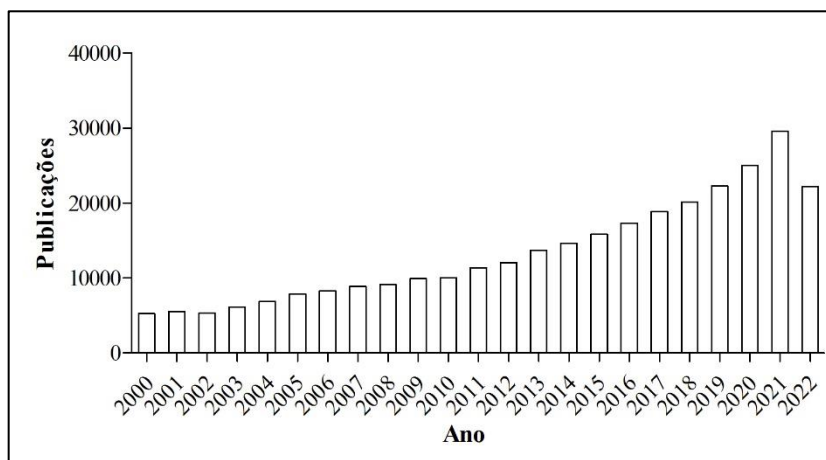
Um aspecto crucial sobre o qual ainda há escassez de informações até o presente momento é a toxicidade potencial dos LIs, informação necessária ao cumprimento dos preceitos de normas regulamentadoras e a avaliação em termos reais dos aspectos de segurança e higiene derivados de sua manipulação, uso e transporte no setor industrial já que o produto final e os efluentes gerados nos processos industriais podem conter LIs residuais que devem ser avaliados quanto aos impactos a nível ambiental e humano. A Figura 1 mostra como somente nos últimos anos houve maior interesse em se estudar a toxicidade dos LIs, havendo também número crescente de publicações que tratam dos LIs de maneira geral (Figura 2).

**Figura 1.** Quantidade de publicações referentes à toxicidade dos líquidos iônicos nas últimas duas décadas.



Fonte: Science Direct, acesso em junho de 2022.

**Figura 2.** Quantidade de publicações em geral sobre líquidos iônicos nas últimas duas décadas.



Fonte: Science Direct, acesso em junho de 2022.

Diante do cenário de escassez de informações referentes à toxicidade dos LIs, principalmente relacionada à saúde humana, faz-se necessário investigar mais detalhadamente esta área, assunto a ser discutido neste trabalho a partir de ensaios *in vitro*, que é de extrema relevância, uma vez que esses promissores solventes verdes estão sendo cada vez mais explorados e utilizados em diversos ramos da ciência e da indústria.

Este trabalho dedicou-se à procura de evidências sobre a segurança biológica dos LIPs, pois na busca por alternativas seguras aos seres humanos, o simples fato de não apresentarem lipofilicidade, como previamente descrito, indica a menor tendência em acumular-se nas adiposidades humanas e de atingirem o Sistema Nervoso Central, como ocorre com diversos solventes convencionalmente empregados no setor industrial.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

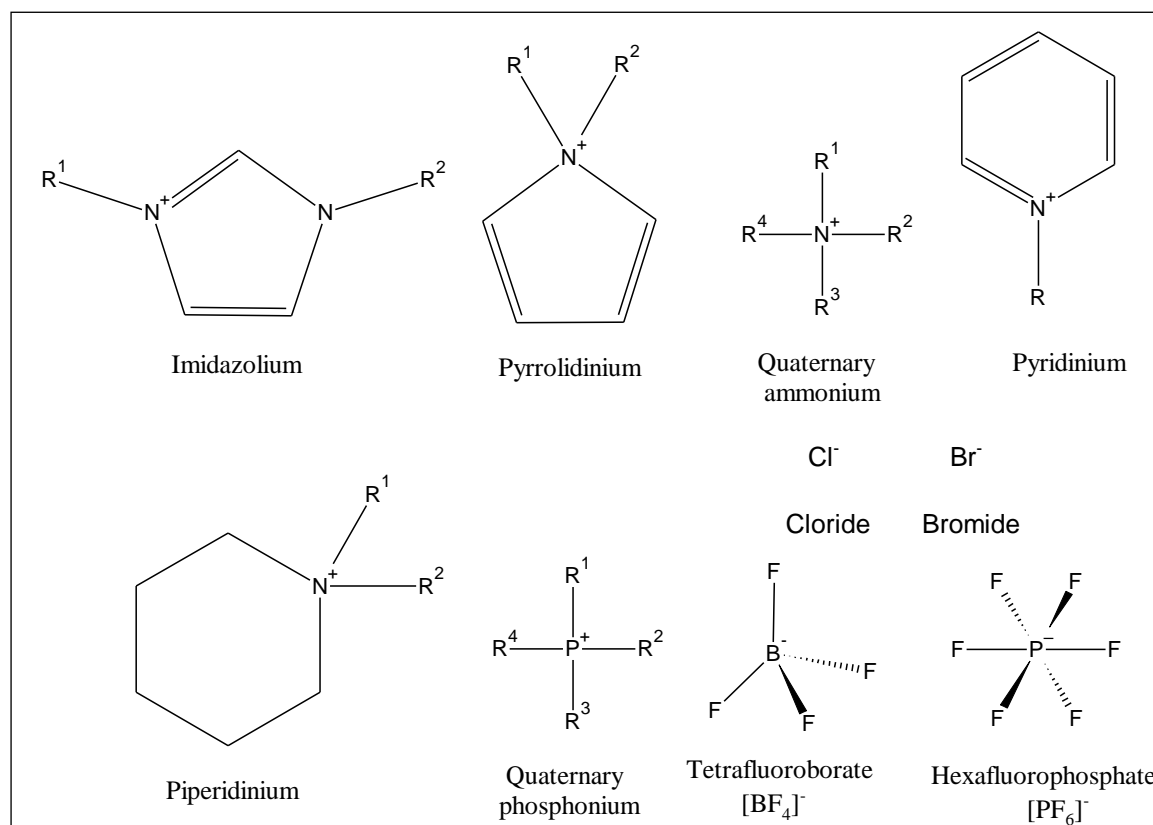
### 2.1 LÍQUIDOS IÔNICOS

Basicamente, os LIs são sais orgânicos que se apresentam em estado líquido, em condições normalizadas, e que são compostos por íons mantidos unidos, principalmente, por atração eletrostática ou coulômbica. São obtidos pela combinação de cátions orgânicos contendo um átomo de nitrogênio, enxofre ou fósforo carregados positivamente com uma grande variedade de ânions inorgânicos e orgânicos. Na literatura, outros termos como sais fundidos ou sais de líquidos orgânicos são utilizados para descrever este grupo de compostos (WELTON, 1999; CHIAPPE, PIERACCINI, 2005; HANDY, 2011; KOKORIN, 2011; BUBALO et al., 2017). O primeiro LI sintetizado foi o nitrato de etilamônio (EAN), que tem ponto de fusão de 12 °C (WALDEN, 1914).

Os cátions comumente utilizados para a síntese de LIs provêm dos íons amônio, sulfônico, imidazólio, triazólio, piridínio, fosfônico, pirazólio, guanidínio, entre outros e com diferentes substituintes (BHATTACHARJEE et al., 2014; ELSHEIKH, 2014; KORDALA-MARKIEWICZ et al., 2014; ZHENG et al., 2014; FALL et al., 2015; NEALE et al., 2016; TANKOV et al., 2017; TIAN et al., 2017; CALZA et al., 2018; CHEN et al., 2018; KISHIMURA et al., 2018; NEHRA et al., 2018; ROGALSKY et al., 2018; XIONG et al., 2018); e os ânions mais comumente utilizados são  $\text{AlCl}_4^-$ ,  $\text{Al}_2\text{Cl}_7^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{ZnCl}_4^{2-}$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ , entre outros (GILBERT et al., 2007; OCHEDZAN-SIODKAK, DZIUBEK, SIODKAK, 2008; BERTOTI, NETTO-FERREIRA, 2009; MAYORAL et al., 2009; SEN et al., 2016; SHARMA, GHORAI, 2016; DEYAB, ZAKY, NESSIM, 2017; FAZLALI et al., 2017; LEI et al., 2017; LOPES et al., 2017; BASU,

BHATTACHARYA, KUMAR, 2018; DECAEN et al., 2018; KAKAEI, ALIDOUST, GHADIMI et al., 2018; ZEC et al., 2018; ZHOU et al., 2018). A Figura 3 mostra alguns cátions e ânions comumente utilizados na síntese de LIs.

**Figura 3.** Alguns cátions e ânions comumente utilizados para síntese de líquidos iônicos.



Teoricamente, as diferentes combinações dos cátions e ânions podem sintetizar aproximadamente  $10^{18}$  novos LIs. Devido a essas inúmeras combinações, os LIs podem ser sintetizados conforme as propriedades físicas e químicas desejadas, como ponto de fusão, viscosidade, densidade e solubilidade. Assim, eles podem ser desenvolvidos, por exemplo, para serem solúveis ou não em água ou para determinados tipos de solventes orgânicos em diversas faixas de composição das misturas (NIEDERMEYER et al., 2012).

LIs apresentam alta condutividade elétrica ou condutividade específica, que é uma medida da capacidade deste para transportar carga elétrica, sendo que os íons atuam como portadores de carga, além de apresentarem estabilidade eletroquímica. Devido ao fato de serem compostos por íons, exibem condutividade iônica intrínseca, diferentes de eletrólitos aquosos que necessitam de um sal para obter condutividade. Outra propriedade dos LIs é a pressão de vapor baixa devido à forte interação coulômbica dos íons, mesmo a temperaturas perto de sua decomposição (FREEMANTLE, 2010).

No geral, são mais viscosos que os solventes orgânicos e, à temperatura ambiente, a viscosidade se apresenta na faixa de 10 cP até valores superiores a 500 cP. Comparativamente, líquidos com baixa viscosidade apresentam valores menores que 1 cP, como a acetona e água, por exemplo. Já a temperaturas mais elevadas, a viscosidade tende a diminuir devido aos íons possuírem maior energia cinética. Outra característica dos LIs é que, em sua maioria, possuem densidade maior que a da água, porém ela pode variar dependendo da composição da cadeia alquílica ou da massa do ânion, podendo então aumentar ou diminuir o valor da densidade (FREEMANTLE, 2010).

Uma característica dos LIs que pode ser considerada uma das mais importantes é o ponto de fusão, que é baixo. Os sais inorgânicos tradicionais apresentam um ponto de fusão consideravelmente maior pois a formação do retículo cristalino e a atração entre cargas bem localizadas torna alta a energia para romper a atração eletrostática. Nos LIs, há um aumento do volume dos cátions e ânions e a distância entre os íons também é maior o que contribui para que a força de atração entre os íons diminua e, conseqüentemente, o ponto de fusão também (PLECHKOVA; SEDDON, 2008).

A maioria dos LIs não são inflamáveis e, considerando a sua não-volatilidade, são frequentemente apresentados como “solventes verdes” ou “alternativas verdes” aos solventes voláteis orgânicos. Contudo, a toxicidade, a biodegradabilidade e os impactos ambientais ainda não foram suficientemente investigados (RANKE et al., 2004; KUMAR, 2006).

Historicamente, as pesquisas eram direcionadas aos LIAs, e, somente na última década, houve um interesse maior em estudar os LIPs e suas aplicações industriais (ÁLVAREZ et al., 2010a, 2010b, 2011). Há referências na literatura da sua utilização em dispositivos eletroquímicos (GREAVES et al., 2006; MARKUSSON et al., 2007; TANG et al., 2019), corantes para fibras acrílicas (OPWIS et al., 2017), meio de tingimento têxtil (ANDRADE et al., 2017; BARROS et al., 2022), membranas condutoras e trocadoras de prótons (TIGELAAR et al., 2006; MARTINELLI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011), eletrólitos de células de combustível (NODA et al., 2003), separação de biodiesel (WU et al., 2007a), catalisadores (DU et al., 2006; COTA et al., 2014; SERRA et al., 2016), solventes renováveis e biodegradáveis (ZHAO et al., 2007), corrosão de aço carbono (DOS SANTOS et al., 2014), dissolução e renovação de celulose (MEENATCHI et al., 2017), captura de dióxido de carbono (VIJAYARAGHAVAN et al., 2018), pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (PIN et al., 2019), extração de ficobiliproteínas (RODRIGUES et al., 2019), além de outros processos sustentáveis.

Em termos estruturais, os LIPs são formados pela transferência protônica de um ácido



de Brönsted [AH] para uma base de Brönsted [B] para produzir espécies [BH<sup>+</sup>][A<sup>-</sup>] e podem ser produzidos a partir de amins primárias, secundárias e terciárias com ácidos orgânicos ou inorgânicos, apresentando baixo custo e simplicidade de síntese (BICAK, 2005; GREAVES et al. 2006; IGLESIAS et al.; 2008; ÁLVAREZ et al., 2010a). Os LIAs contêm outros substituintes que não o próton, sendo, geralmente, um grupo alquílico e, por isso, tendem a ser lipofílicos, apresentando menor mobilidade no meio ambiente, o que facilita a sua acumulação em organismos de sistemas aquáticos e terrestres, assim como sua biomagnificação através das cadeias alimentares, se ingeridos inadequadamente. Contrariamente a isto, os LIPs são extremamente hidrofílicos e, o que auxilia sua dispersão no meio. Porém não há razões para os LIPs se encontrarem isentos de provocar danos à saúde ou problemas ambientais, havendo necessidade de complementação de informações nesta área (DOCHERTY; KULPA, 2005; PERIC et al., 2013).

## 2.2 (ECO)SEGURANÇA DE LÍQUIDOS IÔNICOS

Existem poucos estudos sobre a ecotoxicidade dos LIs, em sua maioria, direcionados aos LIAs, derivados de grupos catiônicos tais como piridínio e imidazólio. Dos resultados existentes na literatura deduzem-se frequentemente conclusões, até certo ponto, contraditórias, como consequência da utilização de compostos com estruturas moleculares distintas ou de ensaios ecotoxicológicos de diferentes tipologias resultando em comparações pouco confiáveis (DOCHERTY; KULPA, 2005; ZHAO et al., 2007; PERIC et al., 2013; MATSUMOTO et al., 2004a, 2004b; BERNOT et al., 2005a, 2005b; LATALA et al., 2005; COULING et al., 2006; MATSUO et al., 2006; DOCHERTY, DIXON, KULPA, 2007; SALMINEN et al., 2007; STOLTE et al., 2007; PERIC et al., 2011, 2014, 2015; REID et al., 2018).

Segundo Dochert e Kulpa (2005), a toxicidade dos LIAs está diretamente relacionada ao número e ao tamanho dos substituintes do grupo catiônico, sendo que a variação do grupo aniônico não altera significativamente a sua toxicidade. Luis et al. (2007) avaliaram a toxicidade de alguns LIAs por estudos de relações estrutura-atividade quantitativas (*QSAR*) com diferentes grupos catiônicos, sendo que os grupos pirrolidínio, imidazólio e piridínio conferiram cerca de 3 %, 20 % e 33 %, respectivamente, para a toxicidade do composto. Além disso foi observado que cada átomo de carbono adicionado à cadeia nos radicais R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> aumentava a toxicidade em 11 %. Segundo alguns pesquisadores, os LIs de cadeias longas são inclusive mais tóxicos do que solventes clássicos (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno, entre outros) (BERNOT et al., 2005b; CHO et al., 2008) enquanto outros autores indicaram serem

menos tóxicos do que as substâncias citadas (COULING et al., 2006). Porém, isso depende da combinação de cátions e ânions e de suas estruturas, pois cada LI apresenta uma característica específica.

A maioria dos estudos dos LIAs relacionados à toxicidade afirmam que o grupo catiônico é o principal responsável pelo aumento da toxicidade, entretanto, Matzke et al. (2007) observaram que dentre os ânions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ ,  $(\text{CF}_3)_2\text{N}^-$ , sulfato de octila e borato de bis(1,2-benzenodiolato) com o grupo catiônico imidazólio, o efeito tóxico do ânion  $(\text{CF}_3)_2\text{N}^-$  foi significativamente maior do que o do grupo catiônico. Egorova, Gordeev e Ananikov (2017) indicaram que o comportamento e o impacto do grupo aniônico dos LIs dependem da sua interação com as moléculas de água, por exemplo, ânions pequenos e hidrofílicos como  $\text{Cl}^-$  permanecem em solução enquanto ânions hidrofóbicos como  $\text{PF}_6^-$ , formam um filme entre a parte lipídica e a água.

De acordo com o trabalho realizado por Pretti et al. (2009), os LIPs com amônio quaternário apresentam menor toxicidade em organismos aquáticos do que aqueles com anéis aromáticos (piridínio e imidazólio), e, segundo Ferraz et al. (2014), alguns LIs, também de amônio quaternário, apresentaram atividade antibacteriana.

No que tange aos resultados comentados, observam-se claras contradições que, em parte, podem ser atribuídas à utilização de LIs diversos e ensaios ecotoxicológicos distintos. Há uma grande variedade de ensaios que se têm utilizado na avaliação da toxicidade ambiental destes compostos e a maioria deles faz uso de uma única espécie de organismo, aquáticos ou terrestres, na determinação da ecotoxicidade, apesar da sensibilidade dos diferentes organismos ser muito diversa frente aos contaminantes.

Avaliar a toxicidade dos LIs sobre os microrganismos pode ser útil para se conhecer as possibilidades de tratamento de águas residuais mediante sistemas secundários de depuração, que poderiam ser ineficazes devido à toxicidade dos LIs (DOCHERTY, DIXON, KULPA, 2007; AZIMOVA, MORTON, FRYMIER, 2009; PERIC et al., 2013, 2014).

Descrições que geralmente acompanham os LIs são as de solventes versáteis e que causam menos dano ao ambiente, porém, o conhecimento do potencial tóxico que apresentam frente a diferentes organismos e níveis tróficos ainda é limitado, em particular, quando se refere aos LIPs. Usualmente, são citados como “solventes verdes”, entretanto, é necessária cautela, pois os estudos referentes à sua toxicidade, biodegradabilidade e mobilidade no ambiente ainda são escassos (OLIVEIRA et al., 2016; MEKSI, MOUSSA, 2017).

Nos últimos anos, a ideia que se tinha sobre os LIs serem verdes e benignos ao ambiente mudou. Essas afirmações eram justificadas por pressão de vapor desprezível, o que resultaria

na diminuição da emissão atmosférica, por não serem inflamáveis e nem mesmo explosivos. De fato, eles apresentam essas vantagens, porém sem um conhecimento sólido sobre seu comportamento ecotoxicológico, nenhuma justificativa para essa classificação pode ser determinada. Dos estudos presentes na literatura, agora se tem conhecimento que existem LIs com potencial de risco baixo ou alto e isso depende predominantemente de sua estrutura (MATZKE et al., 2010).

Os estudos existentes sobre a ecotoxicidade dos LIs baseiam-se em ensaios com diferentes organismos como as algas (*Oocystis submarine*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Cyclotella meneghiniana* e *Ulva lactuca*); bactérias (*Vibrio fischeri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas hydrophilla* e *Bacillus subtilis*); levedura (*Saccharomyces cerevisiae*); plantas aquática (*Lemna minor*) e terrestre (*Lepidium sativum* - agrião, *Triticum aestivum* L. – trigo, e *Raphanus sativus* - rabanete), entre outros (BUBALO et al., 2017).

Em estudos realizados por Peric et al. (2011) foram feitos ensaios para avaliar a toxicidade de diferentes LIPs de cadeia curta, são eles: formiato de 2-hidroxietanolamina (2-HEAF), propionato de 2-hidroxidietanolamina (2-HDEAPr) e pentanoato de 2-hidroxitrietanolamina (2-HTEAPe); considerando o efeito sobre a emergência de plântulas e crescimento inicial de três plantas terrestres: *Allium cepa* (cebola), *Lolium perenne* (grama) e *Raphanus sativus* (rabanete); o ensaio de transformação do carbono e do nitrogênio no solo; e o perfil biodegradável. Dos LIPs analisados, apenas o 2-HTEAPe mostrou toxicidade à *R. sativus* ( $EC_{50} = 826$  mg/kg) enquanto que os outros LIPs não apresentaram toxicidade à nenhuma planta, com  $EC_{50}$  acima de 1000 mg/kg. Os três LIPs se mostraram não tóxicos em termos de toxicidade crônica para as plantas nos ciclos de carbono e nitrogênio e, também, foram considerados biodegradáveis no solo a partir do ensaio respirométrico e quantificação de poluentes no solo. Então, os autores concluíram que, no geral, compostos com estruturas mais complexas têm uma maior tendência de causar inibição nos organismos testados do que aqueles que apresentam uma estrutura mais simples e menor.

Como há inúmeras possibilidades de combinações entre cátions e ânions para a síntese de LIs, Peric et al. (2015) utilizaram os estudos QSAR para prever a ecotoxicidade de possíveis LIs e os já existentes baseando-se nos ensaios de medição da luminescência da bactéria *V. fischeri*; inibição do crescimento da alga *P. subcapitata* e da planta aquática *Lemna minor*; inibição da acetilcolinesterase e citotoxicidade utilizando células leucêmicas de ratos IPC-81. Foram analisados 55 LIs, dentre eles próticos e apróticos e foi observado que o macrófito *L. minor* foi mais sensível aos LIPs do que aos LIAs, devido à hidrofobicidade dos

primeiros. O estudo *QSAR* se mostrou eficiente em prever a toxicidade dos LIs confirmando que o grupo catiônico dos LIAs tem maior influência pelo aumento da cadeia alquílica. Já para os LIPs, tanto o grupo catiônico quanto o aniônico influenciaram na ecotoxicidade dos compostos e foi com o aumento da cadeia carbônica do ácido no grupo aniônico que foi observada maior influência em três dos cinco ensaios de ecotoxicidade.

Ghanem et al. (2017) também utilizaram os estudos *QSAR*, pelo modelo de Regressão Linear Múltipla, para avaliar a toxicidade de 110 LIs frente a bactéria bioluminescente *V. fischeri*, sendo este o organismo mais estudado para avaliar a toxicidade de LIs em meio aquático. Foi constatado que o comprimento da cadeia alquílica influencia no aumento da toxicidade. Além disso, o modelo foi capaz de distinguir entre o menor e o maior efeito dos ânions hidrofílicos e hidrofóbicos, respectivamente.

Há alguns estudos na literatura que demonstraram que a maioria dos LIPs que são classificados como biodegradáveis, são aqueles sintetizados a partir de análogos da colina que é um cátion orgânico, nutriente essencial que faz parte do complexo B de vitaminas. Então, a sua baixa toxicidade e apropriada biodegradabilidade ainda diz respeito a um número limitado de compostos químicos, mas que, no geral, combinando suas propriedades e vantagens, são alternativas benéficas ambientais considerando essa classe de LIs (PERIC et al., 2013; JORDAN, GATHERGOOD, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

Oliveira et al. (2016) avaliaram quatro LIPs, acetato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio (m-2-HEAA), propionato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio (m-2-HEAPr), butirato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio (m-2-HEAB) e pentanoato de N-metil-2-hidroxi-etilamônio (m-2-HEAP), em relação à atividade contra fungos e bactérias (*E. coli*, *S. aureus*, *Fusarium* sp. e *Candida albicans*); à inibição de luminescência da bactéria *V. fischeri*; à fitotoxicidade de sementes de alface (*Lactuca sativa*); e à sua biodegradabilidade pela demanda química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO, respectivamente). Foi constatado que, no geral, o alongamento da cadeia alquílica dos LIPs aumentou o impacto negativo destes compostos para os vários microrganismos testados. Foi verificado, também, a baixa toxicidade dos LIPs testados na bactéria marinha (*V. fischeri*), e este mesmo efeito não foi verificado para todos os microrganismos estudados, em particular para levedura e fungo (*C. albicans* e *Fusarium* sp.), cujo efeito de alguns LIPs foi ainda mais pronunciado que o efeito promovido pelo antibiótico utilizado como controle positivo. A partir dos resultados, foi possível concluir que o m-2-HEAPr e o m-2-HEAP representaram os LIPs menos tóxicos e quanto à sua biodegradabilidade, os quatro LIs testados apresentaram baixa biodegradabilidade.

Sardar et al. (2018) avaliaram indiretamente o impacto da ecotoxicidade de quatro LIPs canforsulfonados com diferentes cátions (2-metil-imidazólio – [2MeimPS][CS], 2-etil-imidazólio – [2EteimPS][CS], 2-fenil-imidazólio – [2PhimPS][CS] e 2-benzil-imidazólio – [BnzimPS][CS]) pela atividade antimicrobiana frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *A. hydrophilla* através do método de concentração inibitória mínima (MIC). Todos os LIPs indicaram atividade antimicrobiana nos microrganismos testados. Os LIPs de maior cadeia carbônica apresentaram maior efeito antibacteriano, seguindo esta ordem: [BnzimPS][CS] > [2PhimPS][CS] > [2EteimPS][CS] > [2MeimPS][CS].

Os estudos aqui apresentados mostraram informações úteis sobre a ecotoxicidade de alguns LIs, porém devido ao grande número de combinações possíveis entre cátions e ânions e propriedades distintas, é necessária a realização de mais ensaios toxicológicos para poder estabelecer comparações entre os LIs convencionais e os recentemente desenvolvidos, a fim de encontrar aqueles que sejam capazes de gerar menor impacto ambiental e humano.

### 2.3 LÍQUIDOS IÔNICOS E A SEGURANÇA AOS SERES HUMANOS

Como já mencionado anteriormente, alguns trabalhos foram desenvolvidos relacionados à toxicidade dos LIs no meio ambiente, porém os potenciais efeitos tóxicos à saúde humana foram pouco investigados, contendo apenas algumas referências na literatura. Dada a grande diversidade de LIs, cabe esperar que eles apresentem comportamentos ambientais e toxicológicos distintos, a depender de sua natureza, tornando necessária a condução de estudos específicos. A atividade biológica das substâncias pode ser alterada em função das suas características, como o tamanho da cadeia alquílica que apresentam (PERIC et al., 2011; EGOROVA, ANANIKOV, 2014).

Um mecanismo importante para avaliar a toxicidade de um composto é pela inibição enzimática. Neste contexto, existem alguns estudos na literatura sobre a inibição da acetilcolinesterase pelos LIs (MATZKE et al., 2007; RANKE et al., 2007; TORRECILLA et al., 2009; ZAMFIR, ROTARIU, BALA, 2013; CHO, YUN, 2016; KUMAR, KUMAR, 2020, LI et al., 2022), adenosina desaminase (SKLADANOWSKI et al., 2005, MASOOMEH, DAVOOD, MARYAM, 2011; AJLOO et al., 2013) e no sistema enzimático antioxidante de fígado de camundongo (YU et al., 2008).

A enzima acetilcolinesterase atua na resposta e função nervosa, além de catalisar a hidrólise de ésteres da colina com especificidade relativa para acetilcolina, que é um neurotransmissor comum em muitas sinapses do sistema nervoso dos mamíferos

(MASSOULIÉ et al., 1993; FULTON, KEY, 2001). Portanto, a inibição desta enzima acarreta em vários efeitos adversos nos processos neurais e, até mesmo, doenças cardíacas ou miastenia em humanos (CHEMNITIUS et al., 1999; POPE, KARANTH, LIU, 2005).

Ranke et al. (2007) avaliaram a inibição da acetilcolinesterase de uma grande variedade de LIs, 292 compostos. Foi constatado que o grupo catiônico foi o responsável pela inibição enzimática, principalmente, daqueles LIs que continham cátions piridínio e, também, causaram maior efeito inibitório do que os LIs formados por cátions imidazólio. Os LIs contendo cátions de fosfônio apresentaram menor efeito inibitório. Já o grupo aniônico não causou a inibição enzimática pois as interações com o sítio ativo desta enzima são limitadas.

A adenosina desaminase é uma enzima envolvida no metabolismo das purinas para produção do ácido úrico. Em humanos, esta enzima é encontrada em altos níveis, principalmente, em órgãos linfoides, tais como baço, timo e linfonodos. Como ela é essencial para a manutenção de linfócitos saudáveis, a sua inibição provoca um mal funcionamento do sistema imunológico (SILVA et al., 2016). Skladanowski et al. (2005) avaliaram a inibição desta enzima por alguns LIs contendo o cátion imidazólio. Os resultados demonstraram que os cátions imidazólio associados com os ânions  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ , p-toluenossulfonato e  $\text{Cl}^-$  causaram inibição da atividade enzimática de forma dose-dependente e os LIs contendo fluoreto apresentaram maior efeito inibitório.

Yu et al. (2008) avaliaram o efeito inibitório das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase de um LI contendo o cátion imidazólio e o ânion brometo ( $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ ). Estas enzimas são importantes na manutenção do sistema antioxidante do organismo. Os resultados apontaram que a administração de 35,7 mg/Kg de  $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$  causou danos e modificou a atividade enzimática no fígado de camundongos.

Em estudo realizado por Cunha et al. (2013) foi desenvolvido um ensaio de atividade carboxilesterase automatizada para prever a toxicidade de LIs para a saúde humana. Para isso, foi implementado um sistema de análise de injeção sequencial (SIA) baseado na hidrólise do acetato de 4-metilumbeliferil pela enzima carboxilesterase para produzir o composto fluorescente 4-metilumbeliferona, método este fundamentado em ensaios de ação/inibição na qual a redução da atividade enzimática foi indicada pela diminuição da fluorescência. Foram analisados sete líquidos iônicos comerciais e dentre eles o mais tóxico foi metanossulfonato de tetrametilfosfônio ( $\text{tbph}[\text{Ms}]$ ) e o menos tóxico, metanossulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio ( $\text{emim}[\text{Ms}]$ ).

Costa et al. (2016) avaliaram a redução da atividade da enzima citocromo c oxidase (ou

complexo IV) na presença de 15 LIs com grupos catiônicos, cadeias alquílicas e ânions distintos. Esta enzima participa da cadeia respiratória e é encontrada em membrana citoplasmática de bactéria e na mitocôndria de mamíferos, catalisando a transferência de elétrons do citocromo C para a molécula de oxigênio, promovendo energia para a célula. Foi constatado que houve considerável inibição da enzima pelo ânion  $\text{BF}_4^-$  e pelos LIs incorporados por grupos de cátions pirrolidínio e tetrabutílfosfônico. Já os grupamentos colina e acetato apresentaram baixo efeito negativo sobre a atividade enzimática, demonstrando que a estrutura dos LIs influencia quanto à toxicidade, especificamente os grupos catiônicos, cadeias alquílicas laterais e ânions.

Os LIs também podem não danificar algumas enzimas digestivas, como foi constatado por Bisht e Venkatesu (2017). Em seu estudo, alguns LIs a base de colina foram sugeridos para utilização como estabilizadores da enzima quimotripsina, pois eles protegeram a sua estrutura enzimática contra a desnaturação térmica. Além disso os LIs  $[\text{Chol}][\text{OAc}]$ ,  $[\text{Chol}][\text{Cl}]$  e  $[\text{Chol}][\text{H}_2\text{PO}_4]$  promoveram tanto a estabilização da enzima quanto a manutenção da sua atividade. Em outro estudo realizado por Fan et al. (2018), LIs a base de amônio e imidazólio inibiram a enzima tripsina, mas essa inibição foi reversível após a remoção dos LIs e a enzima pôde recuperar a sua atividade.

Outra forma de avaliar a toxicidade dos LIs é pelo estudo *in vitro* da citotoxicidade, podendo ser as primeiras evidências do seu impacto no organismo. Estes ensaios apresentam vantagem com relação ao tempo de ensaio e fácil manipulação quando comparados aos estudos *in vivo* em organismos multicelulares (EGOROVA, ANANIKOV, 2017). Entretanto, os efeitos dos LIs em diferentes culturas celulares ainda é uma área a ser mais investigada (EGOROVA, ANANIKOV, 2018a) e objetivo do presente estudo.

Stepnowski et al. (2004) avaliaram a viabilidade de células epiteliais de carcinoma (HeLa) submetidas a tratamento com LIs compostos por cátions imidazólio pelo método colorimétrico de sal monossódico de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-dissulfofenil)-2H-tetrazólio (WST-1). Foi constatado que a toxicidade dos compostos contendo 1-n-butílimidazólio depende diretamente da associação com o grupo aniônico e, neste caso, os valores de  $\text{EC}_{50}$  (concentração efetiva para inviabilizar 50 % das células) do composto contendo  $\text{BF}_4^-$  foram menores, ou seja, foi mais tóxico às células. O aumento da cadeia carbônica das cadeias metílicas, etílicas ou n-hexílicas não influenciou na redução dos valores de  $\text{EC}_{50}$ , somente o LI com a cadeia n-decila, o de maior cadeia carbônica, teve um valor menor de  $\text{EC}_{50}$  do que aquele com cadeia n-butílica e, também, teve maior hidrofobicidade. Além disso, as concentrações efetivas das amostras analisadas em células HeLa foram menores que os valores obtidos para solventes convencionais como diclorometano, tolueno e xileno.

Ainda sobre as células HeLa, Xia et al. (2018) analisaram a toxicidade, viabilidade celular, genotoxicidade, estresse oxidativo e apoptose dessa linhagem celular exposta ao LI cloreto de 1-hexadecil-3-metilimidazólio ( $[C_{16}mim]Cl$ ). Foi verificado que a amostra inibiu ou diminuiu crescimento celular, bem como induziu apoptose e causou danos ao DNA, inibiu a atividade da enzima superóxido dismutase, diminuiu o índice de glutathione, sendo este um importante antioxidante do sistema de defesa antioxidante do organismo; e aumento dos níveis de malondialdeído, que é um dos produtos da peroxidação lipídica, nas células HeLa. Os resultados demonstraram que o  $[C_{16}mim]Cl$  não pode ser classificado como solvente verde, pois induziu o estresse oxidativo, a genotoxicidade e apoptose nessa linhagem celular. Wan et al. (2018) também avaliaram esse mesmo LI frente às células HepG2, células metabolizadoras. Os resultados indicaram o mesmo comportamento, pois este LI promoveu a genotoxicidade, o estresse oxidativo e apoptose nesta linhagem celular.

Frade et al. (2009) avaliaram a citotoxicidade de células de câncer de cólon humano (CaCo-2) tratadas com mais de oitenta LIs com diferentes classes de cátions compostos por grupos imidazólio, guanidínio, amônio, fosfônio, piridínio e pirrolidíneo e diferentes ânions como  $Cl^-$ ,  $I^-$ ,  $BF_4^-$ ,  $FeCl_4^-$ , entre outros. No geral, foi observado que a toxicidade do cátion aumenta quanto maior for sua cadeia alquílica. Grupos benzila demonstraram-se tóxicos, mas quando grupos carboxila foram introduzidos, houve grande diminuição da toxicidade. Foi constatado, também, que a introdução de um éter na dimetil-guanidina diminuiu a toxicidade desse cátion. O tipo do ânion também pode afetar diretamente a toxicidade do LI, e alguns apresentaram maior impacto do que outros, como os ânions bistriflimida (NTf<sub>2</sub>) e dicloanoamida (DCA).

Outro estudo foi realizado por Kumar et al. (2009) em relação à toxicidade de LIs com aplicação em extração de metais, em linhagem de células de câncer de mama (MCF7). Os LIs foram baseados na combinação entre diferentes cátions (piridíneo, pirrolidíneo, piperidíneo ou imidazólio com tamanhos diferentes de cadeias alquílicas) e ânions como o brometo, bistriflimida, entre outros. Foi observado que a toxicidade depende significativamente da natureza dos cátions e ânions da estrutura do LI, principalmente para os cátions de cadeia alquílica longa. Os LIs com função específica, avaliados neste estudo, apresentaram-se menos tóxicos que os LIs clássicos.

Knudsen et al. (2009) caracterizaram os efeitos de dose e via de administração do cloreto de 1-butil-1-metilpirrolidínio (BmPy-Cl) em ratos machos. Em suma, foi constatado que o BmPy-Cl é moderadamente absorvido, excretado pelos rins e eliminado pela urina como composto de origem independente da dose administrada, número ou via de administração,



indicando que pode funcionar como substrato e/ou inibidor dos transportadores de cátions orgânicos no organismo.

Kaushik et al. (2012) sintetizaram LIs contendo cátions de amônio e imidazólio e os avaliaram em células normais e células de tumores cerebrais. Para isto, utilizaram o método MTT. Os resultados demonstraram potente efeito inibitório das células tumorais (T98G), contudo baixa toxicidade às células normais (HEK).

Reid et al. (2015) avaliaram a mutagenicidade de 16 LIPs com ânions de cloreto e carboxilato e, também, cátions de amônio secundário e terciário pelo teste de Ames, que detecta mutações em cepas *Salmonella typhimurium*, como as TA98 e TA100, que restauram a síntese do aminoácido histidina e, conseqüentemente, a bactéria que sofreu mutação é identificada pela sua habilidade em crescer na ausência deste aminoácido essencial. Apesar de ser um teste *in vitro*, mesmo não sendo absoluta a correlação de resultados para afirmar que uma amostra é mutagênica e, posteriormente, carcinogênica em mamíferos, muitos compostos que são positivos no teste de Ames, são, também, cancerígenos em mamíferos. Dos 16 LIPs testados, 15 apresentaram resultados negativos para o teste, não demonstrando ser mutagênicos ou carcinogênicos. O único LIP que não foi possível avaliar o potencial mutagênico, foi o octanoato de N,N-dimetiletanolamônio ([DMEtA][Oct]), pois foi tóxico para as duas cepas testadas.

Larangeira et al. (2016) avaliaram a genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade de carotenoides extraídos de tomates pelo LI cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio utilizando modelo experimental *in vivo*. Foram avaliados 4 grupos, o grupo controle (não tratado), o grupo tratado com 10 mg de carotenoides extraídos pelo LI, outro grupo tratado com 500 mg desses carotenoides, 10 vezes maior que a dose recomendada para humanos, e o grupo tratado somente com o LI. O fígado dos ratos tratados com o LI apresentou mudanças histopatológicas moderadas. Foram encontrados danos no DNA em células de sangue periférico e de fígado nos grupos tratados com 500 mg de carotenoides e com o LI. Foram detectados um aumento de células mononucleadas e imunopositivas 8-OhDG, evidenciando os níveis de dano oxidativo no DNA, nos ratos tratados com 500 mg de carotenoides. Em suma, os resultados demonstraram que a dose de carotenoides extraídos pelo LI recomendada para humanos (10 mg) não induziu a genotoxicidade, a mutagenicidade e a citotoxicidade em alguns órgãos de ratos.

Iqbal et al. (2017) utilizaram o LI acetato de 1-metilimidazólio ([Mim]Ac) para a preparação de hidrogéis com colágeno e alginato para aplicação em feridas. Foram realizadas análises de atividade antibacteriana pelo método de disco-difusão contra a bactéria *Streptococcus mutans*, e, também, de citotoxicidade utilizando células-tronco mesenquimais de

rato (rMSC) pelo método do MTT. Foi observado que houveram zonas de inibição da bactéria *S. mutans* com os hidrogéis carregados com os fármacos. No ensaio de viabilidade celular não foi observado nenhuma alteração na capacidade de proliferação das células rMSC, indicando, portanto, que os hidrogéis preparados com o LI não foram tóxicos.

Em outro estudo realizado por Hwang et al. (2018), sete LIs (1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometanosulfonil)imida - [EMIM][TFSI]; hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazólio - [EMIM][PF<sub>6</sub>]; tetrafluoroborato de 1-etil-3-metilimidazólio - [EMIM][BF<sub>4</sub>]; dicianamido de 1-etil-3-metilimidazólio - [EMIM][DCA]; bis(trifluorometanosulfonil)imida de 1-butil-1-metilpirrolidina - [BMPY][TFSI]; bis(trifluorometanosulfonil)imida de tributimetilamônio - [TBA][TFSI]; e di[bis(trifluorometanosulfonil)imida de zinco - [Zn][TFSI]<sub>2</sub>) foram avaliados quanto à citotoxicidade em queratinócitos e fibroblastos de pele (HaCat e Hs68) pelo ensaio do MTT. No geral, os líquidos compostos por [TFSI] apresentaram maior toxicidade do que o restante, e uma citotoxicidade significativa foi encontrada nos [EMIM][TFSI] e [BMPY][TFSI], semelhante à toxicidade do solvente xileno, utilizado para efeito comparativo.

Alguns dados recentes da literatura, como já foi constatado neste trabalho, demonstraram que os LIs podem apresentar toxicidade. Como alternativa, estão sendo estudados alguns biocompostos de fontes naturais, por exemplo, colina, aminoácidos e ácidos orgânicos para a síntese desses líquidos, bem como substâncias com propriedades benéficas à saúde humana já reconhecidas, como a vitamina C (NIEMCZAK et al., 2019) e o ibuprofeno (WU et al., 2019). Isto demonstra que há evidências de que LIs com baixa ou nenhuma toxicidade podem ser sintetizados, podendo até mesmo serem utilizados em indústrias de alimentos (HIJO et al., 2016). Portanto, alguns grupos de pesquisa já se dedicam ao desenvolvimento de LIs de baixa toxicidade, visando as aplicações biológicas e farmacêuticas (SARDAR et al., 2018) e, para esta finalidade, reconhecer os fatores que interferem neste efeito é fundamental, como é o caso da identificação dos grupamentos mais ou menos tóxicos que podem ser empregados.

A análise da literatura demonstrou um baixo número de estudos sobre LIs voltados à toxicidade para os seres humanos. Nas poucas pesquisas encontradas, foi possível observar que a toxicidade dos LIs depende diretamente da natureza do cátion ou ânion da estrutura. A toxicologia dos LIs é uma área consideravelmente nova e esses solventes tão versáteis que apresentam uma grande variedade de propriedades e aplicações devem ser mais estudados quanto à elucidação dos riscos à saúde humana, já que apresentam inúmeras vantagens. Esta necessidade de estudos de base toxicológica dos LIs aumenta com os avanços nas pesquisas para aplicações biológicas dos mesmos, um exemplo destas aplicações é o uso como agente

anticâncer. Esta aplicação foi pioneiramente avaliada por Kumer et al. (2019) utilizando a química computacional e por Bansode et al. (2019) que detectaram efeitos em células de câncer de mama (MCF-7), inclusive semelhantes à doxorubicina.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo estudar a segurança de líquidos iônicos próticos aos seres humanos através de bioensaios *in vitro* visando obter mais informações a respeito da viabilidade em utilizá-los como substitutos aos solventes convencionalmente empregados no setor industrial. Também visou avaliar possíveis aplicações biológicas dos líquidos iônicos próticos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Sintetizar líquidos iônicos próticos;
- Realizar ensaios de citotoxicidade *in vitro* dos líquidos iônicos próticos, em diferentes linhagens celulares humanas;
- Observar o comportamento da morfologia celular de linhagens humanas quando expostas aos líquidos iônicos próticos;
- Realizar ensaio *in vitro* de irritação ocular dos líquidos iônicos próticos;
- Realizar ensaio de cicatrização *in vitro* com os líquidos iônicos próticos;
- Realizar avaliação de imagem com auxílio de *software*.

### **4 METODOLOGIA**

#### **4.1 SÍNTESE DOS LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS**

Como previamente explicado neste trabalho, com base em dados da literatura, os LIPs tendem a ter menores chances de causar efeitos tóxicos à saúde humana em comparação aos LIAs, devido à menor tendência em acumular-se em adiposidades e ultrapassar barreiras biológicas. Portanto, foram os escolhidos para a realização deste estudo.

Os reagentes utilizados na preparação dos LIPs foram fornecidos por Synth®, com qualidade de alta pureza e armazenados em condições de baixa umidade e temperatura constante. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e a água empregada foi

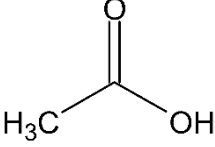
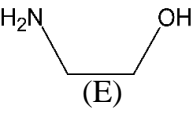
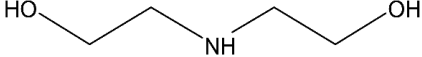
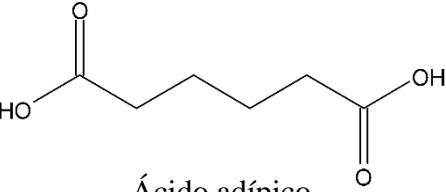
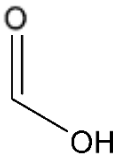
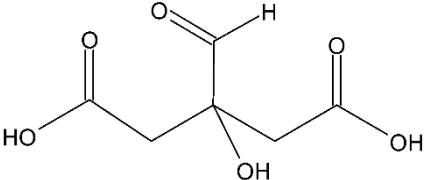
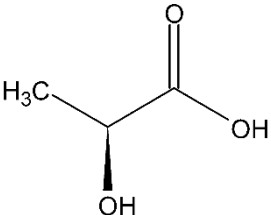
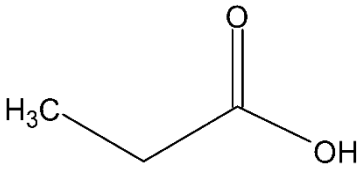
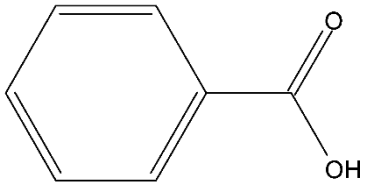
destilada.

A síntese dos LIPs se baseou na reação de Brønsted entre ácidos e bases indicados na Tabela 1, de acordo com a metodologia descrita por Álvarez et al. (2010a). Neste trabalho foi realizada a síntese de quatro LIPs (2-HDEAF, 2-HDEAOx, 2-HDEASu e 2-HDEAPr), enquanto que os demais foram cedidos pelo grupo de pesquisa, previamente sintetizados e caracterizados (ANDRADE et al, 2016; CAMARGO et al., 2016; KULHAVY et al., 2016; ANDRADE, CARRERAS, IGLESIAS, 2017, ANDRADE et al. 2017; BARROS, ANDRADE, IGLESIAS, 2018; ZANONI et al., 2018).

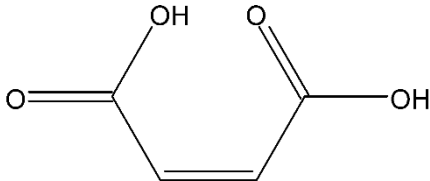
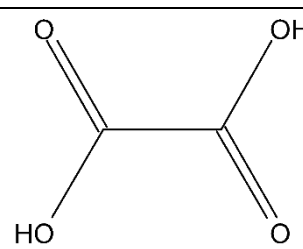
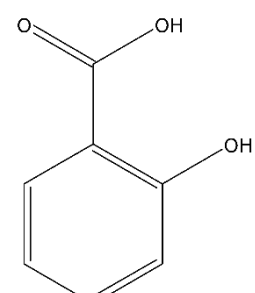
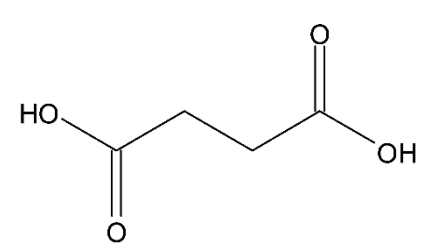
Para a síntese dos LIPs de etanolamina e dietanolamina, de teor maior que 98,0 %, estas foram colocadas num balão de três bocas em banho de gelo equipado com um condensador de refluxo, um sensor de temperatura PT- 100 e um funil de gotejamento. O ácido orgânico (> 98,0 %) foi adicionado gota a gota, lentamente, ao balão sob agitação mecânica. A agitação foi continuada durante 24 h à temperatura ambiente (cerca de 28 °C), para garantir uma reação completa e a fim de se obter um líquido viscoso final. As quantidades de ácido e base foram calculadas estequiometricamente a partir de suas estruturas químicas e massas moleculares.

Estas reações são altamente exotérmicas, então, foi necessário realizar um resfriamento adequado para que a reação fosse completa. Caso contrário, o aumento da temperatura poderia produzir a desidratação do sal para originar a amina correspondente como no caso dos sais de nylon (sais de diaminas com ácidos dicarboxílicos). Após a finalização do processo de reação, foi realizado o processo de purificação em que os LIPs sintetizados foram submetidos a leve aquecimento (aproximadamente 50 °C) para remoção do composto que não reagiu e, também, da umidade adquirida por serem altamente higroscópicos. O procedimento de síntese completo foi descrito em trabalhos anteriores (ÁLVAREZ et al., 2010a, 2010b).

**Tabela 1.** Ácidos e bases de Brönsted utilizados para a síntese dos líquidos iônicos próticos.

Ácidos carboxílicos	Etanolamina (E) e/ou Dietanolamina (DE)	Líquido Iônico Prótico
 Ácido acético	 (E)	Acetato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEAA)
	 (DE)	Acetato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEAA)
 Ácido adípico	(E)	Adipato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEAA <sub>d</sub> )
	(DE)	Adipato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEAA <sub>d</sub> )
 Ácido fórmico	(E)	Formiato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEAF)
	(DE)	Formiato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEAF)
 Ácido cítrico	(E)	Citrato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEACi)
	(DE)	Citrato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEACi)
 Ácido láctico	(E)	Lactato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEAL)
	(DE)	Lactato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEAL)
 Ácido propanóico	(E)	Propionato de 2-hidroxi-etanolamina (2-HEAPr)
	(DE)	Propionato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEAPr)
 Ácido benzóico	(DE)	Benzoato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEABe)

**Tabela 1.** Ácidos e bases de Brönsted utilizados para a síntese dos líquidos iônicos próticos.

Ácidos carboxílicos	Etanolamina (E) e/ou Dietanolamina (DE)	Líquido Iônico Prótico
 <p>Ácido maleico</p>	(DE)	Maleato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEAMa)
 <p>Ácido oxálico</p>	(DE)	Oxalato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEAOx)
 <p>Ácido salicílico</p>	(DE)	Salicilato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEASa)
 <p>Ácido succínico</p>	(DE)	Succinato de 2-hidroxi-dietanolamina (2-HDEASu)

Nota: E = etanolamina. DE = dietanolamina.

#### 4.2 ENSAIO *IN VITRO* DE CITOTOXICIDADE

Para a avaliação da citotoxicidade dos 17 LIPs foi utilizado o ensaio do MTT, que tem como princípio determinar a habilidade de células vivas em reduzir justamente a molécula de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), formando cristais insolúveis de formazana. O MTT apresenta coloração amarelada, que é convertida à violeta após a redução por células vivas. É a formação da coloração violeta, que é medida

espectrofotometricamente, que indica a porcentagem de células viáveis após o tratamento com o composto de interesse.

Linhas de células humanas foram empregadas na condução deste estudo, como forma de atingir o objetivo proposto. Os ensaios foram realizados em células de hepatoma humano (HepG2) que possuem a capacidade de metabolização de xenobióticos, e em queratinócitos humanos (HaCat) e fibroblastos humanos primários (HDFa), ambos encontrados na pele, além de no caso dos fibroblastos, serem células amplamente distribuídas no corpo humano no tecido conjuntivo.

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram incubadas a  $37 \pm 2$  °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células com confluência de 80 a 90 % foram tripsinizadas. A atividade da tripsina foi interrompida pela neutralização com DMEM adicionado de soro fetal bovino e a suspensão de células foi centrifugada a 1.500 rpm por 3 min. Em seguida, as células foram semeadas em placas de 96 poços com densidade celular de  $4,0 \times 10^5$  células/mL.

As placas foram incubadas por 24 h para a completa adesão celular. Em seguida, as células foram tratadas com 100 µL de controle positivo (DMSO 10 % em DMEM sem soro fetal bovino), controle negativo (DMEM sem soro fetal bovino) e diferentes concentrações de cada LIP. Após 24 h, o tratamento foi removido e os poços foram lavados com solução salina tamponada de fosfato (PBS) (BRUGGINSSER et al., 2002). Em seguida, foram adicionados 100 µL de MTT (1,0 mg/mL em PBS) a cada poço. As placas foram incubadas a  $37 \pm 2$  °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana (entre 3 a 5 h). A solução de MTT foi retirada da placa e, para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µL de álcool isopropílico foram adicionados a cada poço. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Espectrofotômetro de Microplacas Epoch BioTek®) a 595 nm. Foram realizados 3 experimentos independentes e, em cada experimento, o tratamento foi feito em triplicata.

O cálculo da porcentagem de viabilidade celular está representado na Equação 1. O resultado corresponde à citotoxicidade de cada tratamento, como proposto por Zhang et al. (2004).

$$\%VC = 100 - \left( \left( \frac{Abs_{CN} - Abs_{AM}}{Abs_{CN}} \right) \times 100 \right) \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

%VC – porcentagem de viabilidade celular;

Abs<sub>CN</sub> – absorbância do controle negativo;

Abs<sub>AM</sub> – absorbância do tratamento com a amostra.

A partir dos valores de %VC, foi possível encontrar a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50 % de cada LIP, ou seja, os valores de CI<sub>50</sub>.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS LIPs

Estudos de avaliação da morfologia celular utilizando microscópio invertido foram realizados para visualizar o comportamento da linhagem HaCat em contato com cada LIP. Para isso, as células foram semeadas em microplaca de 96 poços (300 µL para cada poço) e incubadas durante 24 h a 37 ± 2 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Após a sua adesão, as células foram tratadas com os LIPs na mesma concentração dos valores de CI<sub>50</sub> (concentração necessária para reduzir em 50 % a viabilidade celular) obtidos no ensaio de citotoxicidade (item 5.2). O objetivo foi observar alterações morfológicas tanto no controle (apenas meio de cultura) quanto nas células tratadas com os diferentes LIPs, utilizando o microscópio invertido Binocular Primostar Carl Zeiss® com 40 x de aumento. As fotomicrografias foram capturadas durante 8 h de exposição das células aos LIPs (GEORGE et al., 2012).

#### 4.4 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR (HET-CAM)

O ensaio de irritação ocular foi realizado em membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha (método HET-CAM, *hen's egg test chorionallantoic membrane*). Os ovos foram incubados em posição horizontal a 37,0 ± 0,5 °C por 10 dias. Após a incubação, cada ovo foi removido individualmente da incubadora e colocado em um suporte. A casca foi removida logo acima da linha marcada da membrana cório-alantoide (CAM). Uma vez que esta parte da casca foi retirada, a membrana interna que está diretamente em contato com a CAM, foi cuidadosamente removida utilizando uma pinça, sem causar danos nos vasos sanguíneos, para, assim, revelar a membrana cório-alantoide abaixo. Uma alíquota de 200 µL dos LIPs puros foi colocada em contato com a membrana durante 300s. Após este período, fotografias



foram tiradas para registrar e avaliar a ocorrência de hiperemia, hemorragia e coagulação em diferentes tempos (0s, 30s, 120s e 300s após a aplicação da amostra) e quaisquer efeitos foram comparados ao controle negativo (solução de tampão fosfato, PBS) e ao controle positivo (solução de hidróxido de sódio 1,0 M). Para cada solução testada foi atribuída uma pontuação, dependendo da intensidade das alterações visíveis (Tabelas 2 e 3), graduadas de acordo com o JOURNAL..., (1996). Todas as amostras foram analisadas em quadruplicata e, a partir da pontuação de cada replicata, foi calculada a média.

**Tabela 2.** Escala de pontuação para as mudanças observadas na membrana cório-alantoide do ovo embrionado de galinha no ensaio HET-CAM.

Efeito	Tempo (s)		
	≤ 30	30 < t ≤ 120	120 < t ≤ 300
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação/Opacidade	9	7	5

Fonte: Adaptado de *Journal Officiel de la République Française* (1996).

**Tabela 3.** Escala de pontuação quanto ao potencial de irritabilidade no ensaio HET-CAM.

Pontuação	Classificação
0,0 a 0,9	Não irritante (NI)
1,0 a 4,9	Irritante leve (IL)
5,0 a 8,9	Irritante moderado (IM)
9,0 a 21,0	Irritante severo (S)

Fonte: Adaptado de *Journal Officiel de la République Française* (1996).

A fim de assegurar e tornar os resultados mais detalhados e robustos, as fotografias foram analisadas utilizando os *softwares* gratuitos Photoscape versão 3.6 e ImageJ versão 1.51k para quantificar o dano vascular, seguindo o método descrito por McKenzie et al. (2015) com algumas modificações. Para isso, as imagens da CAM foram carregadas no Photoscape e convertidas em escala de cinza. Para quantificar a extensão de qualquer hiperemia, hemorragia ou coagulação, as imagens pré-tratadas foram carregadas no ImageJ. Para avaliar os valores de escala de cinza em pixel, um quadrado de área de 25 in<sup>2</sup> foi desenhado cuidadosamente na área apropriada para excluir artefatos, como a casca do ovo ou alguma possível desfocalização. O perfil da variação dos valores da escala de cinza ao longo da área selecionada foi obtido pelo comando ‘*Analyse > Plot Profile*’. Após, foi selecionada a opção no menu “*List*” e os valores foram exportados para o *software* Prism 5 versão 5.01.

#### 4.5 ENSAIO *IN VITRO* DE MIGRAÇÃO CELULAR (*SCRATCH ASSAY*)

Visando complementar os dados de segurança e buscando uma aplicação biológica dos LIPs, a capacidade destes líquidos em induzir a cicatrização foi avaliada com base no ensaio de migração celular descrito por Walter et al. (2010) com algumas modificações. Este ensaio tem o potencial de avaliar vários fatores envolvidos no processo de cicatrização, incluindo a formação de um novo tecido, migração e proliferação celular *in vitro* (FRONZA et al., 2009; ZUBAIR et al., 2012).

O teste se baseia na formação de uma fenda em monocamada confluyente de células e avaliação do comportamento de proliferação e migração celular. Neste estudo, portanto, após a formação da fenda na monocamada de células HDFa e o tratamento com os LIPs, foram realizadas capturas de imagens em diferentes tempos até o reestabelecimento do contato célula-célula (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Sendo assim, inicialmente, as células HDFa foram semeadas em placas de 24 poços com concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. Após 24h de incubação a  $37 \pm 2$  °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, para total adesão celular, foi realizada um risco linear (fenda) na monocamada de células, utilizando uma ponteira de micropipeta p200. Em seguida, o meio de cultura DMEM foi removido (juntamente com o resíduo de células deslocadas) e os poços lavados por uma vez com PBS. Após, os tratamentos tanto do controle negativo (apenas DMEM) e dos LIPs 2-HDEAPr, 2-HDEASu, 2-HDEAOx e 2-HDEAF foram adicionados e as concentrações utilizadas foram 31,66 mM; 55,07 mM; 19,39 mM; e 62,24 mM, respectivamente. Estas concentrações foram baseadas nos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade a fim de selecionar a concentração que não houve morte celular considerável, ou seja, abaixo do CI<sub>50</sub>.

O progresso da migração celular foi monitorado a partir das fotomicrografias nos tempos de 0 h, 4 h, 8 h e 24 h após a realização da fenda. O tempo de análise foi estipulado para que compreendesse ao mesmo período do ensaio de citotoxicidade na etapa do tratamento com as amostras, que ocorreu durante 24h (item 4.2). As imagens foram analisadas utilizando o *software* ImageJ versão 1.51k, de modo que foi determinada a porcentagem de fechamento a partir de pontos pré-determinados ao longo da largura de cada risco (três linhas horizontais que compreenderam a parte superior, central e inferior) (COLLINS, 2007). A largura da fenda equivalente a 100% foi determinada no tempo 0 h ( $L_0$ ).

O experimento foi realizado em quadruplicata e o valor da migração das células em porcentagem foi obtido através da Equação 2.

$$\%Mic = 100 - \left( \left( \frac{L_n}{L_0} \right) \times 100 \right) \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

%Mic – porcentagem de migração celular;

$L_0$  – largura da fenda no tempo 0 h;

$L_n$  – largura da fenda nos tempos 4 h, 8 h ou 24 h.

A fim de assegurar os resultados obtidos por observação visual e pela análise da porcentagem de fechamento da fenda, as fotografias do controle negativo e do LIP que apresentou melhor potencial de cicatrização, também foram analisadas pelo *software* ImageJ a fim de quantificar a quantidade de pixels em uma distância pré-determinada baseando-se no método descrito por McKenzie et al. (2015) com algumas modificações. Para isso, as fotografias em formato “.tif” foram convertidas em branco e preto e o seu tamanho ajustado para excluir da imagem artefatos, como alguma possível desfocalização e também para evidenciar somente a parte da fenda na monocamada celular. Neste caso, as células, na escala de cinza, representam a escala mais escura (valores de escala de cinza menores), enquanto que o risco na monocamada de células representa a escala mais clara (valores de escala de cinza maiores). Para avaliar o perfil da variação de escala de cinza foi utilizado o método descrito item 4.4, nos tempos 0h, 4h, 8h e 24h.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE DOS LÍQUIDOS IÔNICOS PRÓTICOS

Os LIPs apresentaram coloração amarela, que pode ser clara ou mais intensa (Figura 4). Nenhum cristal sólido, precipitação ou alteração de cor foram observados após o processo de purificação e posterior armazenamento por mais de 12 meses nas condições de laboratório, evidenciando a sua estabilidade física.

**Figura 4.** Aparência dos líquidos iônicos próticos.



## 5.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE

As concentrações de todas as amostras avaliadas quanto à citotoxicidade variaram entre 0,16 % e 7,00 % (v/v), sendo que, esses valores abrangeram as regiões de viabilidade celular para se ter um perfil de comportamento das células, desde 100 % de viabilidade até uma redução drástica deste valor.

Após a realização dos experimentos, os valores de concentração foram transformados em molaridade a partir das densidades e massas molares de cada LIP, para facilitar a comparação de resultados de outros estudos. A Tabela 4 mostra a densidade, a massa molar e a molaridade dos LIPs.

**Tabela 4.** Massa molar e densidade dos líquidos iônicos próticos.

<b>Líquidos iônicos próticos</b>	<b>Massa molar (g/mol)</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>
2-HEAF	107,11	1,18
2-HDEAF	151,16	1,88
2-HEAA	121,14	1,15
2-HDEAA	165,19	1,17
2-HEAPr	135,16	1,09
2-HDEAPr	179,22	1,13
2-HEAAd	207,23	1,19
2-HDEAAd	251,28	1,22
2-HDEAMa	221,21	1,28
2-HDEASa	243,26	1,20
2-HEAL	151,16	1,21
2-HDEAL	195,22	1,21
2-HEACi	253,21	1,33
2-HDEACi	297,26	1,29
2-HDEABe	227,26	1,20
2-HDEAOx	195,17	1,26
2-HDEASu	223,23	1,23

Como a intenção deste trabalho é avaliar a segurança aos seres humanos em utilizar os LIPs, células humanas foram empregadas. As linhagens celulares HaCat (queratinócitos) e HDFa (fibroblastos) foram escolhidas para este estudo para avaliar a citotoxicidade dos LIPs considerando que, em usos industriais ou mesmo no ambiente, o primeiro órgão de contato seria a pele. As mucosas, que poderiam ser atingidas por meio de inalação não foram consideradas, tendo como base a não volatilidade dos LIPs. Para isto, é válido lembrar que os queratinócitos são as células mais abundantes da epiderme, camada mais externa da pele (BOUKAMP et al., 1988) e os fibroblastos, mais abundantes do tecido conjuntivo frouxo da derme. Além de ser encontrado na derme, os fibroblastos são amplamente distribuídos pelo corpo humano, justamente no tecido conjuntivo, que tem função de sustentação e preenchimento sendo encontrado compondo diversos órgãos e entre eles.

A linhagem HepG2, também foi empregada. Compreende células de hepatoma humano amplamente empregada em estudos de citotoxicidade, pois são competentes para metabolização de substâncias. Desta forma, permite avaliar a citotoxicidade de possíveis metabólitos dos LIPs.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de  $CI_{50}$  de cada amostra avaliada e também valores encontrados na literatura por outros estudos.

**Tabela 5.** Valores de  $CI_{50}$  de líquidos iônicos próticos deste trabalho e de outros estudos.

Referência	Líquido Iônico	$CI_{50}$ (mM)		
		Células HepG2	Células HaCat	Células HDFa
Liu et al., 2017	[C <sub>2</sub> Mim][OAc]	40,020000	-	-
	[C <sub>2</sub> Mim][Cl]	35,660000	-	-
	[Ch][OAc]	135,530000	-	-
	[Ch][Cl]	105,970000	-	-
	[C <sub>2</sub> OHMim][Cl]	62,570000	-	-
Ferraz et al., 2015	[P <sub>6,6,6,14</sub> ]	0,000322	-	-
	[Ch]	0,001619	-	-
	[C <sub>2</sub> mim]	0,024270	-	-
	[C <sub>2</sub> OHMim]	0,000319	-	-
Zhang et al., 2011	[C <sub>4</sub> Mim][Cl]	0,459000	-	-
	[C <sub>8</sub> Mim][Cl]	0,012000	-	-
Li et al., 2015	[C <sub>12</sub> Mim][Br]	0,009800	-	-
Messali et al., 2015	EtO <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> )Cl	17,200000	-	-
	MeO <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> )Br	32,200000	-	-
	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> )Br	15,600000	-	-
Este trabalho	2-HEAF	91,970000	195,600000	214,730000
	2-HEAA	142,300000	193,800000	195,870000
	2-HEAL	66,130000	372,100000	198,770000
	2-HEAAd	20,540000	91,520000	58,480000
	2-HEACi	15,120000	35,670000	33,480000
	2-HEAPr	58,790000	66,780000	106,230000
	2-HDEAA	25,980000	178,400000	149,030000
	2-HDEAL	41,240000	88,540000	64,220000
	2-HDEAAd	28,770000	75,540000	75,220000
	2-HDEABe	29,110000	54,480000	54,450000
	2-HDEASa	8,910000	48,230000	28,200000
	2-HDEACi	19,070000	36,920000	46,496670
	2-HDEAMa	34,760000	143,800000	95,380000
	2-HDEAPr	251,700000	124,960000	108,770000
	2-HDEASu	69,360000	150,370000	114,100000
2-HDEAOx	76,220000	69,740000	48,100000	
2-HDEAF	274,233300	284,570000	392,270000	

A toxicidade de substâncias químicas depende de sua interação com células e tecidos, que se inicia pela sua permeação através da pele e de mucosas. Também é importante considerar o mecanismo de ação (interação com as organelas celulares, receptores e as vias em que são ativados), o que é estritamente relacionado à estrutura química. No caso dos LIPs, as forças osmóticas exercidas no meio devem ser consideradas. Portanto, alguns detalhes importantes devem ser ponderados para relacionar a estrutura química dos LIPs com a sua atividade, como a toxicidade do cátion/ânion que o compõe e a propriedade hidrofílica/hidrofóbica da molécula.

No geral, os resultados demonstraram maior efeito citotóxico nas células HepG2 do que nas células HaCat e HDFa. A concentração dos LIPs 2-HEAF, 2-HEACi, 2-HDEABe e 2-HDEACi para reduzir em 50 % a viabilidade das células HaCat foi duas vezes maior que a concentração necessária para produzir o mesmo efeito nas células HepG2. Para as amostras 2-HEAL, 2-HEAAAd, 2-HDEAA, 2-HDEAAAd, 2-HDEASa e 2-HDEAMa este efeito foi mais acentuado, sendo que a concentração necessária para atingir o  $CI_{50}$  foi maior. Considerando as amostras 2-HEAL e 2-HDEAA, por exemplo, a concentração necessária para atingir o  $CI_{50}$  foi de, aproximadamente, seis vezes maior. O efeito citotóxico dos LIPs 2-HDEAPr, 2HDEASu, 2-HDEAOx e 2-HDEAF nas células HDFa foi similar ao efeito causado nas células HaCat em relação às células HepG2.

O maior efeito citotóxico nas células HepG2 pode ser atribuído à capacidade metabolizadora dessas células, o que pode gerar metabólitos dos LIPs, os quais podem ser mais tóxicos do que os próprios LIPs. Entretanto, é possível sugerir que se não houver permeação, somente ocorrerá contato com as células de pele e o índice de segurança será maior, já que a metabolização não aconteceria. Ainda, é importante destacar que, após contato com pele e mucosas, que funcionam como barreiras, não há penetração da substância em 100 %, sendo que este resultado é interessante, portanto, demonstrado que as células que teriam maior contato com os LIPs, seriam também as menos agredidas por elas.

Além disso, para todos os LIPs avaliados, pôde ser determinada uma faixa sem efeito tóxico e, portanto, esta concentração não tóxica pode ser usada como referência. Em relação aos LIPs contendo os ácidos propanoico e fórmico, é possível observar um efeito menos citotóxico dos LIPs que contêm dietanolamina, sendo que o 2-HDEAPr é, aproximadamente, 4 vezes menos citotóxico que o 2-HEAPr e o 2-HDEAF, aproximadamente, 8 vezes menos citotóxico.

Os LIPs que apresentaram maior citotoxicidade foram 2-HEACi, 2-HDEACi e 2-HDEASa, sintetizados a partir do ácido cítrico e dietanolamina ou monoetanolamina e ácido

salicílico e dietanolamina. O ácido cítrico é um ácido tricarbóxico com três cargas negativas, necessitando de três contra-íons. Supondo que eles não penetrem na célula (AKESON; MUNNS, 1989), a sua dissociação gera seis cargas livres no meio externo, o que pode romper as membranas das células, levando à redução da porcentagem de viabilidade celular e também à alta polaridade. Estes efeitos estão de acordo com os resultados de líquidos iônicos polares compostos por grupos funcionais éter, hidroxila e nitrila testados em células de leucemia em ratos (STOLTE et al., 2007).

O efeito do comprimento da cadeia aniônica foi observado comparando os resultados de citotoxicidade dos LIPs 2-HEAA<sub>d</sub> e 2-HDEAA<sub>d</sub> (ácido adípico com seis grupos metileno na cadeia alquílica) com 2-HEAA e 2-HEAL (ácidos carboxílicos de cadeia relativamente curta). A cadeia alquílica longa do ácido adípico com a cabeça polar nos 2-HEAA<sub>d</sub> e 2-HDEAA<sub>d</sub> podem ser capazes de se incorporar dentro das bicamadas lipídicas das membranas celulares e desestabilizá-las, levando à ruptura da membrana e morte celular. Altas concentrações de 2-HEAF, 2-HEAA e 2-HEAA<sub>d</sub> foram necessárias para alcançar efeito similar. O efeito citotóxico de líquidos iônicos de cadeia longa já foi descrito na literatura, principalmente relacionado aos cátions (WANG et al., 2007).

2-HEAF, 2-HEAA, 2-HEAA<sub>d</sub> e 2-HEAPr são líquidos iônicos de tamanho pequeno, compostos por ácidos carboxílicos também pequenos e cátion de monoetanolamina. O ensaio de citotoxicidade revelou baixo efeito citotóxico, possivelmente devido à sua estrutura química. Mesmo que um volume menor de íon facilite a penetração nas células, a tendência atóxica de seus grupos moleculares requer altas concentrações para inviabilizá-las.

Em relação à toxicidade dos compostos utilizados neste trabalho, eles foram selecionados por apresentarem baixa toxicidade. Em relação a parte catiônica, a estrutura química da monoetanolamina é similar à colina (HU et al., 2014; KLEIN et al., 2013; LIBERACKI et al., 1996; LIEBERT, 1986). A parte aniônica de quase todos os LIPs avaliados tais como citrato, lactato e propionato são normalmente sintetizados e metabolizados no organismo animal. Outros como formiato, salicilato, maleato, adipato e benzoato podem também ser metabolizados por humanos e animais (NELSON; COX, 2014).

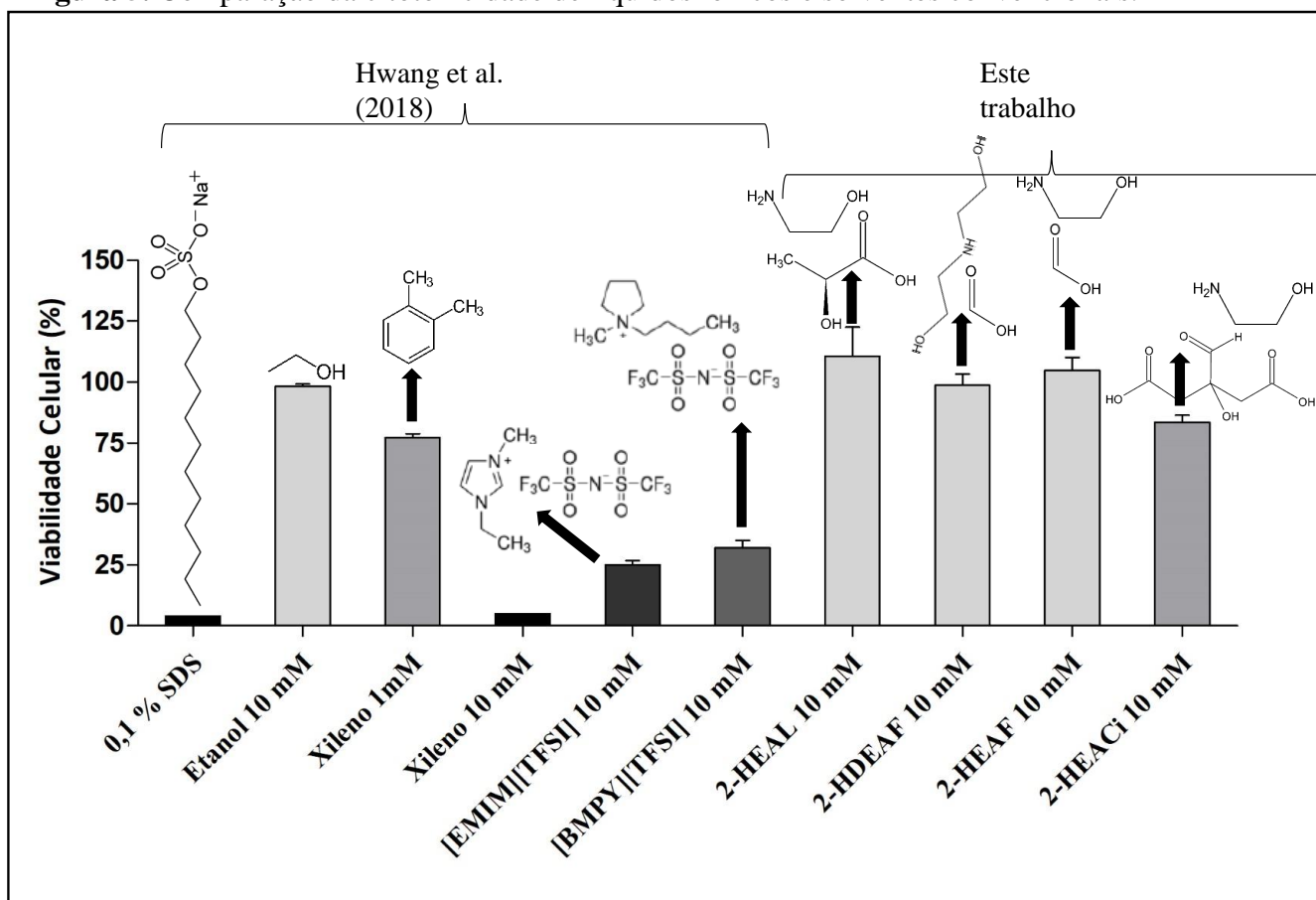
Finalmente, as informações sobre a citotoxicidade dos LIPs observadas neste trabalho utilizando o método do MTT revelaram altos valores de CI<sub>50</sub> quando comparados aos líquidos iônicos derivados de imidazólio avaliados em células HeLa (WANG et al., 2007). Estes resultados indicam o perfil de toxicidade desses LIPs e, portanto, é possível sugerir o seu uso como solventes ou aditivos em produtos que sejam seguros aos humanos, de acordo com as predições baseadas em suas estruturas químicas.



Um fato muito importante que deve ser destacado é de que qualquer LIP que foi avaliado neste estudo demonstrou uma faixa de  $CI_{50}$  entre 1,25 % e 5,00 % em solução. Jaitely, Karatas e Florence (2008) avaliaram líquidos iônicos (sais de hexafluorofosfato) para uso farmacêutico e não foi observado quase nenhum impacto na toxicidade de células CaCo-2 na máxima concentração, que foi de 1,00 %, e eles foram considerados significativamente não tóxicos.

Hwang et al. (2018) fizeram a comparação da citotoxicidade de solventes convencionais com dois LIs a base do cátion imidazólio e pirrolidínio em células HaCat. A Figura 5 mostra os resultados apresentados pelos autores acrescido dos resultados de citotoxicidade obtidos neste trabalho, evidenciando os três LIPs menos tóxicos às células HaCat (2-HEAL, 2-HEAF e 2-HDEAF) e o mais tóxico (2-HEACi) para efeito comparativo.

**Figura 5.** Comparação da citotoxicidade de líquidos iônicos e solventes convencionais.



**Fonte:** Adaptado de Hwang et al. (2018).

No trabalho apresentado por Hwang et al. (2018) os solventes lauril sulfato de sódio (SDS) a 0,1% e xileno a 10 mM inviabilizaram mais de 90 % das células, já o etanol a 10 mM e o xileno a 1,0 mM mantiveram a viabilidade celular acima de 75 %. Os LIs a base do cátion pirrolidínio ([BMPY]) e imidazólio ([EMIM]) combinados com o ânion bis(trifluorometano)sulfonamida ([TFSI]) a 10 mM, inviabilizaram mais de 50 % das células. Comparando os resultados de Hwang et al. (2018) aos dos LIPs deste trabalho, na mesma concentração, é possível notar que todos mantiveram a viabilidade celular acima de 75 %, inclusive o 2-HEACi que foi o mais tóxico às células HaCat (Tabela 5) e nesta concentração de 10 mM, pode ser comparado à citotoxicidade do xileno 1,0 mM, ou seja, numa concentração 10 vezes maior ou 10 vezes menos tóxico. As estruturas químicas representadas na Figura 5 evidenciam o efeito do aumento da cadeia alquílica e da presença de compostos aromáticos que está diretamente relacionado ao aumento de toxicidade.

Como já visto neste trabalho, existem poucas informações sobre a segurança dos LIPs e os dados aqui apresentados contribuem significativamente para este cenário ainda pouco explorado.

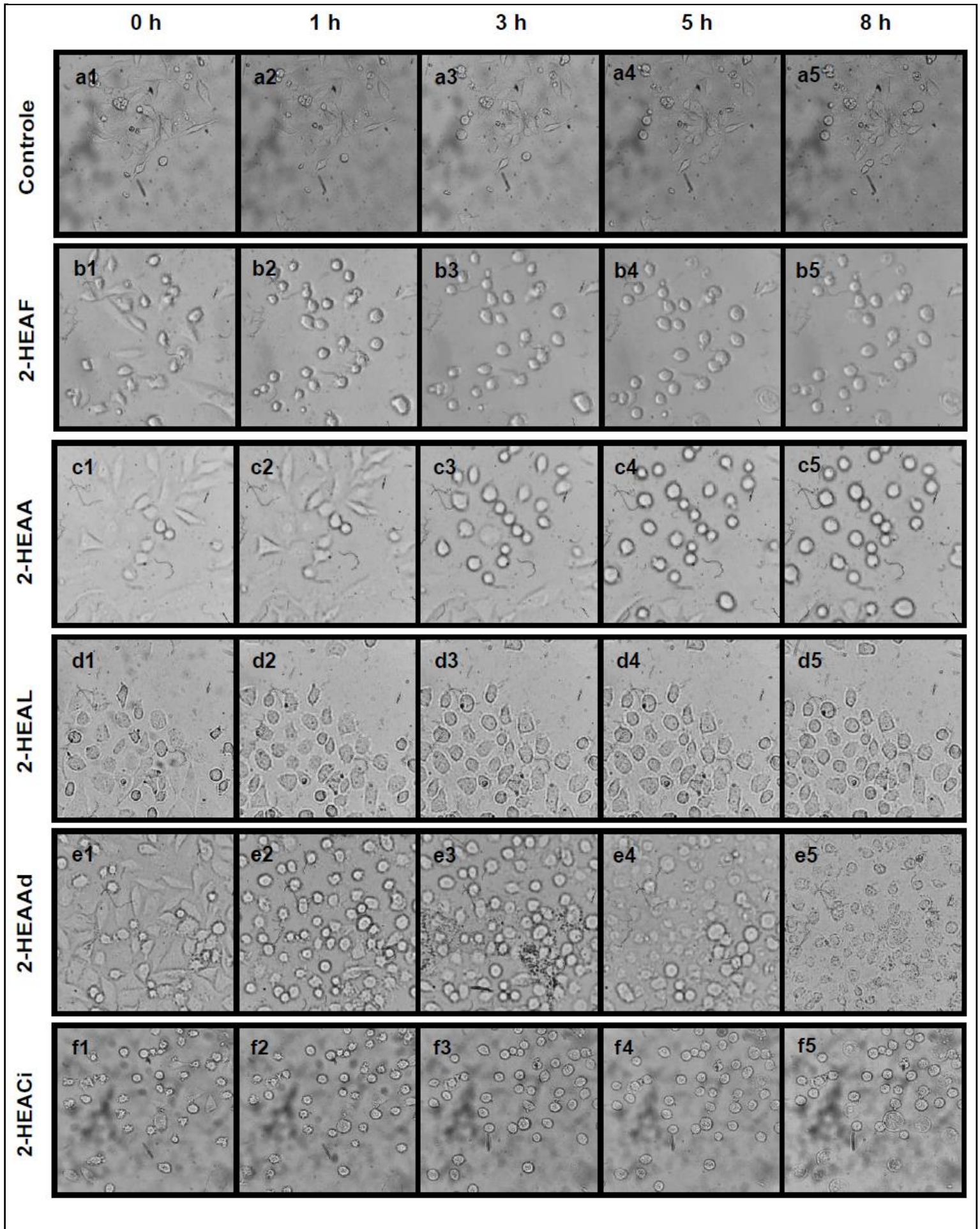
### 5.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AOS LIP

A linhagem HaCat foi escolhida para esta avaliação morfológica devido aos queratinócitos comporem em grande parte a epiderme, camada mais externa da pele, nos quais os LIPs teriam o primeiro contato, considerando uma utilização industrial ou mesmo a distribuição no ambiente.

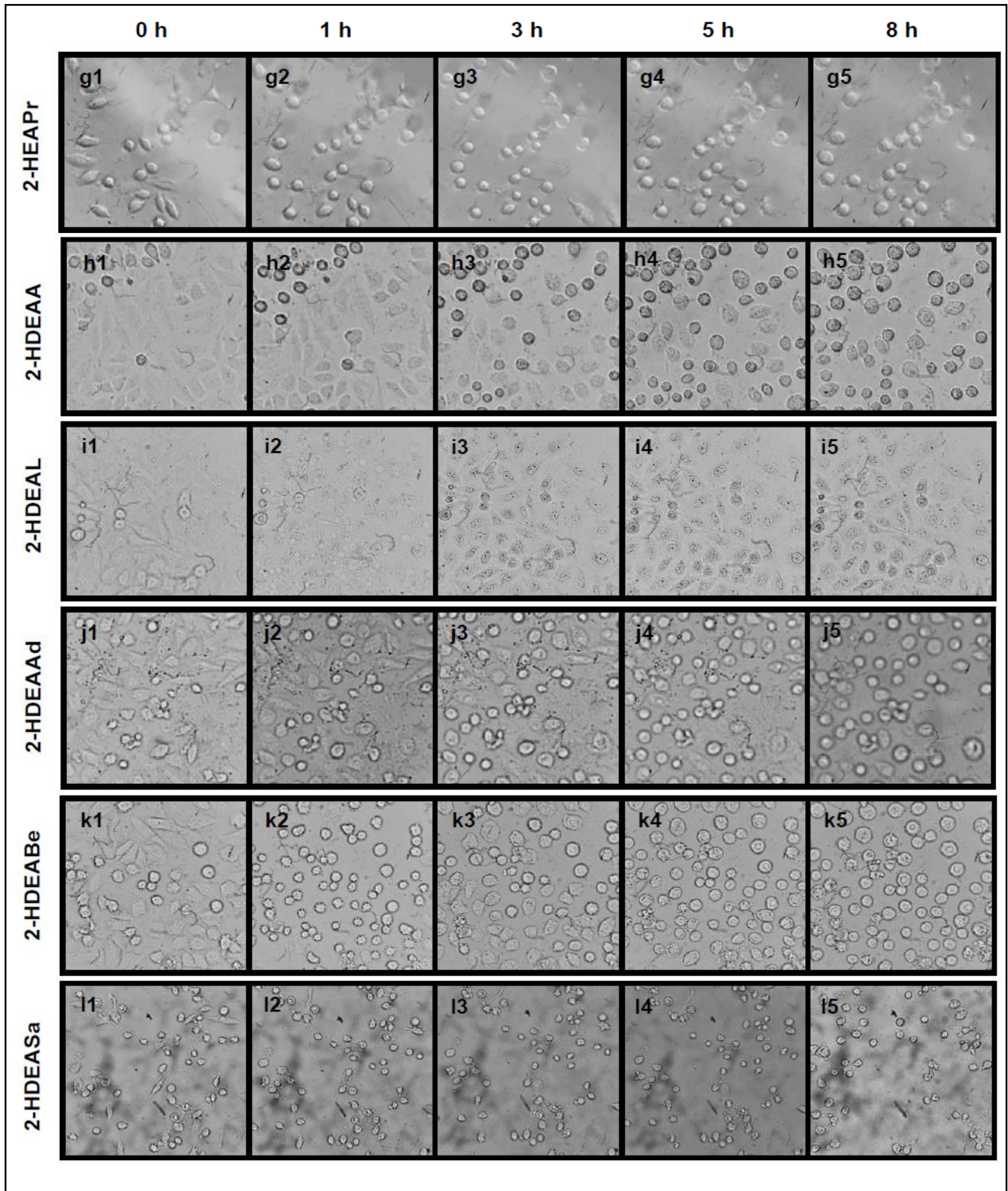
A Figura 6 mostra fotomicrografias que evidenciam a morfologia de células HaCat expostas às concentrações de  $CI_{50}$  obtidas no ensaio de citotoxicidade (Tabela 5). A concentração que promove 50 % de redução na viabilidade celular foi escolhida para que alterações pudessem ser verificadas, auxiliando na compreensão dos efeitos gerados pelos LIPs às células.

No início da exposição (tempo 0 h), foi possível observar a integridade da morfologia celular em todas as amostras testadas. O controle (célula tratada apenas com DMEM) (Figura 6a) demonstrou que a morfologia celular manteve sua integridade durante 8 h. Entretanto, alterações morfológicas foram evidenciadas nos tratamentos com os LIPs, como era esperado, devido ao uso de concentrações do  $CI_{50}$ .

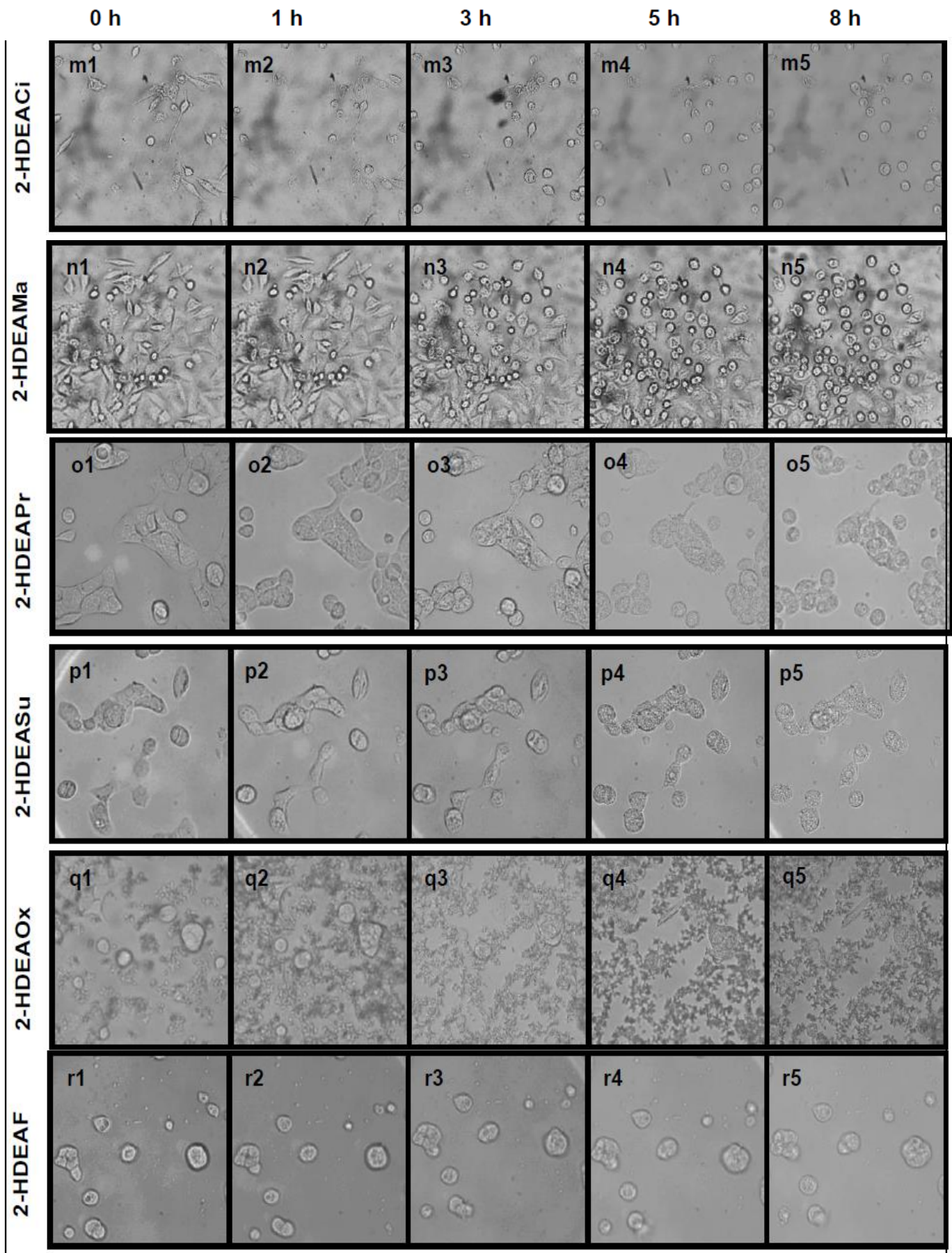
**Figura 6.** Fotomicrografias de células HaCat durante 8 h de exposição aos líquidos iônicos próticos.



**Figura 6.** Fotomicrografias de células HaCat durante 8 h de exposição aos líquidos iônicos próticos.



**Figura 6.** Fotomicrografias de células HaCat durante 8 h de exposição aos líquidos iônicos



Apesar de consistirem apenas em análises baseadas na visualização das fotomicrografias obtidas sequencialmente durante 8 h, é possível sugerir que o LIP 2-HDEABe é mais citotóxico do que o 2-HEAA, porque o primeiro causou o aparecimento de mais bolhas citoplasmáticas do que o segundo. Este dado se corrobora com os resultados da avaliação da citotoxicidade (Tabela 5) nos quais foi demonstrado que o 2-HDEABe causou 50 % de morte celular com menor concentração (54,48 mM) que o 2-HEAA, com concentração aproximadamente 4 vezes maior (193,60 mM).

As mudanças na morfologia celular já mencionadas podem ser observadas na maioria das células expostas aos LIPs e ajudam na compreensão dos efeitos gerados pelos LIPs às células. No geral, ocorreu a redução do volume celular nas primeiras horas de exposição, o que é característico de morte celular por apoptose. Um exemplo disso pode ser encontrado quando as células foram expostas ao 2-HDEABe (Figura 6k2). Após 2 h de exposição (Figura 6k3), é provável que a membrana das células tenha perdido sua integridade, apresentado permeabilidade ao meio, gerando aumento de volume. Após mais 2 h (Figura 6k4) houve o aparecimento de bolhas citoplasmáticas, também indicativas de apoptose, e nas últimas horas (Figura 6k5) podem ser observados indícios de perda de integridade celular, provavelmente devido à concretização da apoptose em algumas células.

Em alguns casos, como quando as células foram expostas ao 2-HEAA (Figura 6c), elas não sofreram redução, mas, por outro lado, aumentaram em volume ao longo do tempo; e nas últimas horas, foi possível observar a perda de integridade de algumas células. Apenas os LIPs 2-HDEAF (Figura 6r), 2-HDEASa (Figura 6l) e 2-HEAL (Figura 6d) causaram mínimas alterações.

A redução do volume celular observada em alguns casos pode indicar que o meio hipertônico, gerado pela presença dos LIPs, causou transporte osmótico de água para fora da célula. O mecanismo de inibição da viabilidade, portanto, pode ser comparado com qualquer outra substância iônica. O exemplo clássico é da solução de NaCl, que a 0,9 % é confortável para a pele e segura para as células. Entretanto, em concentrações maiores, inibe o crescimento celular e promove plasmólise (HARMS; OERTLI, 1985; HUANG; TUNNCLIFFE, 2004; KULTZ; CHAKRAVARTY, 2001; MUNNS, 2002).

Schwarz e Koch (1995) também exploraram esse efeito em células gram-negativas. Provavelmente, o mecanismo de morte celular nestes casos é a apoptose. Friis et al. (2005) avaliaram fibroblastos NIH 3T3 expostos à concentração hipertônica de NaCl e sacarose. Após 3 h de exposição, foi observado a formação de corpos apoptóticos, o que também foi verificado nas primeiras horas de exposição do 2-HDEABe, como já foi mencionado. Isto é evidência de

que a redução da viabilidade celular em exposição aos LIPs testados é derivada de forças osmóticas geradas no meio.

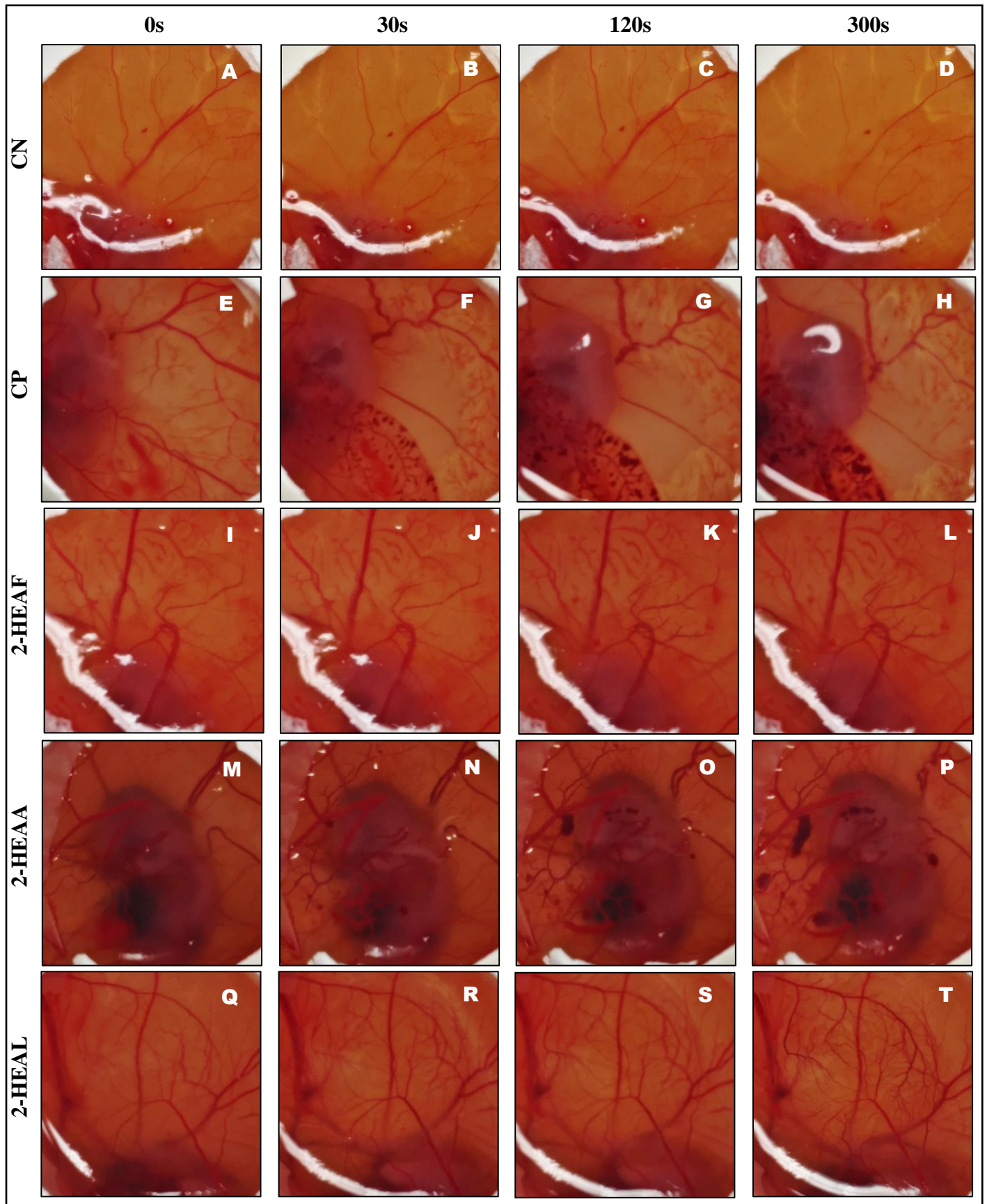
#### 5.4 ENSAIO DE IRRITAÇÃO OCULAR (HET-CAM)

Durante muitos anos os ensaios de irritabilidade de diversos produtos e substâncias químicas de uso tópico foram realizados *in vivo*. Atualmente existem alternativas *in vitro* que podem substituir estes ensaios para demonstrar a segurança e a eficácia das amostras analisadas. O método alternativo pode ser definido como qualquer procedimento que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em experimentação com o objetivo de minimizar a dor e o desconforto, conforme o princípio dos 3R's (reduzir, reutilizar e reciclar) (WORTH; BALL, 2002; ABREU; PRESGRAVE; DELGADO, 2008; PRESGRAVE et al., 2010).

Vários métodos alternativos foram desenvolvidos nas últimas décadas e um deles, utilizado neste trabalho, é o ensaio HET-CAM, que apresenta estrutura vascularizada na membrana cório-alantoide de ovo fecundado de galinha, e características que se assemelham às da conjuntiva ocular, substituindo, então, ensaios realizados em coelhos (teste de irritação ocular de Draize). O método tem como objetivo avaliar semi-quantitativamente o potencial irritante de produtos solúveis, emulsões, géis e óleos (CHORILLI et al., 2009).

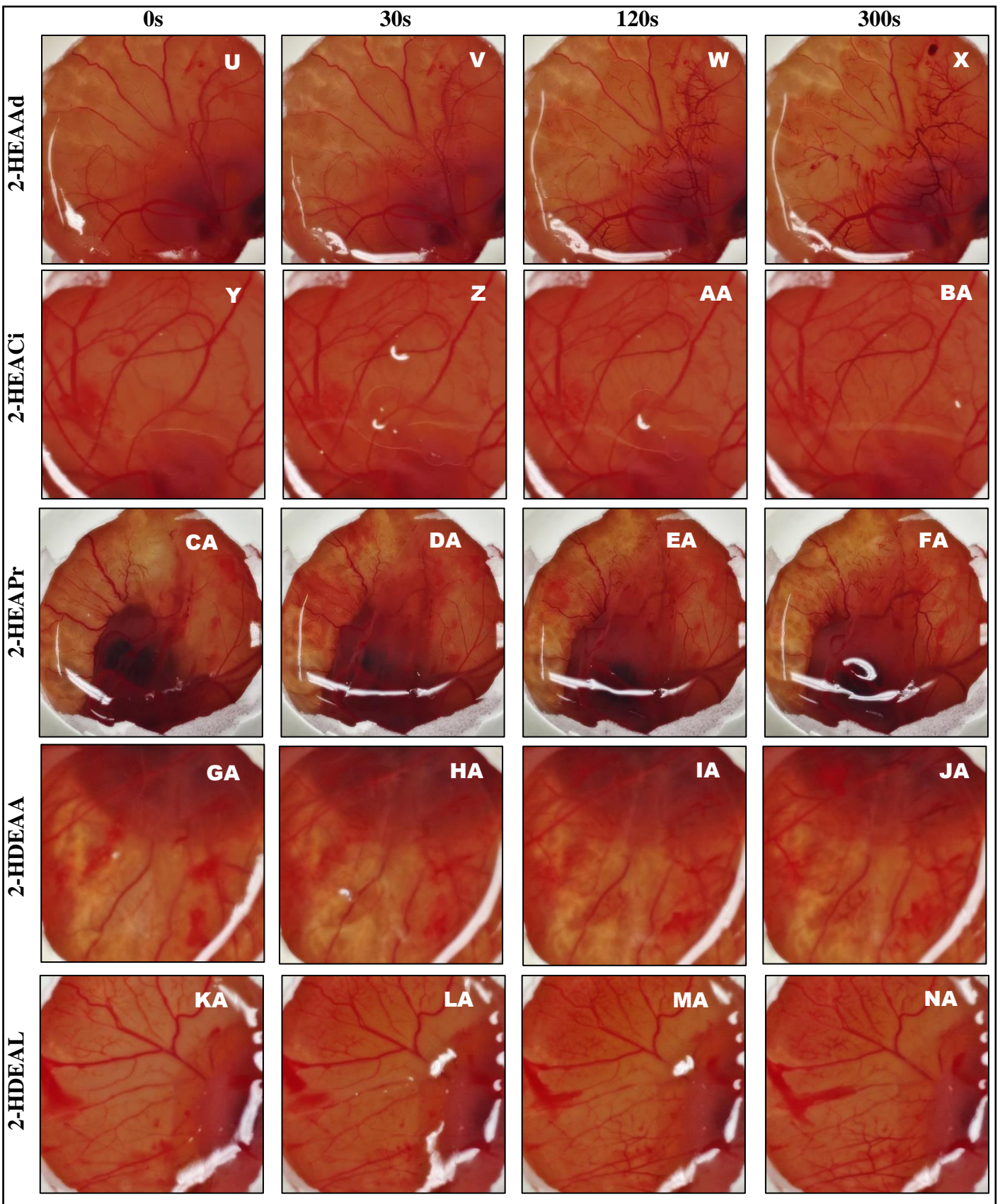
Na Figura 7 estão representadas as imagens das membranas cório-alantoides tratadas com PBS (controle negativo), 1,0 M de NaOH (controle positivo) e os LIPs nos tempos de 0 s a 300s.

**Figura 7.** Sequência de fotografias ilustrando o efeito do PBS (controle negativo), NaOH 1,0M (controle positivo) e diferentes LIPs nas membranas cório-alantoides nos tempos 0s, 30s, 120s e 300s.

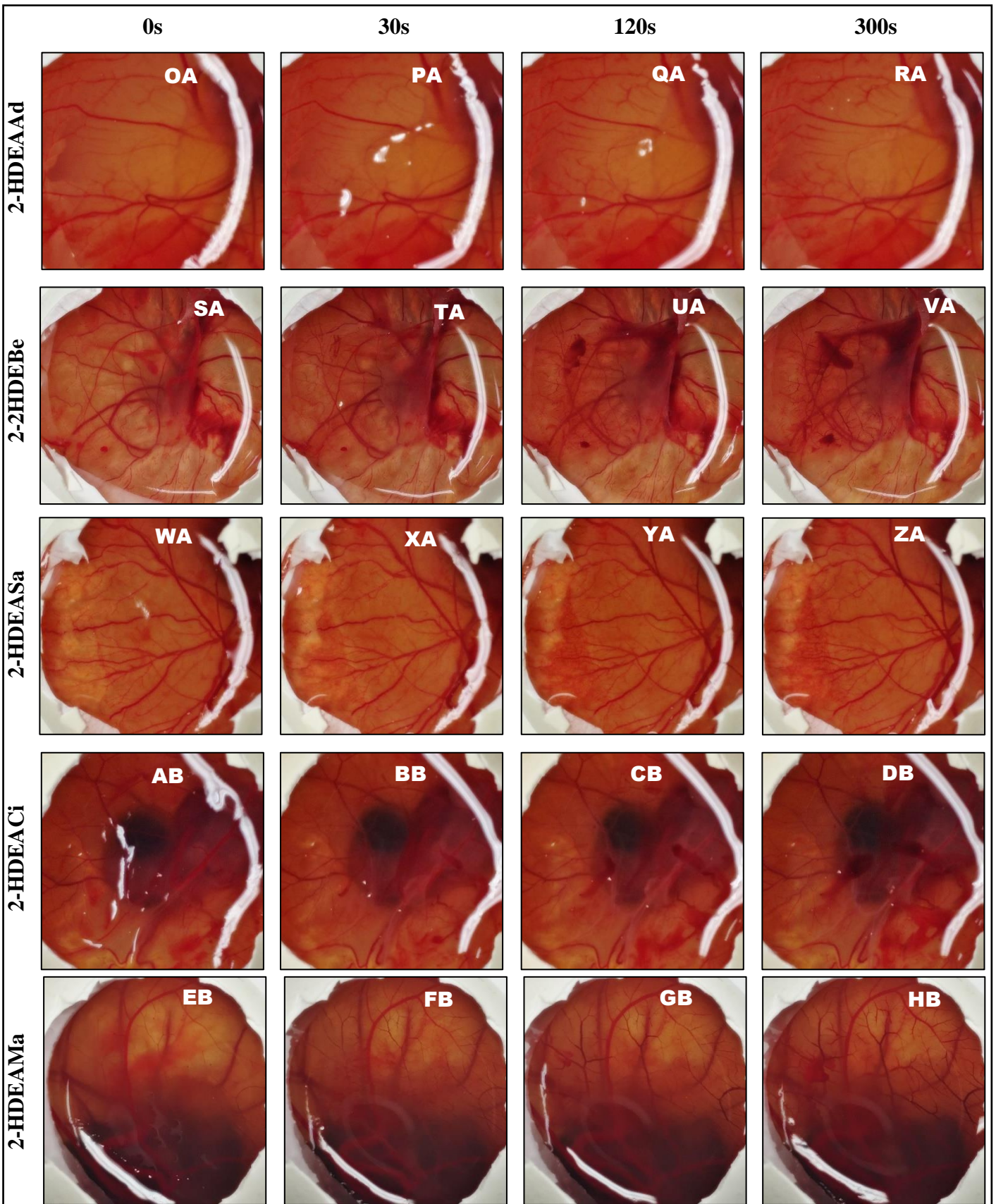




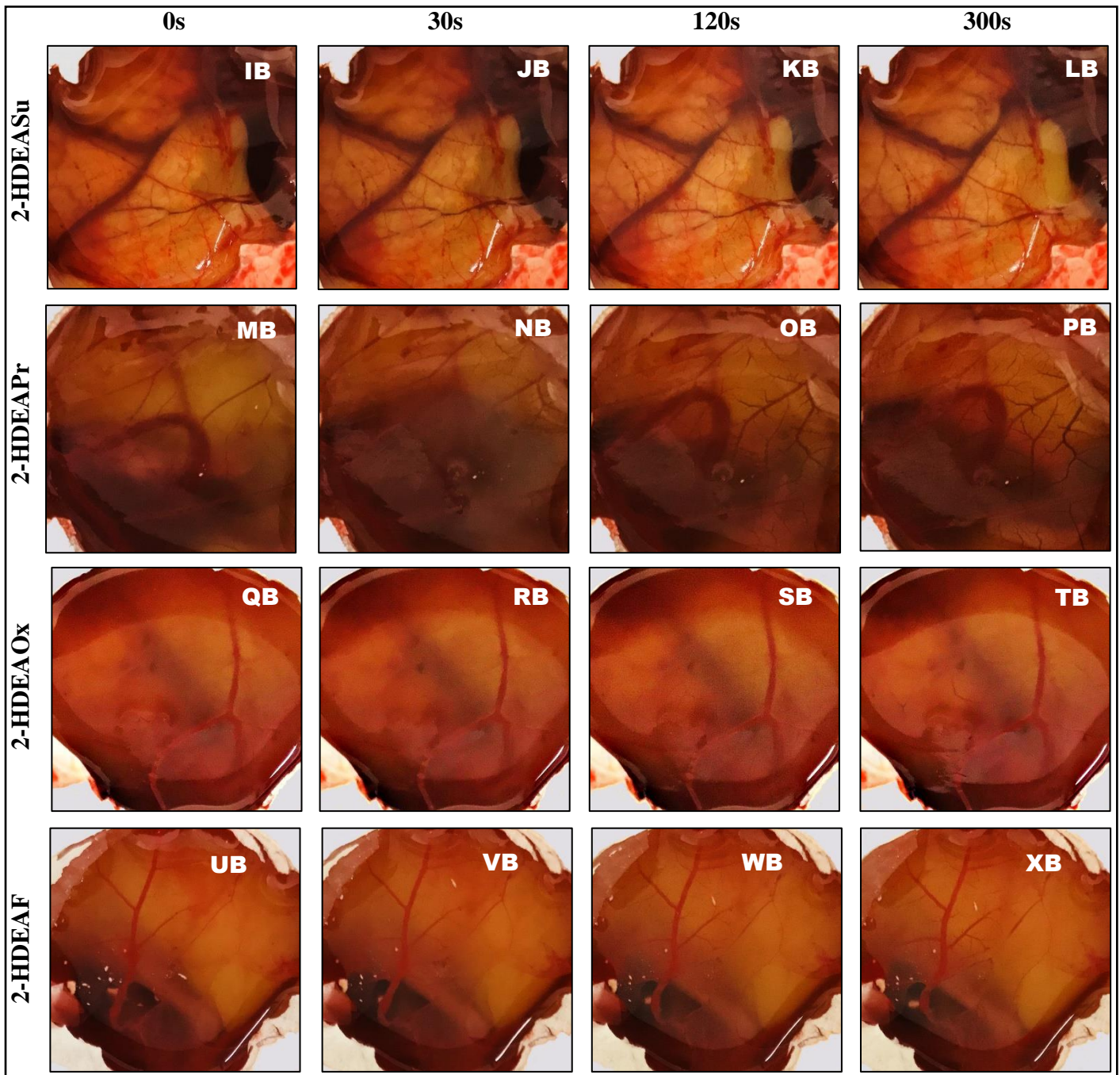
**Figura 7.** Sequência de fotografias ilustrando o efeito do PBS (controle negativo), NaOH 1,0M (controle positivo) e diferentes LIPs nas membranas cório-alantoides nos tempos 0s, 30s, 120s e 300s.



**Figura 7.** Sequência de fotografias ilustrando o efeito do PBS (controle negativo), NaOH 1,0M (controle positivo) e diferentes LIPs nas membranas cório-alantoides nos tempos 0s, 30s, 120s e 300s.



**Figura 7.** Sequência de fotografias ilustrando o efeito do PBS (controle negativo), NaOH 1,0M (controle positivo) e diferentes LIPs nas membranas cório-alantoides nos tempos 0s, 30s, 120s e 300s.



Na Tabela 6 estão representadas as pontuações (baseadas nas Tabelas 2 e 3, item 4.5) adquiridas a partir das alterações observadas nas imagens do ensaio HET-CAM para todos os LIPs testados e controles negativo e positivo.

**Tabela 6.** Pontuação (média e desvio-padrão) e descrição do tipo de irritação obtidos do ensaio HET-CAM para os líquidos iônicos práticos e controles positivo e negativo.

<b>Amostra</b>	<b>Média da pontuação</b>	<b>Desvio-padrão (<math>\pm</math>DP)</b>	<b>Descrição</b>
PBS (CN)	0,00	0,00	NI
NaOH (CP)	16,00	1,41	IS
2-HDEACi	0,00	0,00	NI
2-HEACi	0,67	0,58	
2-HDEAF	1,00	0,00	IL
2-HDEAOx	3,00	1,63	
2-HDEASu	3,67	1,15	
2-HDEASa	4,00	1,41	IM
2-HEAL	4,00	1,41	
2-HDEAL	4,33	1,15	
2-HEAPr	4,50	0,71	
2-HDEAPr	4,67	1,53	
2-HDEAAAd	6,00	1,41	
2-HDEAA	6,50	0,71	
2-HEAAAd	8,25	1,26	
2-HEAA	8,33	3,40	
2-HDEABe	8,50	2,12	
2-HEAF	9,00	1,00	
2-HDEAMa	10,00	2,00	

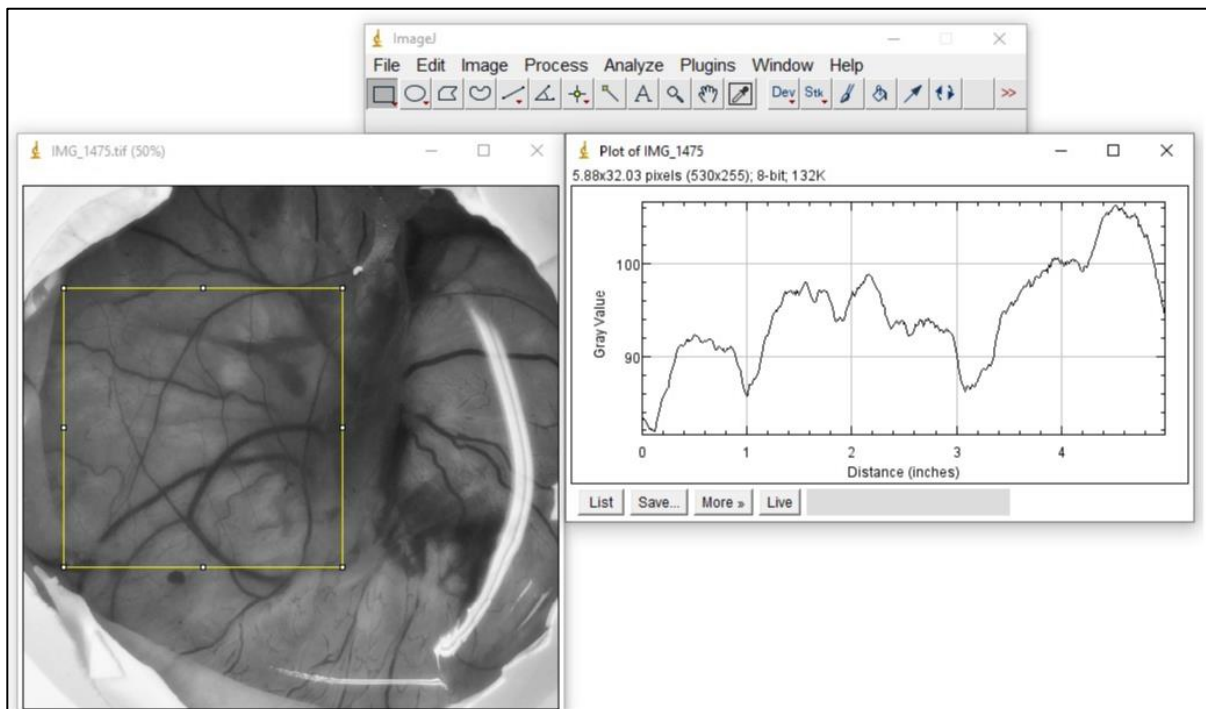
**Nota:** CN = controle negativo. CP = controle positivo. NI = não irritante. IL = irritante leve. IM = irritante moderado. IS = irritante severo.

Apenas dois LIPs promoveram irritação severa (2-HEAF e 2-HDEAMa) enquanto dez, apresentaram irritação moderada; três, irritação leve; e dois, não apresentaram nenhuma irritação ocular. Vale ressaltar que os LIPs foram analisados sem nenhuma diluição e que, portanto, a utilização dos LIPs em processos industriais, por exemplo, após diluição teria ainda menor potencial de risco de irritação ocular. Os valores de desvio-padrão em alguns casos foram relativamente altos devido, provavelmente, a dois fatores: à viscosidade alta dos LIPs que, quando gotejados sobre a membrana córneo-alantoide, ficaram concentrados em apenas um único ponto; e, também, pela forma de análise de dados dessa técnica que é por meio da observação visual.

Tendo em conta a subjetividade deste ensaio, a alta probabilidade de o observador não perceber alterações leves nos vasos sanguíneos e para quantificar os resultados fotográficos, as imagens foram submetidas à análise do *software* ImageJ e PhotoScape (Figura 8). Foram feitas algumas modificações no método proposto por McKenzie et al. (2015) para aprimorar a sensibilidade das análises. Os dados foram analisados e processados como “*Gray Value* – valores da escala de cinza”.

Considerando que cada ovo tem sua própria rede de vasos sanguíneos, este método é inconsistente para comparar amostras diferentes, entretanto, as imagens registradas durante um período (0s, 30s, 120s e 300s) para a mesma amostra foram analisadas, o que permitiu uma avaliação mais objetiva da resposta fisiológica da CAM em função do tempo quando em contato com cada LIP, individualmente.

**Figura 8.** Exemplo do perfil de valores de escala de cinza utilizando o *software* ImageJ, evidenciando a correlação entre vasos sanguíneos escuros e valores de escala de cinza.

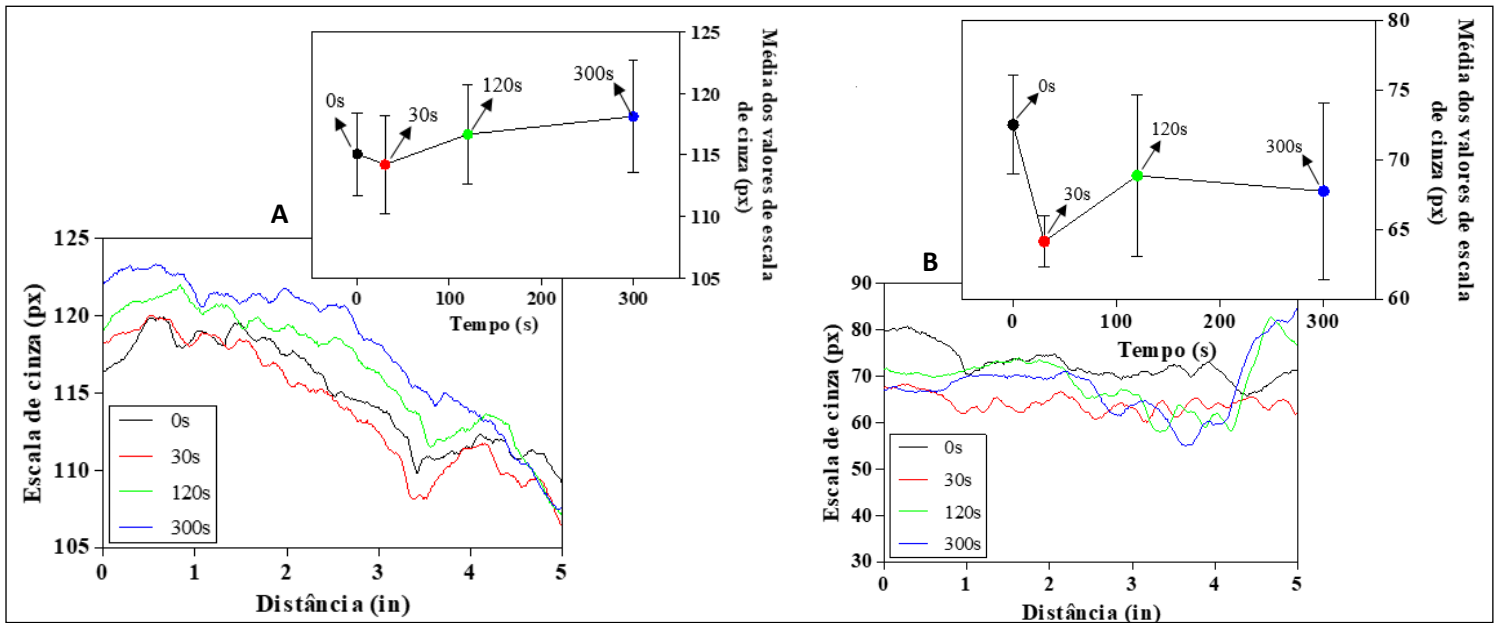


A escala de cinza se relaciona ao ensaio de irritação ocular da seguinte forma: valores menores (portanto, linhas posicionadas inferiormente no gráfico) representam regiões de cores mais escuras nas imagens, ou seja, quando há hemorragia ou hiperemia, na conversão da imagem para escala de cinza, estas áreas apresentam-se em tonalidades mais escuras. O contrário acontece quando a membrana permanece saudável, ou seja, há regiões mais claras na imagem e, portanto, os valores de escala de cinza são maiores quando comparados às áreas hemorrágicas (MCKENZIE et al., 2015).

Na Figura 9 estão representados os gráficos de valores de escala de cinza dos controles negativo (Figura 9A) e positivo (Figura 9B) nos tempos 0s, 30s, 120s e 300s. É possível observar que a aplicação de 0,2 mL de PBS à membrana saudável não produziu nenhuma resposta visual (pontuação 0, Tabela 6) durante o período de 300s (Figuras 7A-D e 9A), enquanto que o mesmo volume de NaOH 1M causou uma hemorragia severa desde os primeiros

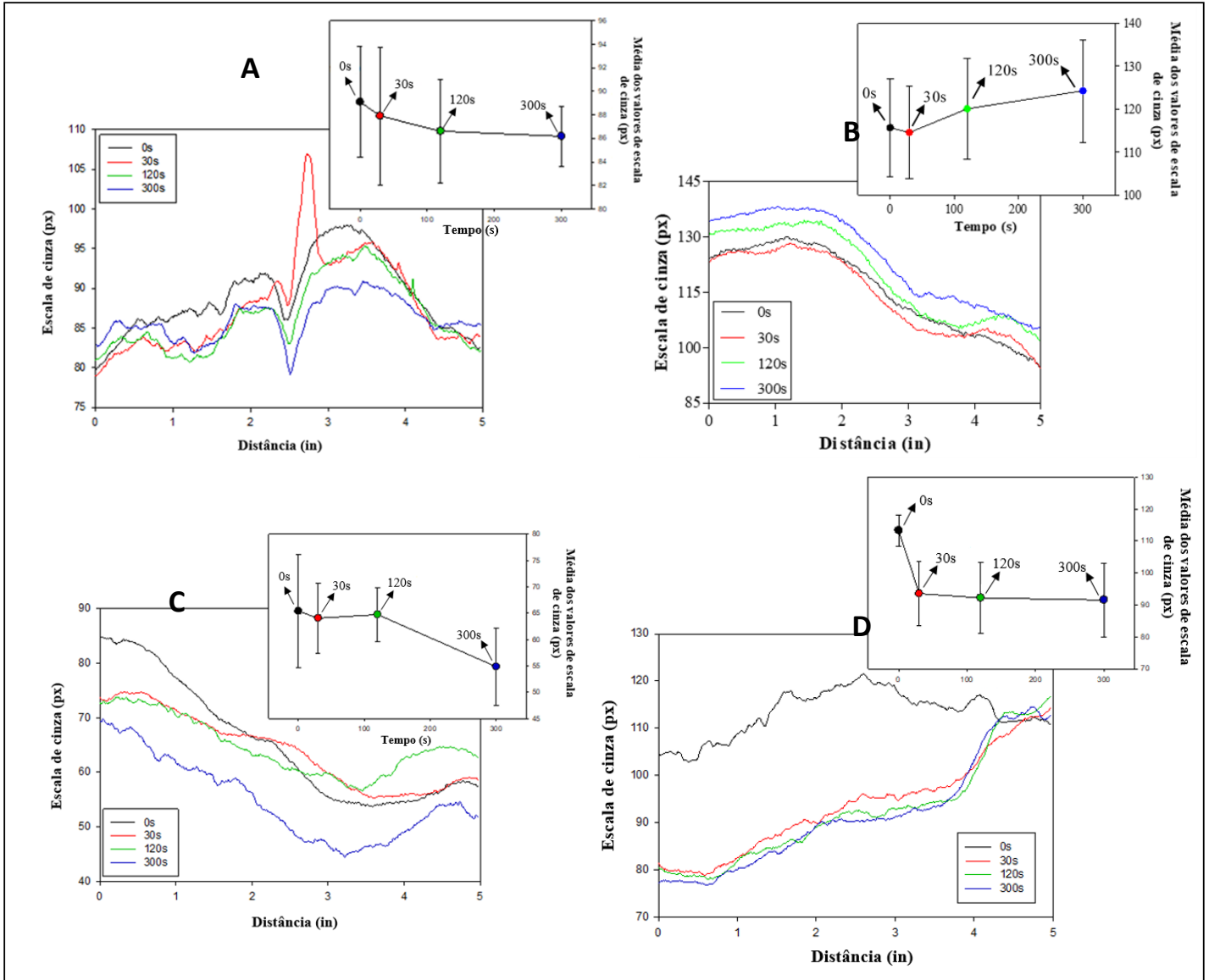
30s (pontuação 16, Tabela 6). Durante todo o período da análise, o dano à membrana aumentou progressivamente (Figuras 7E-H e 9B), classificando esta solução como irritante ocular severo.

**Figura 9.** Correlação entre vasos sanguíneos escuros (hemorragia e hiperemia) e valores de escala de cinza dos controles negativo (A) e positivo (B) nos tempos 0s, 30s, 120s e 300s.



Na Figura 10 estão representados os perfis de escala de cinza dos LIPs 2-HDEACi (não irritante), 2-HDEAOx (irritante leve), 2-HEAAd (irritante moderado) e 2-HEAF (irritante severo). O LIP que não apresentou irritação ocular, 2-HDEACi (pontuação 0, Tabela 6) não apresentou alteração visual durante o período da análise, tendo uma queda na média de valores de escala de cinza em pixel após 120 s (Figuras 7AB-DB e 10A). O 2-HDEAOx (pontuação 3, Tabela 6), também não apresentou alteração visual na CAM e, mesmo apresentando uma pequena queda nos 30s iniciais, os valores se mantiveram altos até o final da análise, indicando leve irritação ocular (Figuras 7QB-TB e 10B). O LIP irritante moderado 2-HEAAd (pontuação 8,25, Tabela 6), apresentou dano à membrana após os 120s, havendo uma queda maior da média de valores de escala de cinza, evidenciando a irritação ocular moderada (Figuras 7U-X e 10C). O LIP irritante severo, 2-HEAF (pontuação 9, Tabela 6), causou danos à membrana, havendo uma queda na média de valores de escala de cinza já nos primeiros 30s, se mantendo mais baixos até final (Figuras 7I-L e 10D).

**Figura 10.** Exemplos dos perfis de escala de cinza de LIPs não irritante (2-HDEACi, A), irritante leve (2-HDEAOx, B), irritante moderado (2-HEAAd, C) e irritante severo (2-HEAF, D).



De acordo com as análises visuais, os LIPs 2-HEACi e 2-HDEACi (Figuras 7Y-BA e 7AB-DB) não produziram danos relevantes à CAM, um comportamento similar ao controle negativo, resultando em uma pontuação de 0,67 e 0,00, respectivamente (Tabela 6), o que os classificaram como não irritantes. As Figuras 10A e A10 confirmaram o esperado, no qual é possível notar que os valores da escala de cinza para os tempos 0s, 30s, 120s e 300s se sobrepõem, aproximadamente, para 2-HDEACi, indicando ausência de resposta fisiológica, e diminui levemente para 2-HEACi, indicando uma leve hiperemia, observada visualmente. Em ambos os casos é possível perceber uma ligeira coagulação em 30s em uma área específica

(visualmente imperceptível, mas claramente mostrada no gráfico de valores escala de cinza), que, conforme observado, diminui com o tempo. As alterações nos vasos sanguíneos geralmente começam rapidamente após uma lesão ou infecção, mas se desenvolvem em velocidades variadas, dependendo da natureza e gravidade do estímulo inflamatório original. É comum ocorrer uma leve vasoconstrição transitória antes da vasodilatação das arteríolas como primeira resposta fisiológica à agressão, resultando em aumento do fluxo sanguíneo e abertura dos leitos capilares (hiperemia) (ACTOR, 2019).

O ácido cítrico possui ampla distribuição entre os animais, e diferente dos demais ácidos estudados, sua presença foi demonstrada nos fluídos intraoculares de várias espécies de mamíferos e aves, bem como, de alguns peixes (KRAUSE, 1938). Esse fato poderia explicar a menor capacidade irritante desses LIPs.

A maioria dos LIPs analisados foi categorizada como irritante ocular moderado. Com pontuação 4,50 (Tabela 6) devido a uma leve hiperemia progressiva desde os primeiros 30 s do início do teste, sem outros efeitos associados, o 2-HEAPr (Figuras 5CA-FA e A3) apresentou comportamento moderadamente irritante equivalente ao 2-HEAL, o que era esperado, pois suas estruturas são muito semelhantes e diferem apenas pela presença de um grupo hidroxila no composto lactato.

2-HEAAd e 2-HDEAAd apresentaram pontuações 8,25 e 6,00, respectivamente (Tabela 6). O contato da CAM com 2-HEAAd (Figuras 7U-X) resultou em uma leve hiperemia no primeiro contato (antes dos 30s), seguida de hemorragia observada a partir dos 300s de teste (Figura 10C) . Por outro lado, o 2-HDEAAd permitiu a percepção visual de um efeito hemorrágico no primeiro momento sem nenhum outro efeito associado (Figura 7OA-RA). Apesar disso, a Figura A9 revela a redução dos valores da escala de cinza a partir do tempo 120s, indicativo de contenção da hemorragia gerada, e vasoconstrição progressiva ao longo do tempo.

2-HEAF (Figuras 5I-L) e 2-HDEAMa (Figuras 5 EB-HB) foram os únicos dois LIPs analisados que apresentaram um perfil severamente irritante. Com pontuação 9,00 e 10,00, respectivamente (Tabela 6), o contato de ambos com a membrana corioalantóica resultou em hiperemia nos primeiros 30s, seguida de hemorragia observada entre 30s e 120s. As Figuras 10D e A8 mostram uma tendência de diminuição progressiva dos valores da escala de cinza, resultado indicativo de hiperemia/hemorragia progressiva ao longo do tempo.

Embora não haja informações disponíveis na literatura sobre o potencial de irritação ocular do 2-HEAF, o ácido fórmico e os sais de formato são amplamente utilizados na indústria cosmética como ingredientes de fragrâncias, conservantes, ajustadores de pH e conservantes



em produtos cosméticos, razão pela qual alguns desses produtos já tiveram seu potencial de irritação ocular avaliado. Para efeito comparativo, o potencial de irritação ocular do formato de sódio foi avaliado *in vivo* utilizando 6 coelhos brancos da raça Nova Zelândia (3 machos, 3 fêmeas; pelo menos 8 semanas de idade). A irritação conjuntival transitória (moderada a grave) foi observada em todos os 6 coelhos, e necrose conjuntival foi observada em 4 dos 6 coelhos. Todas as reações desapareceram no 17º dia (JOHNSON et al., 2016).

Em termos gerais, é importante destacar que, para um mesmo ânion, os sais de dietanolamina apresentaram menor potencial irritante do que os respectivos sais de monoetanolamina (2-HEAA > 2-HDEAA, 2-HEAAd > 2-HDEAAd e 2-HEACi > 2-HDEACi). Trietanolamina (TEA), Dietanolamina (DEA) e Monoetanolamina (MEA) são aminoálcoois utilizados em formulações cosméticas como emulsificantes, espessantes, agentes umectantes, detergentes e agentes alcalinizantes (FINAL..., 1983), e têm sido estudados quanto ao seu potencial de irritação ocular em coelhos (CARPENTER, SMYTH, 1946; WEIL, SCALA, 1971; COMMITTED..., 1959, 1976, 1979A, 1979 B, 1980; GRIFFITH et al., 1980) e macacos rhesus (COMMITTED..., 1976). Em altas concentrações e com longo tempo de contato, TEA, DEA e MEA são irritantes ao olho do coelho em concentrações de 100 %, 50 % e 5 % m/m, respectivamente, ou seja, a monoetanolamina tem maior potencial irritante do que a dietanolamina (FINAL..., 1983).

Para os LIPs alifáticos e monoelétrônicos é evidente que o aumento da cadeia aniônica diminui o potencial irritante do composto (2-HEAF > 2-HEAA > 2-HEAPr > 2-HEAL; 2-HDEAA > 2-HDEAPr > 2-HDEAL > 2-HDEASu). O mesmo comportamento é observado para os LIPs aromáticos (2-HDEABe > 2-HDEASa) e multieletrônicos (2-HEAAd > 2-HEACi e 2-HDEAMa > 2-HDEAAd > 2-HDEACi), o que pode ser explicado pelo fato de que o complexo estrutural com maior efeito de impedimento estérico (altos volumes molares) apresentam maior resistência à passagem pelas membranas biológicas, reduzindo seu potencial irritante ocular (RAMOS et al., 2018).

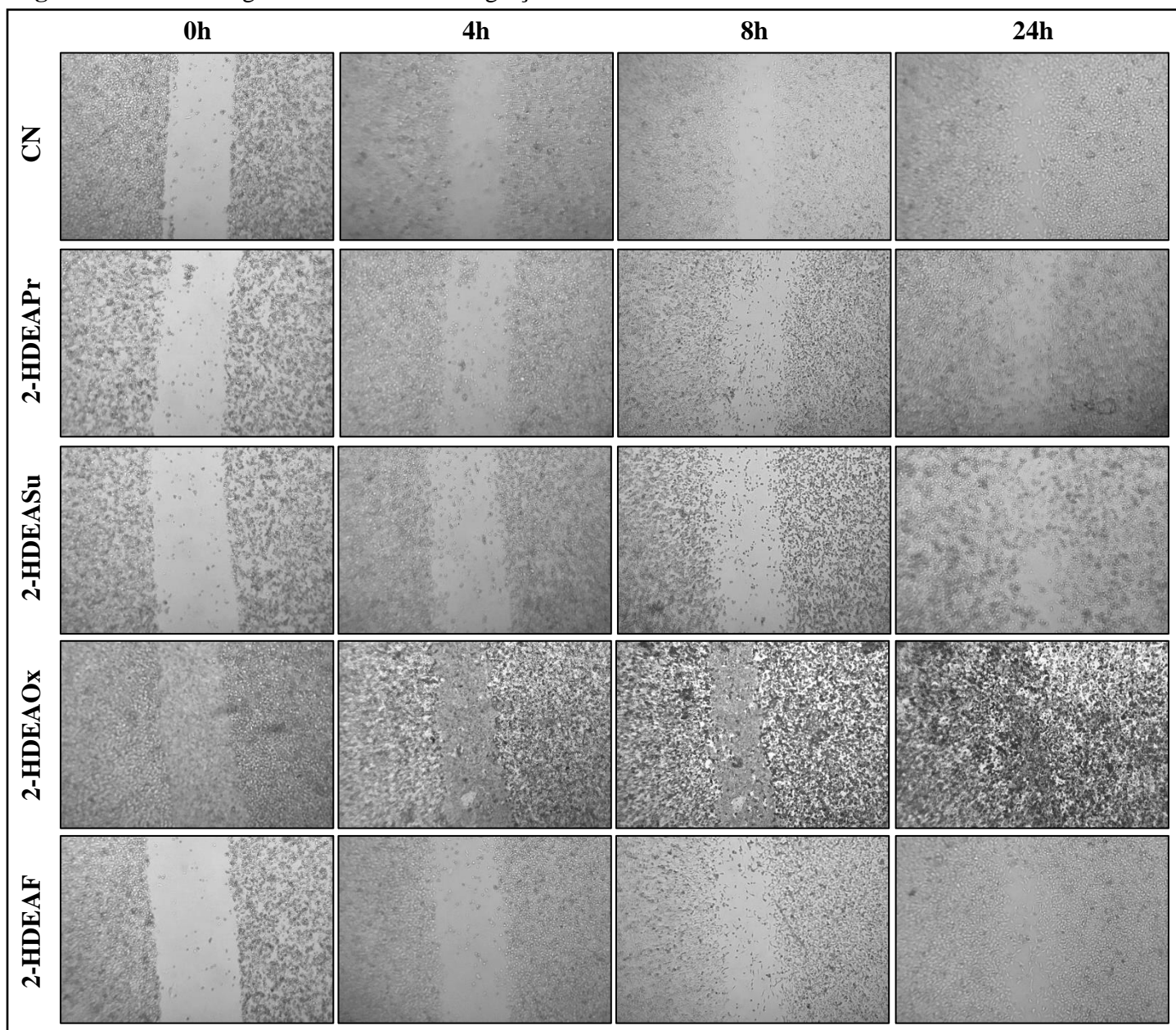
Dos dois métodos de análise utilizados nesta pesquisa, semiquantitativo (JOURNAL..., 1996) e quantitativo (um método modificado de McKenzie et al. (2015)), nenhum descreve completamente os efeitos de todas as soluções testadas. Portanto, a combinação dos dois métodos é útil para permitir uma descrição completa e precisa dos danos causados à CAM.

## 5.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE MIGRAÇÃO CELULAR

Esta análise foi realizada por dois motivos. O primeiro motivo consiste em obter mais um dado por meio de estudos *in vitro* que corroborem com os estudos de citotoxicidade e de irritação ocular, uma vez que, havendo citotoxicidade, certamente a proliferação e migração celular seriam prejudicadas, e poderiam ser evidenciadas por esta análise. O segundo motivo consiste em estimular a busca por efeitos biológicos que talvez possam ser alcançados com o emprego dos LIPs, vislumbrando outros possíveis usos destas substâncias inovadoras e, ainda, pouco estudadas para esta finalidade.

Tendo em vista que a migração dos fibroblastos consiste em um importante evento que ocorre durante a cicatrização, avaliou-se os efeitos dos LIPs sobre a migração celular utilizando o modelo *scratch assay*. Para efeito ilustrativo, na Figura 11 estão representadas uma replicata das fotomicrografias das células em exposição aos LIPs durante 24h.

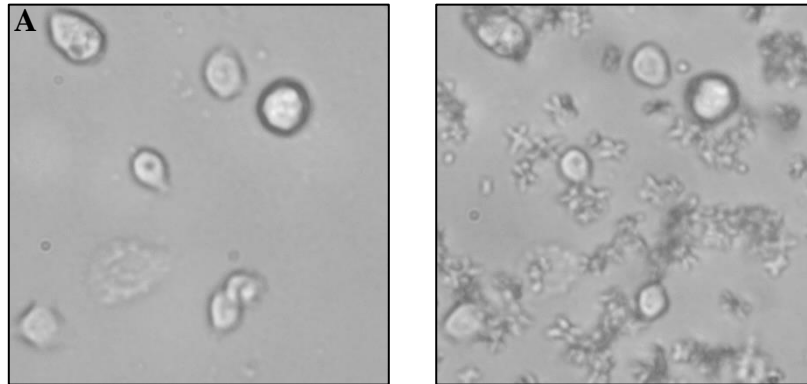
**Figura 11.** Fotomicrografias do ensaio de migração celular durante 24h de monitoramento.



**Nota:** CN = controle negativo.

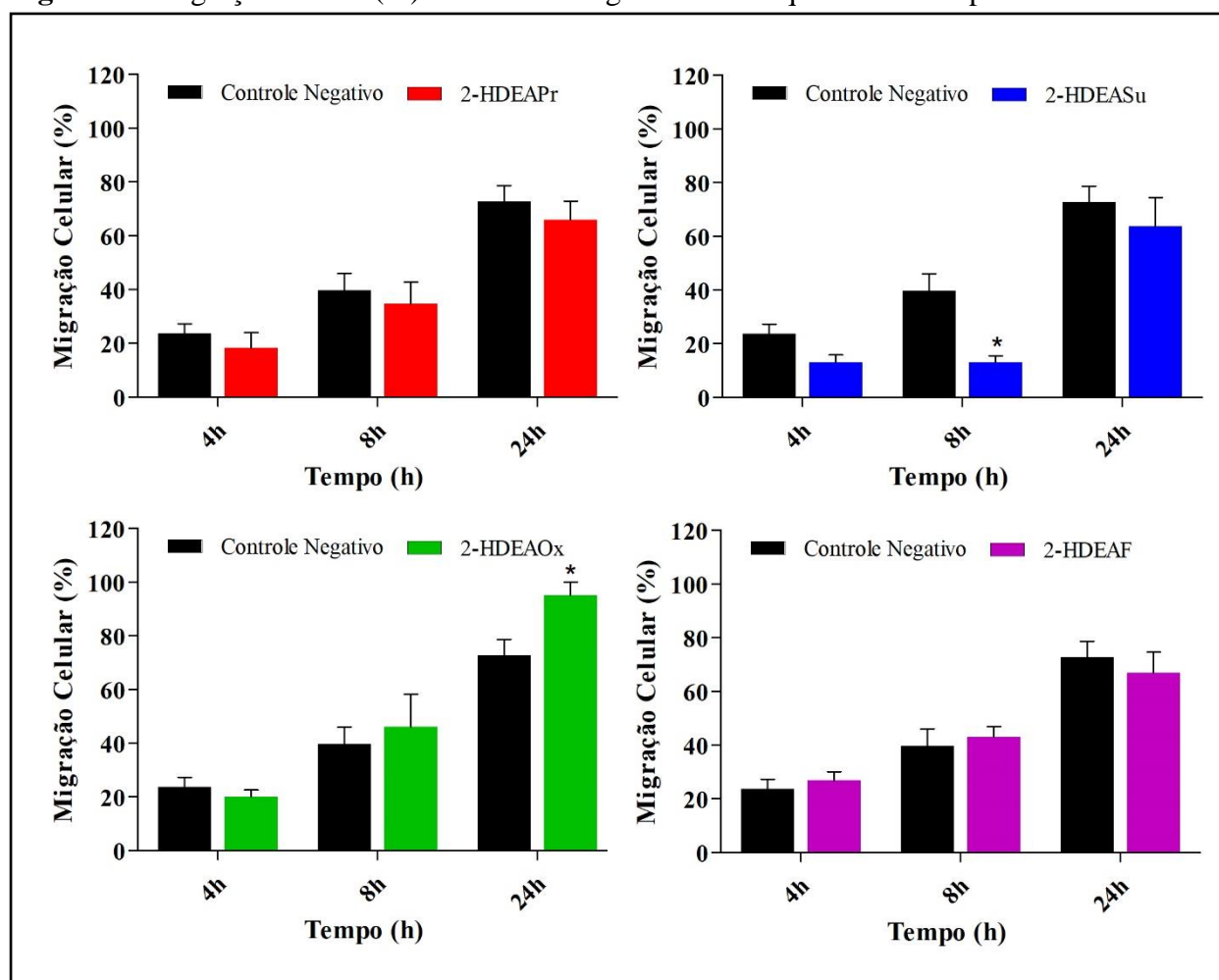
As imagens da Figura 11, no tempo 0h, demonstraram que a remoção das células foi feita de forma eficiente, uma vez que a fenda se apresenta bastante evidente para todas as amostras, com exceção da amostra 2-HDEAOx. De acordo com as observações realizadas durante este trabalho, notou-se que a amostra 2-HDEAOx tem como característica a precipitação no meio de cultura celular, o que dificultou a visibilidade da fenda. Isto pode ser melhor observado na Figura 12, com a imagem ampliada. Nelas, pontos de precipitação estão evidentes, o que tornou a área escurecida.

**Figura 12.** Fotomicrografias da cultura celular sem amostra (A) e após a adição do LIP 2-HDEAOx (B) evidenciando a precipitação.



A partir da observação da Figura 11, é possível afirmar que os LIPs não impediram o processo de cicatrização já que apresentaram um perfil de migração celular semelhante ao do controle negativo. Isto também pode ser verificado pela análise dos dados através do *software* ImageJ, em que foi possível medir a largura da fenda e calcular a porcentagem de fechamento da mesma, como descrito no item 4.5. Os dados estão apresentados na Figura 13.

**Figura 13.** Migração celular (%) do controle negativo e dos líquidos iônicos próticos durante 24h.



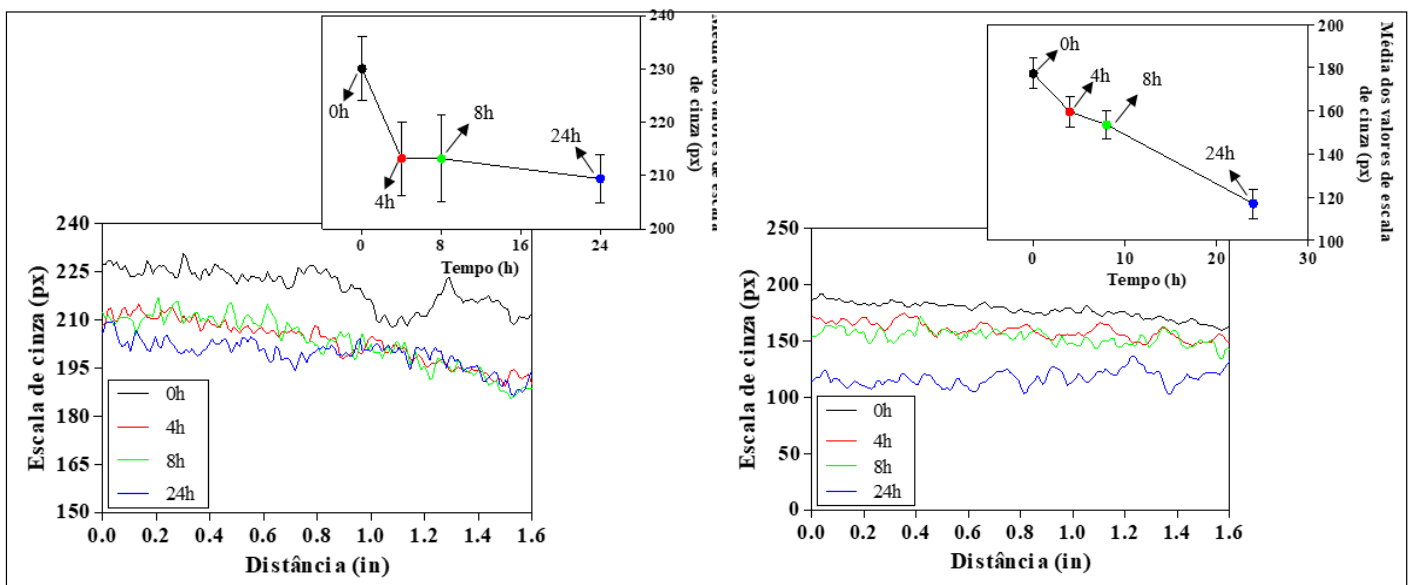
**Nota:** Todos os resultados estão expressos como média de quatro experimentos  $\pm$  erro padrão ( $M \pm EP$ ), analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey (\*:  $p \leq 0,05$ , diferenças com controle negativo).

Os gráficos apresentados na Figura 13 demonstraram que os LIPs não inibiram o processo de cicatrização, pois acompanharam o perfil de cicatrização do controle negativo. Apenas o 2-HDEASu apresentou uma diferença significativa na porcentagem de cicatrização em relação ao controle negativo no tempo de 8h, ficando abaixo do resultado do controle, mas que não se manteve no tempo de 24 h. Dentre os ácidos carboxílicos presentes na estrutura dos LIPs testados, o ácido succínico é o que apresenta maior cadeia alquílica em relação aos outros três (ácido propanóico, oxálico e fórmico). Como já descrito, o aumento da cadeia alquílica favorece a toxicidade às células, podendo então retardar a migração celular, porém em 24 h, a cicatrização se estabeleceu, não causando, então, retardo ou impedimento da cicatrização neste período. Estas informações cumprem o primeiro motivo de realização desta técnica, pois servem para reforçar os dados de segurança coletados pelo estudo de citotoxicidade e de irritação ocular.

Um dado interessante, e que cumpre o segundo motivo de realização desta técnica, se baseia no aumento da proliferação e migração celular em relação ao controle negativo que pode ser observado pelo tratamento com o LIP 2-HDEAOx. Uma vez que esta amostra não se solubiliza totalmente no meio de cultura celular (Figura 12), é possível sugerir que as células utilizaram este LIP como substrato e proliferaram em uma maior velocidade que no controle negativo. Entretanto, independentemente do meio pelo qual isto ocorre, podemos notar um efeito biológico deste LIP, podendo ser, portanto, um indicativo de uso para tratamento de males que afetam o ser humano, como as deficiências de cicatrização.

Ainda utilizando as análises de imagem do *software* ImageJ, na Figura 14 estão presentes os gráficos de escala de cinza (px) *versus* a distância (in) do controle negativo e do 2-HDEAOx, para corroborar com os resultados já apresentados na avaliação do processo de cicatrização (Figura 12). Esta análise foi feita, pois com o fechamento da fenda, a tonalidade da imagem torna-se mais escurada devido à ocupação celular.

**Figura 14.** Análise da variação da escala de cinza do controle negativo e do 2-HDEAOx referente à migração celular.



Nesta análise de valores de escala de cinza apresentados na Figura 14, como já mencionado anteriormente, a quantidade de células se relaciona aos valores de escala de cinza da seguinte forma: quanto mais células forem detectadas na imagem, os valores de escala de cinza são menores, uma vez que a imagem apresenta mais cores escuras. Então, em condições com menor quantidade de células, os valores de escala de cinza são maiores pois as cores são

mais claras. Portanto, é possível observar que o 2-HDEAOx apresentou maior quantidade de células do que o controle negativo, pois houve uma queda significativa na média de valores de escala de cinza após 8h, evidenciando aumento da quantidade de células (região mais escura). Além disso, quando comparamos a linha do tempo 0h com a do tempo 24h, nota-se um aumento significativo da intensidade da cor, indicando a proliferação e migração celular para ocupar a fenda. Estes dados, indicam, então, possível efeito cicatrizante do LIP 2-HDEAOx obtido com este estudo preliminar.

Ainda, avaliando as linhas que representam cada tempo de análise, é possível notar que a linha verde (24h), é a que exibiu menor valor na escala de cinza, tanto no controle negativo quanto no tratamento com o LIP 2-HDEAOx, indicando a adequabilidade deste recurso para determinar o preenchimento celular da fenda.

Zakrewsky et al. (2014) investigaram alguns LIs a base de colina (cátion orgânico e nutriente essencial que faz parte do complexo B de vitaminas) para romper o biofilme formado pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica* no processo de cicatrização para melhor liberação do antibiótico através das camadas da pele. Estes LIs promoveram ação antibacteriana, toxicidade mínima para células normais do epitélio bronquial humano (NBEC) e a própria pele, além de aprimorar de forma eficaz a permeação para administração de fármacos.

## 6 CONCLUSÕES

Os estudos sobre a toxicidade dos LIs são relativamente novos, uma vez que apresentam vasta aplicação em processos industriais de diversas áreas, e as pesquisas os apontam como sendo solventes alternativos aos convencionais e inovadores, podendo fazer parte do desenvolvimento de novos processos mais verdes e sustentáveis, reduzindo os impactos causados ao meio ambiente.

Um aspecto essencial sobre os LIs que ainda não foi extensivamente explorado é o seu perfil de segurança, tanto a nível ambiental quanto humano. Os dados da literatura apresentados neste trabalho, demonstraram um maior número de pesquisas relacionadas aos LIAs, que, geralmente, apresentam toxicidade elevada em relação aos LIPs, devido aos aspectos estruturais e seu caráter lipofílico que favorece a sua acumulação no meio ambiente e nos organismos. Já os LIPs, por apresentarem caráter hidrofílico, têm maior facilidade de dispersão no meio e, conseqüentemente, menores impactos ambientais e menor toxicidade.

Os resultados dos ensaios *in vitro* de citotoxicidade demonstraram que os LIPs causam algum efeito tóxico nas células provavelmente por pressão osmótica, aumentando ou diminuindo seu volume, e até mesmo promovendo a perda da integridade das células HaCat. Foram observados efeitos citotóxicos reduzidos dos LIPs testados em células HepG2, HaCat e HDFa, entre uma faixa de  $CI_{50}$  de 8,0 a 390,0 mM, aproximadamente, podendo atribuir uma maior citotoxicidade aos LIPs cujo grupo aniônico apresenta maior cadeia alquílica. Entretanto, diferentes perfis foram observados, inclusive, com citotoxicidade menor do que a observada para solventes convencionais, evidenciando vantagens no emprego de alguns LIPs.

Para representar as condições oculares *in vivo*, o teste HET-CAM pode ser usado para avaliar substâncias que podem estar associadas a lesões oculares. No caso de possíveis lesões, avalia-se a ocorrência de hemorragia, hiperemia e coagulação, produzindo um resultado qualitativo determinado pela observação do analista, que pode falhar ou não ser preciso. Assim, nesta pesquisa foi utilizada uma combinação de dois *softwares* livres, ImageJ e Photoscape, para obter um resultado semi-quantitativo para reforçar a análise qualitativa preliminar. Dentre os dezessete LIPs testados, 2-HDEACi e 2HEACi não ocasionaram nenhum efeito irritante à membrana, enquanto outros treze, foram classificados como irritantes leves ou moderados.

Considerando os resultados, fica evidente que o aumento da cadeia aniônica diminui o potencial irritante do composto (2-HEAF > 2-HEAA > 2-HEAPr > 2-HEAL; 2-HDEAA >> 2-HDEAPr > 2-HDEAL > 2-HDEASu). O mesmo comportamento é observado para LIPs aromáticos (2-HDEABe > 2-HDEASa) e multieletrônicos (2-HEAAd > 2-HEACi e 2-HDEAMa > 2-HDEAAd > 2-HDEACi), o que pode ser explicado pelo fato de que estruturas complexas com maior efeito de impedimento estérico (altos volumes molares) apresentam maior resistência à passagem pelas membranas biológicas, reduzindo seu potencial irritante ocular.

Dentre os quatro LIPs analisados no ensaio de cicatrização, observou-se comportamento semelhante ao controle negativo no processo de migração celular, sendo mais um fator que corrobora para segurança no uso dos LIPs. Ainda, o indício de um efeito biológico foi observado pelo LIP 2-HDEAOx, que aumentou a proliferação e migração celular, evidenciando um melhor resultado do que o controle negativo.

Finalmente, os dados obtidos neste trabalho demonstraram que os LIPs analisados têm alto potencial de utilização como alternativas aos solventes convencionais, com vantagens diversas, mas principalmente com menor toxicidade às células humanas. Estes efeitos, claramente são dependentes da molécula e da concentração empregadas, sendo que os dados aqui coletados são relevantes para direcionar o emprego destas substâncias.



## 7 REFERÊNCIAS

ABREU, C. L. C.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Metodologias alternativas à experimentação animal: aplicação no controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. **Revista CFMV**, v. 45, p. 20-27, 2008.

ACTOR, J. K. The Inflammatory Response. **Introductory Immunology** (2<sup>a</sup> ed., p. 17-30). United States, US: Academic Press, 2019.

ADAWIYAH, N.; MONIRUZZAMAN, M.; HAWATULAILA, S.; GOTO, M. Ionic liquids as a potential tool for drug delivery systems. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 7, p. 1881-1897, 2016.

AJLOO, D.; SANGIAN, M.; GHADAMGAHI, M.; EVINI, M.; SABOURY, A. A. Effect of two imidazolium derivatives of ionic liquids on the structure and activity of adenosine deaminase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 47-61, 2013.

AKESON, M. A.; MUNNS, D. N. Lipid bilayer permeation by neutral aluminum citrate and by three  $\alpha$ -hydroxy carboxylic acids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 984, n. 2, p. 200-206, 1989.

ÁLVAREZ, V. H.; IGLESIAS, M.; DOSIL, N.; GONZALEZ-CABALEIRO, R.; MARTIN-PASTOR, M.; MATTEDI, S.; NAVAZA, J. M. Brønsted ionic liquids for sustainable processes: synthesis and physical properties. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, p. 625-632, 2010a.

ÁLVAREZ, V. H.; MATTEDI, S.; AZNAR, M.; IGLESIAS, M. Thermophysical properties of binary mixtures of {ionic liquid 2-hydroxyethylammonium acetate + (water, methanol, or ethanol)}. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 43, p. 997-1010, 2011.

ÁLVAREZ, V. H.; MATTEDI, S.; MARTIN-PASTOR, M.; AZNAR, M.; IGLESIAS, M. Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion. **Fluid Phase Equilibria**, v. 299, p. 42-50, 2010b.

ANDRADE, R. S.; CAMARGO, D.; MAZZER, H.; CARDOZO FILHO, L.; IGLESIAS, MIGUEL. Rheological Study of Polyelectrolytic Protic Ionic Liquids. **International Journal of Engineering Research & Technology**, v. 5, p. 419, 2016.

ANDRADE, R.; CARRERAS, A.; IGLESIAS, M. Influence of temperature on thermodynamics for binary mixtures of short aliphatic protic ionic liquids. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 82, p. 68-68, 2017a.

ANDRADE, R. S.; TORRES, D.; RIBEIRO, F. R.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; OSHIRO, J. A. Jr., IGLESIAS, M. Sustainable cotton dyeing in nonaqueous medium applying protic ionic liquids. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 10, p. 8756-8765, 2017b.

AZIMOVA, M.A., MORTON III, S.A., FRYMIER, P.D. Comparison of three bacterial toxicity assays for imidazolium-derived ionic liquids. **Journal of Environmental Engineering**, 135, 1388–1392, 2009.

BALK, A.; HOLZGRABE, U.; MEINEL, L. 'Pro et contra' ionic liquid drugs - Challenges and opportunities for pharmaceutical translation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 291-304, 2015.

BANSODE, P.; PATIL, P.; CHOUDHARI, P.; BHATIA, M.; BIRAJDAR, A.; SOMASUNDARAM, I.; RASHINKAR, G. Anticancer activity and molecular docking studies of ferrocene tethered ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 111182-111193, 2019.

BARROS, S. M.; ANDRADE, R. S.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; VELOSO, G. B. R.; GONZALEZ, C.; IGLESIAS, M. Eco-friendly technology for reactive dyeing of cationized fabrics: protic ionic liquids as innovative media. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 56, p. 403-425, 2022.

BARROS, S.; ANDRADE, R. S.; IGLESIAS, M. Effect of temperature on thermodynamic properties of protic ionic liquids: 2-hydroxy ethylammonium lactate (2-HEAL) + short hydroxylic solvent. **International Journal of Thermodynamics**, v. 21, p. 70-80, 2018.

BASU, A.; BHATTACHARYA, C. S.; KUMAR, G. S. Influence of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide on amyloid fibrillogenesis in lysozyme: Evidence from photophysical and imaging studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, Part B, p. 2643-2649, 2018.

BERNOT, R. J.; BRUESEKE, M. A.; EVANS-WHITE, M. A.; LAMBERTI, G. A. Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 87-92, 2005a.

BERNOT, R. J.; KENNEDY, E. E.; LAMBERTI, G. H. Effects of ionic liquids on the survival, movement, and feeding behaviour of the freshwater snail *Physa acuta*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 1759-1765, 2005b.

BERTHOD, A.; RUIZ-ÁNGEL, M. J.; BROCH, S. Recent advances on ionic liquid uses in separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1559, p. 2-16, 2018.

BERTOTI, A. R.; NETTO-FERREIRA, J. C. Ionic liquid [bmim.PF<sub>6</sub>]: a convenient solvent for laser flash photolysis studies. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1934-1938, 2009.

BHATTACHARJEE, A.; LUÍS, A.; SANTOS, J. H.; LOPES-DA-SILVA, J. A.; COUTINHO, J. A. P. Thermophysical properties of sulfonium- and ammonium-based ionic liquids. **Fluid Phase Equilibria**, v. 381, p. 36-45, 2014.

BIANCHINI, R.; CEVASCO, G.; CHIAPPE, C.; POMELLI, C. S.; DOUTON, M. J. R. Ionic liquids can significantly improve textile dyeing: An innovative application assuring economic and environmental benefits. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, p. 2303-2308, 2015.

BICAK, N. A new ionic liquid: 2-hydroxy ethylammonium formate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 116, p. 15-18, 2005.

BISHT, M.; VENKATESU, P. Influence of cholinium-based ionic liquids on the structural stability and activity of  $\alpha$ -chymotrypsin. **New J. Chem.**, v. 41, p. 13902-13911, 2017.

BORRA, E. F.; SEDDIKI, O.; ANGEL, R.; EISENSTEIN, D.; HICKSON, P.; SEDDON, K. R.; WORDEN, S. P. Deposition of metal films on an ionic liquid as a basis for a lunar telescope. **Nature**, v. 447, p. 979-981, 2007.

BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNING, J.; MARKHAM, A.; FUSENIG, N. E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **The Journal of cell biology**, v. 106, n. 3, p. 761-771, 1988.

BRUGGINSSER, R.; VON DAENIKEN K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002.

BUBALO, M. C.; RADOŠEVIĆ, K.; REDOVNIKović, I. R.; SLIVAC, I.; SRČEK, V. G. Toxicity mechanisms of ionic liquids. **Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju-Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 68, p. 171-179, 2017.

CALZA, P.; FABBRI, D.; NOÈ, G.; SANTORO, V.; MEDANA, C. Assessment of the photocatalytic transformation of pyridinium-based ionic liquids in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 341, p. 55-65, 2018.

CAMARGO, D.; ANDRADE, R. S.; FERREIRA, G. A.; MAZZER, H.; CARDOZO-FILHO, L.; IGLESIAS, M. Investigation of the rheological properties of protic ionic liquids. **Journal of Physical Organic Chemistry (Print)**, v. 1, p. n/a-n/a, 2016.

CARPENTER, C. P., SMYTH, Jr. H. F. Chemical burns of the rabbit cornea. **American Journal of Ophthalmology**, v. 29, p. 1363-72, 1946.

CHANG, L. Y.; LEE, C. P.; LI, C. T.; HO, K. C.; LIN, J. J. Synthesis of a novel amphiphilic polymeric ionic liquid and its application in quasi-solid-state dye-sensitized solar cells. **Journal of Materials Chemistry**, v. 2, p. 20814-20822, 2014.

CHEMNITIUS, J. M.; SADOWSKI, R.; WINKEL, H.; ZECH, R. Organophosphate inhibition of human heart muscle cholinesterase isoenzymes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 120, p. 183-192, 1999.

CHEN, C.; MA, Y.; ZHENG, D.; ZHANG, J.; ZHANG, J. Influence of different substitution in pyrazolium ionic liquids on catalytic activity for the fixation of CO<sub>2</sub> under solvent- and metal-free conditions. **Tetrahedron**, v. 74, n. 15, p. 1776-1784, 2018.

CHENG, D. H. Application of ionic liquid in silk dyeing. **Advanced Materials Research**, v. 331, p. 253-256, 2011.

CHIAPPE, C.; PIERACCINI, D. Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 275-297, 2005.

CHO, C. W.; JEON, Y. C.; PHAM, T. P.; VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y. S. The ecotoxicity of ionic liquids and traditional organic solvents on microalga *Selenastrum capricornutum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 166–171, 2008.

CHO, C. W.; YUN, Y. S. Interpretation of toxicological activity of ionic liquids to acetylcholinesterase inhibition via *in silico* modelling. **Chemosphere**, v. 159, p. 178-183, 2016.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H. R. N. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 19-30, 2009.

CHU, L.; KANG, X.; LI, D.; SONG, X.; ZHAO, X. The toxicological mechanism of two typical imidazole ionic liquids in textile industry on *Isatis tinctoria*. **Chemosphere**, v. 275, 130042, 2021.

CLARK, K. D.; NACHAM, O.; PURSLOW, J. A.; PIERSON, S. A.; ANDERSON, J. L. Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 934, p. 9-21, 2016.

CLAUS, J.; SOMMER, F.O.; KRAGL, U. Ionic liquids in biotechnology and beyond. **Solid State Ionics**, v. 314, p. 119-128, 2018.

COLLIN, R. M.; COLLIN, R.W. **Encyclopedia of Sustainability**. ABC-CLIO, LLC, Santa Barbara, California, 2010.

COLLINS, T. J. Image J for microscopy. **Biotechniques**, v. 43 p. 25–30, 2007.

COMMITTED to maintaining high quality and safety. Submission of data by CTFA. (2-5-29). CIR safety data test summary, primary skin irritation and eye irritation of triethanolamine, 1959.

COMMITTED to maintaining high quality and safety. Submission of data by CTFA. (2-5-24). CIR safety data test summary, primary skin irritation and eye irritation of diethanolamine, 1979A.

COMMITTED to maintaining high quality and safety. Submission of data by CTFA. (2-5-23). CIR safety data test summary, primary skin irritation and eye irritation of monoethanolamine, 1979B.

COMMITTED to maintaining high quality and safety. Submission of data by CTFA. (2-5-65). Allergic contact sensitization test (Test No. APTC-128-80), 1980.

COMMITTED to maintaining high quality and safety. Submission of data by CTFA. (2-5-61). CIR safety data test summary, primate eye test of shampoo containing 12.6 percent triethanolamine, 1976.

COSTA, S. P. F.; MARTINS, B. S. F.; PINTO, P. C. A. G.; SARAIVA, L. M. F. S. Automated cytochrome c oxidase bioassay developed for ionic liquids' toxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 309, p. 165-172, 2016.

COTA, I.; MEDINA, F.; GONZALEZ-OLMOS, R.; IGLESIAS, M. Alanine-supported protic ionic liquids as efficient catalysts for aldol condensation reactions, **Comptes Rendus Chimie**, v. 17, n. 1, p. 18-22, 2014.

COULING, D. J.; BERNOT, R. J.; DOCHERTY, K. M.; DIXON, J. K.; MAGINN, E. J. Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure-property relationship modelling. **Green Chemistry**, v. 8, p. 82-90, 2006.

CUNHA, E.; PINTO, P. C. A G.; CARBALHO, J. P. S.; SARAIVA, M. L. M. F. S. Automated carboxylesterase assay for the evaluation of ionic liquids' humantoxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244-245, p. 563-569, 2013.

DECAEN, P.; ROLLAND-SABATÉ, A.; GUILOIS, S.; JURY, V.; LEROY, E. Choline chloride vs choline ionic liquids for starch thermoplasticization. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, p. 424-432, 2018.

DEYAB, M. A.; ZAKY, M. T.; NESSIM, M. I. Inhibition of acid corrosion of carbon steel using four imidazolium tetrafluoroborates ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 229, p. 396-404, 2017.

DOCHERTY, K. M.; DIXON, J. K.; KULPA, C. F. JR. Biodegradability of imidazolium and pyridinium ionic liquids by an activated sludge microbial community. **Biodegradation**, v. 18, p. 481-493, 2007.

DOCHERTY, K. M.; KULPA, C. F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 7, p. 185-189, 2005.

DONG, Z. Q. Influence of ionic liquids on the sorption of acid dyes by nylon fibers. **Advanced Materials Research**, v. 175-176, p. 602-607, 2011.

DOS SANTOS, R. F.; FALCADE, T.; ANTONINI, L. M.; ORTEGA-V., MARÍA R.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M.; MALFATTI, C. F. Ionic liquids (IL) corrosion on A285 carbon steel. **DYNA (Medellín)**, v. 81, p. 122, 2014.

DU, Y. Y.; TIAN, F. L. Protic acidic ionic liquids promoted formation of 1,5-benzodiazepines: remarkable effects of cations and anions on their performances. **Journal of Chemical Research-S**, v. 8, p. 486-489, 2006.

EGOROVA, K. S., ANANIKOV, V. P. Fundamental importance of ionic interactions in the liquid phase: A review of recent studies of ionic liquids in biomedical and pharmaceutical applications. **Journal of Molecular Liquids**, v. 272, p. 271-300, 2018a.

EGOROVA, K. S., ANANIKOV, V. P. Ionic liquids in whole-cell biocatalysis: a compromise between toxicity and efficiency. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 3, p. 881-900, 2018b.

EGOROVA, K. S., ANANIKOV, V. P. Toxicity of ionic liquids: Eco(cyto)activity as complicated, but unavoidable parameter for task-specific optimization. **ChemSusChem**, v. 7, p. 336-360, 2014.

EGOROVA, K. S.; GORDEEV, E. G.; ANANIKOV, V. P. Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine. **Chemical reviews**, v. 117, p. 7132-7189, 2017.

ELGHARBAWY, A. A.; RIYADI, F. A.; ALAM, M. Z.; MONIRUZZAMAN, M. Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 251, p. 150-166, 2018.

ELSHEIKH, Y. A. Optimization of novel pyrazolium ionic liquid catalysts for transesterification of bitter apple oil. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 92, n. 6, p. 828-834, 2014.

FALL, A.; SECK, I.; DIOUF, O.; GAYE, M.; FALL, Y. Synthesis of new triazolium-based ionic liquids and their use in the Morita–Baylis–Hillman reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 36, p. 5128-5131, 2015.

FAN, Y.; WANG, X.; LI, J.; ZHANG, L.; YANG, L.; GAO, P.; ZHOU, Z. Kinetic study of the inhibition of ionic liquids on the trypsin activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 252, p. 392-398, 2018.

FAZLALI, A.; SHAHEBRAHIMI, Y.; ALIYARI, N.; MOHAMMADI, A. H. Oil products desulfurization by 1-butyl-3-methylimidazolium tetrachloroaluminate ionic liquid: Experimental study and thermodynamic modelling. **Journal of Molecular Liquids**, v. 237, p. 437-446, 2017.

FERRAZ, R.; COSTA-RODRIGUES, J.; FERNANDES, M. H.; SANTOS, M. M.; MARRUCHO, I. M.; REBELO, L. P. N.; BRANCO, L. C. Antitumor activity of ionic liquids based on ampicillin. **Chem Med Chem**, v. 10, n. 9, p. 1480-1483, 2015.

FERRAZ, R.; TEIXEIRA, V.; RODRIGUES, D.; FERNANDES, R.; PRUDENCIO, C.; NORONHA, J. P.; PETROVSKI, Z.; BRANCO, L. C. Antibacterial activity of Ionic Liquids based on ampicillin against resistant bacteria. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 4301-4307, 2014.

FINAL report on the safety assessment of triethanolamine, diethanolamine, and monoethanolamine. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 2, p. 183–235, 1983.

FORSYTH, M.; GIRARD, G. M. A.; BASILE, A.; HILDER, M.; MACFARLANE, D. R.; CHEN, F.; HOWLETT, P. C. Inorganic-Organic Ionic Liquid Electrolytes Enabling High Energy-Density Metal Electrodes for Energy Storage. **Electrochimica Acta**, v. 220, p. 609-617, 2016.

FRADE, R. F. M., ROSATELLA, A. A., MARQUES, C. S., BRANCO, L. C., KULKARNI, P. S., MATEUS, N. M. M., AFONSO, C. A. M., DUARTE, C. M. M. Toxicological evaluation on human colon carcinoma cell line (CaCo-2) of ionic liquids based on imidazolium, guanidinium, ammonium, phosphonium, pyridinium and pyrrolidinium cations. **Green Chemistry**, v. 11, p. 1660-1665, 2009.

FREEMANTLE, M. **Introduction to Ionic Liquids**. RCS publishing, 2010.

FRIIS, M. B.; FRIBORG, C.R.; SCHNEIDER, L.; NIELSEN, N. M-B.; LAMBERT, I. H.; CHRISTENSEN, S. T.; HOFFMANN, E. K. Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts. **The Journal of Physiology**, v. 567, p. 427–443, 2005.

FRONZA, M.; HEINZMAN, B.; HAMBURGER, M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 463–467, 2009.

FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 37–45, 2001.

GEORGE, V. C.; KUMAR, D. R. N.; SURESH, P. K.; KUMAR, R. A. Apoptosis-Induced Cell Death due to Oleanolic Acid in HaCaT Keratinocyte Cells –a Proof-of-Principle Approach for Chemopreventive Drug Development. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 2015-2020, 2012.

GHANEM, O. B.; MUTALIB, M. I. A.; LÉVÊQUE, J. M.; EL-HARBAWI, M. Development of QSAR model to predict the ecotoxicity of *Vibrio fischeri* using COSMO-RS descriptors. **Chemosphere**, v. 170, p. 242–250, 2017.

GILBERT, B.; OLIVIER-BOURBIGOU, H.; FAVRE, F. Chloroaluminate Ionic Liquids: from their Structural Properties to their Applications in Process Intensification. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 62, n. 6, p. 745-759, 2007.

GREAVES, T. L.; WEERAWARDENA, A.; FONG, C.; KRODKIEWSKA, I.; DRUMMOND, C. J. Protic ionic liquids: solvents with tunable phase behavior and physicochemical properties. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 22479-22487, 2006.

GREWAL, J.; KHARE, S. K. One-pot bioprocess for lactic acid production from lignocellulosic agro-wastes by using ionic liquid stable *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 268-273, 2018.

GRIFFITH, J. F.; NIXON, G .A.; BRUCE, R. D.; REER, P. J.; BANNAN, E. A. Dose-response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the human eye. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 55, p. 501-13, 1980.

HAGIWARA, R.; LEE, J. S. Ionic liquids for electrochemical devices. **Electrochemistry**, v. 75, p. 23-34, 2007.

HAN, Q.; BROWN, S. J.; DRUMMOND, C. J. GRAVES, T. L. Protein aggregation and crystallization with ionic liquids: Insights into the influence of solvent properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 609, Part 2, p. 1173-1190, 2022.

HANDY, S. (Ed.). **Applications of Ionic Liquids in Science and Technology**, InTech: Rijeka, 2011.

HARMS, C. T.; OERTLI, J. J. The use of osmotically adapted cell cultures to study salt tolerance in vitro. **Journal of Plant Physiology**, v. 120, n. 1, p. 29-38, 1985.

HE, Z.; ALEXANDRIDIS, P. Ionic liquid and nanoparticle hybrid systems: Emerging applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 244, p. 54-70, 2017.

HUO, A. A. C. T.; MAXIMO, G. J.; COSTA, M. C.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELLES, A. J. A. Applications of ionic liquids in the food and bioproducts industries. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, p. 5347-5369, 2016.

HOU, J.; LIN, S.; ZHANG, M. Ionic-liquid-enhanced solvent extraction mechanism: A novel concept. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, 107899, 2022.

HU, F.; WEI, L.; ZHENG, C.; SHEN, Y.; MIN, W. Live-cell vibrational imaging of choline metabolites by stimulated Raman scattering coupled with isotope-based metabolic labeling. **Analyst**, v. 139, n. 10, p. 2312-2317, 2014.

HUANG, Z.; TUNNACLIFFE, A. Response of human cells to desiccation: comparison with hyperosmotic stress response. **The Journal of Physiology**, v. 558, p. 181-191, 2004.

HWANG, J., PARK, H., CHOI, D. W., NAM, K. T., LIM, K. M. Investigation of dermal toxicity of ionic liquids in monolayer-cultured skin cells and 3D reconstructed human skin models. **Toxicology in vitro**, v. 46, p. 194-202, 2018.

IGLESIAS, M.; TORRES, A.; GONZALEZ-OLMOS, R., SALVATIERRA, D. Effect of temperature on mixing thermodynamics of a new ionic liquid: {2-hydroxyethylammonium formate (2-HEAF) + short hydroxylic solvents}. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 40, p. 119-133, 2008.

IQBAL, B.; MUHAMMAD, N.; JAMAL, A.; AHMAD, P.; HAQ KHAN, Z. U.; RAHIM, A.; KHAN, A. S.; GONFA, G.; IQBAL, J.; REHMAN, I. U. An application of ionic liquid for preparation of homogeneous collagen and alginate hydrogels for skin dressing. **Journal of Molecular Liquids**, v. 243, p. 720-725, 2017.

JAITELY, V.; KARATAS, A.; FLORENCE, A. T. Water-immiscible room temperature ionic liquids (RTILs) as drug reservoirs for controlled release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 54, n. 1-2, p. 168-173, 2008.

JOHNSON, W., HELDRETH, B., BERGFELD, W. F., BELSITO, D. V., HILL, R. A., KLAASSEN, C. D., LIEBLER, D. C., MARKS, J. G., SHANK, R. C., SLAGA, T. J., SNYDER, P. W., & ANDERSEN, F. A. Safety assessment of formic acid and sodium formate as used in cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 35 (2\_suppl), 41S-54S, 2016.

JORDAN, A., GATHERGOOD, N. Biodegradation of ionic liquids e a critical review. **Chemical Society Reviews**, v. 44, p. 8200-8237, 2015.

JOURNAL Officiel de la République Française. Arrête du 27 décembre 1996 relatif aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques. Annexe IV: méthode officiel d'évaluation du potentiel irritant par application sur la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poule, p. 19137-8, 1996.



- KAKAEI, K.; ALIDOUST, E.; GHADIMI, G. Synthesis of N- doped graphene nanosheets and its composite with urea choline chloride ionic liquid as a novel electrode for supercapacitor. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 735, p. 1799-1806, 2018.
- KANTOUCH, A., KHALIL, E. M., EL-SAYED, H., MOWAFI, S. A novel application of ionic liquid in improvement of the felting resistance of wool. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 54, p. 481-493, 2011.
- KAUSHIK, N. K., ATTRI, P., KAUSHIK, N., CHOI, E. H., Synthesis and antiproliferative activity of ammonium and imidazolium ionic liquids against T98G brain cancer cells. **Molecules**, v. 17, p. 13727-13739, 2012.
- KISHIMURA, H.; KOHKI, E.; NAKADA, A.; TAMATANI, K.; ABE, H. Ether bond effects in quaternary ammonium and phosphonium ionic liquid-propanol solutions. **Chemical Physics**, v. 502, p. 87-95, 2018.
- KLEIN, R.; MÜLLER, E.; KRAUS, B.; BRUNNER, G.; ESTRINE, B.; TOURAUD, D.; KUNZ, W. Biodegradability and cytotoxicity of choline soaps on human cell lines: effects of chain length and the cation. **RSC Advances**, v. 3, n. 45, p. 23347-23354, 2013.
- KNUDSEN, G. A.; CHENG, Y.; KUESTER, R. K.; HOOTH, M. J.; SIPES, I. G. Effects of dose and route on the disposition and kinetics of 1-butyl-1-methylpyrrolidinium chloride in male F-344 rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 11, p. 2171-2177, 2009.
- KORDALA-MARKIEWICZ, R.; RODAK, H.; MARKIEWICZ, B.; WALKIEWICZ, F.; SZNAJDROWSKA, A.; MATERNA, K.; MARCINKOWSKA, K.; PRACZYK, T.; PERNAK, J. Phenoxy herbicidal ammonium ionic liquids. **Tetrahedron**, v. 70, n. 32, p. 4784-4789, 2014.
- KOKORIN, A. (Ed.). **Ionic Liquids: Applications and Perspectives**. InTech: Rijeka, 2011.
- KOSINSKI, S.; RYKOWSKA, I.; GONSIOR, M.; KRZYZANOWSKI, P. Ionic liquids as antistatic additives for polymer composites – A review. **Polymer Testing**, v. 112, 107649, 2022.
- KRAUSE, A. C. Citric Acid Studies Referring to the Eye. **Archives of Ophthalmology**, v. 20, p. 530-530, 1938.
- KULHAVY, J.; ANDRADE, R.; BARROS, S.; SERRA, J.; IGLESIAS, M. Influence of temperature on thermodynamics of protic ionic liquid 2-hydroxy diethylammonium lactate (2-HDEAL)+short hydroxylic solvents. **Journal of Molecular Liquids (Print)**, v. 213, p. 92-106, 2016.
- KULTZ, D.; CHAKRAVARTY, D. Maintenance of genomic integrity in mammalian kidney cells exposed to hyperosmotic stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 130, p. 421-428, 2001.
- KUMAR, A., KUMAR, P. Quantitative structure toxicity analysis of ionic liquids toward acetylcholinesterase enzyme using novel QSTR models with index of ideality of correlation and correlation contradiction index. **Journal of Molecular Liquids**, v. 318, 114055, 2020.

- KUMAR, R. A., PAPAÏCONOMOU, N., LEE, J. M., SALMINEN, J., CLARK, D. S., PRAUSNITZ, J. M. *In vitro* cytotoxicities of ionic liquids: effect of cation rings, functional groups, and anions. **Environmental Toxicology**, v. 24, p. 388-395, 2009.
- KUMAR, S.; RUTH, W.; SPRENGER, B.; KRAGL, U. On the biodegradation of ionic liquid 1- Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. **Chimica Oggi**, n. 24, p. 24–26, 2006.
- KUMER, A., SARKER, M., PAUL, S. The Simulating Study of HOMO, LUMO, thermo physical and quantitative structure of activity relationship (QSAR) of some anticancer active ionic liquids. **Eurasian Journal of Environmental Research**, v. 3, p. 1-10, 2019.
- KUNOV-KRUSE, A. J.; WEBER, C. C.; ROGERS, R. D.; MYERSON, A. S. The a priori design and selection of ionic liquids as solvents for active pharmaceutical ingredients. **Chemistry-A European Journal**, v. 23, p. 5498-5508, 2017.
- LARANGEIRA, P. M.; ROSSO, V. V.; SILVA, V. H. P.; MOURA, C. F. G.; RIBEIRO, D. A. Genotoxicity, mutagenicity and cytotoxicity of carotenoids extracted from ionic liquid in multiples organs of Wistar rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, V. 68, P. 571-578, 2016.
- LARRIBA, M.; NAVARRO, P.; DELGADO-MELLADO, N.; STANISCI, V.; GARCÍA, J.; RODRÍGUEZ, F. Separation of aromatics from *n*-alkanes using tricyanomethanide-based ionic liquids: Liquid-liquid extraction, vapor-liquid separation, and thermophysical characterization. **Journal of Molecular Liquids**, v. 223, p. 880-889, 2016.
- LATALA, A.; STEPNOWSKI, P.; NEDZI, M.; MROZIK, W. Marine toxicity assessment of imidazolium ionic liquids: acute effects on the Baltic algae *Oocystis submarina* and *Cyclotella meneghiniana*. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 91-98, 2005.
- LE BIDEAU, J.; VIAU, L.; VIOUX, A. Ionogels, ionic liquid based hybrid materials. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 907-925, 2011.
- LEI, H.; TU, J.; YU, Z.; JIAO, S. Exfoliation Mechanism of Graphite Cathode in Ionic Liquids. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 42, p. 36702-36707, 2017.
- LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F; SILVEIRA, C. C. “Green chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.
- LI, K.; CHOUDHARY, H.; ROGERS, R. D. Ionic liquids for sustainable processes: Liquid metal catalysis. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 11, p. 15-21, 2018.
- LI, L.; BU, C.; ZHANG, Y.; DU, J.; LU, X.; LIU, X. Composite system based on biomolecules-functionalized multiwalled carbon nanotube and ionic liquid: electrochemistry and electrocatalysis of tryptophane. **Electrochimica Acta**, v. 58, p. 105-111, 2011.
- LI, T. H.; JING, C. Q.; GAO, K. L.; YUE, W. Y.; LI, S. F. Cytotoxicity of 1-dodecyl-3-methylimidazolium bromide on HepG2 cells. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 13342-13348, 2015.

LI, W.; QI, Y., GAO, C.; LIU, Y.; DUAN, J. A sensitive approach for screening acetylcholinesterase inhibition of water samples using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1190, 123101, 2022.

LI, W.; SUN, D.; ZHANG, T.; S.; PAN, F.; ZHANG, Z. Separation of acetone and methanol azeotropic system using ionic liquid as entrainer. **Fluid Phase Equilibria**, v. 383, p. 182-187, 2014.

LIANG, C. L.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v.2, p. 329-333, 2007.

LIBERACKI, A. B.; NEEPER-BRADLEY, T. L.; BRESLIN, W. J.; ZIELKE, G. J. Evaluation of the developmental toxicity of dermally applied monoethanolamine in rats and rabbits. **Toxicological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 117-123. 1996.

LIEBERT, M.A. Final report on the safety assessment of cocamide DEA, lauramide DEA, linoleamide DEA, and oleamide DEA. **Journal Of The American College Of Toxicology**, v. 5, n. 5, p. 415, 1986.

LIU, L.; YANG, P.; LI, P.; CUI, M. Y. Application of bis(trifluoromethanesulfonyl)imide lithium-N-methyl-Nbutylpiperidinium-bis(trifluoromethanesulfonyl)imide-poly(vinylidene difluoride-co-hexafluoropropylene) ionic liquid gel polymer electrolytes in Li/LiFePO<sub>4</sub> batteries at different temperatures. **Electrochimica Acta**, v. 85, p. 49-56. 2012.

LIU, X. ; JI, C. ; YANG, Q. ; BAO, Z.; FAN, X.; YANG, Y. ; XING, H. Carboxylate ionic liquids combining low cytotoxicity toward HepG2 cell and high separation efficiency for bioactive molecules. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1974-1981, 2017.

LOPES, J. M.; BERMEJO, M. D.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Ionic Liquid as Reaction Media for the Production of Cellulose-Derived Polymers from Cellulosic Biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 1, n. 10, p. 1-28, 2017.

LUIS, P., ORTIZ, I., ALDACO, R., IRABIEN, A. A novel group contribution method in the development of a QSAR for predicting the toxicity (*Vibrio fischeri* EC<sub>50</sub>) of ionic liquids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Saf. 67, 423–429, 2007.

MARKUSSON, H.; BELIERES, J. P.; JOHANSSON, P.; ANGELL, C. A.; JACOBSSON, P. Prediction of macroscopic properties of protic ionic liquids by ab initio calculations. **Journal of Physical Chemistry A**, v.111, p. 8717-8723, 2007.

MARTINELLI, A.; MATIC, A.; JACOBSSON, P.; BORJESSON, L.; FERNICOLA, A.; PANERO, S.; SCROSATI, B.; OHNO, H. Physical properties of proton conducting membranes based on a protic ionic liquid. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, p. 12462-12467, 2007.

MASOOMEH, S.; DAVOOD, A.; MARYAM, G. Effect of two ionic liquids on the structure and activity of adenosine deaminase enzyme. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. S243, 2011.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 31–91, 1993.

MATSUMOTO, M.; MOCHIDUKI, K.; FUKUNISHI, K.; KONDO, K. Extraction of organic acids using imidazolium-based ionic liquids and their toxicity to *Lactobacillus rhamnosus*. **Separation and Purification Technology**, v. 40, p. 97-101, 2004a.

MATSUMOTO, M.; MOCHIDUKI, K.; KONDO, K. Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, p. 344-347, 2004b.

MATSUO, A. Y. O.; LAMBERTI, G. A. Understanding the mechanism of ionic liquid toxicity to fish and *Daphnia*. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 231, 176-IEC, 2006.

MATZKE, M.; ARNING, J.; JOHANNES, R.; JASTORFF, B.; STOLTE, S. Design of inherently safer ionic liquids: toxicology and biodegradation. In: Wasserscheid P, Stark A, editors. **Handbook of green chemistry**. Vol. 6: Ionic liquids. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; p. 235-98, 2010.

MATZKE, M., STOLTE, S., THIELE, K., JUFFERNHOLZ, T., ARNING, J., RANKE, J., WELZ-BIERMANN, U., JASTORFF, B. The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. **Green Chem**, v. 9, p. 1198–1207, 2007.

MAYORAL, M. J.; OVEJERO, P.; CAMPO, J. A.; HERAS, J. V.; CANO, M. Ionic liquid crystals from  $\beta$ -diketonyl containing pyridinium cations and tetrachlorozincate anions. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 12, n. 3, p. 214-218, 2009.

MCKENZIE, B.; KAYA, G.; MATTHEWS, K. H.; KNOTT, R. M.; CAIRNS, D. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop1 and ImageJ. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, p. 1-8, 2015.

MEENATCHI, B.; RENUGA, V.; MANIKANDAN, A. Cellulose dissolution and regeneration using various imidazolium based protic ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 238, p. 582-588, 2017.

MEKSI, N.; MOUSSA, A. A review of progress in the ecological application of ionic liquids in textile processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 161, p. 105-126, 2017.

MESSALI, M.; ALMTIRI, M. N.; ABDERRAHMAN, B.; SALGHI, R.; AOUD, M. R.; ALSHAHATEET, S. F.; ALI, A. A. New pyridazinium-based ionic liquids: An eco-friendly ultrasound-assisted synthesis, characterization and biological activity. **South African Journal of Chemistry**, v. 68, p. 219-225, 2015.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 239–250, 2002.

MUZALEVSKIY, V. M.; SHASTIN, A. V.; SHIKHALIEV, N. G.; MAGERRAMOV, A. M.; TEYMUROVA, A. N.; NENAJDENKO, V. G. Ionic liquids as a reusable media for copper catalysis. Green access to alkenes using catalytic olefination reaction. **Tetrahedron**, v. 72, n. 45, p. 7159-7163, 2016.

NAWATA, J. DAWIDZIUK, B.; DZIEDZIC, D.; GORDON, D.; POPIEL, S. Applications of ionic liquids in analytical chemistry with a particular emphasis on their use in solid-phase microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 18-36, 2018.

NEALE, A. R.; MURPHY, S.; GOODRICH, P.; SCHÜTTER, C.; HARDACRE, C.; PASSERINI, S.; BALDUCCI, A.; JACQUEMIN, J. An ether-functionalised cyclic sulfonium based ionic liquid as an electrolyte for electrochemical double layer capacitors. **Journal of Power Sources**, v. 326, p. 549-559, 2016.

NEHRA, P.; KHUNGAR, B.; SINGH, R. P.; SIVASUBRAMANIAN, S. C.; JHA, P. N.; SAINI, V. Synthesis, characterization and applications of imidazolium ionic liquid-tagged zinc(II) complex. **Inorganica Chimica Acta**, v. 478, p. 260-267, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIEDERMEYER, H.; HALLETT, J. P.; VILLAR-GARCIA, I. J.; HUNT, P. A.; WELTON, T. Mixtures of ionic liquids. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 7780-7802, 2012.

NIEMCZAK, M.; KACZMAREK, D.K.; KLEJDYSZ, T.; GWIAZDOWSKA, D.; MARCHWIŃSKA, K.; PERNAK, J. Ionic liquids derived from vitamin C as multifunctional active ingredients for sustainable stored-product management. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, p. 1072-1084, 2019.

NODA, A.; SUSAN, A. B.; KUDO, K.; MITSUSHIMA, S.; HAYAMIZU, K.; WATANABE, M. Bronsted acid-base ionic liquids as proton-conducting nonaqueous electrolytes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, p. 4024-4033, 2003.

OCHEDZAN-SIODKAK, W.; DZIUBEK, K.; SIODKAK, D. Biphasic ethylene polymerisation using 1-n-alkyl-3-methylimidazolium tetrachloroaluminate ionic liquid as a medium of the Cp<sub>2</sub>TiCl<sub>2</sub> titanocene catalyst. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 11, p. 3608-3614, 2008.

OLIVEIRA, L.; JOSE, N. M.; BOAVENTURA, J.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S. Proton conducting polymer membrane using the ionic liquid 2-hydroxyethylammonium lactate for ethanol fuel cells. **AIP Conference Proceedings**, v. 1400, p. 149-153, 2011.

OLIVEIRA, M. V. S.; VIDAL, B. T.; MELO, C. M.; MIRANDA, R. C. M.; SOARES, C. M. F.; COUTINHO, J. A. P.; VENTURA, S. P. M.; MATTEDI, S.; LIMA, A. S. (Eco)toxicity and biodegradability of protic ionic liquids. **Chemosphere**, v. 147, p. 460-466, 2016.

OPWIS, K.; BENKEN, R.; KNITTEL, D.; GUTMANN, J. S. Dyeing of PET Fibers in Ionic Liquids. **International Journal of New Technology and Research**, v. 3, n. 11, p. 101-108, 2017.

- PERIC, B.; MARTÍ, E.; SIERRA, J.; CRUAÑAS, R.; IGLESIAS, M.; GARAU, M.A. Terrestrial ecotoxicity of short aliphatic protic ionic liquids. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 12, p. 2802-2809, 2011.
- PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTÍ, E., CRUAÑAS, R.; GARAU, M. A. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) prediction of (eco)toxicity of short aliphatic protic ionic liquids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, p. 257-262, 2015.
- PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTÍ, E.; CRUAÑAS, R.; GARAU, M.A. A comparative study of the terrestrial ecotoxicity of selected protic and aprotic ionic liquids. **Chemosphere**, v. 108, p. 418-425, 2014.
- PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTI, E.; CRUAÑAS, R.; GARAU, M.A.; ARNING, J. BOTTIN-WEBER, U.; STOLTE, S. (Eco)toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 99–105, 2013.
- PETKOVIC, M.; SEDDON, K. R.; REBELO, L. P.; SILVA PEREIRA, C. Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 1383-1403, 2011.
- PIN, T. C.; NAKASU, P. Y. S.; MATTEDI, S.; RABELO, S. C.; COSTA, A. C. Screening of protic ionic liquids for sugarcane bagasse pretreatment. **Fuel**, v. 235, p. 1506-1514, 2019.
- PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 123-150, 2008.
- POPE, C.; KARANTH, S.; LIU, J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 433-446, 2005.
- PRESGRAVE, O. A. F.; CALDEIRA, C.; GIMENES, I.; FREITAS, J. C. B. R.; NOGUEIRA, S. T. B.; OLIVEIRA, N. D. E.; OLIVEIRA, A. G. L.; SILVA, R. S.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. F. Métodos alternativos ao uso de animais: uma visão atual. **Tropical Animal Science Journal**, v. 13, n. 1, p. 106-117, 2010.
- PRETTI, C., CHIAPPE, C., BALDETTI, I., BRUNINI, S., MONNI, G., INTORRE, L. Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 72, p. 1170–1176, 2009.
- QINGDAO UNIVERSITY. **Dyeing method of reactive dye containing ionic liquid**. CN Patent 102493222 A, 2012.
- RAMOS, M. A. D. S.; DA SILVA, P. B.; SPÓSITO, L.; DE TOLEDO, L. G.; BONIFACIO, B. V.; RODERO, C. F.; SANTOS, K. C. DOS; CHORILLI, M., BAUAB, T. M. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1179-1213, 2018.

RANKE, J.; MÖLTER, K.; STOCK, F.; BOTTIN-WEBER, U.; POCZOBUTT, J.; HOFFMANN, J.; ONDRUSCHKA, B.; FILSER, J.; JASTORFF, B. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio Fischeri* and WST-1 cell viability assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 58, p. 396–404, 2004.

RANKE, J.; STOLTE, S.; STORMANN, R.; ARNING, J.; JASTORFF, B. Design of sustainable chemical products – the example of ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 2183–2206, 2007.

REACH, REGLAMENTO (CE) n° 1907/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 18 de diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), Diario Oficial de la Unión Europea L 396/1 (30.12.2006).

REID, J. E. S. J.; PRYDDERCH, H.; SPULAK, M.; SHIMIZU, S.; GATHERGOOD, N. Green profiling of aprotic versus protic ionic liquids: Synthesis and microbial toxicity of analogous structures. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 7, p. 17-26, 2018.

REID, J. E. S. J.; SULLIVAN, N.; SWIFT, L.; HERNBURY, G. A.; SHIMIZU, S.; WALKER, A. J. Assessing the mutagenicity of protic ionic liquids using the mini Ames test. **Sustainable Chemical Processes**, v. 3, n. 17, p. 1-11, 2015.

RIDUAN, S. N.; ZHANG, Y. Imidazolium salts and their polymeric materials for biological applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 9055-9070, 2013.

RODRIGUES, R. D. P.; DE LIMA, P. F.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S. DE; ROCHA, M. V. P. Evaluation of protic ionic liquids as potential solvents for the heating extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Algal Research**, v. 38, 101391, 2019.

ROGALSKY, S.; BARDEAU, J. F.; MAKHNO, S.; BABKINA, N.; BROVKO, O. New proton conducting membrane based on bacterial cellulose/polyaniline nanocomposite film impregnated with guanidinium-based ionic liquid. **Polymer Journal**, v. 142, p. 183-195, 2018.

ROSA, J. M.; FILETI, A. M. F.; TAMBOURGI, E. B.; SANTANA, J. C. C. Dyeing of cotton with reactive dyestuffs: the continuous reuse of textile wastewater effluent treated by ultraviolet/hydrogen peroxide homogeneous photocatalysis, **Journal of Cleaner Production**, v. 90, p. 60-65, 2015.

ROUT, A.; RAMANATHAN, N. Cyphos nitrate: A potential ionic liquid for the extraction and selective separation of plutonium (IV) from other metal ions present in nitric acid. **Journal of Ionic Liquids**, v. 2, 100029, 2022.

ROUETTE, H. K. **Encyclopedia of Textile Finishing**. Springer, Berlin, Germany. 2001.

RYKOWSKA, I.; ZIEMBLIŃSKA, J.; NOWAK, I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 259, p. 319-339, 2018.

- SALA, M.; GUTIERREZ-BOUZAN, M. C. Electrochemical treatment of industrial wastewater and effluent reuse at laboratory and semi-industrial scale, **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 458-464, 2014.
- SALMINEN, J.; PAPAICONOMOU, N.; KUMARA, R. A.; LEE, J. M.; KERR, J.; NEWMAN, J.; PRAUSNITZ, J. M. Physicochemical properties and toxicities of hydrophobic piperidinium and pyrrolidinium ionic liquids. **Fluid Phase Equilibria**, v. 261, p. 421-426, 2007.
- SARDAR, S.; WILFRED, C.D.; MUMTAZ, A.; LEVEQUE, J.; KHAN, A.S.; KRISHNAN, S. Physicochemical properties, Brønsted acidity and ecotoxicity of imidazolium-based organic salts: Non-toxic variants of protic ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v. 269, p. 178-186, 2018.
- SCHWARZ, H.; KOCH, A.L. Phase and electron microscopic observations of osmotically induced wrinkling and the role of endocytotic vesicles in the plasmolysis of the Gram-negative cell wall. **Microbiology**, v. 141, n.3, 161-170, 1995.
- SCHWARZENBACH, R. P.; GSCHWEND P. M.; IMBODEN, D. M. The amazing world of anthropogenic organic chemicals. In:\_\_\_\_\_. **Environmental Organic Chemistry**, 3. ed. New Jersey: Wiley-Interscience, cap. 3, p. 52, p. 45-79, 2016.
- SEN, S.; LOSEY, B. P.; GORDON, E. E.; ARGYROPOULOS, D. S.; MARTIN, J. D. Ionic Liquid Character of Zinc Chloride Hydrates Define Solvent Characteristics that Afford the Solubility of Cellulose. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 6, p. 1134-41, 2016.
- SERRA, J. S.; ROSARIO, T. C.; COSTA, K. S.; ANDRADE, R.; IGLESIAS, M. Synthesis of triacetin by protic ionic liquids as catalysts. **World Wide Journal of Multidisciplinary Research and Development**, v. 2, p. 7-13, 2016.
- SHANG, D.; LIU, X.; BAI, L.; ZENG, S.; XU, Q.; GAO, H.; ZHANG, X. Ionic liquids in gas separation processing. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 74-81, 2017.
- SHARMA, A.; GHORAI, P. K. Effect of water on structure and dynamics of [BMIM][PF<sub>6</sub>] ionic liquid: An all-atom molecular dynamics simulation investigation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 144, p. 114505, 2016.
- SILVA, P. S.; JUNIOR, C. T. S.; ARAÚJO, E. G.; KANAAN, S.; XAVIER, A. R. Adenosina desaminase: uma enzima extraordinária e onipresente. **Pulmão RJ**, v. 25, n. 1, p. 11-16, 2016.
- SKLADANOWSKI, A. C.; STEPNOWSKI, P.; KLESZCZYNSKI, K.; DMOCHOWSKA, B. AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics. A potential molecular method for risk assessment of synthetic nitro- and polycyclic musks, imidazolium ionic liquids and N-glucopyranosyl ammonium salts. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 291-296, 2005.
- STEPNOWSKI, P., SKLADANOWSKI, A. C., LUDWICZAK, A., LACZYNSKA, E. Evaluating the cytotoxicity of ionic liquids using human cell line HeLa. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, p. 513-517, 2004.



- STOLTE, S.; MATZKE, M.; ARNING, J.; BOSCHEN, A.; PITNER, W. R.; WELZBIERMANN, U.; JASTORFF, B.; RANKE, J. Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 1170-1179, 2007.
- TANG, B.; GONDOSISWANTO, R.; HIBBERT, D. B.; ZHAO, C. Critical assessment of superbases-derived protic ionic liquids as electrolytes for electrochemical applications. **Electrochimica Acta**, v. 298, p. 413-420, 2019.
- TANKOV, I.; YANKOVA, R.; GENIEVA, S.; MITKOVA, M.; STRATIEV, D. Density functional theory study on the ionic liquid pyridinium hydrogen sulfate. **Journal of Molecular Structure**, v. 1139, p. 400-406, 2017.
- TARANNUM, A.; RAO, J. R.; FATHIMA, N. N. Insights into protein-ionic liquid interaction: A comprehensive overview on theoretical and experimental approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, Part A, p. 498-505, 2021.
- THRIEL, C. V. Toxicology of Solvents (Including Alcohol). **Reference Module in Biomedical Sciences**, 2014.
- THAMKE, V. R.; CHAUDARI, A. U.; TAPASE, S. R.; PAUL, D.; KODAM, K. M. *In vitro* toxicological evaluation of ionic liquids and development of effective bioremediation process for their removal. **Environmental Pollution**, V. 250, p. 567-577, 2019.
- TIAN, T.; HU, X.; GUAN, P.; WANG, S.; DING, X. Density and thermodynamic performance of energetic ionic liquids based on 1-alkyl/esteryl-4-amino-1,2,4-triazolium. **Journal of Molecular Liquids**, v. 248, p. 70-80, 2017.
- TIGELAAR, D. A.; WALDECKER, J. R.; PEPLOWSKI, K. M.; KINDER, J. D. Study of the incorporation of protic ionic liquids into hydrophilic and hydrophobic rigid-rod elastomeric polymers. **Polymer Journal**, v. 47, p. 4269-4275, 2006.
- TORRECILLA, J. S.; GARCÍA, J.; ROJO, E.; RODRÍGUEZ, R. Estimation of toxicity of ionic liquids in leukemia rat cell line and acetylcholinesterase enzyme by principal component analysis, neural networks and multiple linear regressions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p. 182-194, 2009.
- VEKARIYA, R. L. A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations. **Journal of Molecular Liquids**, v. 227, p. 44-60, 2017.
- VIJAYARAGHAVAN, R.; ONCSIK, T.; MITSCHKE, B.; MACFARLANE, D. R. Base-rich diamino protic ionic liquid mixtures for enhanced CO<sub>2</sub> capture. **Separation and Purification Technology**, v. 196, p. 27-31, 2018.
- WALDEN, P. Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts, **Bull. Bulletin of the Imperial Academy of Sciences (Saint Petersburg)**, v. 1800, p. 405-422, 1914.

WALTER, M. N. M.; WRIGHT, K. T.; FULLER, H. R., MACNEIL, S.; JOHNSON, W. E. B. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental Cell Research**, v. 316, p. 1271-1281, 2010.

WANG, X.; OHLIN, C. A.; LU, Q.; FEI, Z.; HUB, J.; DYSON, P. J. Cytotoxicity of ionic liquids and precursor compounds towards human cell line HeLa. **Green Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 1191-1191, 2007.

WEIL, C. S. ; SCALA, R. A. Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 19, p. 276-360, 1971.

WELTON, T. Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 8, p. 2071-2084, 1999.

WORTH, A. P.; BALL, M. Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. **ATLA**, v. 30, n. 1, p. 13-19, 2002.

WU, H.; DENG, Z.; ZHOU, B.; QI, M.; HONG, M.; REN, G. Improved transdermal permeability of ibuprofen by ionic liquid technology: Correlation between counterion structure and the physicochemical and biological properties. **Journal of Molecular Liquids**, v. 283, p. 399-409, 2019.

WU, Q.; CHEN, H.; HAN, M. H.; WANG, D. Z.; WANG, J. F. Transesterification of cottonseed oil catalyzed by bronsted acidic ionic liquids. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 7955-7960, 2007a.

XIA, X.; WAN, R.; WANG, P.; HUO, W.; DONG, H.; DU, Q. Toxicity of imidazoles ionic liquid [C<sub>16</sub>mim]Cl to Hela cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, p. 408-414, 2018.

XIONG, C.; LI, Y.; WANG, S.; ZHOU, Y. Functionalization of nanosilica via guanidinium ionic liquid for the recovery of gold ions from aqueous solutions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 256, p. 183-190, 2018.

YU, M. LI, S. M.; ZHANG, B. J.; WANG, J. J. Acute effects of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system of mouse liver. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 903-908, 2008.

YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X.; WANG, P. Enhancing dye adsorption of wool fibers with 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid processing. **Textile Research Journal**, v. 80, p. 1898-1904, 2010a.

YUAN, J., WANG, Q., FAN X. Dyeing behaviors of ionic liquid treated wool. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 117, p. 2278-2283, 2010b.

ZAKREWSKY, M.; LOVEJOY, K. S.; KERN, T. L.; MILLER, T. E.; LE, V.; NAGY, A.; GOUMASD, A. M.; IYERD, R. S.; SESTOE, R. E. D.; KOPPISCHF, A. T.; FOXD, D. T.; MITRAGOTRIA, S. Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 13313–13318, 2014.

ZAMFIR, L. G.; ROTARIU, L.; BALA, CAMELIA. Acetylcholinesterase biosensor for carbamate drugs based on tetrathiafulvalene–tetracyanoquinodimethane/ionic liquid conductive gels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 46, p. 64-67, 2013.

ZANONI, B.; BRASIL ROMÃO, G.; ANDRADE, R. S.; BARRETTO CICARELLI, R.; TROVATTI, E. ; CHIARI-ANDRÉO, B.; IGLESIAS, M. Cytotoxic effect of protic ionic liquids in HepG2 and HaCat human cells: In vitro and In silico studies. **Toxicology Research**, v. 8, p. 447-458, 2019.

ZEC, N; VRANES, M.; BESTER-ROGAC, M.; TRTIĆ-PETROVIĆ, T.; GADZURIĆ, S. Influence of the alkyl chain length on densities and volumetric properties of 1,3-dialkylimidazolium bromide ionic liquids and their aqueous solutions. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 121, p. 72-78, 2018.

ZHANG, X.; PAN, L.; WANG, L.; ZOU, J. Review on synthesis and properties of high-energy-density liquid fuels: Hydrocarbons, nanofluids and energetic ionic liquids. **Chemical Engineering Science**, v. 180, p. 95-125, 2018.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evadamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmaceutica**, v. 25, p. 83-89, 2004.

ZHANG, Z.; LIU, J. F.; CAI, X. Q.; JIANG, W. W.; LUO, W. R.; JIANG, G. B. Sorption to dissolved humic acid and its impacts on the toxicity of imidazolium based ionic liquids. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 4, p. 1688-1694, 2011.

ZHAO, D. B.; LIAO, Y. C.; ZHANG, Z. D. Toxicity of ionic liquids. **Clean-Soil Air Water**, v. 35, p. 42-48, 2007.

ZHENG, D.; DONG, L.; HUANG, W.; WU, X.; NIE, N. A review of imidazolium ionic liquids research and development towards working pair of absorption cycle. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, p. 47-68, 2014.

ZHOU, S.; ZHU, G.; KANG, X.; LI, Q.; XU, X. Molecular dynamics simulation of the ionic liquid N-octylpyridinium tetrafluoroborate and acetonitrile: Thermodynamic and structural properties. **Chemical Physics Letters**, v. 701, p. 1-6, 2018.

ZHUANG, L., ZHENG, C., SUN, J., YUAN, A., WANG, G. Performances of ramie fiber pretreated with dicationic imidazolium ionic liquid. **Fibers and Polymers**, v. 15, p. 226-233, 2014.

ZUBAIR, M.; EKHOLM, A.; NYBOM, H.; RENVERT, S.; WIDEN, C.; RUMPUNEN, K. Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 825– 830, 2012.

## 8 APÊNCIDE A – Figuras suplementares

Figura A1. Variação da escala de cinza pela distância do 2-HEAA.

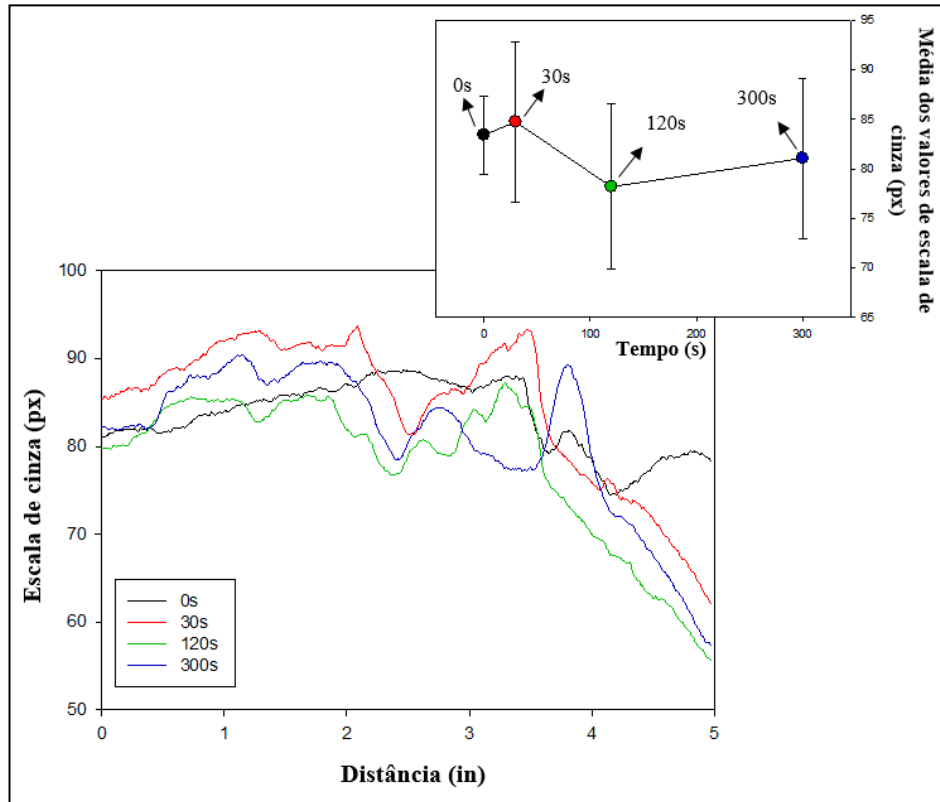
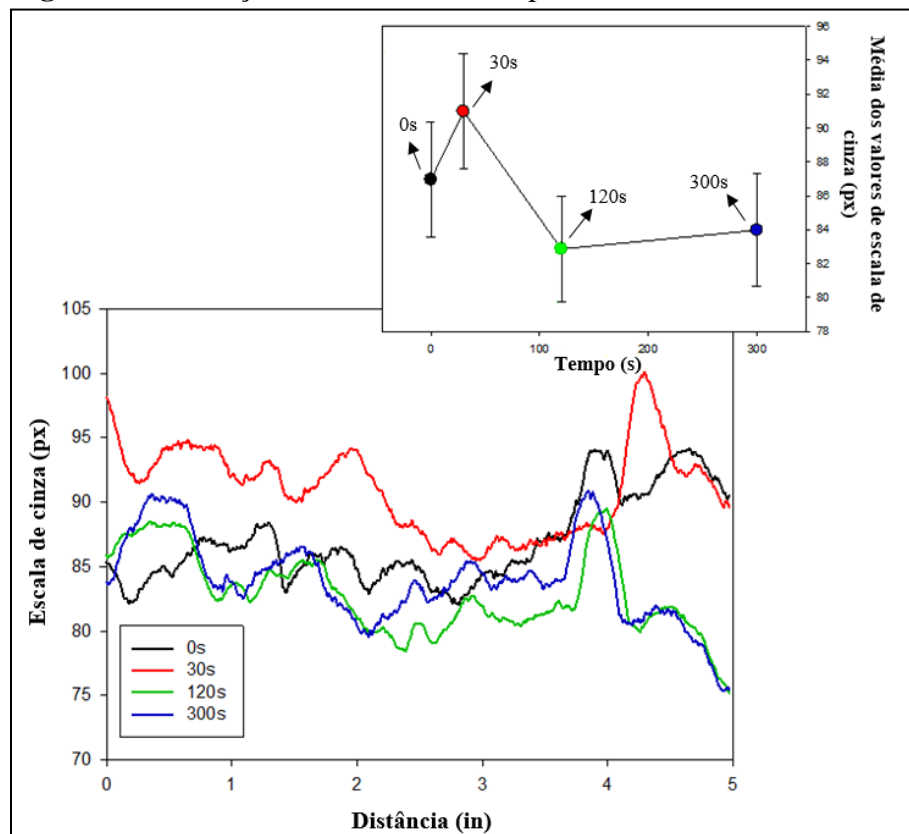
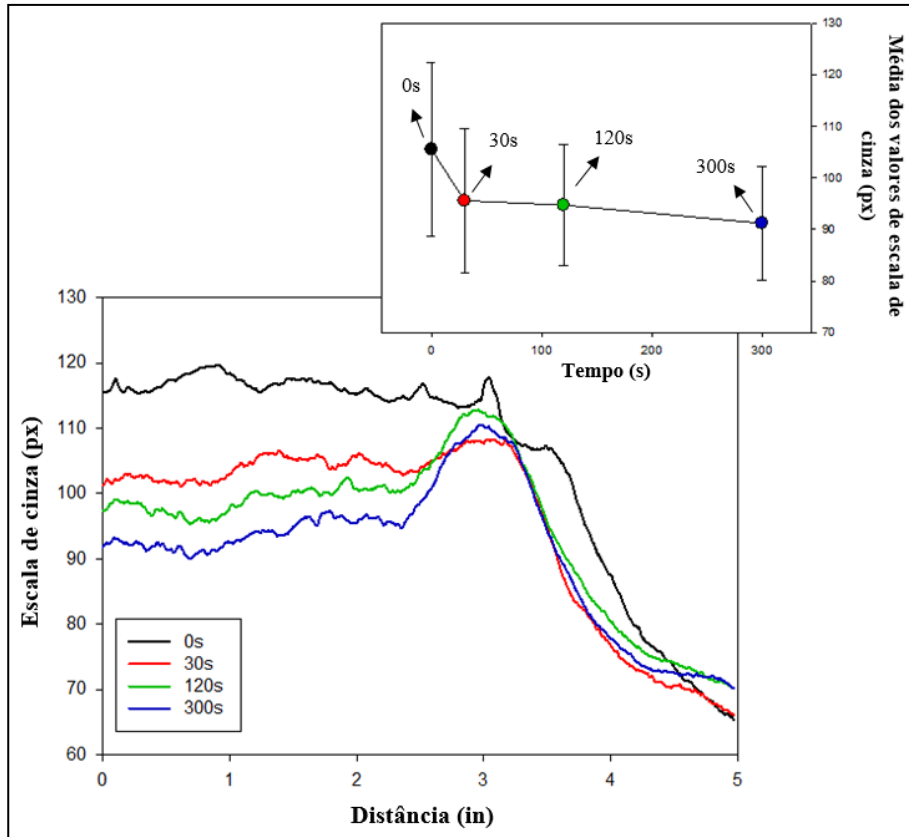


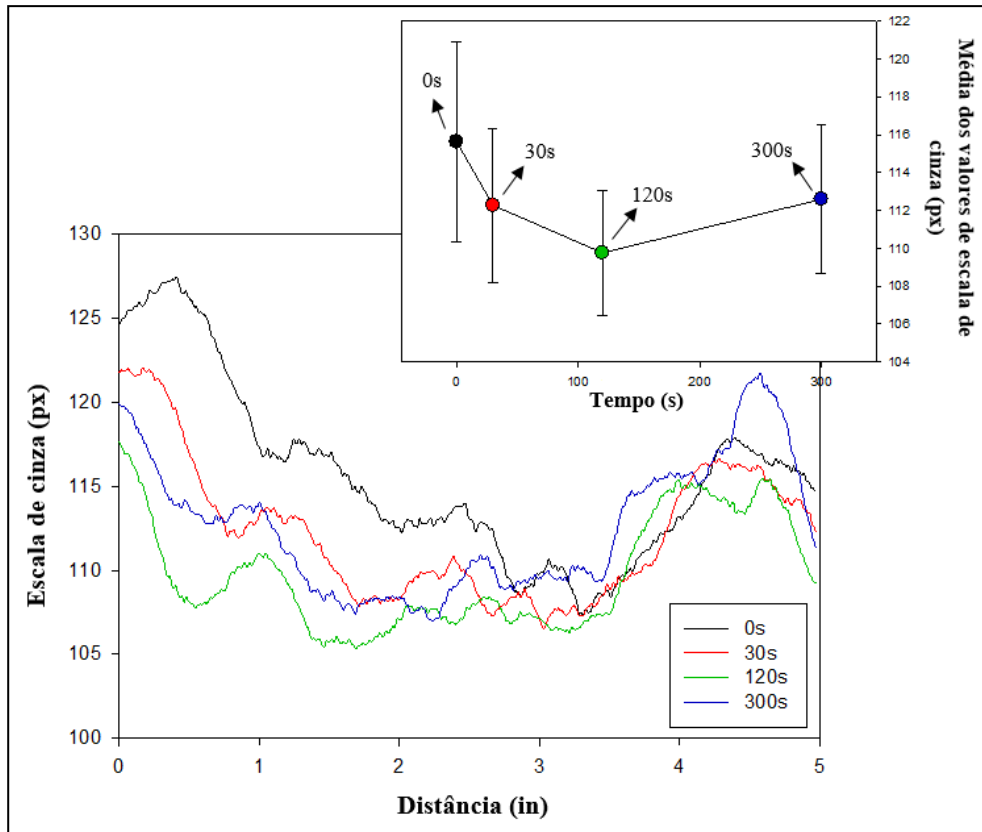
Figura A2. Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAA.



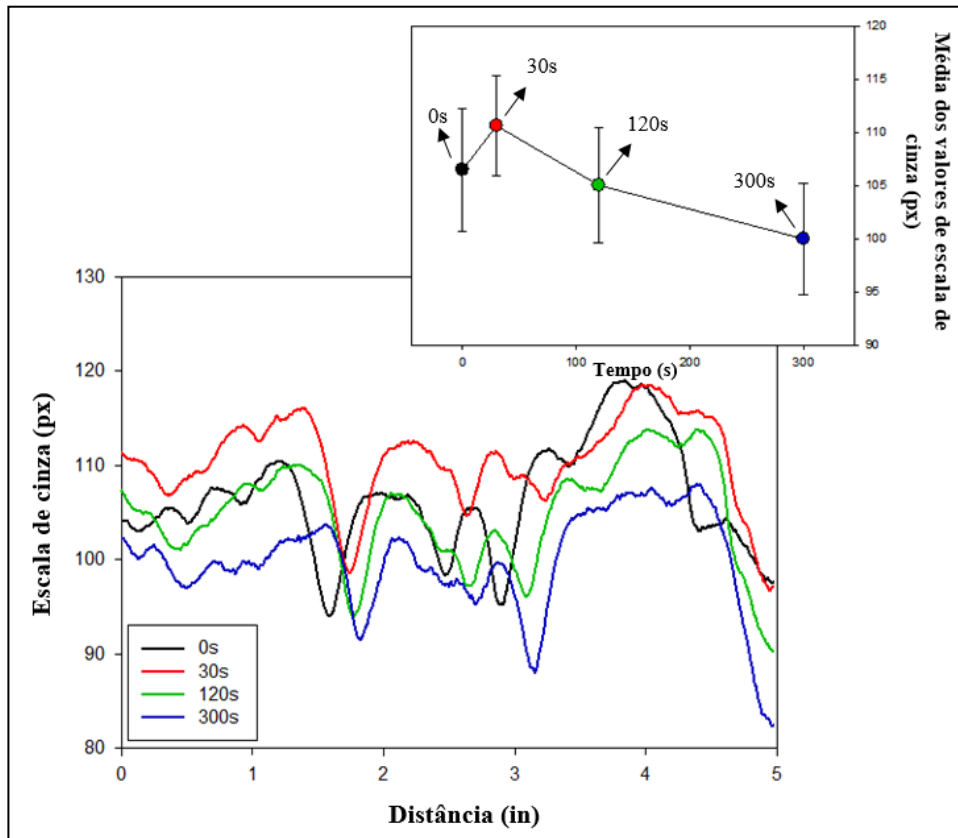
**Figura A3.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HEAPr.



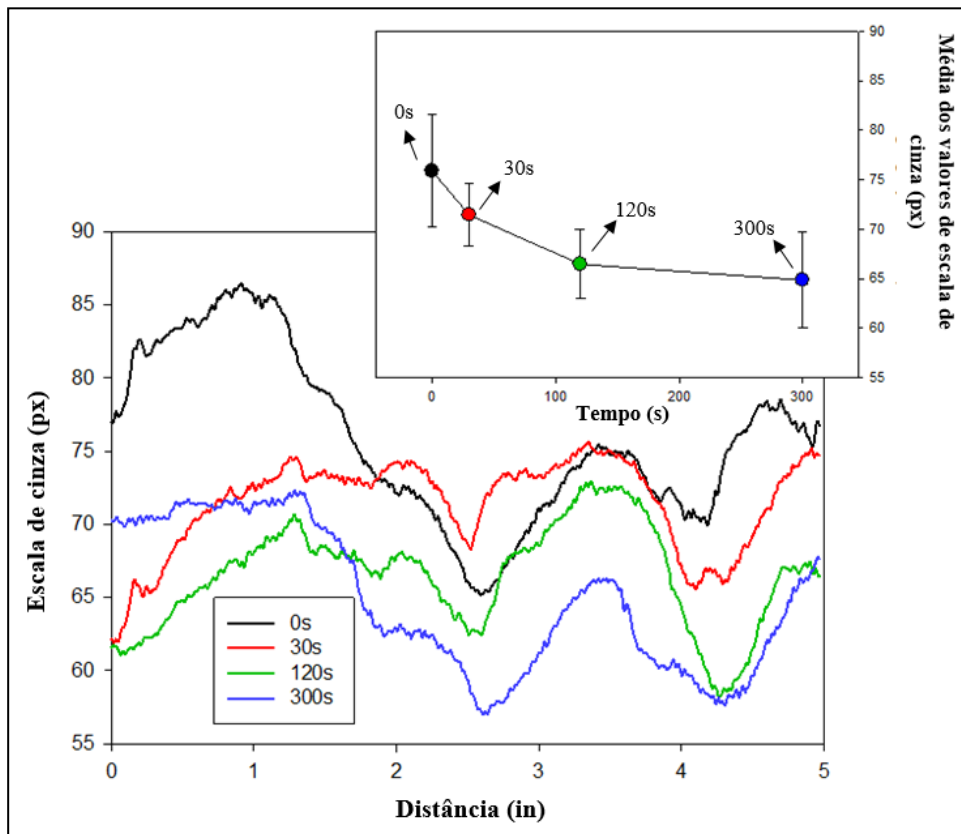
**Figura A4.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HEAL.



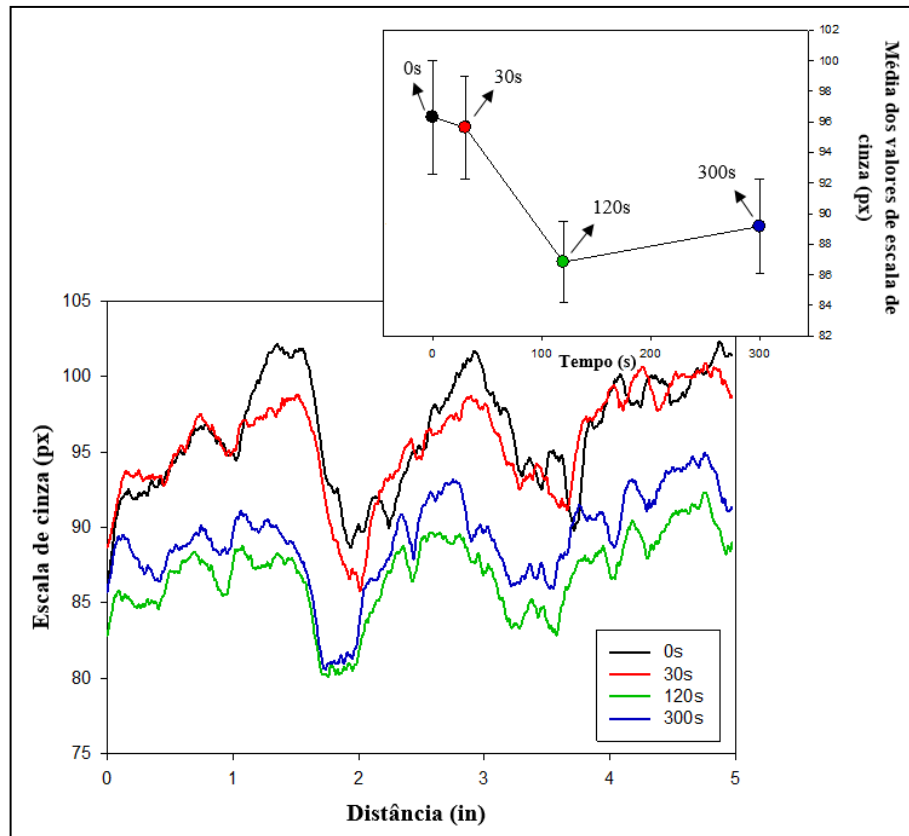
**Figura A5.** Variação da escala de cinza pela distância do HDEAL.



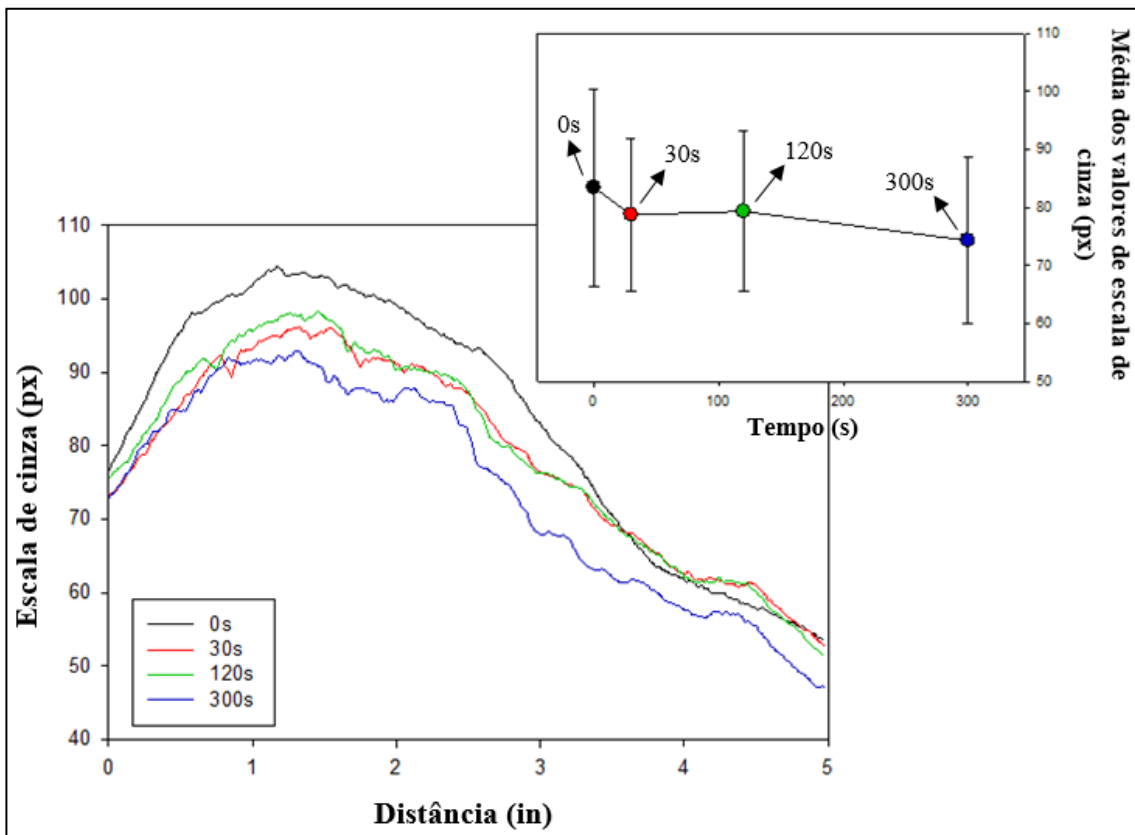
**Figura A6.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEABe.



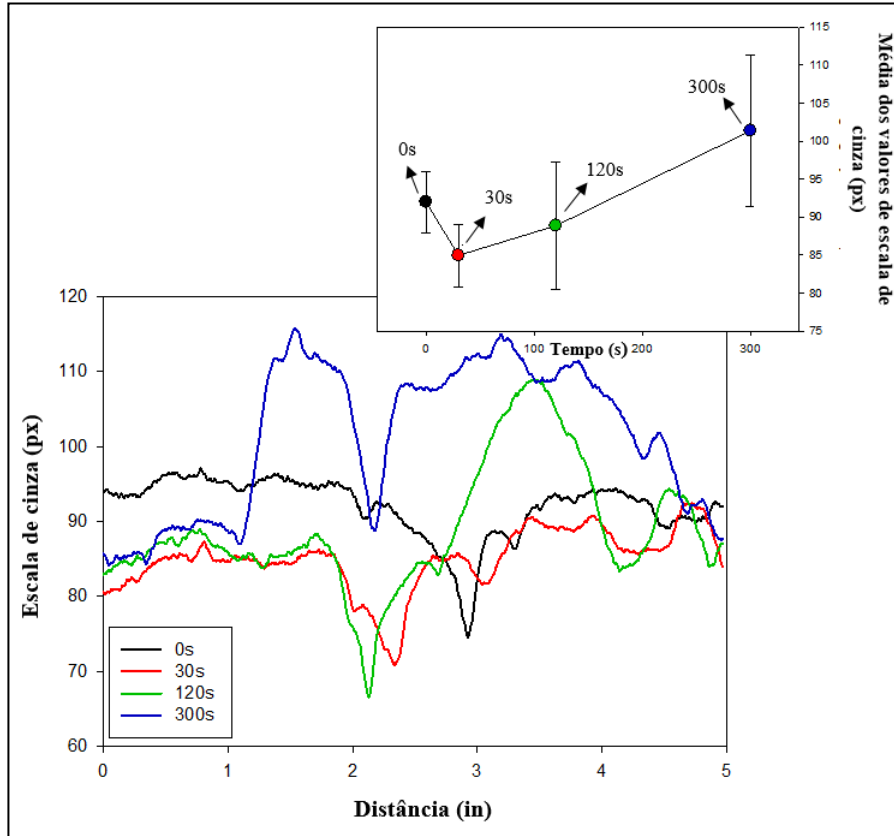
**Figura A7.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEASa.



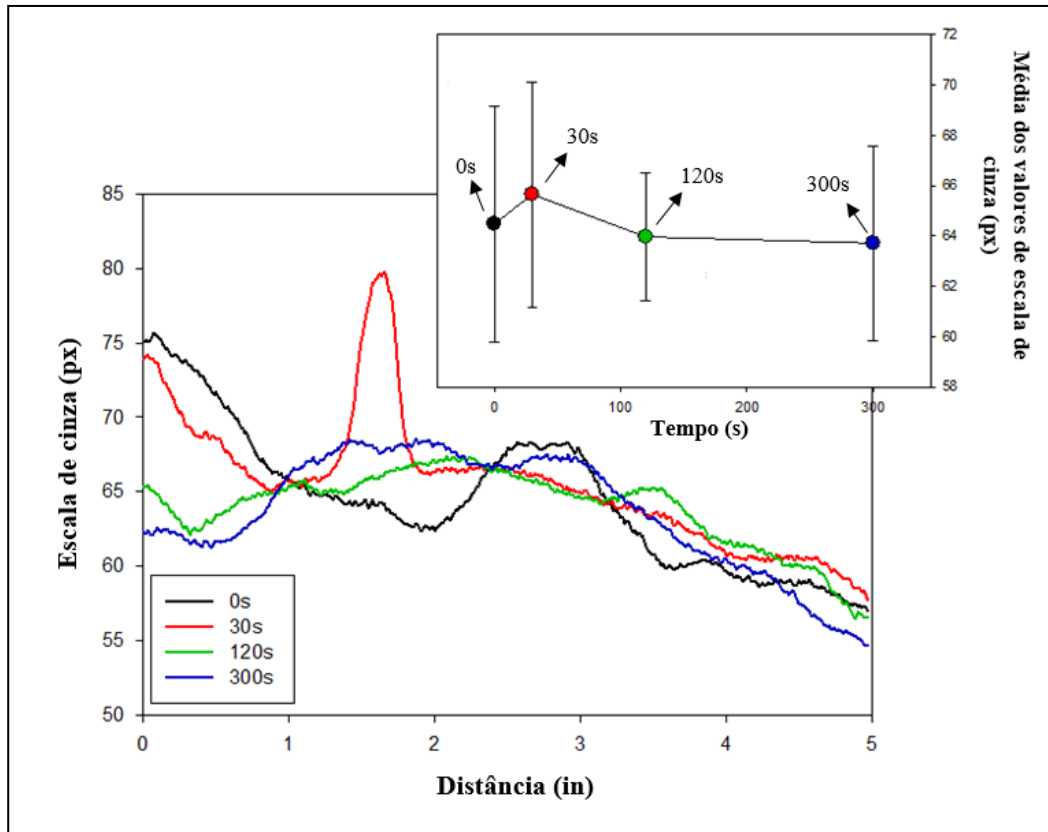
**Figura A8.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAMa.



**Figura A9.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAAAd.

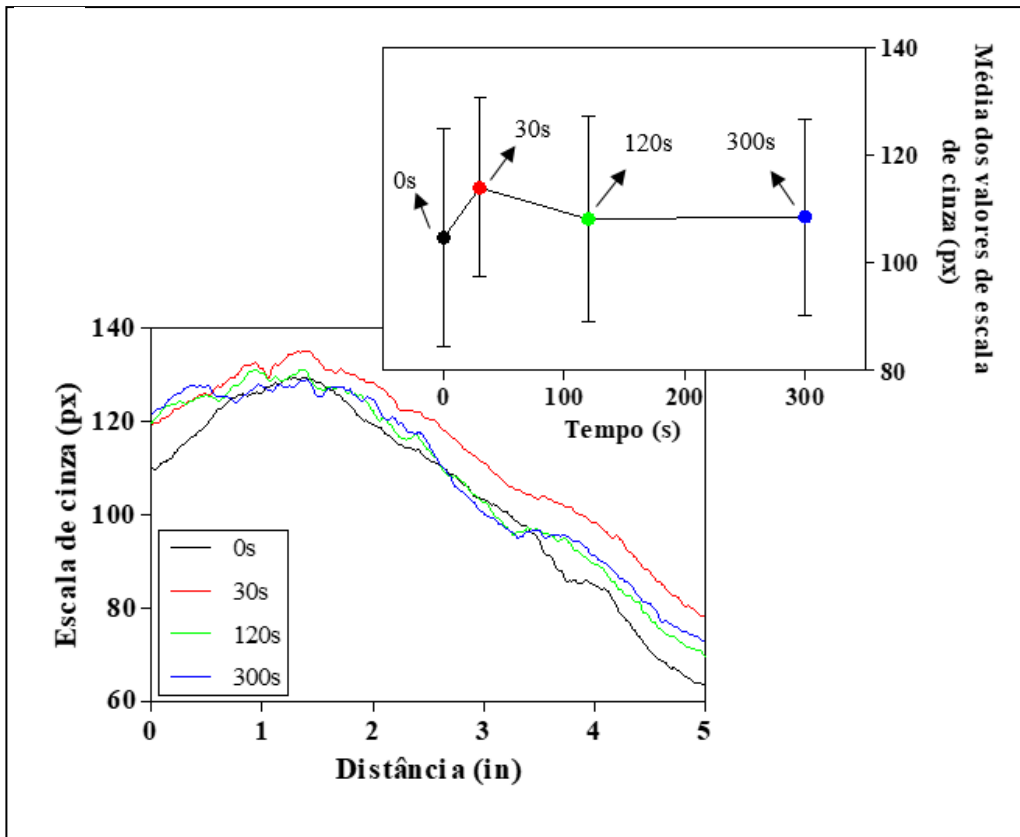


**Figura A10.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HEACi.

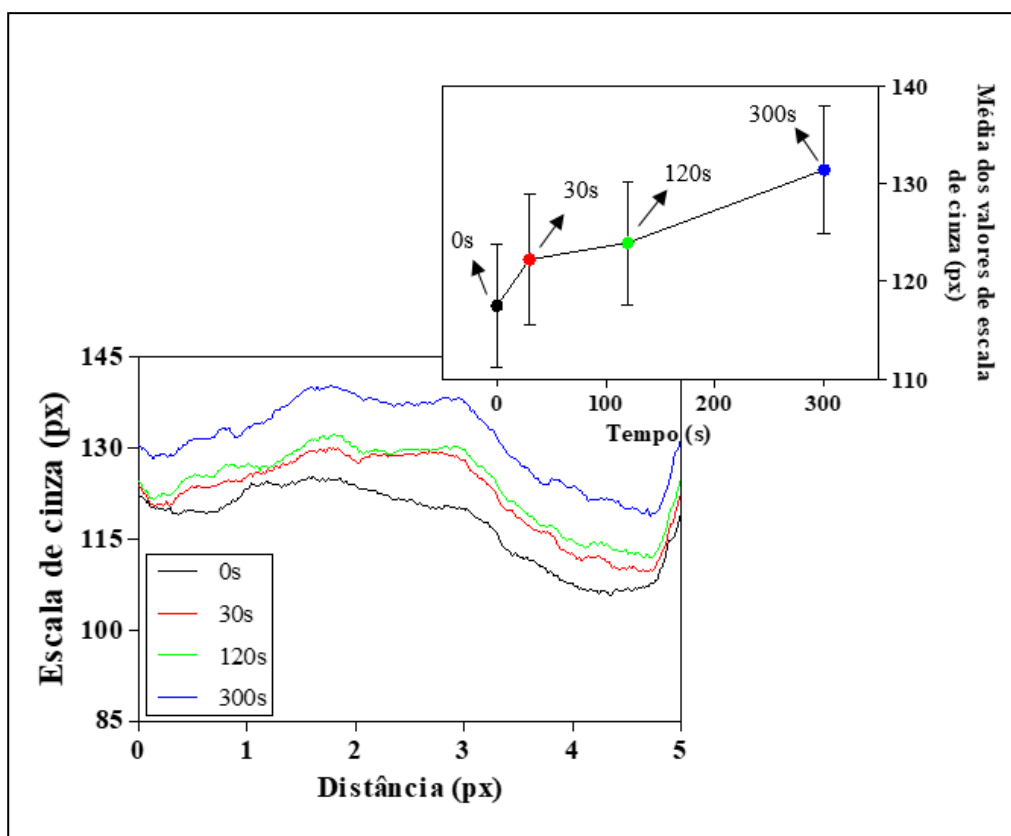




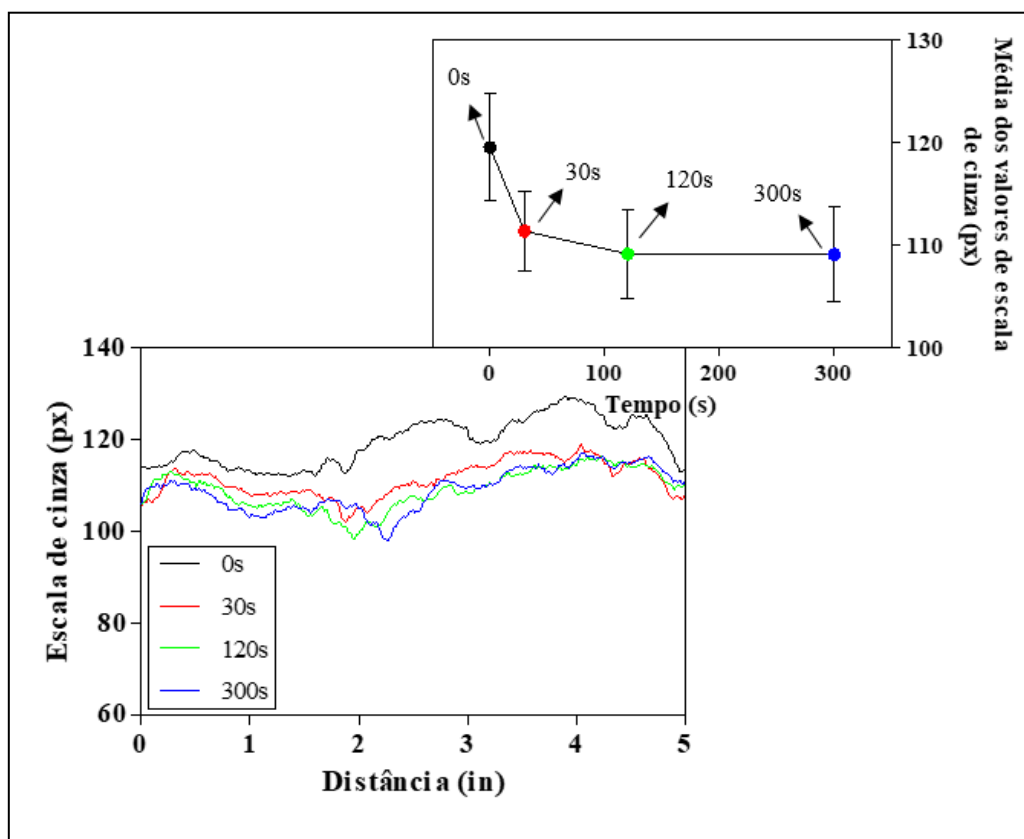
**Figura A11.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAPr.



**Figura A12.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEAF.



**Figura A13.** Variação da escala de cinza pela distância do 2-HDEASu.



## 9 APENDICE B – Resultados adicionais

### B1. SIMULAÇÃO DE TINGIMENTO DE TECIDOS

Como nosso grupo de pesquisa dedica-se ao estudo dos LIPs como substituintes da água no processo de tingimento têxtil, fez-se uma breve investigação sobre a citotoxicidade dos tecidos tingidos neste processo.

A fim de se realizar a análise de citotoxicidade dos tecidos tingidos com os LIP em células HaCat, foi realizada uma simulação do processo de tingimento. Como já é bem estabelecido na literatura, os corantes apresentam uma certa toxicidade em células e, para evitar possíveis interferências, eles foram removidos do processo de tingimento, porém todas as etapas foram realizadas.

A simulação do tingimento foi realizada com tecido 100 % algodão, cedido pelo Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade Estadual de Maringá (UEM), numa razão de 1:20 de massa do tecido por massa do banho, e a temperatura de tingimento foi fixada em 60 °C, de acordo com a prática comum do processo industrial de tingimento de algodão. Os ensaios de tingimento foram desenvolvidos em reator de vidro com temperatura controlada utilizando um procedimento de contato estático direto (ROSA et al., 2015; SALA;

GUTIERREZ-BOUZAN, 2014).

Inicialmente, os LIPs foram adicionados ao reator na razão previamente indicada, iniciando o processo de aquecimento e solubilização gradual por 15 min por agitação mecânica em banho termostatzado. Após, o tecido, previamente cortado em tiras retangulares, foi adicionado ao reator de tingimento, mantendo a agitação, e esperou-se 60 min, sendo este o tempo de tingimento. Cada amostra foi tingida de forma simulada utilizando um LIP específico e, então, os tecidos foram lavados utilizando solução detergente aquosa padrão (1 g/L) numa razão de 20:1 de massa de solução detergente por massa do tecido por 30 min a 60 °C. Após a remoção completa do LIP no tecido, todas as amostras foram secas em temperatura ambiente por convecção natural e umidade constante. Para comparação, a simulação de tingimento da amostra controle foi feita da mesma forma, substituindo o LIP pela mesma quantidade de água.

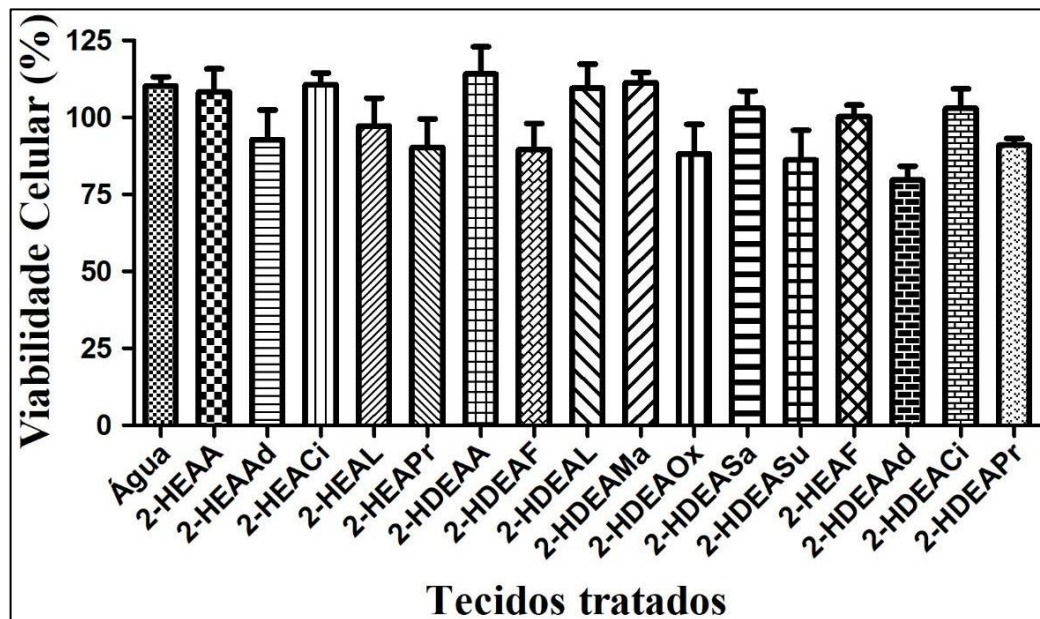
Os tecidos que passaram pelo processo de simulação de tingimento foram avaliados quanto à sua toxicidade em células HaCat. Para isso, os tecidos foram cortados em tamanhos iguais (4 cm<sup>2</sup>) e incubados durante 24 h a 37 ± 2 °C com 5 mL de DMEM. Após, os tecidos foram removidos e a solução extratora foi avaliada como descrito no item 4.2 (ISO, 1999).

## B2. CITOTOXICIDADE DOS TECIDOS

Todos os tecidos apresentaram sua coloração natural (branco) após o processo de simulação de tingimento. Em estudo realizado por Andrade et al. (2017) no qual o tecido foi realmente tingido, foi constatado que os LIPs utilizados como meio de tingimento melhoraram o rendimento tintorial, apresentando uma coloração mais forte, em relação ao tecido tingido em água. Além disso, alguns LIPs como 2-HEAAd e 2-HDEASa promoveram uma melhor inserção do corante à fibra do tecido, por alterar a estrutura da celulose. De maneira geral, os LIPs analisados foram eficientes no processo de tingimento, evidenciando a vantagem de utilizá-los neste processamento quando comparado com o processo utilizando água.

Em relação à citotoxicidade dos tecidos, não foi possível obter os valores de CI<sub>50</sub> pois nenhuma amostra promoveu 50 % de redução da viabilidade celular. Todos os tratamentos com LIPs mantiveram aproximadamente 100 % das células em culturas viáveis (Figura B1).

**Figura B1.** Viabilidade celular promovida pelos tecidos tratados com os LIPs.



Este é um dado muito importante que também deve ser destacado, pois os traços de LIPs remanescentes ou não nos tecidos não foram tóxicos às células de pele (queratinócitos). Levando em consideração apenas este resultado, é possível sugerir que os tecidos tingidos utilizando esses LIPs específicos como meio de tingimento são seguros.



**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI**

Rua Aristides Novis, 02, 6º andar, Federação, Salvador BA

CEP: 40.210-630

Telefone: (71) 3283-9800

E-mail: [pei@ufba.br](mailto:pei@ufba.br)

Home page: <http://www.pei.ufba.br>