



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ARIANE GASPAR SANTOS

TOXIDADE DE LÍQUIDOS IÔNICOS PARA MICRORGANISMOS DE
IMPORTÂNCIA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

RIO DE JANEIRO

2013

Ariane Gaspar Santos

TOXIDADE DE LÍQUIDOS IÔNICOS PARA MICRORGANISMOS DE
IMPORTÂNCIA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência de
Alimentos, Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dra. Maria Alice Zarur Coelho

Co-orientadora: Dra. Daniela Sales Alviano Moreno

RIO DE JANEIRO

2013

S231

Santos, Ariane Gaspar.

Toxicidade de líquidos iônicos para microrganismos de importância na indústria de alimentos / Ariane Gaspar Santos. – Rio de Janeiro: UFRJ, 2013. 70 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos 2013.

Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho e Daniela Sales Alviano.

1. Líquidos iônicos. 2. Toxicidade. 3. Microrganismos da indústria de alimentos. I. Coelho, Maria Alice Zarur (Orient.). II. Alviano, Daniela Sales. (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDD 664

Ariane Gaspar Santos

TOXIDADE DE LÍQUIDOS IÔNICOS PARA MICRORGANISMOS DE
IMPORTÂNCIA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência de
Alimentos, Instituto de Química,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em

Orientadora: Dra. Maria Alice Zarur Coelho (EQ/UFRJ)

Dra. Daniela Sales Alviano Moreno (IMPG/UFRJ)

Dra. Celuta Sales Alviano, Doutorado (IMPG/UFRJ)

Dra. Rosalie Reed Rodrigues Coelho (IMPG/UFRJ)

Dr. Bernardo Dias Ribeiro (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro
2013

AGRADECIMENTOS

Ao amor Divino, presente no interior de cada um de nós, com o qual, muitas vezes, conversei secretamente.

Aos meus pais Aurea e Amaury, pelo carinho, amor incondicional, confiança. Saibam que, apesar das 2 horas e meia de vôo que nos separam, carrego-os em cada ato, gesto e pensamento, vocês estarão sempre comigo na minha caminhada.

A minha irmã Adriana, que durante grande parte da minha vida foi como uma segunda mãe. O meu lado mais inocente, mais criança feliz. Obrigada por me ensinar a não levar a vida tão a sério sempre.

A minha irmã Amanda, que me chama de pequena, mas é menor do que eu. Obrigada por me ensinar a voar, por me mostrar o prazer de ler um bom livro, escutar uma boa música, apreciar a arte e viver sem medo. A você devo o meu lado criativo, artístico, culto, sensível, sensato, intuitivo.

Ao meu marido Marcio, que esteve sempre ao meu lado, vivendo o melhor e o pior de mim, sempre com muito amor e paciência. Obrigada por ser o meu ombro, abrir meu sorriso, enxugar minhas lágrimas, pelo abraço silencioso, pelos ouvidos sempre disponíveis. E obrigada também pelo esforço de aprender a cozinhar, só pra eu poder escrever um pouquinho mais!

A minha avó Aurea, que nesses dois anos foi minha família presente.

Ao meu cunhado, Marcelo, pela revisão do abstract.

À Prof^a. Maria Alice, pela orientação, confiança e incentivo a cada conversa. Sou imensamente grata por ter caído em suas mãos e tido a oportunidade de conhecer os líquidos iônicos. Para mim, uma profissional inspiradora.

À Prof^a. Daniela Alviano, pela orientação, por ter aberto as portas do seu laboratório, pelos conselhos e ajuda nos experimentos.

A Cátia e Mariana, que como anjos-da-guarda estiveram sempre presentes e disponíveis a ajudar durante a realização dos experimentos. A David, Daniele, Ludmila, Cristina, Fabiane, Sandra, Paula, Max, e a todos que fazem parte do

Laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos, obrigada pela troca de experiências e convivência agradável.

A todo o pessoal do BIOSE com quem pude conviver no finalzinho destes dois anos, e que me acolheu num momento crítico de conclusão do trabalho. Especialmente, a Luana, Roseli, Verônica e Carlos Eduardo, que estiveram presentes durante a realização dos experimentos.

Ao meu futuro co-orientador, Prof. Bernardo Ribeiro, pelos líquidos iônicos trazidos de Portugal, pela amizade, pela preocupação com o meu trabalho e conselhos ao longo do caminho.

Aos amigos pernambucanos Hugo, Andressa, Rafael, Fernanda, Sérgio, Renata, Amanda, e às amigas cariocas, Carol, Tayná, Anna, obrigada pelas conversas confortantes, momentos de descontração, e por fazerem parte da minha vida, perto ou longe.

À Prof^a. Rosalie Reed e à Marcela Franco pela concessão da cepa de *Streptomyces*.

A Juliana Furtado pela concessão da cepa de *Lactobacillus delbrueckii*.

À Prof^a. Isabel Marrucho pela concessão dos líquidos iônicos utilizados neste trabalho e dicas durante a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

“Voe

É preferível arriscar-se

Vivendo no perigo fértil

Do que na segurança estéril”

Horivaldo Gomes

RESUMO

SANTOS, Ariane Gaspar. **Toxicidade de líquidos iônicos para microrganismos de importância na indústria de alimentos.** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Líquidos iônicos (LI's) são sais com baixo ponto de fusão (<100°C) que têm despertado o interesse como substituintes dos solventes orgânicos voláteis. Estes solventes “verdes” são assim denominados, principalmente, devido a sua desprezível pressão de vapor e estabilidade térmica. LI's podem ainda ter suas características físico-químicas alteradas através de mudanças na sua composição iônica, combinando diferentes cátions e ânions, a fim de atender aos requisitos do processo em que se pretende aplicá-los. São considerados uma alternativa aos solventes orgânicos convencionais utilizados em processos biotecnológicos como a fermentação extrativa, ou recuperação *in situ*, onde estes formam uma segunda fase que atua como um reservatório de produtos e/ou substratos, com efeito inibitório sobre a produção pelo agente fermentador. Podem ainda agir como co-solventes, aumentando a solubilidade e disponibilidade de substratos hidrofóbicos. Em vista de sua potencial aplicação em processos biotecnológicos, tais como a produção de insumos alimentícios via síntese microbiana, este trabalho teve como objetivo a avaliação da toxicidade destes novos solventes para microrganismos de importância da indústria de alimentos. Com base no método padrão internacional do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), foi determinada a concentração máxima não tóxica (CMNT), para nove líquidos iônicos iônicos: [C₂mim][Cl] (cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio), [C₂mim][C₂SO₄] (etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazólio), [C₂mim][C₂SO₃] (etilsulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio), [Colina][Ac] (acetato de colina), [Colina][Cl] (cloreto de colina), [P₄₄₄₁][C₁SO₄] (metilsulfato de tributil(metil)fosfônio), [C₂mim][NTF₂] (bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-etil-3-metilimidazólio), [C₄mim][NTF₂] (bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio), [Colina][NTF₂] (bis(trifluorometilsulfonil)imida de colina); frente a nove microrganismos, dentre eles as bactérias *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *delbrueckii*, *Pseudomonas aeruginosa*, a actinobactéria *Streptomyces drozdowiczii*, e os fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*.

Dentre as bactérias, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* foram em geral, as mais tolerantes aos LI's imidazólicos hidrofílicos baseados em $[C_2mim]^+$, combinados com os ânions $[EtSO_4]^-$, $[EtSO_3]^-$, $[Cl]^-$. Quando na presença de LI's hidrofílicos baseados em cátion colina e fosfônio, a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* mostrou-se mais resistente que as demais. O mesmo foi observado para os LI's hidrofóbicos contendo o ânion $[NTF_2]^-$, onde somente a bactéria *P. aeruginosa* teve a CMNT determinada na presença destes LI's. Com relação aos fungos, observou-se uma tendência de tolerância a altas concentrações dos LI's por parte dos fungos filamentosos *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*. Dentre as leveduras somente *Yarrowia lipolytica* foi tolerante a todos os LI's testados. De uma forma geral, LI's cuja porção catiônica foi composta por colina foram considerados mais biocompatíveis, por permitirem o crescimento de todos os microrganismos testados. Em ensaio preliminar para utilização de LI's na produção de ácido cítrico, foi avaliado o crescimento celular de *A. brasiliensis* e *Y. lipolytica* na presença de LI's colínicos. $[Colina][OAc]$ teve maior efeito inibitório sobre o crescimento dos fungos.

Palavras-chave: Líquidos iônicos, toxicidade, microrganismos, indústria de alimentos.

ABSTRACT

SANTOS, Ariane Gaspar. **Toxicity of ionic liquids for microorganisms of food industry**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

Ionic liquids, IL's, are low-melting-point salts (<100°C) that have become attractive as replacements for volatile organic solvents. Mainly because of their negligible vapor pressure and thermal stability they have been named as “green” solvents. IL's can have their physicochemical properties changed by differently combining cations and anions in order to attend the requirements of a given process in particular. They are considered an alternative for conventional organic solvents used in biotechnological process like the extractive fermentation, or *in situ* removal, where they form a second phase that works as a reservoir of products or substrates with inhibitory effects on the production of the fermenting agent. Furthermore, they can be used as co-solvents increasing solubility and availability of hydrophobic substrates. Because of their potential application in biotechnological process, such as the production of food supply via microbial synthesis, the work presented here aimed to evaluate the toxicity of these new solvents to microorganisms of interest in the food industry. Following the international standard method of CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), the maximum non-toxic concentration (MNTC) was determined for nine ionic liquids: [C₂mim][Cl] (1-ethyl-3-methylimidazolium chloride), [C₂mim][C₂SO₄] (1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate), [C₂mim][C₂SO₃] (1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfonate), [Colina][Ac] (choline acetate), [Colina][Cl] (choline chloride), [P₄₄₄₁][C₁SO₄] (tributyl(methyl)phosphonium methylsulfate), [C₂mim][NTF₂] (1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide), [C₄mim][NTF₂] (1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide), [Colina][NTF₂] (choline bis(trifluoromethylsulfonyl)imide) toward nine microorganisms, among them the bacteria *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *delbrueckii*, *Pseudomonas aeruginosa*, the actinobacteria *Streptomyces drozdowiczii*, and the fungus *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*. Among bacteria, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* were more tolerant to hydrophilic imidazolium IL's with [C₂mim]⁺ cations, combined with the [EtSO₄]⁻, [EtSO₃]⁻ and [Cl]⁻ anions. When in the presence of hydrophilic IL's choline and phosphonium based, the Gram-negative

bacteria *P. aeruginosa* was more resistant than others. The same was observed for the hydrophobic IL's containing the anion [NTF₂]⁻ and just *P. aeruginosa* had CMNT values determined in the presence of this IL's. Regarding the fungi, it was observed a trend for filamentous fungi *Aspergillus brasiliensis* and *Rhizopus oryzae* to tolerate high concentrations of IL's. Among the yeast, only *Yarrowia lipolytica* was tolerant to all IL's tested. In general, IL's whose the cationic moiety was choline based showed to be more biocompatible, since they allowed the growth of all microorganisms studied. As a preliminary assay for application of IL's in the production of citric acid, the cellular growth of *A. brasiliensis* e *Y. lipolytica* in the presence of choline based IL's was evaluated. [Choline][OAc] demonstrated higher inhibitory effect on fungal growth.

Key words: Ionic Liquids, toxicity, microorganisms, food industry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de utilização de enzimas em líquidos iônicos (YANG; PAN, 2005)	28
Tabela 2	Aplicação de LI's em processos com células inteiras (QUIJANO <i>et al.</i> , 2010)	30
Tabela 3	Valores de CMNT para os líquidos iônicos imidazólicos miscíveis em água.	47
Tabela 4	Valores de CMNT para os líquidos iônicos miscíveis em água baseados em colina e fosfônio	48
Tabela 5	Valores de CMNT para os líquidos iônicos imiscíveis em água	51
Tabela 6	Taxa de crescimento (%) de <i>Yarrowia lipolytica</i> e <i>Aspergillus brasiliensis</i> na presença de líquidos iônicos (% v/v) após 96h	54
Tabela 7	pH final do meio de cultivo de <i>Yarrowia lipolytica</i> e <i>Aspergillus brasiliensis</i> na presença de líquidos iônicos (% v/v) após 96h	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura dos principais cátions e ânions utilizados em líquidos iônicos (Fauzi; Amin, 2012)	20
Figura 2	Esquema do experimento para determinação da CMNT	41
Figura 3	Imagem do ensaio de determinação da CMNT para <i>Bacillus subtilis</i> após adição de resazurina, onde (a) representa o controle positivo (meio + inóculo); (b) controle negativo (meio); (c) [Colina][Cl]; (d) [P ₄₄₄₁][MetSO ₄].	50
Figura 4	Cinética de crescimento celular para <i>Yarrowia lipolytica</i> na presença de (A) [Colina][OAc] e (B) [Colina][Cl]	56
Quadro 1	Líquidos iônicos utilizados	39
Quadro 2	Microrganismos utilizados no estudo	40

LISTA E ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM/CFM	concentração mínima bactericida/fungicida
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMI	concentração mínima inibitória
CMNT	concentração máxima não tóxica
[C _n mim]	1-alkil-3-metilimidazólio
[COC ₂ mim]	1-metoxietil-3-metilimidazólio
[C ₂ OHmim]	1-(2'-hidroxil)etil-3-metilimidazólio
Colina	2-hidroxietiltrimetilamônio
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade ótica
[EPy]	<i>N</i> -etilpiridínio
[EtNH ₃][NO ₃]	Nitrato de etilamônio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
[HMPL]	1-hexil-1-metil-pirrolidínio
LI	Líquido Iônico
MRS	deMan, Rogosa e Sharpe
[MTOA]	Metiltriocetilamônio
NTF ₂	bis(trifluorometilsulfonil)imida
P ₄₄₄₁	Tributil(metil)fosfônio
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
p.s.	Peso seco
pTS	<i>p</i> -toluenosulfonato
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
quats	Compostos de amônio quaternário
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
YPD	<i>Yeast Extract, Peptone, Dextrose</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. Revisão de Literatura	19
3.1 Líquidos Iônicos: Definição, Características e Aplicações.....	19
3.2 Toxicidade de Líquidos Iônicos	22
3.2.1 Métodos para Avaliação de Toxicidade	25
3.3 Líquidos Iônicos em Processos Biotecnológicos	27
3.4 Microrganismos na Indústria de Alimentos.....	32
3.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	33
3.4.2 <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	33
3.4.3 <i>Streptomyces</i> sp.....	34
3.4.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
3.4.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.4.6 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	35
3.4.7 <i>Yarrowia lipolytica</i>	36
3.4.8 <i>Aspergillus brasiliensis</i>	37
3.4.9 <i>Rhizopus oryzae</i>	37
4. Materiais e Métodos	39
4.1 Avaliação da Toxicidade de Líquidos Iônicos	39
4.1.1 Líquidos Iônicos.....	39
4.1.2 Microrganismos Utilizados.....	40
4.1.3 Determinação da Concentração Máxima Não Tóxica (CMNT)	40
4.2 Crescimento Celular	43
4.2.1 Microrganismos e Líquidos Iônicos	43
4.2.2 Obtenção do Inóculo	43
4.2.3 Condições de Crescimento	44
4.2.4 Quantificação da Concentração Celular	44
5. Resultados e Discussão	46
5.1 Toxicidade de Líquidos Iônicos	46
5.2 Taxa de Crescimento na Presença de Líquidos Iônicos	54
6. Conclusões e Sugestões	58
Referências	59
Anexo – Composição dos Meios de Cultivo	69

1. Introdução

Recentemente, tem-se buscado o desenvolvimento de processos de biotransformação por células íntegras, do inglês “whole-cells”, com a aplicação de solventes orgânicos, devido à presença de substratos e produtos tóxicos ou hidrofóbicos (MATSUMOTO; MOCHIDUKI; KONDO, 2004). A presença do solvente orgânico imiscível formando uma segunda fase aumenta a disponibilidade do substrato pouco solúvel em água, enquanto funciona como um reservatório para o produto formado, diminuindo a concentração deste no meio reacional e conseqüentemente atenuando seu efeito tóxico sobre o agente fermentador. Através desse sistema de recuperação *in situ*, também chamado de fermentação extrativa, é possível otimizar a produção de compostos pelos microrganismos, utilizando um solvente como extrator da substância de interesse (NIVEN, 1995). Contudo a natureza volátil, baixo ponto de fulgor e caráter tóxico inerente aos solventes orgânicos, comprometem a sua aplicação (VERMUË *et al.*, 1993).

A partir do interesse por alternativas “verdes” em processos industriais, muitas estratégias vêm surgindo com o intuito de diminuir ou substituir o uso de substâncias que possam trazer algum prejuízo quando liberadas no ambiente. Dentre as substâncias tradicionalmente utilizadas em processos industriais estão os solventes orgânicos que tem conhecidos efeitos tóxicos, ao ambiente e perigoso manuseio, sendo altamente explosivos. Os solventes estão, normalmente, no topo da lista de produtos químicos perigosos, por serem altamente voláteis, e na maioria das vezes, utilizados em grande quantidade (WELTON, 1999). As principais estratégias aplicadas com o intuito de evitar o uso de solventes orgânicos convencionais são: ausência de solventes (catálise heterogênea), água, fluidos supercríticos, e líquidos iônicos (ROGERS; SEDDON, 2003).

Líquidos iônicos são sais orgânicos, e portanto, compostos inteiramente de íons, cujo ponto de fusão está abaixo dos 100°C (RANKE *et al.*, 2007). Podem ser produzidos a partir de uma variedade de cátions orgânicos, tais como imidazólio e piridínio, ligados a cadeia de alquila de diferentes tamanhos, variando a hidrofobicidade da molécula. Os ânions mais comuns são o hexafluorofosfato (PF_6^-), tetrafluoroborato (BF_4^-), brometo (Br^-), cloreto (Cl^-) e nitrato (NO_3^-) (DOCHERTY; KULPA Jr., 2005). Os líquidos iônicos (LI's) têm sido chamados por diversos pesquisadores com solventes “verdes” por apresentarem pressão de vapor

desprezível e alta estabilidade térmica; e, por isso, vem sendo considerados como possíveis substituintes dos tradicionais solventes orgânicos voláteis (RANKE *et al.*, 2007). São também conhecidos como solventes “designer”, uma vez que propriedades como ponto de fusão, viscosidade, densidade e hidrofobicidade podem variar através de mudanças na estrutura dos íons, de forma a atender aos requerimentos de um processo em particular (EARLE; SEDDON, 2000).

A potencial aplicação dos LI's em biotecnologia pode ser dividida em duas principais ramificações: processos enzimáticos e de células íntegras (QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010). Em número ainda pouco expressivo, surgem estudos que visam sua aplicação em biocatálise envolvendo células íntegras (PFRUENDER; JONES; WEUSTER-BOTZ, 2006; PFRUENDER *et al.*, 2004; QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010) focando principalmente em processos de fermentação extrativa envolvendo a síntese de enantiômeros puros de álcool e cetona, que exige o uso de LI's imiscíveis em água (QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010). Adicionalmente a isso, alguns estudos também investigam a possibilidade de usar LI's miscíveis em água, cuja função é funcionar como um aditivo que facilite a disponibilidade de substratos tóxicos ou de pouca solubilidade no meio reacional (DIPEOLU; GREEN; STEPHENS, 2009; HE *et al.*, 2009).

Um pré-requisito importante para o sucesso de um processo que utilize um solvente como extrator ou aditivo, é que este apresente baixa toxicidade para o microrganismo de interesse. Sendo assim, como um primeiro passo para a escolha do solvente é necessário a realização de um “screening” com diferentes grupos de solventes. Estão disponíveis na literatura, diversos estudos de toxicologia no âmbito ecológico, nos quais microrganismos considerados modelos no campo da ecotoxicologia são testados quanto a sua suscetibilidade aos líquidos iônicos (DOCHERTY *et al.*, 2007; DOCHERTY; KULPA, JR., 2005; RANKE *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011). No contexto da biotecnologia ainda há poucos estudos de toxicidade e estes são limitados àqueles microrganismos mais utilizados, tais como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, e a processos como síntese de alcoóis quirais (BRÄUTIGAM *et al.*, 2009; HOWARTH; JAMES; DAI, 2001; LOU; ZONG; SMITH, 2006; PFRUENDER; JONES; WEUSTER-BOTZ, 2006; QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010; SENDOVSKI; NIR; FISHMAN, 2010; WOOD *et al.*, 2011).

Visando a possibilidade de aplicação dos líquidos iônicos em processos biotecnológicos voltados para a indústria de alimentos, tais como a produção de ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, polissacarídeos, entre outros; o presente trabalho teve como objetivo investigar a tolerância de microrganismos importantes na indústria de alimentos a diversos líquidos iônicos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade de líquidos iônicos em bactérias e fungos importantes para a indústria de alimentos.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração máxima não tóxica (CMNT) para líquidos iônicos contendo diferentes cátions e ânions;
- Avaliar se há um padrão de resistência ou sensibilidade aos líquidos iônicos entre os diferentes grupos de microrganismos;
- Identificar as combinações ou porções iônicas mais biocompatíveis e promissoras para aplicações futuras em processos biotecnológicos.
- Selecionar microrganismos tolerantes aos LI's e avaliar sua taxa de crescimento na presença destes solventes.

3. Revisão de Literatura

3.1 Líquidos iônicos: Definição, Características e Aplicações

Líquidos iônicos podem ser definidos como uma nova classe de sais com baixo ponto de fusão (<100°C) (EARLE; SEDDON, 2000; RANKE *et al.*, 2007; SEDDON, 1997), muitos deles apresentando-se em estado líquido a temperatura ambiente.

Em geral, líquidos iônicos formam sais onde um ou ambos os íons são assimétricos, resultando em baixa interação intermolecular, razão pela qual seu ponto de fusão é baixo quando comparado ao cloreto de sódio, por exemplo, cujo ponto de fusão é de 800°C (SEDDON, 1997; EARLE; SEDDON, 2000; RANKE *et al.*, 2004). O elevado ponto de fusão do cloreto de sódio é resultado dos seus pequenos cátion e ânion, o que permite a formação de uma estrutura rígida e cristalina. O mesmo não ocorre com os líquidos iônicos, cujo empacotamento é menos eficiente devido ao maior tamanho de seus íons (DUPONT; SUAREZ, 2006). Os centros catiônicos são geralmente grandes, orgânicos e com baixa simetria, em sua maioria envolvem um nitrogênio ou fósforo carregado positivamente, e os ânions podem ser compostos orgânicos ou inorgânicos (Figura 1) (CLARE; SIRWARDANA; MACFARLANE, 2010).

O primeiro líquido iônico, nitrato de etilamônio [EtNH₃][NO₃] (ponto de fusão 12°C), foi descoberto em 1914 por Paul Walden (WALDEN, 1914). Mas o interesse por esses compostos só se desenvolveu a partir da descoberta do líquido iônico binário produzido a partir da mistura de tricloreto de alumínio e cloreto de N-alquilpiridínio (CHUM *et al.*, 1975) ou cloreto de 1,3-dialquilimidazólio (WILKES *et al.*, 1982), esse último com ponto de fusão ainda menor do que seu análogo contendo o cátion alquilpiridínio, apresentado-se em estado líquido a 25°C quando composto por 40-67% mol de AlCl₃ (WILKES, *et al.*, 1982).

Os líquidos iônicos baseados em AlCl₃ podem ser referenciados como os líquidos iônicos de primeira geração (ENDRES; ABEDIN, 2006). Inicialmente, os líquidos iônicos foram utilizados principalmente como solventes para estudos eletroquímicos de compostos orgânicos (ROBINSON; OSTERYOUNG, 1979), organometálicos (ARNETT; WOLF, 1975) e inorgânicos (HUSSEY; KING; WILKES, 1979); e também na área de espectroscopia (ROBINSON; OSTERYOUNG, 1979; WILKES *et al.*, 1982). Um dos requerimentos para o uso destes halogeno-

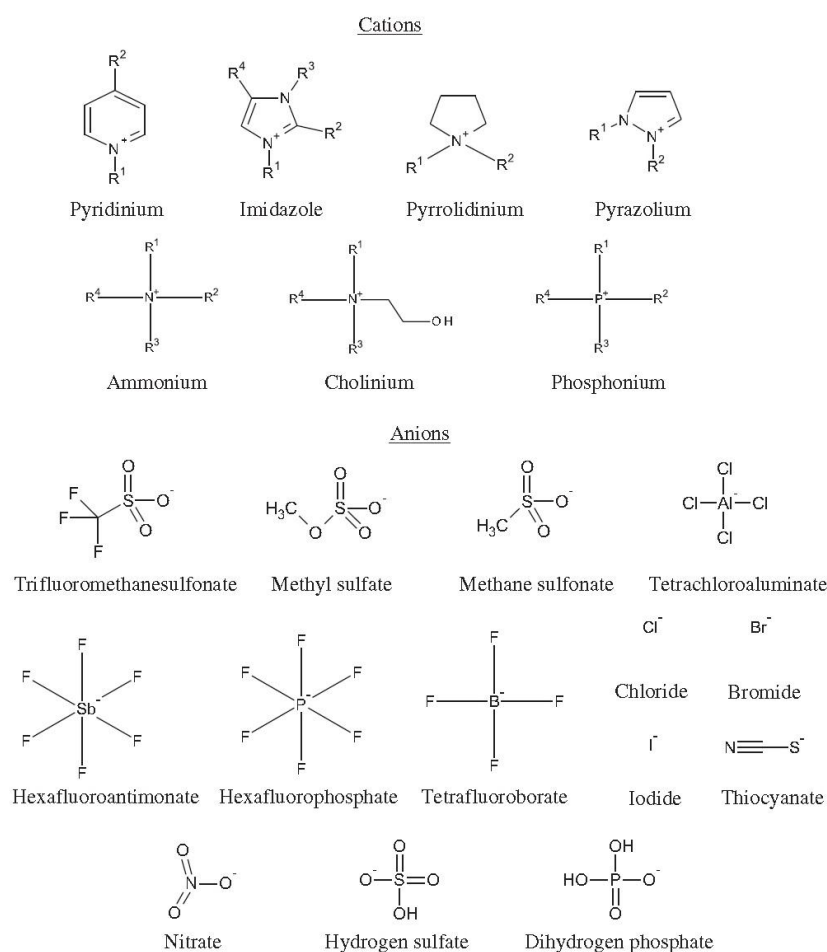


Figura 1. Estrutura dos principais cátions e ânions utilizados em líquidos iônicos (Fauzi; Amin, 2012)

aluminatos é que deveriam ser mantidos em condições anidras devido a sua extrema reatividade com água, o que limitava sua aplicação (BAKER *et al.*, 2005). Somente nos anos noventa, com o surgimento de líquidos iônicos estáveis em contato com o ar e água, baseados em alquilimidazólio com ânions fracamente complexados, tais como [PF₆]⁻ e [BF₄]⁻ (WILKES; ZAWOROTKO, 1992), houve uma expansão do seu uso em outros campos de estudo, mas particularmente como solventes para síntese e catálise (BAKER *et al.*, 2005). O interesse por estes compostos foi então renovado pela segunda geração de líquidos iônicos, os quais ofereciam propriedades importantes dos seus ancestrais combinadas com facilidade no manuseio e ausência da instabilidade associada aos ânions cloroaluminatos (BAKER *et al.*, 2005).

O número de pesquisas envolvendo os líquidos iônicos cresceu bastante, principalmente pela sua aplicação na química verde, por exemplo, como um

substituinte dos solventes orgânicos convencionais em diversas reações químicas, incluindo catálise orgânica (GORDON, 2001; SEDDON, 1997; WELTON, 1999; ZHAO; MALHOTRA, 2002), síntese inorgânica (ENDRES; WELTON, 2003), biocatálise (DEIVE *et al.*, 2011; KRAGL; ECKSTEIN; KAFTZIK, 2002; SEONGSOON; KAZLAUSKAS, 2003) e polimerização (KUBISA, 2004). Os principais atributos que os tornam “verdes” são: (1) sua pressão de vapor desprezível, o que oferece vantagens tais como, fáceis reciclo e recuperação; (2) apresentam estabilidade térmica acima de 200°C; (3) são bons solventes para uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e poliméricos; alta solubilidade implica em reatores com volumes menores (SEDDON, 1997). Outras propriedades interessantes incluem alta condutividade iônica intrínseca, não inflamabilidade, uma larga janela eletroquímica, excelente transferência de calor e eficiente absorção/transferência de micro-ondas (BAKER *et al.*, 2005).

A inerente flexibilidade sintética através do pareamento de diferentes cátions com um número crescente de ânions concede a possibilidade para certo ajuste fino de suas propriedades físico-químicas de forma a atender os requerimentos de um processo em particular (BAKER *et al.*, 2005; EARLE; SEDDON, 2000). Propriedades como ponto de fusão, viscosidade, densidade, e hidrofobicidade podem variar através de mudanças na estrutura dos íons (EARLE; SEDDON, 2000) e por isso são conhecidos como “solventes designer”, sendo capazes de oferecer uma gama de novos meios reacionais com características e aplicações diversas em comparação aos tradicionais solventes. Estima-se que há aproximadamente 10^{18} de combinações possíveis entre cátions e ânions no delineamento de líquidos iônicos (HOLBREY; SEDDON, 1999)

O crescente interesse pelos líquidos iônicos e seu potencial uso na indústria, despertado principalmente por suas características físico-químicas, mas também pelo seu apelo sustentável como solvente “verde”, estimulou a investigação de seus impactos ambientais, principalmente em relação a sua toxicidade para os diversos organismos. E o que se têm percebido é que delinear líquidos iônicos biocompatíveis é uma tarefa complexa e que muitos dos que são comumente utilizados podem apresentar elevado nível de toxicidade para os organismos vivos. Como base nestas discussões, a comunidade científica vem buscando sintetizar novos líquidos iônicos mais biocompatíveis, como por exemplo, aqueles baseados

em cátion colina, que é uma molécula naturalmente encontrada em seres vivos (PETKOVIC *et al.*, 2010).

3.2 Toxicidade de Líquidos iônicos

O aspecto verde dos líquidos iônicos tem sido atribuído principalmente ao fato de apresentarem ínfima pressão de vapor, o que os tornam menos poluentes atmosféricos quando comparados aos solventes orgânicos voláteis. É notável que seu conceito tem grande potencial para atender aos requerimentos de sustentabilidade ambiental; contudo, ainda são solventes bastante inovadores, compreendendo um grupo muito heterogêneo e que não podem ser, a princípio, considerados benignos, devido ao seu conhecimento preciso ainda estar nebuloso (PETKOVIC *et al.*, 2011). Para tratá-los como tal, é importante a análise de todo seu ciclo de vida, desde sua síntese até sua liberação no meio ambiente. Os líquidos iônicos não são amplamente aplicados em processos industriais, porém o desenvolvimento científico e futuros empregos destes na indústria podem levar a descarte e contaminação acidental (PHAM; CHO; YUN, 2010). E justamente as propriedades que os tornam tão interessantes para a indústria, tais como estabilidade química e térmica, e não volatilidade, podem representar potenciais problemas para sua degradação ou persistência no ambiente (PHAM; CHO; YUN, 2010).

Dentre os princípios da química verde está a fraca ou inexistente toxicidade dos compostos para os organismos vivos (GANSKE; BORNSCHEUER, 2006; QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010). Em vista disso, vários trabalhos têm avaliado sua biodegradabilidade (DOCHERTY; DIXON; KULPA, 2007) e especialmente sua toxidez aguda para microrganismos de importância ambiental, naturalmente encontrados no solo e água (DOCHERTY; KULPA, 2005; RANKE *et al.*, 2004), além de representantes vegetais (PHAM *et al.*, 2008), invertebrados (BERNOT; KENNEDY; LAMBERTI, 2005; WELLS; COOMBE, 2006) e vertebrados (PRETTI *et al.*, 2006), e também células de mamíferos (RANKE *et al.*, 2004).

É importante salientar que os organismos pertencentes a cada Reino apresentam uma série de características gerais, e específicas, e, portanto, na

presença de líquidos iônicos mostrarão comportamentos muito distintos. Os testes de toxicidade são realizados sob condições dissimilares, tais como períodos de incubação, “end points”, diferentes meios de cultivo, fornecendo, portanto, informações muitas vezes não correlacionáveis sobre efeitos letais ou sub-letais (PETKOVIC *et al.*, 2011).

No contexto da toxicidade de líquidos iônicos existem trabalhos que procuram investigar tanto sua biocompatibilidade e/ou biodegradabilidade, ou novos biocidas (PETKOVIC *et al.*, 2011). Diversos estudos buscam a síntese de líquidos iônicos que exibam atividade antimicrobiana para a formulação de novos biocidas, baseados em cátions compostos por imidazólio, piridínio e amônio quaternário associados a diversos substituintes e ânions (PERNAK; CHWAŁA, 2003; PERNAK; MIRSKA; KMIĘCIK, 1999; PERNAK; ROGOZA; MIRSKA, 2001; PERNAK; SKRZYPCZAK, 1996; PERNAK *et al.*, 2001; SKRZYPCZAK *et al.*, 1997). Nesses estudos, a toxidez é avaliada frente a diversas bactérias e fungos de importância para a saúde humana como, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra*, *Bacillus subtilis*, entre outros.

Na grande maioria dos casos a atividade antimicrobiana é afetada pelo tamanho da cadeia alquílica substituinte e o tipo de cátion presente na molécula, sendo o aumento da toxidez dos líquidos iônicos diretamente proporcional ao aumento do tamanho da cadeia alquílica. Em geral, aqueles LI's que contém de 10 a 12 carbonos, associados a cátions como o 1-alquoximetil(carbomoil)piridínio (PERNAK *et al.*, 2001), 1-alquoximetil-3-(nicotiny laminometil)benzimidazólio (PERNAK; ROGOZA; MIRSKA, 2001), 3-alquoximetil-1-metilimidazólio e 1-alquoximetil-3-metilimidazólio (PERNAK; SOBASZKIEWICZ; MIRSKA, 2003) foram mais efetivos contra os microrganismos testados.

Este efeito vem sendo associado ao aumento da lipofilicidade da molécula, relação que é estabelecida através do método QSAR (do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*), o qual relaciona estatisticamente a estrutura química e a atividade antimicrobiana (PERNAK *et al.*, 2001). A lipofilicidade mais acentuada da molécula resulta então em maior interação com a superfície da membrana celular destes organismos, o que explica seu efeito tóxico. Este grupo também observou

que a presença de diferentes grupos funcionais como substituintes da porção catiônica pode alterar sua toxicidade. Ao avaliar a atividade antimicrobiana de líquidos iônicos baseados em cloretos de amônio quaternário derivados de colina contendo álcool e éster como substituintes, os pesquisadores observaram que estes foram menos tóxicos para os microrganismos do que aqueles contendo álcool (PERNAK; CHWAŁA, 2003).

A mesma tendência de aumento da toxicidade dos líquidos iônicos com o aumento do tamanho das cadeias alquílicas laterais pode ser observado por estudos ecotoxicológicos. Ranke e colaboradores (2004) avaliaram compostos imidazólicos, com cadeias de carbono variando de 3-10 átomos, combinados com vários ânions ($[\text{BF}_4]^-$, $[\text{PF}_6]^-$, $[\text{Br}]^-$, $[\text{pTS}]^-$ e $[\text{Cl}]^-$) para *Vibrio fischeri* e linhagens de células de mamíferos. A elongação de cadeias laterais foi um fator decisivo para maior suscetibilidade (RANKE *et al.*, 2004). Assim como para compostos imidazólicos (RANKE *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2008), o mesmo foi encontrado para compostos alquilpiridínicos pareados com diversos ânions (DOCHERTY; KULPA, JR., 2005). Esta mesma tendência também já foi descrita para outros organismos estudados, incluindo o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (SWATLOSKI *et al.*, 2004), o caramujo de água doce *Physa acuta* (BERNOT; KENNEDY; LAMBERTI, 2005), e a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* (PHAM *et al.*, 2008).

O tipo de composto catiônico também influencia na toxicidade dos LI's, para *Vibrio fischeri*: líquidos iônicos contendo compostos aromáticos na porção catiônica, tais como imidazólio e piridínio foram mais tóxicos do que aqueles cuja porção catiônica era composta por amônio quaternário (COULING *et al.*, 2006). Em outro estudo realizado com a microalga *Selenastrum capricornutum* (CHO *et al.*, 2008) os autores também observaram esta mesma tendência.

Já em relação à porção aniônica, muitos trabalhos afirmam que dentre os ânions mais comumente investigados na literatura, tais como $[\text{BF}_4]^-$, $[\text{PF}_6]^-$, $[\text{N}(\text{CN}_2)_2]^-$, $[\text{Cl}]^-$, $[\text{CH}_3\text{SO}_4]^-$, $[\text{pTS}]^-$, $[\text{NTf}_2]^-$, estes geralmente não apresentam efeitos significantes, ou demonstram efeito secundário na toxicidade dos líquidos iônicos (DOCHERTY; KULPA, JR., 2005; RANKE *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2008). Por vezes não é possível estabelecer um efeito sistemático para os ânions, e desta maneira a toxidez parece der determinada principalmente pelo componente catiônico

(RANKE *et al.*, 2004). Porém, um estudo realizado por Stolte e colaboradores (2006) avaliou uma variedade maior de ânions, alguns raramente estudados, e pode-se observar que de 27 ânions combinados com cátions imidazólicos, 10 apresentaram atividade citotóxica significativa frente a linhagens de células leucêmicas, sugerindo que o fato de porções aniônicas apresentarem elementos estruturais lipofílicos ou hidrolisáveis parece ser uma característica relevante no que diz respeito aos seus efeitos tóxicos. Dados também mostram que o efeito do ânion pode tornar-se mais pronunciado quando combinado com cátions menos tóxicos (PETKOVIC *et al.*, 2011).

Estudos apontam que, em alguns casos, os líquidos iônicos podem ser mais tóxicos que os solventes orgânicos tradicionais para modelos biológicos em estudos ecotoxicológicos, principalmente aqueles com cadeia longa (DOCHERTY; KULPA, JR., 2005; RANKE *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2008).

Mas, apesar destas evidências, sabe-se que uma das vantagens dos líquidos iônicos é o seu reuso, reduzindo a necessidade de liberá-lo no ambiente, prolongando sua vida útil em determinados processos (DENNEWALD; PITNER; WEUSTER-BOTZ, 2011). Adicionando-se a isso, é possível perceber que o número crescente de pesquisas de toxicidade vem guiando o “design” consciente de líquidos iônicos mais biocompatíveis tais como aqueles formados por cátions colínicos (PERNAK *et al.*, 2007; PETKOVIC *et al.*, 2010), e os ânions, sacarinato, acesulfamato (HOUGH-TROUTMAN *et al.*, 2009; NOCKEMANN *et al.*, 2007; STASIEWICZ *et al.*, 2008), lactato e alcanoato (PETKOVIC *et al.*, 2009).

3.2.1 Métodos para Avaliação de Toxicidade

Toxicidade de líquidos iônicos frente aos microrganismos é um importante tema a ser investigado para a aplicação biotecnológica destes. Entretanto, a toxicidade de IL's pode ser determinada por diferentes critérios tais como inibição de crescimento celular, viabilidade celular ou inibição do metabolismo mensurada através da quantidade de produto formado ou absorção de substrato (QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010). Alguns resultados de trabalhos que avaliam a toxicidade de LI's apresentam controvérsias quanto a concentrações tóxicas referentes aos mesmos

microrganismos. Segundo Quijano e colaboradores (2010), isso pode ser explicado pela diferença de concentração de IL's e biomassa utilizada nos experimentos.

Métodos rápidos de “screening” vêm sendo aplicados no contexto da ecotoxicologia, utilizando modelos biológicos considerados padrão para estes tipos de análise. Um ensaio bastante aplicado e que foi utilizado no primeiro estudo tóxico e ecotoxicológico com líquidos iônicos é o bioensaio padrão (ISO 11348) de redução de luminescência em culturas de *Vibrio fischeri*, uma bactéria Gram-negativa (RANKE *et al.*, 2004). A diminuição da luminescência da cultura desta bactéria é relacionada à redução na taxa de respiração, e serve como uma medida indireta da toxicidade dos compostos testados (COULING *et al.*, 2006). Além deste modelo microbiano, linhagens de células de mamíferos provenientes de ratos, tais como, IPC-81, linhagem de células leucêmicas e C₆, linhagem de células de glioma, também foram utilizadas neste trabalho pioneiro como modelos de citotoxicidade (RANKE *et al.*, 2004). Outro importante organismo usado em testes ecotoxicológicos é *Daphnia magna*, um crustáceo aquático, que é reconhecido como um modelo adequado para este tipo de teste, devido a sua rápida taxa de reprodução e sensibilidade a mudanças nas condições ambientais (LUO *et al.*, 2008).

No que diz respeito à avaliação de atividade antimicrobiana em geral, dentro ou fora do contexto ecotoxicológico, os procedimentos de testes básicos envolvem ensaios de suscetibilidade planctônica, concentração mínima inibitória (CMI) ou concentração máxima não tóxica (CMNT) ou ainda concentração mínima bactericida/fungicida (CBM/CFM) ou técnicas de difusão em ágar; alguns estudos também avaliam a atividade antimicrobiana contra biofilmes microbianos (GILMORE, 2011).

O teste de difusão em ágar é útil para a determinação empírica do potencial antimicrobiano de um dado composto a partir da mensuração da zona de inibição do crescimento bacteriano ou fúngico ao redor do local de aplicação do composto em questão (GILMORE, 2011). Não obstante sua fácil execução e rápida obtenção de resultado, este tipo de teste também apresenta algumas limitações, como já apontado em alguns estudos, tais como a possibilidade de interação dos líquidos iônicos com o filtro de papel ou meio de cultura sólido; difusão não homogênea do LI

através do ágar, produzindo zonas de inibição irregulares, resultando em erros de medição (WOOD *et al.*, 2011).

Testes de concentração mínima inibitória (CMI) são considerados “padrão ouro” para determinar a suscetibilidade de organismos a antimicrobianos e são, por esse motivo, usados para julgar o desempenho de outros testes de suscetibilidade (ANDREWS, 2001). O método de microdiluição é uma adaptação do método de macrodiluição exigindo volumes de teste bem menores, usando microplacas de 96 poços. A vantagem deste sistema é o pequeno volume de reagentes requerido, permitindo que um número considerável de bactérias e fungos sejam testados em um tempo relativamente curto (SCHWALBE; STEELE-MOORE; GOODWIN, 2007). A CMI é definida como a menor concentração de um composto capaz de inibir visualmente o crescimento do microrganismo após um dia de incubação (ANDREWS, 2001). O presente trabalho seguiu o mesmo conceito do teste, porém os resultados foram expressos como concentração máxima não tóxica (CMNT) ao invés de CMI, já que o objetivo é que os LI's não inibam o crescimento microbiano. As condições do teste são mais comumente obtidas a partir do “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI), o qual fornece normas específicas dependendo do tipo de microrganismos que se pretende submeter ao teste.

3.3 Líquidos Iônicos em Processos Biotecnológicos

A primeira aplicação de líquidos iônicos em biotecnologia teve como foco principal a biocatálise enzimática, onde se tem registro de aumento da atividade, estabilidade e seletividade de várias enzimas na presença dos IL's (QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010). Uma grande variedade de enzimas tem sido usada para reações biocatalíticas em líquidos iônicos, sendo os sais baseados em imidazólio, principalmente $[C_4mim][PF_6]$, $[C_4mim][NTF_2]$ e $[C_4mim][BF_4]$, os mais investigados até o momento (QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010), como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de utilização de enzimas em líquidos iônicos (YANG; PAN, 2005)

Biocatalisador	Reação	Líquido Iônico
Lipase	Transterificação	[C ₄ mim]PF ₆
	Alcoólise, amoniólise, peridrólise	[C ₄ mim][PF ₆], [C ₄ mim][BF ₄]
	Resolução cinética de alcoóis	[C ₄ mim][NTF ₂]
	quirais	[C ₂ Py][BF ₄], [C ₂ mim][BF ₄]
	Resolução de ester aminoácido	[C ₄ mim][PF ₆]
	Resolução cinética de	
	hidroximetanofosfinatos <i>P</i> -quiral	[COC ₂ mim][BF ₄]
	Esterificação de carboidratos	
Síntese de poliésteres	[C ₄ mim][PF ₆]	
Álcool desidrogenase	Redução enantiosseletiva de 2-octanona	[C ₄ mim][NTF ₂]
Termolisina	Síntese de Z-aspartame	[C ₄ mim]PF ₆
α-quimotripsina	Transesterificação	[C ₂ mim][NTF ₂], [MTOA][NTF ₂]
Esterase	Transesterificação	[C ₄ mim][PF ₆]
Subtilisina	Resolução de ester aminoácido	[C ₂ Py][TFA]
B-Galactosidase	Síntese de <i>N</i> -acetilactosamina	[Cmim][CSO ₄]
Peroxidase	Oxidação de guaiacol	[C ₄ mim][PF ₆]
Lacase	Oxidação de antraceno	[C ₄ mim][PF ₆]
Formato desidrogenase	Regeneração de NADH	[Cmim][CSO ₄]

Além da aplicação em biocatálise enzimática, outra potencial aplicação dos líquidos iônicos em biotecnologia é seu uso em processos envolvendo células íntegras. Biotransformação utilizando células íntegras, em geral, é mais vantajoso que sistemas enzimáticos, onde a regeneração de coenzimas e cofatores custosos, como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e adenosina trifosfato (ATP), é requerida (HEIPIEPER *et al.*, 2007). Uma grande variedade de compostos químicos pode ser produzida por biotransformação, porém, em um número importante de casos, o acúmulo de produtos no meio pode inibir sua produção, assim como o substrato pode apresentar efeito tóxico. Uma solução promissora pra ambos os problemas é a implementação de um sistema bifásico, que tradicionalmente é formado por um solvente orgânico imiscível em água,

funcionando como uma fonte e reservatório para substratos, e produtos gerados, respectivamente (HEIPIEPER *et al.*, 2007; OPPERMANN; STEIN; KRAGL, 2011). Assim, o efeito do acúmulo do produto no meio pode ser reduzido pela sua remoção contínua (ROFFLES; BLANCH; WILKE, 1984), e a concentração de substrato no meio aquoso é mantida em nível mais baixo que o inibitório (HEIPIEPER *et al.*, 2007) aumentando o rendimento e produtividade do processo. Além disso, há redução de processos de “downstream”, como processos de extração e purificação, que são responsáveis por uma grande parcela dos custos de um produto (OPPERMANN; STEIN; KRAGL, 2011).

Não obstante suas vantagens, os solventes orgânicos utilizados como segunda fase podem ser tóxicos para o microrganismo, tornando o processo ineficiente (LEON *et al.*, 1998). Devido às características já abordadas, os líquidos iônicos vêm sendo investigados e utilizados como substituintes dos solventes orgânicos na formação de sistemas bifásicos em biotransformação com células íntegras. Porém, o número de estudos ainda é escasso e focado principalmente em reações de redução de cetonas para a produção de álcool quiral, bastante utilizados em química fina (DENNEWALD; HORTSCH; WEUSTER-BOTZ, 2012; DENNEWALD; PITNER; WEUSTER-BOTZ, 2011; HOWARTH; JAMES; DAI, 2001; LOU *et al.*, 2009; PFRUENDER *et al.*, 2004; WANG; ZONG; LOU, 2009). Até o momento, poucos líquidos iônicos têm sido testados para o uso em processos de biotransformação microbiana, sendo os sais imidazólicos mais investigados, e o ânion $[PF_6]$ mais recorrente (QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010), por formar líquidos iônicos imiscíveis em água (Tabela 2).

Neste contexto, há alguns notáveis sucessos. Por exemplo, Cull e outros autores (2000), mostraram pela primeira vez que líquidos iônicos, como $[C_4mim][PF_6]$, podem ser considerados substituintes diretos dos solventes orgânicos em bioprocessos multifásicos. Biotransformação em ambos os sistemas formados por água- $[C_4mim][PF_6]$ e água-tolueno apresentaram perfis similares para a conversão a 3-cianobezamida e a de 1,3 cianobenzeno depois ácido 3-cianobenzóico (CULL *et al.*, 2000). Neste processo, a fase orgânica atuou como um reservatório para o substrato pouco solúvel na fase aquosa, aumentando a produtividade do reator.

Tabela 2. Aplicação de LI's em processos com células inteiras (QUIJANO; COUVERT; AMRANE, 2010)

Microrganismo	Processo	Líquido Iônico
<i>Escherichia coli</i>	Síntese de álcool quiral	[C ₄ mim]PF ₆
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		[C ₄ mim][NTF ₂]
<i>Rhodococcus</i> R312	Síntese de ácido 3-cianobenzóico e 3-cianobenzamida	[C ₄ mim]PF ₆
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Síntese de 2-feniletanol	[C ₄ mim]PF ₆ [C ₆ mim]PF ₆ [C ₈ mim]PF ₆ [C ₁₀ mim]PF ₆ [C ₄ mim][NTF ₂]
<i>Escherichia coli</i>	Redução assimétrica de cetona proquiral	[C ₄ mim]PF ₆ [C ₆ mim]PF ₆ [C ₄ mim][NTF ₂] [C ₆ mim][NTF ₂]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizada	Redução de cetona	[C ₄ mim][PF ₆]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizada	Síntese de (S)-1-trimetilsilietanol	[C ₄ mim][PF ₆] [C ₄ mim][BF ₄]

Em outro estudo, a eficiência da redução assimétrica de 4-cloroacetofenona a (R)-1-(4-clorofenil)etanol catalisada por *Lactobacillus kefir* em um sistema contendo 20% de líquido iônico ou solvente orgânico foi avaliada. Dentre os LI's imiscíveis em água estudados ([Bmim][PF₆], [Bmim][NTF₂], [MTOA][NTF₂]), [Bmim][NTF₂] foi considerado um bom solvente, tanto para o substrato, quanto para o produto, apresentando o dobro do rendimento relativo ao processo contendo substrato e produto dispersos (PFRUENDER *et al.*, 2004).

Dennewald e outros autores (2011), demonstraram que o líquido iônico [HMPL][NTF₂] (1-hexil-1-metil-pirrolidínio bis(trifluorometilsulfonil)imida) foi eficiente na formação de sistema bifásico para conversão de 2-octanona a (R)-2-octanol por *Escherichia coli* recombinante. Além disso, o LI foi reutilizado durante 25 ciclos sem perda de produtividade e sem degradação durante o processo, evidenciando que

apesar de serem, em sua maioria, bastante custosos, quando apresentam estabilidade química e térmica podem ser facilmente reciclados, o que reduz o custo do processo em longo prazo (DENNEWALD; PITNER; WEUSTER-BOTZ, 2011).

Além de funcionarem como segunda fase e reservatório de substratos e produtos, os líquidos iônicos também podem funcionar como co-solventes em processos biotecnológicos, e nesse caso líquidos iônicos miscíveis em água são requeridos para a formação do sistema monofásico. Lou e outros autores (2009) obtiveram resultados positivos na redução enantiosseletiva de 4'-metoxiacetofenona (MOAP) a (R)-1-(4-metoxifenol)etanol {(R)-MOPE} por células imobilizadas da levedura *Trigonopsis variabilis* AS2.1611, na presença do líquido iônico 1-(2'-hidroxil)etil-3-metilimidazólio nitrato [C₂OHmim][NO₃] como co-solvente. A presença de 2,5 % (v/v) de [C₂OHmim][NO₃], miscível na fase tampão aquoso permitiu que as células tolerassem relativamente altas temperaturas e concentrações de substrato comparado ao sistema sem LI, possivelmente devido ao aumento moderado na permeabilidade da membrana celular (LOU *et al.*, 2009). Em outro estudo, 1-butil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato [C₄mim][BF₄] foi empregado como co-solvente na biorredução de etil acetoacetato a etil (R)-3-hidroxiacetato catalizada por *Pichia membranaefaciens* Hansen ZJPH07, obtendo-se maior rendimento e enantiosseletividade, assim como foi possível utilizar maiores concentrações de substrato na presença deste LI (HE *et al.*, 2009).

Recentemente estudados em reações de redução assimétrica, os líquidos iônicos também apresentam potencial aplicação na produção de outros compostos de importância biotecnológica como os ácidos orgânicos. Porém, ainda são escassos e iniciais os estudos que investigam sua utilização em sistemas de reação mais complexos, como os processos de fermentação, e principalmente para a produção de insumos utilizados na indústria de alimentos. Pesquisas preliminares avaliaram o crescimento de bactérias lácticas na presença dos líquidos iônicos [C₄mim][PF₆], [C₆mim][PF₆], [C₈mim][PF₆], assim como sua capacidade de extração do ácido láctico buscando LI's biocompatíveis que possam ser empregados em fermentação extrativa (MATSUMOTO; MOCHIDUKI; KONDO, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2004).

3.4 Microrganismos na Indústria de Alimentos

Por milhares de anos, os microrganismos tem suprido a humanidade com produtos fermentados tais como, pães, cerveja, vinho, bebidas destiladas, vinagre, queijo, pickles entre outros. Os produtos microbianos podem ser divididos em metabólitos primários e secundários. Metabólitos primários são pequenas moléculas intermediárias ou produtos finais de vias do metabolismo intermediário ou ainda blocos constituintes de macromoléculas essenciais para o crescimento vegetativo (DEMAIN, 2000b). Alguns metabólitos primários utilizados na indústria de alimentos incluem: álcool (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos (5'-ácido guanílico, 5' ácido inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, succínico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, eritriol, xilitol), polissacarídeos (xantana, gelana), açúcares (frutose, ribose, sorbose) e vitaminas [riboflavina (B₂), cianocobalamina (B₁₂), biotina] (DEMAIN, 2000a). Já os metabólitos secundários não exercem função no crescimento do microrganismo, entretanto são essenciais para a sobrevivência do organismo produtor. Formam um grupo que inclui antibióticos, toxinas, biopesticidas e fatores de crescimento animal e vegetal (DEMAIN, 2000a).

Como já discutido anteriormente, comparado aos processos químicos, um processo biotecnológico utilizando células vivas é caracterizado por baixa produtividade devido à inibição pelo produto gerado. Além disso, o produto formado encontra-se diluído, o que leva a altos custos nos processos subsequentes de isolamento e purificação do mesmo (STARK; STOCKAR, 2003). O processo de fermentação integrado à separação do produto pode acelerar a formação e melhorar o rendimento do produto, além de facilitar o processos de “downstream” (MALINOWSKI, 2001). Dentre as diferentes abordagens de integração das etapas de reação e recuperação do produto em sistemas biológicos, a fermentação extrativa líquido-líquido parece apresentar grande potencial (MALINOWSKI, 2001). Um dos critérios importantes para a escolha da fase extratante é a biocompatibilidade deste com o microrganismo fermentador (MALINOWSKI, 2001). Visto isso, alguns microrganismos importantes para a indústria de alimentos, descritos a seguir, foram selecionados a fim de determinar sua tolerância a alguns grupos de líquidos iônicos.

3.4.1 *Bacillus subtilis*

São bactérias Gram-positivas, aeróbias, esporuladas, com metabolismo proteolítico e amilolítico, utilizadas em biotecnologia para a produção de enzimas (MASSAGUER, 2005). Considerada uma espécie segura com status GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) (SHARP *et al.*, 1989). São produtoras de α -amilase (ANDERSSON; JOHANSSON; HAHN-HÄIGERDAL, 1985; ASGHER *et al.*, 2007), que assim como as aminoglicosidases, são enzimas industriais utilizadas na sacarificação de amido, convertendo-o em glicose (HUANG; TANG, 2007). Esta espécie também é capaz de produzir biossurfactantes, metabólitos com atividade de superfície, capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial utilizando o mesmo mecanismo dos surfactantes químicos (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006), tais como, surfactina, fengicina e iturina (NITSCHKE; COSTA, 2007), este último com atividade antifúngica (BESSON *et al.*, 1976). Na indústria de alimentos, biossurfactantes são usados como emulsificantes e devido a sua baixa toxicidade, natureza biodegradável e diversidade, têm ganhado atenção considerável recentemente (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

3.4.2 *Lactobacillus delbrueckii*

Bactérias lácticas, incluindo espécies de *Lactobacillus*, são utilizadas industrialmente para a produção de iogurte, chucrute, pickles, silagem e outros alimentos fermentados. Produção de bacteriocinas e exopolissacarídeos também são outros exemplos de aplicação dos lactobacilos na indústria de alimentos, controlando crescimento de microrganismos patogênicos; e aumentando a viscosidade e firmeza, melhorando a textura e contribuindo para o sabor de produtos com pouca gordura, respectivamente (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

São bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, capazes de converter lactose e outros açúcares simples em ácido láctico (HUANG; TANG, 2007). O ácido láctico é utilizado na indústria de alimentos como preservante, acidulante e flavorizante; na indústria têxtil, farmacêutica e química (WEE; KIM; RYU, 2006). Das 80.000 toneladas de ácido láctico produzidas mundialmente por ano

aproximadamente, 90% são produzidas via fermentação por bactérias lácticas e o restante é produzido sinteticamente pela hidrólise de lactonitrila (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Processos de produção comercial existentes utilizam organismos homolácticos, que convertem a glicose quase que totalmente a ácido láctico, tais como *Lactobacillus delbrueckii*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus* e *L. leichmanii* (DATTA; HENRY, 2006).

3.4.3 *Streptomyces sp.*

São actinobactérias Gram-positivas, não móveis e filamentosas. Formam micélio e esporos, e produzem numerosos pigmentos e antibióticos (HUANG; TANG, 2007). Cerca de 6.000 antibióticos estão descritos, 4.000 são provenientes de actinobactérias. As linhagens de *S. griseus* produzem cerca de 40 antibióticos diferentes, *S. hugroscopicus* sintetizam aproximadamente 200 antibióticos (DEMAIN, 2000b) Espécies como *S. coelicolor* são capazes de sintetizar pigmentos azuis com atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas (ELIBOL; MAVITUNA, 1999) que podem ser utilizados na indústria de alimentos como corante de bebidas e bolos. Além disso, são produtoras comerciais de glucose isomerase, a qual catalisa a isomerização reversível da D-glucose e D-xilose a D-frutose e D-xilulose, respectivamente, sendo de importância comercial na produção de xarope de milho rico em frutose (BHOSALE; RAO; DESHPANDE, 1996)

3.4.4 *Pseudomonas aeruginosa*

São bactérias Gram-negativas, bastonetes móveis com flagelo polar, não esporuladas, aeróbios obrigatórios, capazes de crescer em meios simples (MASSAGUER, 2005). Sob condições específicas, esta bactéria produz biosurfactantes glicolipídicos contendo ramnose. Os ramnolipídios são os surfactantes de origem microbiana mais bem estudados (MAIER; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). Além de ser um produto interessante como um emulsificante, os ramnolipídios são fonte de L-ramnose, considerado um potencial precursor de agentes flavorizantes (NITSCHKE; COSTA, 2007). *P. aeruginosa* é um organismo patogênico oportunista de humanos, conseqüentemente não reconhecido como

seguro (GRAS), motivo que oferece alguma resistência quanto ao seu uso em ingredientes alimentares (NITSCHKE; COSTA, 2007)

3.4.5 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae é um fungo leveduriforme pertencente ao filo *Ascomycota*, conhecido como levedura de cerveja, tem sido amplamente utilizada na produção de etanol. É o organismo eucariótico modelo em biologia celular e molecular, semelhante a *E. coli* como modelo procariótico. Primeiro eucarioto com seu genoma sequenciado e completamente caracterizado genética e fisiologicamente (HUANG; TANG, 2007). Tem recebido particular atenção também na produção de compostos lipídicos, tais como esteróis, hormônios esteróides e ácidos graxos poliinsaturados, os quais levam a biossíntese de ômega-3 e ômega-6, que podem ser importantes componentes nutracêuticos (VEEN; LANG, 2004).

3.4.6 *Kluyveromyces marxianus*

K. marxianus é um fungo leveduriforme, hemiascomiceto, filo *Ascomycota*, e também denominado como levedura “não convencional”. É filogeneticamente relacionada à *S. cerevisiae* e pertence ao mesmo gênero que sua “irmã” *K. lactis*, as duas últimas bastante conhecidas e estudadas (LANE; MORRISSEY, 2010). *K. marxianus* e *K. lactis* tem como principal característica comum a capacidade de assimilar lactose e usá-la como fonte de carbono, o que tornou esta última modelo para estudos envolvendo metabolismo da lactose (BREUNIG *et al.*, 2000), característica que é ausente na levedura *S. cerevisiae* (LANE; MORRISSEY, 2010). São, portanto, frequentemente isoladas a partir de produtos lácteos, por exemplo, leite fermentado, iogurtes e queijos (LANE; MORRISSEY, 2010).

O uso biotecnológico desta espécie tem sido motivado por uma série de vantagens quando comparada a *K. lactis*, alta taxa de crescimento em diversos substratos, termotolerância (LOVE *et al.*, 1998), e ausência de metabolismo fermentativo quando na presença de açúcar em excesso (FONSECA *et al.*, 2008). *K. marxianus* tem sido estudada como fonte de uma série de enzimas de interesse industrial, como inulinase (KALIL *et al.*, 2001), β -galactosidase (SANTIAGO *et al.*,

2004), β -glucosidase, e endopoligalacturonases. Além dessas, outras enzimas com potencial aplicação industrial são as fosfatases, carboxipeptidases e aminopeptidases (FONSECA *et al.*, 2008). A produção de compostos aromáticos de grande importância comercial como o 2-feniletanol, extraído naturalmente de pétalas de rosas, também são reportados para esta espécie (WITTMANN; HANS; BLUEMKE, 2002).

3.4.7 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um fungo leveduriforme, hemiascomiceto, estritamente aeróbio pertencente ao filo *Ascomycota*. Dentre o grupo das leveduras “não convencionais”, é a mais estudada, comumente utilizada como modelo para o estudo de secreção de proteínas, biogênese de peroxissomos, dimorfismo, degradação de substratos hidrofóbicos, e em outros novos campos (FICKERS *et al.*, 2005). Recebe a denominação “não-convencional” como forma de diferenciá-la do grupo das leveduras mais comumente utilizadas e bem estudadas, chamadas portanto de “convencionais”, tais como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

Y. lipolytica tem emergido como um microrganismo importante em aplicações industriais. Ácidos orgânicos, enzimas (proteases, lipases, esterases, e fosfatase), proteínas microbiana (*single-cell protein*), óleo microbiano (*single-cell oil*) são os principais produtos obtidos a partir desta levedura (BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009). Em meados dos anos 1960, o interesse por *Y. lipolytica* surgiu dada sua habilidade de utilizar substratos hidrofóbicos, especialmente alcanos, para a produção de proteína microbiana (“single-cell protein, SCP), bem como os metabólitos intermediários, ácido cítrico e ácido 2-cetoglutárico (FICKERS *et al.*, 2005). Tal como o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, é considerado como um produtor potencial de ácido cítrico (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002), e para tal aplicação industrial foi classificado como GRAS pela FDA (FICKERS *et al.*, 2005).

O fato desta espécie crescer na presença de substratos hidrofóbicos tem sido atribuído a uma eficiente síntese e excreção de enzimas lipolíticas (BARTH; GAILLARDIN, 1997). Por este motivo, a produção de lipase por *Y. lipolytica*, vem

sendo extensivamente estudada (DESTAIN; ROBLAIN; THONART, 1997; FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011; FICKERS *et al.*, 2003). Lipases desempenham um papel relevante na indústria de alimentos, como a produção de compostos aromatizantes e flavorizantes, e a modificação estrutural de óleos e gorduras (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

3.4.8 *Aspergillus brasiliensis*

Aspergillus niger é um fungo filamentosos, com crescimento aeróbio, pertencente ao filo *Ascomycota*. Na natureza, é encontrado no solo, adubo e em materiais vegetais em decomposição. Tem sido objeto de pesquisa e uso industrial por décadas, sendo capaz de produzir ácido cítrico, glucônico e fumárico, além de uma variedade de enzimas, pectinase, protease e amiloglucosidase, que são utilizadas no processamento de frutas, indústria de amido, entre outras (SCHUSTER *et al.*, 2002). É considerado GRAS pelo FDA como produtor de ácido cítrico e juntamente com *A. wentii* são quase que exclusivamente responsáveis pela produção comercial deste acidulante, uma vez que apresentam bom rendimento e mínima produção de produtos indesejáveis (SCHUSTER *et al.*, 2002).

A espécie *A. brasiliensis* ATCC 16404, foi inicialmente depositada como *A. niger* até o ano de 2007, quando reclassificada por Varga e outros (2007) após estudos moleculares. Apesar de não ser mais classificada como *A. niger*, esta espécie e cepa, mas especificamente, ainda é reportada como *A. niger* e também é capaz de produzir ácido cítrico (ÇEVRIMLİ *et al.*, 2010) e por isso foi utilizada no presente trabalho.

3.4.9 *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae é um fungo filamentosos da ordem *Mucorales*, filo *Zygomycota*. Linhagens de *R. oryzae* são bastante utilizadas na Ásia na fabricação de bebidas alcoólicas, e as cepas são reconhecidas como seguras (MEUSSEN *et al.*, 2012). É capaz também de produzir ácido láctico e ao contrário do processo bacteriano, este fungo sintetiza o isômero puro L-(+)-ácido láctico, o qual é preferido

na indústria de alimentos, pois somente este pode ser metabolizado por mamíferos (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). A principal desvantagem do processo fúngico na produção de ácido láctico é o desvio do carbono para a formação de produtos indesejáveis como etanol e ácido fumárico (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). Em revisão recente, foi apresentada a grande variedade de metabólitos produzido por *R. oryzae*, dentre eles, celulases, hemicelulases, pectinases, tanases, fitases, amilases, lipases, proteases; além de ácidos orgânicos, polímeros, e bioálcool (GHOSH; RAY, 2011).

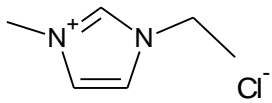
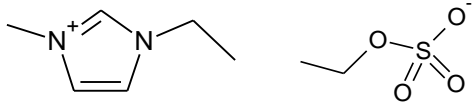
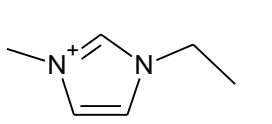
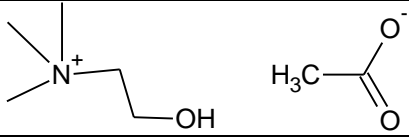
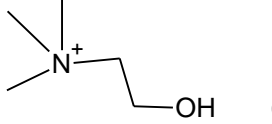
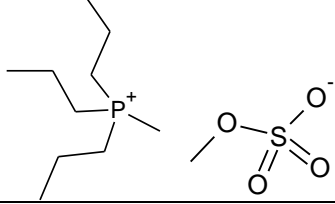
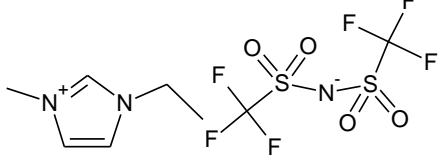
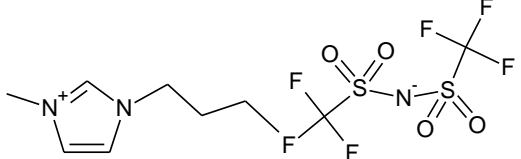
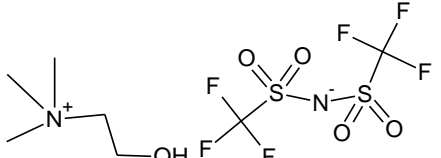
4. Materiais e Métodos

4.1 Avaliação da Toxicidade dos Líquidos Iônicos

4.1.1 Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos utilizados neste estudo (Tabela 3) foram gentilmente cedidos pela Prof^a Dr^a. Isabel Marrucho do ITQB/Universidade Nova de Lisboa (Portugal).

Quadro 1. Líquidos iônicos utilizados.

Nome	Abreviação	Estrutura
Cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio	[C ₂ mim][Cl]	
Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazólio	[C ₂ mim][EtSO ₄]	
Etilsulfonato de 1-etil-3-metilimidazólio	[C ₂ mim][EtSO ₃]	
Acetato de colina	[Colina][OAc]	
Cloreto de colina	[Colina][Cl]	
Metilsulfato de tributil(metil)fosfônio	[P ₄₄₄₁][MetSO ₄]	
Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-etil-3-metilimidazólio	[C ₂ mim][NTF ₂]	
Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio	[C ₄ mim][NTF ₂]	
Bis(trifluorometilsulfonil)imida de colina	[Colina][NTF ₂]	

4.1.2 Microrganismos Utilizados

Foram utilizados nove microrganismos de importância na indústria de alimentos para a análise de toxicidade dos líquidos iônicos, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 2. Microrganismos utilizados no estudo.

Tipo de Microrganismo	Espécie	Origem/Código
Bactérias Gram-positivas	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	ATCC 9649
Actinobactéria	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	M7a ¹
Bactéria Gram-negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
Fungos leveduriformes	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 2601
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	IMUFRJ 50682 ²
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IMUFRJ 50815 ²
Fungos Filamentosos	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
	<i>Rhizopus oryzae</i>	UCP 1506 ³

(1) Cedida pela Prof^a. Dr^a. Rosalie Coelho (Instituto de Microbiologia/Universidade Federal do Rio de Janeiro); (2) obtidas a partir do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro; (3) cedida gentilmente pela Prof^a. Galba Takaki (Universidade Católica de Pernambuco).

4.1.3 Determinação da Concentração Máxima Não Tóxica (CMNT)

A determinação da concentração máxima não tóxica dos líquidos iônicos foi realizada com base na metodologia padrão internacional do CLSI/NCCLS (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) descrita para cada um dos microrganismos listados que foram testados (CLSI/NCCLS Normas M27-A2 (leveduras), M38-A (fungos filamentosos), M7–A6 (bactérias aeróbias), M24-A2 (actinobactérias). No caso de *L. delbrueckii*, cuja norma correspondente seria a M45-A, o meio de cultura indicado foi alterado, uma vez que o protocolo exigia um complemento que não pode ser comercializado no Brasil. Sendo assim foi utilizado um meio MRS (deMan, Rogosa e Sharpe), indicado para bactérias lácticas.

Para observação da CMNTs foram utilizadas microplacas de 96 poços, onde foram adicionados 100 μL de uma solução estoque a 500 mg/mL de cada líquido iônico no primeiro poço, e feitas 8 diluições seriadas (1:2) em 100 μL de meio de cultivo RPMI – 1640 (DIFCO) com glutamina e sem bicarbonato, tamponado a pH 7,0 em 25°C com HEPES para fungos; Mueller Hinton – 2 g de infusão de carne, 17,5 g de caseína e 1,5 g de amido por litro - para bactérias; e MRS - para *Lactobacillus* (Figura 2).

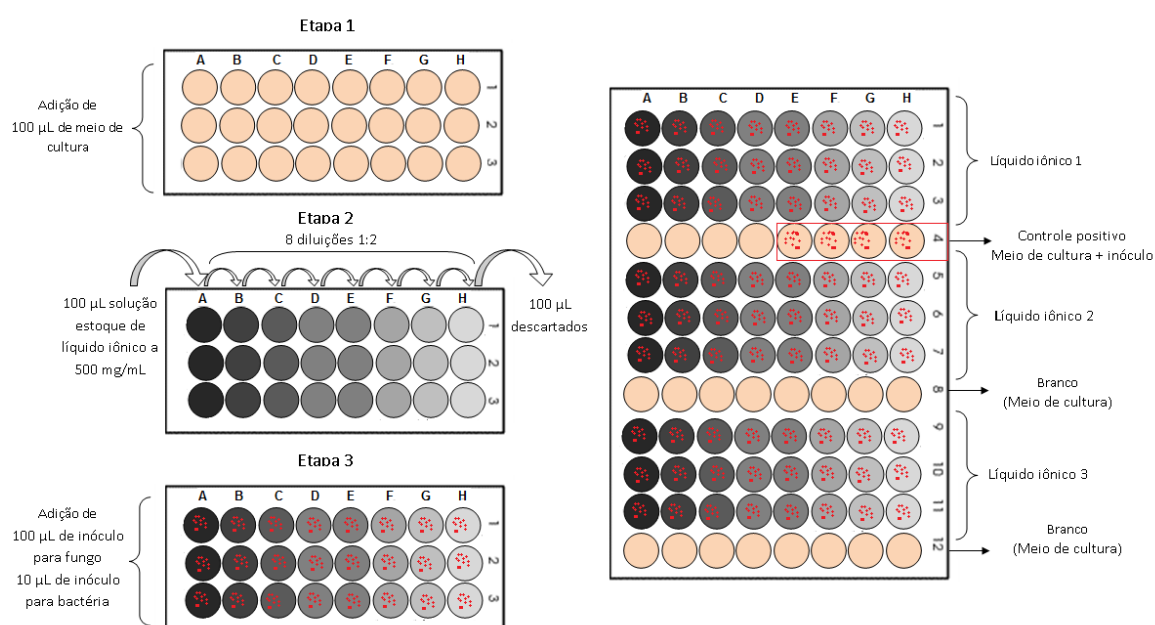


Figura 2. Esquema do experimento para determinação da CMNT

As bactérias foram crescidas em BHI (*Brain Heart Infusion*) sólido por 24 horas a 37°C, exceto *L. delbrueckii* que foi crescida em MRS sólido por 48 h a 37°C. O inóculo inicial foi obtido através de suspensão em água para determinar a D.O. de 0,08 – 0,1 em 625 nm (1×10^8 UFC). Foram feitas diluições do inóculo inicial (1:20 de meio de cultura líquido Mueller Hinton) para obtenção do inóculo final de 5×10^6 UFC/mL. Foi adicionado em cada poço 10 μL do inóculo em um volume final de 110 μL de meio líquido Mueller Hinton adicionado com cada líquido iônico em suas respectivas diluições, obtendo-se uma suspensão de 5×10^5 UFC/mL.

A actinobactéria *S. drozdowiczii* foi crescida em meio sólido composto por 10 g de extrato de malte, 4 g de extrato de levedura, 4 g de glicose e 14 g de ágar por litro durante 7 dias em temperatura ambiente $\pm 28^{\circ}\text{C}$. O inóculo inicial foi obtido através de suspensão direta da placa de crescimento em 4,5 mL de água destilada estéril contendo de 7 a 10 pérolas de vidro, cuja função foi romper os filamentos para obtenção de uma suspensão homogênea. Após agitação em vortex, a suspensão foi mantida em repouso por 15 minutos para que grandes aglomerados remanescentes se depositassem no fundo. Foi retirada uma alíquota do sobrenadante para a determinação da D.O. 0,08 - 0,1 em 625 nm ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Após atingida a D.O. desejada, diluiu-se a suspensão na razão 1:30, obtendo-se um inóculo de 5×10^6 UFC/mL. Transferiu-se 10 μL do inóculo em um volume final de 110 μL de meio líquido Mueller Hinton, obtendo-se uma suspensão final de 5×10^5 UFC/mL.

Os fungos foram crescidos em ágar Sabouraud por 48 horas em temperatura ambiente. Para as leveduras, o inóculo inicial foi obtido através de suspensão em água para determinar a D.O. de 0,08 – 0.1 em 530 nm. Foram feitas diluições do inóculo 1:50 (10 μL em 500 μL de meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)) e 1:20 (100 μL em 2000 μL de meio) obtendo-se um inóculo de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mL. Para os fungos filamentosos foi feita contagem de esporos a fim de obter-se um inóculo de 5×10^4 cél/mL. Foi adicionado em cada poço 100 μL do inóculo, em um volume final de 200 μL de meio de cultura RPMI adicionado com cada líquido iônico em suas respectivas diluições.

Após o período de incubação, a CMNT foi determinada visualmente pela turvação e pela adição de Resazurina (0.005% em PBS pH 7.2). Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido) é um indicador redox, utilizado para determinação de viabilidade celular. Apresenta coloração azul e não fluorescente no seu estado oxidado, mas é reduzido a um derivado rosa fluorescente, resorufina, por enzimas redutases (McNICHOLL *et al.*, 2007).

Os valores de CMNT foram expressos como a média de pelo menos 2 experimentos independentes, realizados em triplicata.

Os líquido iônicos hidrofóbicos, $[\text{C}_2\text{mim}][\text{NTF}_2]$, $[\text{C}_4\text{mim}][\text{NTF}_2]$, $[\text{Colina}][\text{NTF}_2]$, foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para que fosse possível pipetar de forma

homogênea a alíquota necessária da solução estoque. Foi feito um controle do diluente, para assegurar a ausência de influência deste nos resultados obtidos.

4.2 Crescimento Celular

4.2.1 Microrganismos e Líquidos iônicos

Foram selecionados para este experimento os fungos *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, e os líquidos iônicos [Colina][OAc] e [Colina][Cl].

4.2.2 Obtenção do inóculo

O inóculo de *Y. lipolytica* foi obtido a partir de crescimento em meio sólido YPD (*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*) contendo: extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e ágar 2%. Inoculou-se a levedura, de forma estéril, utilizando alça de platina, em 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Os frascos foram incubados em um agitador rotatório (Tecnal TE – 420) a 28°C, 160 rpm de agitação por 72 h. Após este período, foi determinada a absorbância (570 nm) de uma amostra deste cultivo, cujo valor é convertido para mg p.s. cél/mL (miligrama de peso seco de células por mililitro) através do fator de conversão previamente determinado em curva de peso seco. A curva de peso seco foi obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl), de onde retirou-se uma amostra (10 mL) que foi filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 µm) e em seguida submetida a secagem sob luz de infravermelho por cerca de 30 minutos até obtenção de peso constante. Desta suspensão foram feitas diferentes diluições cujas absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro, e peso seco como descrito acima. Uma alíquota correspondente à concentração celular desejada (0,5 mg p.s. cél/mL) é retirada do meio de cultivo, centrifugada de forma estéril a 1258 x g por 5 minutos e ressuspensa, para posterior inóculo em meio de cultivo teste.

A. brasiliensis foi cultivado em ágar batata dextrose (PDA) a 28°C por 4-6 dias. Para obtenção do inóculo, foi realizada suspensão de esporos diretamente do meio de cultivo sólido utilizando água destilada estéril. A concentração de

esporos foi quantificada através de contagem na câmara de Neubauer para a obtenção de uma concentração inicial do inóculo de aproximadamente 10^8 cél/mL.

4.2.3 Condições de Crescimento

Para *Y. lipolytica* foi utilizado meio de cultivo mineral tamponado segundo Da Silva e colaboradores (2012) constituído por KH_2PO_4 (12 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (22,6 g/L) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,5 g/L) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,15 g/L) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02g/L) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,06 g/L), alterando apenas a fonte de carbono para glicose (30 g/L), ao invés de glicerol, e a concentração de extrato de lêvedo (0,341 g/L), a fim de manter-se a mesma relação C/N (714).

Para *A. brasiliensis* foi utilizado meio de cultivo segundo ÇEVRIMLİ e outros autores (2010) constituído por sacarose (140 g/L), $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (3 g/L), KH_2PO_4 (3 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,86 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,44 g/L) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,24 g/L).

Para cada líquido iônico, [Colina][OAc] e [Colina][Cl], foi feita uma solução estoque de 12 mL a 50% com o próprio meio de cultivo. Após isso foram adicionados em erlenmeyers de 50 mL: 5 mL, 3,75 mL e 2,5 mL da solução estoque em 20 mL, 21,25 mL e 22,5 mL de meio, respectivamente, para obtenção de concentração final de 10; 7,5 e 5% (v/v) de LI. Os frascos de 50 mL contendo 25 mL de meio e LI foram inoculados e incubados em agitador rotatório (*shaker* Tecnal TE – 420) a 250 rpm e 28°C para *Y. lipolytica* e a 200 rpm a 30°C para *A. brasiliensis*, durante 96 horas.

4.2.4 Quantificação da concentração celular

Nos ensaios de crescimento de *Y. lipolytica* foram realizadas amostragens diárias durante 5 dias de cultivo. O procedimento consistiu da retirada de 1 mL do meio de crescimento a cada 24 horas para determinação da concentração celular, que foi acompanhada através da densidade óptica a 570 nm. Os valores de D.O. foram convertidos em mg p.s. cél/mL através do fator de conversão como já mencionado no item 4.2.2.

Para os ensaios realizados com *A. brasiliensis*, não foi possível retirar alíquota diária, devido à formação de pellets que impediram a amostragem homogênea, sendo assim foi feita a quantificação ao final do experimento para verificação do rendimento total de biomassa. Para tal, todo o conteúdo do erlenmeyer foi filtrado em filtros Millipore (0,45 μm), secos sob luz de infravermelho até obtenção de peso constante. O pH final das amostras livres de células foi determinado utilizando-se o pHmetro Digimed, modelo DM-22, previamente calibrado com tampões padrão 7,0 e 4,0 a temperatura ambiente (25°C).

5. Resultados e Discussão

5.1 Toxicidade de Líquidos Iônicos

Nove líquidos iônicos foram testados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento de nove microrganismos, dentre bactérias, actinobactérias, fungos leveduriformes e filamentosos. Os valores de CMNT expressam a maior concentração na qual foi possível observar crescimento e viabilidade celular, ou seja, quanto maior o valor da CMNT menor a toxicidade do líquido iônico.

Já é bastante descrita a relação entre o aumento das cadeias alquílicas da porção catiônica e a toxicidade dos líquidos iônicos para diversos organismos, por este motivo procurou-se utilizar neste estudo compostos cujo cátion apresentasse cadeias alquílicas curtas, entre 2 - 4 carbonos (PERNAK; SOBASZKIEWICZ; MIRSKA, 2003).

Para os líquidos iônicos hidrofílicos baseados em imidazólio apresentados na Tabela 3, foi possível observar que estes apresentaram maior toxicidade para os fungos leveduriformes, principalmente para *S. cerevisiae* e *K. marxianus*, os quais não mostraram crescimento nas concentrações estudadas. Dentre as leveduras, somente *Y. lipolytica* demonstrou certa resistência aos LI's hidrofílicos contendo imidazólio em seu cátion, ainda sim com valores de CMNT mais baixos que os fungos filamentosos. Os fungos filamentosos *A. brasiliensis* e *R. oryzae* foram bastante resistentes aos LI's supracitados, não sendo possível, inclusive, determinar a concentração máxima não tóxica em alguns casos, uma vez que foi observado crescimento nas maiores concentrações testadas, como foi o caso de *R. oryzae* que não teve seu crescimento inibido por [C₂mim][Cl] a 125 mg/mL (825,5 mM). Dentre as bactérias, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* foram relativamente mais resistentes aos LI's imidazólicos hidrofílicos. Tal efeito não parece estar ligado à composição da membrana e parede celulares, uma vez que diferem neste quesito.

Tabela 3. Valores de CMNT para os líquidos iônicos imidazólicos miscíveis em água.

Microrganismos	CMNT (mg/mL)		
	[C ₂ mim][Cl]	[C ₂ mim][EtSO ₄]	[C ₂ mim][EtSO ₃]
Bactérias			
Gram-positiva			
<i>Bacillus subtilis</i>	62,5	62,5	125
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	7,81	15,625	15,625
Actinobactéria			
<i>Streptomyces drozdowickii</i>	4	7,8	7,8
Gram-negativa			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	125	31,25	31,25
Fungos			
Leveduriformes			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	< 0,98	< 0,98	< 0,98
<i>Yarrowia lipolytica</i>	31,25	62,5	31,25
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	< 0,98	< 0,98	< 0,98
Filamentosos			
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	62,5	>125	>125
<i>Rhizopus oryzae</i>	> 125	>125	62,55

Não foi possível observar uma diferença evidente entre a toxidez dos ânions Cl⁻, EtSO₄⁻ e EtSO₃⁻, demonstrando serem pouco tóxicos para os microrganismos testados. Wood e outros autores (2011) observaram que ânions alquilsulfatos e cloretos produziram líquidos iônicos de baixa toxicidade para *E. coli*. A toxicidade do líquido iônico é governada pelo componente mais tóxico, neste caso o cátion [C₂mim]⁺, com os ânions desempenhando um papel secundário. Em estudos com *Clostridium butyricum* (REBROS *et al.*, 2009) e *Escherichia coli* (WOOD *et al.*, 2011), ânions alquilsulfatos foram considerados não-tóxicos e promissores para a produção de líquidos iônicos biocompatíveis e biodegradáveis.

Íons baseados em derivados de produtos naturais são bons candidatos para formar líquidos iônicos biocompatíveis e biodegradáveis (RESTOLHO; MATA; SARAMAGO, 2012), um exemplo é o cátion colina, um micronutriente essencial

parte do complexo de vitaminas B (PERNAK *et al.*, 2007). [Colina][Cl] (ou vitamina B4) é um sal orgânico de baixo custo, utilizado, por exemplo, como um aditivo alimentar para frangos. Tem um alto ponto de fusão (298-304°C) e por isso não é considerado um líquido iônico, porém é utilizado na síntese de líquidos iônicos colínicos através da troca de seu ânion (NOCKEMANN *et al.*, 2007), e é também utilizado na síntese dos solventes eutéticos (*deep eutetic solvents*), formados a partir da mistura de dois sais que quando misturados em proporções específicas tornam-se líquidos a temperatura ambiente, como por exemplo, a mistura de cloreto de colina e uréia (ABBOTT *et al.*, 2003). Dado o exposto, considerou-se interessante o estudo da toxicidade do cloreto de colina, uma vez que apresenta potencial de uso também como solvente eutético.

Tabela 4. Valores de CMNT para os líquidos iônicos miscíveis em água baseados em colina e fosfônio

Microrganismos	CMNT (mg/mL)		
	[Colina][OAc]	[Colina][Cl]	[P ₄₄₄₁][MetSO ₄]
Bactérias			
Gram-positiva			
<i>Bacillus subtilis</i>	4	4	< 1,95
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. delbrueckii</i>	4	15,625	4
Actinobactéria			
<i>Streptomyces drozdowikzii</i>	4	15,625	< 1,95
Gram-negativa			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,625	62,5	7,8
Fungos			
Leveduriformes			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15,625	31,25	1,95
<i>Yarrowia lipolytica</i>	31,25	62,5	7,8
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	15,625	31,25	< 0,98
Filamentosos			
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	31,25	62,5	4
<i>Rhizopus oryzae</i>	62,5	>125	4

Os líquidos iônicos miscíveis em água contendo colina em seu cátion (Tabela 4) foram em geral mais biocompatíveis com os microrganismos estudados, uma vez que possibilitou o crescimento de todas as espécies microbianas estudadas.

Alguns estudos envolvendo outros líquidos iônicos contendo tetralquilamônio não cíclicos em seu cátion evidenciam que estes são menos tóxicos que aqueles baseados em amônio quaternário cíclicos, como alquilimidazólio (COULING *et al.*, 2006; REBROS *et al.*, 2009). Além disso, dados anteriores demonstram que a introdução de grupos hidroxila nos substituintes aquil, como é o caso da colina (2-hidroxietiltrimetilamônio) tende a produzir sais não tóxicos, tanto para representantes microbianos (WOOD *et al.*, 2011), quanto para linhagens de células de mamíferos (STOLTE *et al.*, 2007).

As bactérias Gram-positivas, incluindo *S. drozdowikzii*, apresentaram valores de CMNT mais baixos para [Colina][OAc] e [Colina][Cl] em relação ao cátion imidazólio. O cátion colina é estruturalmente semelhante aos compostos quaternários de amônio (quats), que são surfactantes catiônicos com atividade biocida. Tem a capacidade de atrair compostos carregados negativamente como proteínas, mudar a tensão superficial, solubilizar e desnaturar proteínas e desagregar a membrana celular, sendo mais efetivos em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas (MASSAGUER, 2005). Como esperado *P. aeruginosa* exibiu maior tolerância aos LI's colínicos comparado às bactérias Gram-positivas, sugerindo que talvez haja semelhança no mecanismo de ação destas substâncias. Pernak e outros autores (2003) observaram esta mesma tendência ao avaliarem atividade antimicrobiana de compostos quaternários de amônio derivados de colina associados ao ânion cloreto. Para os fungos, [Colina][Ace] e [Colina][Cl] determinaram CMNT's altas, sendo menos inibitórios para *Y. lipolytica*, *A. brasiliensis* e *R. oryzae*.

Ainda com relação aos ânions associados ao cátion colina, foi possível observar uma diminuição na CMNT do [Colina][Ace] em relação ao [Colina][Cl] em todos os casos, confirmando que o ânion acetato é mais tóxico que o cloreto, como já observado por Oullet e colaboradores (2011) que avaliou o impacto de [C₂mim][OAc] e [C₂mim][Cl] no crescimento de *S. cerevisiae*. O mesmo também foi sugerido por Pernak e colaboradores (2001), cujo trabalho mostrou que de sete

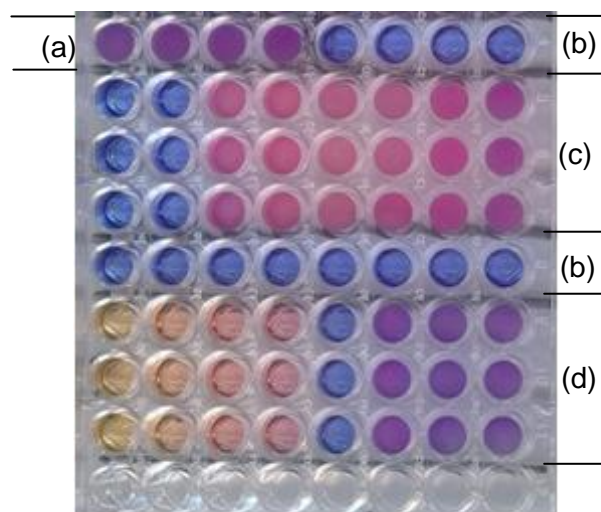


Figura 3. Imagem do ensaio de determinação da CMNT para *Bacillus subtilis* após adição de resazurina, onde (a) representa o controle positivo (meio + inóculo); (b) controle negativo (meio); (c) [Colina][Cl]; (d) [P₄₄₄₁][MetSO₄].

ânions, dentre eles o acetato e o cloreto contidos em líquidos iônicos piridínicos, o acetato foi o mais inibitório para o crescimento de diversos microrganismos.

O cátion fosfônio, apesar de ter sido menos tóxico que o imidazólio para as leveduras, mostrou valores muito baixos de CMNT em todos os casos. Durante a revelação dos ensaios com a adição de resazurina, observou-se que nos quatro primeiros poços houve mudança na coloração do meio imediatamente após o contato com o indicador redox, mesmo não havendo crescimento microbiano, como pode ser observado na Figura 2. Indicando que a ausência de crescimento em concentrações mais altas deste LI pode ser devido a estresse oxidativo causado pelo mesmo.

Os líquidos iônicos hidrofóbicos baseados em [NTF₂]⁻ foram em geral mais tóxicos para os microrganismos, constatando a influência do ânion na toxidez dos IL's, conforme descrito na Tabela 5. Tanto o cátion [C₂mim]⁺ quanto o [Colina]⁺ apresentaram resultados discrepantes quando associados com outros ânions, como a inibição total do crescimento das bactérias em todas as concentrações testadas de [C₂mim][NTF₂], as quais toleraram concentrações de até 125 mg/mL deste cátion associados a outros ânions. Exceção foi observada no caso da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, única bactéria capaz de crescer em concentrações altas

destes LI's. O mecanismo responsável por este comportamento é desconhecido, porém é sabido que as bactérias Gram-negativas, especialmente espécies do gênero *Pseudomonas*, dispõem de diversos mecanismos de tolerância a solventes orgânicos (SARDESSAI; BHOSLE, 2002), os quais talvez possam atuar também no caso do LI's.

Tabela 5. Valores de CMNT para os líquidos iônicos imiscíveis em água

Microrganismos	CMNT (mg/ml)		
	[C ₂ mim][NTF ₂]	[C ₄ mim][NTF ₂]	[Colina][NTF ₂]
Bactérias			
Gram-positiva			
<i>Bacillus subtilis</i>	< 1,95	< 1,95	4
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. delbrueckii</i>	< 1,95	< 1,95	< 1,95
Actinobactéria			
<i>Streptomyces drozdowikzii</i>	< 1,95	< 1,95	< 1,95
Gram-negativa			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	125	31,25
Fungos			
Leveduriformes			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	< 0,98	< 0,98	4
<i>Yarrowia lipolytica</i>	4	1,95	15,625
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	< 0,98	< 0,98	< 0,98
Filamentosos			
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	62,5	62,5	31,25
<i>Rhizopus oryzae</i>	7,8	>125	31,25

Em concordância com os dados para LI's hidrofílicos, as leveduras *S. cerevisiae* e *K. marxianus* não cresceram na presença dos LI's hidrofóbicos baseados em imidazólio, assim como quando estes estiveram combinados com outros ânions hidrofílicos, evidenciando que a toxicidade para estes microrganismos parece ser principalmente influenciada pelo cátion imidazólio. Para confirmar esta hipótese, pode-se citar o fato de *S. cerevisiae* ter crescido, mesmo que em concentrações baixas (4 mg/mL), em contato com o LI [Colina][NTF₂]. Alguns

trabalhos afirmam que o ânion não desempenha um papel tão significativo na toxidez do líquido iônico (RANKE *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2008). Porém, algumas pesquisas (OUELLET *et al.*, 2011; PETKOVIC *et al.*, 2009; REBROS *et al.*, 2009), além dos dados obtidos neste trabalho, demonstram que dependendo da estrutura do ânion, este tem efeitos significantes na toxidez do líquido iônico. Em estudo prévio realizado com *S. cerevisiae* (SENDOVSKI; NIR; FISHMAN, 2010), o LI [C₄mim][NTf₂], em discordância com os dados aqui apresentados, foi considerado biocompatível a 20% (v/v), porém a concentração inicial do inóculo (OD_{600 nm} = 1), além do critério de determinação do crescimento foram diferentes. Como já discutido em revisão realizada por Quijano e colaboradores (2006), resultados controversos podem ser explicados por diferença de concentração de biomassa.

Estes sais inibiram o crescimento principalmente das bactérias. Tal tendência pode ser confirmada em um estudo realizado por Wood e colaboradores (2011), onde mostraram que [C_nmim][NTf₂] (n= 2 - 8) inibiu completamente o crescimento de uma cepa de *Escherichia coli* na presença de 2% destes sais.

Neste mesmo trabalho, foi demonstrada uma tendência de aumento da atividade tóxica do LI contendo NTf₂ quando combinado com cátions compostos por amônio quaternário com cadeias menores, ou seja, mais miscíveis em água. Esta observação é oposta a ideia de que quanto menor a cadeia alquílica associada ao ânion, menos tóxico este será, porém é sugerido que devido a presença de um cátion mais hidrofílico, a migração do ânion para a fase aquosa é facilitada, acentuando assim sua toxidez (WOOD *et al.*, 2011). Como uma forma de diminuição do erro durante a transferência de LI da solução estoque para o meio teste, foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) como detergente para homogeneização da solução, sendo assim, houve alteração da solubilidade do LI em meio líquido, mesmo que ainda não fosse possível obter uma solução homogênea após adicionado no meio de cultivo. Portanto, em vista do exposto acima, a toxidez dos LI's imiscíveis em água pode ter sido potencializada pela adição de DMSO, uma vez que está facilitou a interação do ânion [NTf₂]⁻ com o meio aquoso e consequentemente com os microrganismos testados. Outra observação importante foi a formação de precipitado no ensaio realizado com *L. delbrueckii* e os LI's hidrofóbicos. Este fato pode ter ocorrido como resultado da interação do meio MRS, que foi utilizado somente para esta bactéria, com os líquidos iônicos, causando

precipitação de componentes do meio. Seriam necessários mais estudos para avaliar até que ponto tal fato influenciou no resultado.

O efeito tóxico do ânion $[\text{NTF}_2]^-$ também já foi reportado em um estudo onde os ânions $[\text{NTF}_2]^-$, $[\text{PF}_6]^-$, $[\text{BF}_4]^-$, trifluoroacetato $[\text{CF}_3\text{COO}]^-$ e metano sulfonato $[\text{OMS}]^-$, exibiram, nesta ordem, redução da intensidade de inibição, sendo, portanto, o $[\text{NTF}_2]^-$ considerado o mais tóxico para a bactéria *Clostridium* sp (WANG; MALHOTRA; FRANCIS, 2011). Este efeito inibitório foi linearmente relacionado com o número de átomos de flúor presente na porção aniônica, os dois primeiros com 6, e os outros com 4 e 3 átomos, respectivamente, com exceção do $[\text{OMS}]^-$, que não apresenta flúor em sua molécula (WANG; MALHOTRA; FRANCIS, 2011).

Apesar de seu caráter tóxico relatado, os fungos filamentosos foram bastante resistentes aos líquidos iônicos compostos por $[\text{NTF}_2]^-$, o que os tornam promissores para investigações futuras em processos onde seja exigida a utilização de solventes imiscíveis em água, como é o caso da fermentação extrativa. É bem recente o uso de espécies de fungos filamentosos como modelo de organismos eucarióticos na investigação de toxicidade de líquidos iônicos. O primeiro trabalho com este objetivo foi publicado em 2009, onde dez espécies do gênero *Penicillium* foram selecionadas como modelo para acessar o impacto de 16 LI's, dentre ele alguns utilizados no presente estudo, tais como $[\text{C}_2\text{mim}][\text{Cl}]$, $[\text{C}_2\text{mim}][\text{ETSO}_4]$, $[\text{Colina}][\text{Cl}]$ e $[\text{Colina}][\text{NTF}_2]$ (PETKOVIC *et al.*, 2009). Neste trabalho também foi observada alta tolerância dos fungos filamentosos aos LI's testados, especialmente aos supracitados, concordando com os dados encontrados no presente estudo. A concentração testada foi fixada em 50 mM, valor alto segundo os autores, sendo considerados bastante tolerantes aqueles fungos que não tivessem seu crescimento inibido. Fazendo uma comparação com alguns resultados descritos nas Tabelas 3, 4 e 5 pode-se perceber que *A. brasiliensis* e *R. oryzae* não tiveram seu crescimento inibido em concentrações ainda maiores em contato com LI's $[\text{C}_2\text{mim}][\text{Cl}]$ (426 mM e 852,5 mM), $[\text{C}_2\text{mim}][\text{ETSO}_4]$ (540 mM), $[\text{Colina}][\text{Cl}]$ (448 mM e 896 mM) e $[\text{Colina}][\text{NTF}_2]$ (74 mM), atestando o potencial de uso de LI's envolvendo fungos filamentosos.

Os LI's hidrofóbicos são aqueles formados principalmente pelos ânions $[\text{NTF}_2]^-$, $[\text{PF}_6]^-$, tornando-se, portanto, difícil a utilização destes em bioprocessos

dados seus efeitos inibitórios para várias espécies microbianas. Uma iniciativa recente buscou direcionar o planejamento de um LI combinando baixa toxicidade e alta hidrofobicidade, avaliando seu efeitos no crescimento de organismos de diferentes níveis tróficos, *Vibrio fischeri* (bactéria), *P. subcapitata* (alga marinha) e *D. magna* (crustáceo) (VENTURA *et al.*, 2013). Constatou-se que é possível amenizar o efeito tóxico destes ânions, quando na presença de cátions mais benignos, que neste caso foram os cátions cíclicos não-aromáticos piperidínio e pirrolidíneo, capazes de aumentar a hidrofobicidade do sal e reduzir seu efeito tóxico (VENTURA *et al.*, 2013). O cátion colina também parece ser uma boa opção (Tabela 5), levando em consideração principalmente seu potencial de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo.

5.2 Crescimento Celular na Presença de Líquidos Iônicos

Uma vez constatada sua baixa toxicidade para a maioria dos microrganismos em estudo, especialmente para os fungos filamentosos e a levedura *Yarrowia lipolytica*, foi realizado um ensaio de crescimento na presença de líquidos iônicos baseados em colina. Por serem produtores de ácido cítrico e dada sua importância comercial, *Aspergillus brasiliensis* e *Yarrowia lipolytica* foram selecionados para este ensaio preliminar. Na Tabela 6 encontra-se descrita a taxa de crescimento destes microrganismos na presença dos LI's.

Tabela 6. Taxa de crescimento (%) de *Yarrowia lipolytica* e *Aspergillus brasiliensis* na presença de líquidos iônicos (% v/v) após 96h

Líquido iônico (% v/v)	<i>Aspergillus brasiliensis</i>			<i>Yarrowia lipolytica</i>		
	5	7,5	10	5	7,5	10
[Colina][OAc]	16	16	19	30	11	17
[Colina][Cl]	136	173	39	79	60	51
Controle	100			100		

Observou-se maior inibição de crescimento na presença de [Colina][OAc], como pode ser constatado tanto na Tabela 6, quanto na Figura 3. Para *Y. lipolytica* este efeito tornou-se mais acentuado com o aumento da concentração. Este LI aumentou

consideravelmente o pH do meio, como observado na Tabela 7, atingindo valores entre 8,12 – 9,46, enquanto no meio ausente de LI mediu-se 1,96 e 6,6 para *A. brasiliensis* e *Y. lipolytica*, respectivamente. Esta variação de pH pode, juntamente com a toxicidade inerente ao ânion acetato e sua concentração no meio, ser um dos motivos da inibição do crescimento destes organismos. Talvez realizando ajuste de pH no início do experimento ou a adição de uma solução tampão pode-se amenizar este efeito. *Y. lipolytica* é conhecida por utilizar diversas fontes de carbono para a produção de energia, inclusive acetato, conseguindo crescer em concentrações abaixo de 1% de acetato de sódio (BARTH; GAILLARDIN, 1997). Os resultados apontam que esta levedura cresceu em concentrações maiores que 5% deste ânion, possivelmente por estar associado a outro cátion que não o sódio, o que pode ter alterado seu comportamento em solução.

Tabela 7. pH final do meio de cultivo de *Yarrowia lipolytica* e *Aspergillus brasiliensis* na presença de líquidos iônicos (% v/v) após 96h

Líquido iônico (% v/v)	<i>Aspergillus brasiliensis</i>			<i>Yarrowia lipolytica</i>		
	5	7,5	10	5	7,5	10
[Colina][OAc]	8,98	9,46	8,12	8,71	8,65	9,4
[Colina][Cl]	1,90	1,85	2,43	6,50	6,53	6,61
Controle	1,96			6,60		

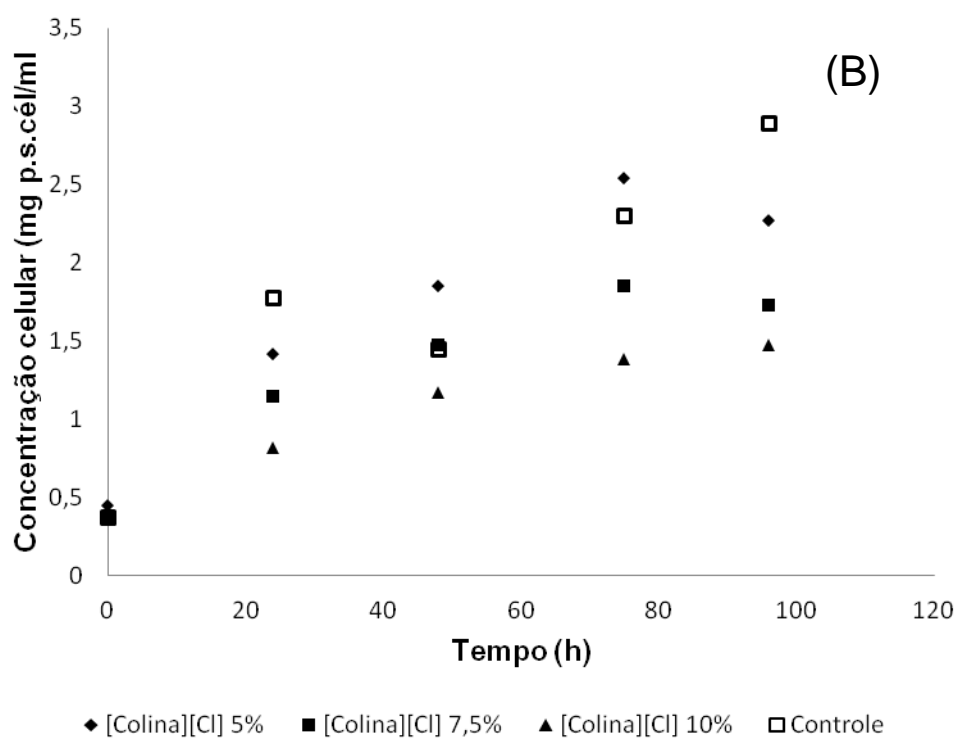
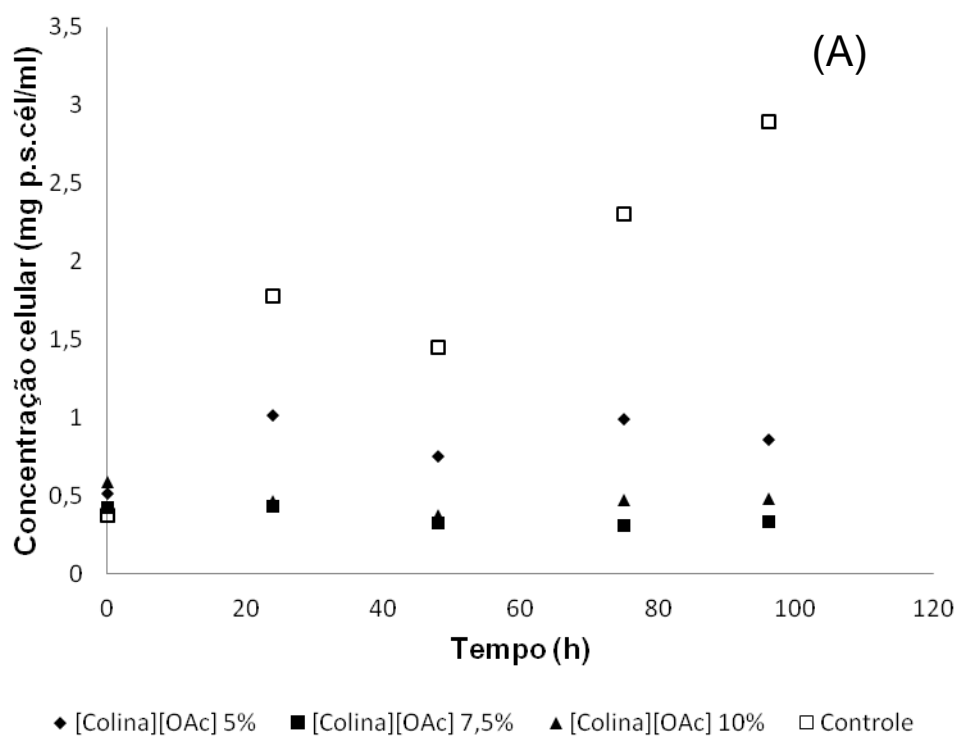


Figura 4. Cinética de crescimento celular para *Yarrowia lipolytica* na presença de (A) [Colina][OAc] e (B) [Colina][Cl]

Já na presença de [Colina][Cl], que apesar de não ser considerado por definição um LI, vem sendo estudado como tal (PETKOVIC *et al.*, 2009) e pode ser a base para outros solventes como exposto anteriormente no item 4.3, a inibição foi menor nas diferentes concentrações para *Y. lipolytica* e no caso do fungo filamentosos, foi observado estímulo de crescimento nas concentrações 5% e 7,5% (Tabela 6). Através dos valores de pH apresentados na Tabela 7, é possível sugerir que não houve produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*, inclusive no experimento controle. Isso porque não houve redução significativa do pH, que inicialmente fica em torno de 6,6 e ao final das 96 horas de experimento não houve alteração do valor. Segundo dados anteriores obtidos por Silva e colaboradores (2012), que avaliou a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, a mesma cepa do presente estudo, na presença de glicerol como fonte de carbono, o pH ao final das 96 horas de fermentação ficou em torno de 4, o que não ocorreu no presente estudo. O ocorrido pode ser atribuído à diferença na fonte de carbono utilizada. Não há estudos que constatem a produção de ácido cítrico por esta cepa especificamente nas condições apresentadas, utilizando glicose como fonte de carbono. Em contrapartida, a redução do pH, observado nos ensaios com *A. brasiliensis*, tanto do controle quanto do meio contendo [Colina][Cl], são um indicativo da possível produção de ácidos orgânicos, demonstrando que é possível o crescimento celular e produção de ácido orgânicos na presença do cátion colina.

6. Conclusões e Sugestões

- Os resultados sugerem que o uso de cátions [Colina] são preferidos quando se pretende utilizar LI's em processos que envolvam microrganismos, devido a sua baixa toxidez frente a uma maior variedade de espécies.
- Os fungos filamentosos *Rhizopus oryzae* UCP 1506 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 foram os microrganismos mais tolerantes aos LI's estudados seguidos pelo fungo leveduriforme *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.
- O ânion $[\text{NTF}_2]^-$ foi o ânion mais tóxico para os microrganismos testados, sendo interessante o estudo de outros ânions que formem LI's hidrofóbicos, interessantes para a formação de sistema bifásico de fermentação.
- [Colina][Cl] permitiu o crescimento de *A. brasiliensis* e *Y. lipolytica* em frascos agitados, indicando o potencial de utilização deste composto como base para LI's bicompatíveis e solventes eutéticos, visando sua aplicação em processos biotecnológicos envolvendo estes microrganismos.
- Os resultados sugeriram a produção de ácidos orgânicos por *A. brasiliensis* na presença de [Colina][Cl], podendo ser interessante prosseguir estudos que avaliem efetivamente a produção destes metabólitos na presença de outros LI's colínicos.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. P. *et al.* Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical communications**, v. 0, n. 1, p. 70-71, 7 jan. 2003.
- ANDERSSON, E.; JOHANSSON, A.-C.; HAHN-HÄIGERDAL, B. α -Amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 333-338, 1985.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 5-16, 1 jul. 2001.
- ASGHER, M. *et al.* A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 3, p. 950-955, abr. 2007.
- BAKER, G. A. *et al.* An analytical view of ionic liquids. **The Analyst**, v. 130, n. 6, p. 800-808, jun. 2005.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, maio. 2000.
- BANKAR, A. V.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 847-65, out. 2009.
- BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and Genetics of the Dimorphic Fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, p. 219-237, 1997.
- BERNOT, R. J.; KENNEDY, E. E.; LAMBERTI, G. A. Effects of ionic liquids on the survival, movement, and feeding behavior of the freshwater snail, *Physa acuta*. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 24, n. 7, p. 1759-65, jul. 2005.
- BESSION, F. *et al.* Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 10, p. 1043-1049, 1976.
- BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 280-300, jun. 1996.
- BREUNIG, K. *et al.* Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 9-10, p. 771-780, 1 jun. 2000.
- BRÄUTIGAM, S. *et al.* Whole-cell biocatalysis: Evaluation of new hydrophobic ionic liquids for efficient asymmetric reduction of prochiral ketones. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 4, p. 310-316, out. 2009.

CHO, C.-W. *et al.* The ecotoxicity of ionic liquids and traditional organic solvents on microalga *Selenastrum capricornutum*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 71, n. 1, p. 166-71, set. 2008.

CLARE, B.; SIRWARDANA, A.; MACFARLANE, D. R. Synthesis, purification and characterization of ionic liquids. **Topics in current chemistry**, v. 290, p. 1-40, jan. 2010.

COULING, D. J. *et al.* Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modeling. **Green Chemistry**, v. 8, p. 82-90, 2006.

CULL, S. G. *et al.* Room-Temperature Ionic Liquids as Multiphase Bioprocess Operations. **BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING**, v. 69, n. 2, p. 227-233, 2000.

DATTA, R.; HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, p. 1119-1129, 2006.

DEIVE, F. J. *et al.* Ionic liquid-based aqueous biphasic system for lipase extraction. **Green**, v. 13, p. 390-396, 2011.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 26-31, jan. 2000a.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, out. 2000b.

DENNEWALD, D.; HORTSCH, R.; WEUSTER-BOTZ, D. Evaluation of parallel milliliter-scale stirred-tank bioreactors for the study of biphasic whole-cell biocatalysis with ionic liquids. **Journal of biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 253-7, jan. 2012.

DENNEWALD, D.; PITNER, W.-R.; WEUSTER-BOTZ, D. Recycling of the ionic liquid phase in process integrated biphasic whole-cell biocatalysis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1132-1137, maio. 2011.

DESTAIN, J.; ROBLAIN, D.; THONART, P. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology letters**, v. 19, n. 2, p. 105-107, 1997.

DIPEOLU, O.; GREEN, E.; STEPHENS, G. Effects of water-miscible ionic liquids on cell growth and nitro reduction using *Clostridium sporogenes*. **Green Chemistry**, v. 11, p. 397-401, 2009.

DOCHERTY, K. M.; DIXON, J. K.; KULPA, C. F. Biodegradability of imidazolium and pyridinium ionic liquids by an activated sludge microbial community. **Biodegradation**, v. 18, n. 4, p. 481-93, ago. 2007.

DOCHERTY, K. M.; KULPA, JR., C. F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 185, 2005.

DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z. Physico-chemical processes in imidazolium ionic liquids. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 8, n. 21, p. 2441-52, 7 jun. 2006.

EARLE, M. J.; SEDDON, K. R. Ionic liquids. Green solvents for the future. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1391-1398, 2000.

ELIBOL, M.; MAVITUNA, F. A kinetic model for actinorhodin production by *Streptomyces*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 625-631, 1999.

ENDRES, F.; ABEDIN, S. Z. E. Air and water stable ionic liquids in physical chemistry. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, p. 2101-2116, 14 maio. 2006.

FAUZI, A. H. M.; AMIN, N. A. S. An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5770-5786, 2012.

FICKERS, P. *et al.* Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 63, n. 2, p. 136-42, dez. 2003.

FICKERS, P. *et al.* Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 6-7, p. 527-43, abr. 2005.

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 632-44, 2011.

FONSECA, G. G. *et al.* The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339-54, jun. 2008.

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

GHOSH, B.; RAY, R. R. Current Commercial Perspective of *Rhizopus oryzae*: A Review. **Journal of Applied Sciences**, v. 11, n. 14, p. 2470-2486, 2011.

GILMORE, B. F. Antimicrobial Ionic Liquids. In: KOKORIN, A. (Ed.). **Ionic Liquids: Applications and Perspectives**. 1. ed. [S.l.] InTech, 2011. p. 674.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in microbiology**, v. 161, n. 6, p. 480-487, 2010.

GORDON, C. M. New developments in catalysis using ionic liquids. **Applied Catalysis A: General**, v. 222, n. 1-2, p. 101-117, dez. 2001.

HE, J.-Y. *et al.* Microbial reduction of ethyl acetoacetate to ethyl (R)-3-hydroxybutyrate in an ionic liquid containing system. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 316-321, mar. 2009.

HEIPIEPER, H. J. *et al.* Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 961-73, abr. 2007.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources(1). **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 2-4, p. 87-107, 1 fev. 2000.

HOLBREY, J. D.; SEDDON, K. R. Ionic Liquids. **Clean Products and Processes**, v. 1, p. 223-236, 1999.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, p. 155-70, 2004.

HOUGH-TROUTMAN, W. L. *et al.* Ionic liquids with dual biological function: sweet and anti-microbial, hydrophobic quaternary ammonium-based salts. **New Journal of Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 26, 2009.

HOWARTH, J.; JAMES, P.; DAI, J. Immobilized baker ' s yeast reduction of ketones in an ionic liquid , [Bmim][PF₆] and water mix. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 7517-7519, 2001.

HUANG, W.; TANG, I. Bacterial and Yeast Cultures – Process Characteristics , Products , and Applications. In: YANG, S.-T. (Ed.). **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. 1. ed. Amsterdã: Elsevier, 2007. p. 185-223.

HUSSEY, C. L.; KING, L. A.; WILKES, J. S. An electrochemical study of the fe(iii)/fe(ii) electrode reaction in the aluminum chloride + n-(n-butyl)pyridinium chloride molten salt system. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 102, p. 321-332, 1979.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 524-34, mar. 2007.

KALIL, S. J. *et al.* Optimization of Inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 94, n. 257-264, 2001.

KRAGL, U.; ECKSTEIN, M.; KAFTZIK, N. Enzyme catalysis in ionic liquids. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 565-71, dez. 2002.

KUBISA, P. Application of ionic liquids as solvents for polymerization processes. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 1, p. 3-12, jan. 2004.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, fev. 2010.

LEON, R. *et al.* Whole-cell biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 483-500, 1998.

LOU, W.; WANG, W. *et al.* Biocatalytic anti-Prelog stereoselective reduction of 4'-methoxyacetophenone to (R)-1-(4-methoxyphenyl)ethanol with immobilized *Trigonopsis variabilis* AS2.1611 cells using an ionic liquid-containing medium. **Green Chemistry**, v. 11, p. 1377-1384, 2009.

LOU, W.; CHEN, L. *et al.* Using a water-immiscible ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4-(trimethylsilyl) -3-butyn-2-one catalyzed by immobilized *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 cells. **BMC Biotechnology**, v. 9, n. 90, p. 1-12, 2009.

LOU, W.; ZONG, M.; SMITH, T. J. Use of ionic liquids to improve whole-cell biocatalytic asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane for efficient synthesis of enantiopure (S) -1-trimethylsilylethanol. p. 147-155, 2006.

LOVE, G. *et al.* Continuous ethanol fermentation at 45°C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in Calcium alginate and karris. **Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 3, p. 187-189, 23 mar. 1998.

LUO, Y. *et al.* The Developmental Toxicity of 1-Methyl-3- Octylimidazolium Bromide on *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 736-744, 2008.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625-33, nov. 2000.

MALINOWSKI, J. J. Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 7, p. 525-38, nov. 2001.

MASSAGUER, P. R. *Microbiologia dos Processos Alimentares*, ed.1, São Paulo, SP, Brasil, Varela Editora e Livraria Ltda, 2006, 268p.

MATSUMOTO, M. *et al.* Extraction of organic acids using imidazolium-based ionic liquids and their toxicity to *Lactobacillus rhamnosus*. **Separation and Purification Technology**, v. 40, n. 1, p. 97-101, nov. 2004.

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, n. 5, p. 344-7, jan. 2004.

MCNICHOLL, B. P.; MCGRATH, J. W.; QUINN, J. P. Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. **Water research**, v. 41, n. 1, p. 127-33, jan. 2007.

MEUSSEN, B. J. *et al.* Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, p. 875-886, 2012.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-15, nov. 2006.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 252-259, maio. 2007.

NIVEN, G. W. Chapter 8 Separation processes for biotechnology in the food industry. In: GAONKAR, A. G. (Ed.). **Food Processing: Recent Developments**. 1. ed. Amsterdã: Elsevier Science B.V., 1995. p. 143-184.

NOCKEMANN, P. *et al.* Choline saccharinate and choline acesulfamate: ionic liquids with low toxicities. **The journal of physical chemistry. B**, v. 111, n. 19, p. 5254-63, 17 maio. 2007.

OPPERMANN, S.; STEIN, F.; KRAGL, U. Ionic liquids for two-phase systems and their application for purification, extraction and biocatalysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 493-499, 2011.

OUELLET, M. *et al.* Impact of ionic liquid pretreated plant biomass on *Saccharomyces cerevisiae* growth and biofuel production. **Green Chemistry**, v. 13, p. 2743-2749, 2011.

PAPANIKOLAOU, S. *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 737-744, 2002.

PERNAK, J. *et al.* Synthesis and anti-microbial activities of some pyridinium salts with alkoxyethyl hydrophobic group. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 11-12, p. 899-907, 1 dez. 2001.

PERNAK, J. *et al.* Choline-derivative-based ionic liquids. **Chemistry - A European Journal**, v. 13, n. 24, p. 6817-27, jan. 2007.

PERNAK, J.; CHWAŁA, P. Synthesis and anti-microbial activities of choline-like quaternary ammonium chlorides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 11-12, p. 1035-1042, nov. 2003.

PERNAK, J.; MIRSKA, I.; KMIECIK, R. Antimicrobial activities of new analogues of benzalkonium chloride. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 9, p. 765-771, set. 1999.

PERNAK, J.; ROGOZA, J.; MIRSKA, I. Synthesis and antimicrobial activities of new pyridinium and benzimidazolium chlorides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 313-320, abr. 2001.

PERNAK, J.; SKRZYPCZAK, A. 3-Alkylthiomethyl-1-ethylimidazolium chlorides. Correlation between critical micelle concentrations and minimum inhibitory

concentrations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 11, p. 901-903, jan. 1996.

PERNAK, J.; SOBASZKIEWICZ, K.; MIRSKA, I. Anti-microbial activities of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 52-56, 11 fev. 2003.

PETKOVIC, M. *et al.* Exploring fungal activity in the presence of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 11, p. 889-894, 2009.

PETKOVIC, M. *et al.* Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids — toxicity and biodegradability. **Green Chemistry**, v. 12, p. 643-649, 2010.

PETKOVIC, M. *et al.* Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability. **Chemical Society reviews**, v. 40, n. 3, p. 1383-403, mar. 2011.

PFRUENDER, H. *et al.* Efficient Whole-Cell Biotransformation in a Biphasic Ionic Liquid/Water System. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 4529-4531, 2004.

PFRUENDER, H.; JONES, R.; WEUSTER-BOTZ, D. Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. **Journal of biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 182-90, 25 jun. 2006.

PHAM, T. P. T. *et al.* Alkyl-chain length effects of imidazolium and pyridinium ionic liquids on photosynthetic response of *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 4, p. 425-428, abr. 2008.

PHAM, T. P. T.; CHO, C.-W.; YUN, Y.-S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review. **Water research**, v. 44, n. 2, p. 352-72, jan. 2010.

PRETTI, C. *et al.* Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*). **Green Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 238, 2006.

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

RANKE, J. *et al.* Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 58, n. 3, p. 396-404, jul. 2004.

RANKE, J. *et al.* Design of sustainable chemical products--the example of ionic liquids. **Chemical reviews**, v. 107, n. 6, p. 2183-206, jun. 2007.

REBROS, M. *et al.* A high throughput screen to test the biocompatibility of water-miscible ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 11, p. 402-408, 2009.

RESTOLHO, J.; MATA, J. L.; SARAMAGO, B. Choline based ionic liquids: Interfacial properties of RTILs with strong hydrogen bonding. **Fluid Phase Equilibria**, v. 322-323, p. 142-147, maio. 2012.

ROBINSON, J.; OSTERYOUNG, A. An Electrochemical and Spectroscopic Study of Some Aromatic Hydrocarbons. **Journal of American chemical Society**, v. 101, n. 2, p. 323-327, 1979.

ROFFLES, S. R.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. In situ recovery of fermentation products. **Trends in biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 251-252, 1984.

ROGERS, R. D.; SEDDON, K. R. Ionic liquids--solvents of the future? **Science**, v. 302, n. 5646, p. 792-3, 31 out. 2003.

ROMERO, A *et al.* Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids. **Journal of hazardous materials**, v. 151, n. 1, p. 268-73, 28 fev. 2008.

SANTIAGO, P. A. *et al.* Estudo da Produção de β -Galactosidase por Fermentação de Soro de Queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência de Tecnologia de Alimento**, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SARDESSAI, Y.; BHOSLE, S. Tolerance of bacteria to organic solvents. **Research in microbiology**, v. 153, n. 5, p. 263-8, jun. 2002.

SCHUSTER, E. *et al.* On the safety of *Aspergillus niger*--a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 426-35, ago. 2002.

SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A. C. **Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols**. Nova Yorque: CRS Press, 2007. p. 414

SEDDON, K. R. Ionic Liquids for Clean Technology. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 68, n. 4, p. 351-356, abr. 1997.

SENDOVSKI, M.; NIR, N.; FISHMAN, A. Bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic ionic liquid aqueous system. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2260-5, 24 fev. 2010.

SEONGSOON, P.; KAZLAUSKAS, R. J. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 432-437, 2003.

SILVA, L. V *et al.* Production of Citric Acid by *Yarrowia lipolytica* in Different Crude Glycerol Concentrations and in Different Nitrogen Sources. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 199-204, 2012.

SKRZYPCZAK, A. *et al.* Synthesis and antimicrobial activities of new quats. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 7-8, p. 661-668, jul. 1997.

STASIEWICZ, M. *et al.* Assessing toxicity and biodegradation of novel, environmentally benign ionic liquids (1-alkoxymethyl-3-hydroxypyridinium chloride, saccharinate and acesulfamates) on cellular and molecular level. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 71, n. 1, p. 157-65, set. 2008.

STOLTE, S. *et al.* Anion effects on the cytotoxicity of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 8, p. 621-629, 2006.

STOLTE, S. *et al.* Effects of different head groups and functionalised side chains on the cytotoxicity of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 760, 2007.

SWATLOSKI, R. P. *et al.* Using *Caenorhabditis elegans* to probe toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride based ionic liquids. **Chemical communications**, p. 668-9, 21 mar. 2004.

VARGA, J. *et al.* *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, p. 1925-32, ago. 2007.

VEEN, M.; LANG, C. Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 63, n. 6, p. 635-46, fev. 2004.

VENTURA, S. P. M. *et al.* Designing ionic liquids: the chemical structure role in the toxicity. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 1, p. 1-12, jan. 2013.

VERMUË, M. *et al.* Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* Sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Sp. **Biotechnology and bioengineering**, v. 42, n. 6, p. 747-58, 5 set. 1993.

WALDEN, P. Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. **Bulletin of Russian Academy of Sciences**. v. 8, p.405-422, 1914.

WANG, H.; MALHOTRA, S. V; FRANCIS, A. J. Toxicity of various anions associated with methoxyethyl methyl imidazolium-based ionic liquids on *Clostridium* sp. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1597-603, mar. 2011.

WANG, W.; ZONG, M.-H.; LOU, W.-Y. Use of an ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4'-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Rhodotorula* sp. AS2.2241 cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 70-76, jan. 2009.

WEE, Y.; KIM, J.; RYU, H. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 163-172, 2006.

WELLS, A. S.; COOMBE, V. T. On the Freshwater Ecotoxicity and Biodegradation Properties of Some Common Ionic Liquids. **Organic Process Research & Development**, v. 10, p. 794-798, 2006.

WELTON, T. Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis. **Chemical reviews**, v. 99, n. 8, p. 2071-2083, 11 maio. 1999.

WILKES, J. S. *et al.* Dialkylimidazolium Chloroaluminate Melts: A New Class of Room-Temperature Ionic Liquids for Electrochemistry, Spectroscopy, and Synthesis. **Inorganic Chemistry**, v. 237, n. 1980, p. 1263-1264, 1982.

WILKES, J. S.; ZAWOROTKO, M. J. Air and Water Stable 1-Ethyl-3-methylimidazolium Based Ionic Liquids. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 13, p. 965-967, 1992.

WITTMANN, C.; HANS, M.; BLUEMKE, W. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. **Yeast**, v. 19, n. 15, p. 1351-63, nov. 2002.

WOOD, N. *et al.* Screening ionic liquids for use in biotransformations with whole microbial cells. **Green Chemistry**, v. 13, p. 1843-1851, 2011.

YANG, Z.; PAN, W. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 19-28, jun. 2005.

ZHANG, C.; MALHOTRA, S. V.; FRANCIS, A. J. Toxicity of imidazolium- and pyridinium-based ionic liquids and the co-metabolic degradation of N-ethylpyridinium tetrafluoroborate. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1690-5, mar. 2011.

ZHAO, L.; MALHOTRA, S. V. Applications of Ionic Liquids in Organic Synthesis. **Adrichimica Acta**, v. 35, p. 75-83, 2002.

ÇEVRİMLİ, B. S. *et al.* Influences of alcohol derivatives on citric acid productivity by *Aspergillus niger* in stirred fermentor. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 1-7, 15 nov. 2010.

ANEXO – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO

Caldo Mueller Hinton

Componentes	g/L
Infusão de carne	2
Caseína	17,5
Amido	1,5

Meio RPMI 1640

Sais inorgânicos	mg/L	L-triptofano	5,00
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100,00	L-prolina	20,00
KCl	400,00	L-tirosina	28,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	100,00	L-serina	30,00
NaCl	6000,00	L-valina	20,00
NaHCO ₃	2000,00	L-treonina	20,00
Na ₂ HPO ₄	800,00	Vitaminas	mg/mL
Aminoácidos	mg/L	Biotina	0,200
L-arginina.HCl	200,00	Pantotenato de cálcio	0,250
L-asparigina.H ₂ O	50,00	Cloreto de colina	3,000
L-ácido aspártico	20,00	Ácido fólico	1,000
L-cistina	50,00	Inositol	35,000
L-ácidoglutâmico	20,00	Nicotinamida	1,000
L-glutamina	300,00	Ácido p-aminobenzóico	1,000
Glicina	10,00	Piridozina.HCl	1,000
L-histidina.HCl.H ₂ O	15,00	Riboflavina	0,200
L-hidroxiprolina	20,00	Tiamina.HCl	1,000
L-isoleucina	50,00	VitaminaB12	0,005
L-leucina	50,00	Outros Componentes	mg/L
L-lisina.HCl	40,00	Glicose	2.000,00
L-metionina	15,00	Glutationa	1,00
L-fenilalanina	15,00	Vermelho de fenol	5,00

Caldo MRS (De Man, Rogosa, Sharpe)

Componente	g/L	Componente	g/L
Peptona	10,0	Na ₂ HPO ₄	2,0
“Lab-Lemco” powder	8,0	CH ₃ COONa.3H ₂ O	5,0
Extrato de lêvedo	4,0	Citrato de triamônio	2,0
Glucose	20,0	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Monooleato de sorbitan	1 mL	MNSO ₄ .4H ₂ O	0,05

Brain Heart Infusion (BHI) Agar

Componente	g/L	Componente	g/L
Peptona	10,00	Infusão de Coração de Boi	10,00
Infusão de cérebro de bezerro	7,50	NaCl	5,00
K ₂ HPO ₄	2,50	Dextrose	2,00
Ágar	15,0		

Sabouraud Dextrose Agar

Componente	g/L
Dextrose	40,00
Peptona	10,00
Ágar	15,00