



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Quantificação de Cloreto de 1-hexadecilimidazólio em Etapas de Purificação de Poli(3-hidroxitirato)

Autor: Yuri Costa Marin

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Débora Jung Luvizetto Faccin

Prof. Dr. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

Porto Alegre, setembro de 2023

Autor: Yuri Costa Marin

Quantificação de Cloreto de 1-hexadecilimidazólio em Etapas de Purificação de Poli(3-hidroxi-butirato)

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
COMGRAD/ENQ da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química*

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a Caroline Borges Agustini, UFRGS

Ma. Débora Gonçalves Carvalho, UFRGS

Porto Alegre

2023

AGRADECIMENTOS

Aos professores, Débora, Nilo e Henri, pela oportunidade de trabalhar com algo inovador, pelos ensinamentos e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Cláudia e Jefferson, pelo apoio e incentivo ao estudo durante toda minha vida.

E à minha namorada, Amanda, pelo companheirismo, paciência e por sempre estar ao meu lado ao longo destes anos.

RESUMO

Líquidos iônicos (LIs) são sais orgânicos com ponto de fusão de 100 °C ou menor e compostos somente por íons, com uma série de propriedades diferenciadas que tem gerado o interesse no seu uso como alternativa a solventes tóxicos e nocivos ao meio ambiente em muitas aplicações. Uma delas é a recuperação de biopolímeros biodegradáveis, como os polihidroxicanoatos (PHAs), do interior das células das bactérias pelas quais são produzidos. Este é o caso do poli(3-hidroxi-butirato) [P(3HB)], um dos PHAs mais estudados, cujo método de recuperação mais utilizado industrialmente utiliza como solvente o clorofórmio, composto de alta toxicidade e nocivo ao meio ambiente. Um aspecto importante para aplicação de LIs na recuperação de P(3HB) refere-se a que as metodologias para a sua quantificação em solução são escassas na literatura e se baseiam em métodos custosos como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a quantificação do LI cloreto de 1-hexadecilimidazólio ($C_{16}MImCl$) em solução por espectrofotometria UV-Vis, assim como avaliar possíveis interações no contato do LI com o biopolímero P(3HB) e diferentes solventes para a remoção de LI através de lavagens. Para tanto, realizou-se varreduras, em espectrofotômetro, em comprimentos de onda entre 190 e 300 nm, visto que o pico do anel imidazólico se dá próximo a 210 nm, para definição dos picos característicos dos componentes contidos nas soluções de água-LI. Para os três picos identificados, realizou-se construção de curva padrão para verificação de linearidade entre absorvância e concentração para as concentrações entre 1 e 2,5 mg/L e entre 10 e 120 mg/L. Também se avaliou a estabilidade das amostras ao longo do tempo em 48 e 96 h, assim como influência da temperatura e da agitação das amostras prévia a medição sobre as absorvâncias medidas. Para avaliação das interações entre líquido iônico e P(3HB), realizou-se o contato sob agitação magnética entre a solução de LI, nas concentrações de 1 mg/mL e 100 mg/mL, e o biopolímero a 30 °C, por 24 h. Posteriormente realizou-se a lavagem do polímero com água Milli-Q, etanol ou metanol. A partir dos experimentos, foi possível constatar alta linearidade para a faixa de concentração entre 10 e 100 mg/L para o comprimento de onda de 212 nm em água Milli-Q, R^2 de 0,9961, e baixa influência da temperatura, agitação e tempo na absorvância, indicando alta estabilidade das amostras. Para os testes de contato das soluções de LI com o biopolímero, as lavagens sucessivas com todos os solventes testados se mostraram efetivas na remoção do LI, com diminuição superior a 90% para a concentração de 1 mg/mL e superiores a 80% para as de 100 mg/mL. Entretanto, ainda é necessário aumentar a pureza do P(3HB) obtido para sua utilização. Além disso, novos testes são necessários para a elucidação da possível influência do LI na análise de pureza do P(3HB).

Palavras-chave: Líquido iônico, Quantificação, Biopolímero, Poli(3-hidroxi-butirato)

ABSTRACT

Ionic Liquids (ILs) are organic salts with a melting point of 100 °C or below and composed solely of ions, possessing a range of distinctive properties that have sparked interest in their use as alternatives to toxic and environmentally harmful solvents in many applications. One such application is the recovery of biodegradable biopolymers, such as polyhydroxyalkanoates (PHAs), from within bacterial cells where they are produced. This is the case for poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)], one of the most studied PHAs, wherein the most used industrial recovery method employs chloroform as a solvent, which is highly toxic and environmentally harmful. An important aspect of applying ILs to P(3HB) recovery involves the scarcity of methodologies in the literature for its quantification in solution, relying on costly methods like high-performance liquid chromatography (HPLC). In this context, the aim of this study was to evaluate the quantification of the 1-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride (C16MImCl) IL in solution using UV-Vis spectrophotometry, as well as to assess potential interactions when the IL comes into contact with the P(3HB) biopolymer. To achieve this, scans were conducted with a spectrophotometer at wavelengths ranging from 190 to 300 nm, since the imidazolium ring peak is close to 210 nm, to identify characteristic peaks of the components in the water-IL solutions. For the three identified peaks, standard curves were constructed to verify linearity between absorbance and concentration within the ranges of 1 to 2.5 mg/L and 10 to 120 mg/L. The stability of the samples was also evaluated over 48 and 96 h, along with the influence of temperature and sample agitation prior to measurement on the measured absorbances. For the assessment of interactions between the IL and P(3HB), contact was established under magnetic stirring between IL solutions at concentrations of 1 mg/mL and 100 mg/mL, and the biopolymer at 30 °C for 24 h. Subsequently, the polymer was washed with Milli-Q water, ethanol, or methanol. From the experiments, it was observed that high linearity was achieved within the concentration range of 10 to 100 mg/L at a wavelength of 212 nm in Milli-Q water, with an R^2 value of 0.9961. The temperature, agitation, and time exhibited low influence on absorbance, indicating high sample stability. In the tests involving contact between IL solutions and the biopolymer, successive washes with all tested solvents effectively removed the IL, with reductions exceeding 90% for the 1 mg/mL concentration and over 80% for the 100 mg/mL concentrations. However, it is still necessary to increase the purity of the obtained P(3HB) for its utilization. Furthermore, new tests are needed to elucidate the possible influence of LI on the P(3HB) purity analysis.

Keywords: *Ionic Liquid, Quantification, Biopolymer, Poly(3-Hydroxybutyrate)*

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Cátions (acima) e Ânions (abaixo) comumente utilizados em Lis | 3 |
| Figura 2: (a) Desaparecimento de estruturas tubulares mitocondriais, em glicerol, conforme aumento da concentração de EMIImCl; (b) Aumento da difusividade do indicador fluorescente, indicando rompimento mitocondrial | 5 |
| Figura 3: (a) Estrutura química e mapeamento de potencial eletrostático molecular do cloreto de 1-hexadecilimidazólio (C ₁₆ MIImCl); (b) interação do LI com molécula de água;..... | 7 |
| Figura 4: Estrutura química geral de polihidroxialcanoatos (PHAs) (ao centro), classificação baseada em átomos de carbono dentro da unidade monomérica (a esquerda) e baseada na estrutura homo ou copolimérica (a direita). | 10 |
| Figura 5: Imagem em microscopia eletrônica de transmissão de células de <i>Cupriavidus necator</i> com grânulos de P(3HB) em seu interior | 11 |
| Figura 6: Aparato experimental para contato de P(3HB) e solução de LI em banho térmico a 30°C..... | 14 |
| Figura 7: Diagrama de metodologia experimental para contato P(3HB) - LI. | 15 |
| Figura 8: Curva padrão para quantificação de LI via HPLC | 16 |
| Figura 9: Curva padrão para quantificação de P(3HB) | 17 |
| Figura 10: Espectro para solução de 20 mg/L de LI..... | 18 |
| Figura 11: Curvas de calibração para soluções de LI entre 1 e 2,5 mg/L em diferentes comprimentos de onda: (a) 194 nm; (b) 198 nm; (c) 212nm..... | 19 |
| Figura 12: Espectro para soluções de 10 a 120 mg/L de LI. | 20 |
| Figura 13: Curvas de calibração para soluções de LI entre 10 e 120 mg/L em diferentes comprimentos de onda: (a) 193 nm; (b) 197 nm; (c) 212 nm. | 20 |
| Figura 14: Espectro para solução de 30 mg/L em temperatura ambiente (≈ 23 °C) e resfriada (≈ 13 °C). | 23 |
| Figura 15: Espectro obtido para solução de 100 mg/L sem e com agitação..... | 23 |
| Figura 16: Espectro obtido para soluções de 40 a 80 mg/L de LI em etanol. | 24 |
| Figura 17: Espectro obtido para soluções de 40 a 80 mg/L de LI em metanol. | 25 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Propriedades de PHAs e do Polipropileno | 10 |
| Tabela 2: Concentrações de C ₁₆ MImCl em água Milli-Q para construção de curva padrão.... | 13 |
| Tabela 3: Resultados de absorvância em comprimento de onda de 193 nm para soluções de LI ao longo do tempo..... | 21 |
| Tabela 4: Resultados de absorvância em comprimento de onda de 197 nm para soluções de LI ao longo do tempo..... | 21 |
| Tabela 5: Resultados de absorvância em comprimento de onda de 212 nm para soluções de LI ao longo do tempo..... | 22 |
| Tabela 6: Valores de massa medidos antes (M2) e após contato (M3-M1) com solução de 1 mg/mL de LI | 25 |
| Tabela 7: Valores de massa medidos antes (M2) e após contato (M3-M1) com solução de 100 mg/mL de LI | 26 |
| Tabela 8: Concentração e massa de LI no sobrenadante de amostras contendo P(3HB) em contato com solução de 1 mg/mL após sucessivas lavagens..... | 27 |
| Tabela 9: Concentração e massa de LI no sobrenadante de amostras contendo P(3HB) em contato com solução de 100 mg/mL após sucessivas lavagens..... | 28 |
| Tabela 10: Concentração e massa de LI nas lavagens das amostras em contato com solução de 1 mg/mL..... | 29 |
| Tabela 11: Concentração e massa de LI nas lavagens das amostras em contato com solução de 100 mg/mL..... | 29 |
| Tabela 12: Pureza obtida para amostras de P(3HB) após contato com solução de LI e sucessivas lavagens..... | 31 |

SUMÁRIO

| | | | |
|-------|---|--|----|
| 1 | 1 | Introdução | 1 |
| 2 | | Revisão Bibliográfica | 3 |
| 2.1 | | Líquidos Iônicos | 3 |
| 2.1.1 | | Classificação dos líquidos iônicos | 3 |
| 2.1.2 | | Aplicações dos líquidos iônicos | 4 |
| 2.2 | | Caracterização e quantificação de líquidos iônicos | 8 |
| 2.3 | | Poli-(hidroxialcanoatos) | 9 |
| 2.4 | | Produção de poli(3-hidroxiбутирато) | 10 |
| 2.5 | | Métodos de extração de P(3HB) | 11 |
| 3 | | Materiais e Métodos | 13 |
| 3.1 | | Quantificação de líquido iônico | 13 |
| 3.2 | | Testes de interação P(3HB) x líquido iônico | 14 |
| 4 | | Resultados e Discussão | 18 |
| 4.1 | | Quantificação de líquido iônico | 18 |
| 4.2 | | Testes de interação P(3HB) x líquido iônico | 25 |
| 5 | | Conclusões e Trabalhos Futuros | 31 |
| | | REFERÊNCIAS | 33 |

1 1Introdução

A cada ano, 330 milhões de toneladas de plástico são produzidos mundialmente, sendo sua maior utilização para embalagens e na construção civil. A grande maioria desses produtos são de uso único e não biodegradáveis, levando a grande impacto ambiental devido ao seu descarte inadequado. Dessa forma, os biopolímeros de inclusão intracelular são cada vez mais estudados devido a suas propriedades de biodegradação e de origem renovável, em busca de alternativas para os plásticos não biodegradáveis (IBRAHIM et al., 2021).

Para recuperar o biopolímero das inclusões intracelulares, empregam-se diferentes métodos químicos, físicos ou uma combinação de métodos, visando alcançar uma maior eficiência na extração, redução de custos e aumento da pureza do polímero. Entre as técnicas mais empregadas, as extrações com solventes halogenados destacam-se por sua simplicidade, altas taxas de recuperação e a obtenção de um produto altamente puro. No entanto, é importante ressaltar que esses solventes podem apresentar elevada toxicidade e grande impacto ambiental, além de alguns serem dispendiosos e inviáveis para recuperação após seu uso. Portanto, a busca por métodos de recuperação que possam apresentar baixo custo e pouco ou nenhum impacto ambiental são essenciais para a viabilização e o crescimento da produção industrial dos P(3HB)s (ARAMVASH et al., 2015).

Como possível alternativa aos solventes halogenados, os líquidos iônicos (LIs) surgem como possíveis substitutos e já são considerados como “solventes verdes”. Os LIs são sais orgânicos, compostos por cátions de elevado volume e ânions de volume reduzido. Dentre suas propriedades de interesse, destacam-se sua baixa volatilidade, alta estabilidade química e térmica, além de ponto de fusão inferior a 100 °C para os líquidos iônicos de temperatura ambiente. Além disso, diversos estudos já identificaram a sua citotoxicidade e capacidade de rompimento da parede celular para diferentes bactérias e com possíveis aplicações na indústria alimentícia, farmacologia e para a extração de biopolímeros. Entretanto, pouco ainda é conhecido a respeito de possíveis interações entre os LIs e o P(3HB) (DUBEY et al., 2018; TOKUDA et al., 2005; TOLEDO HIJO et al., 2016).

Entretanto, apesar do crescente interesse nas propriedades dos líquidos iônicos poucos métodos para a sua quantificação em solução são descritas na literatura. Os métodos existentes se baseiam em técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e de fase reversa (RPLC), requerendo preparo prévio das amostras além de maior custo de investimento e operação. Em contrapartida, métodos como a espectroscopia UV-Vis surgem como possível alternativa de baixo custo para sua quantificação. Porém, devido à grande gama de LIs existentes, com diferentes interações físico-químicas, a validação desses métodos se faz necessária (CAO et al., 2014; HAWKINS et al., 2015; STEPNOWSKI; MROZIK, 2005).

Os poli-hidroxicanoatos (PHA)s são biopolímeros biodegradáveis amplamente estudados atualmente devido a suas propriedades físico-químicas similares aos polímeros de origem fóssil. Tais biopolímeros podem ser produzidos por inúmeros microrganismos como forma de reserva energética, podendo utilizar diferentes matérias-primas renováveis para tal objetivo. Dependendo do substrato disponível, diferentes polímeros e copolímeros podem ser obtidos com diferentes propriedades físico-químicas. Dentre os PHAs, os poli(3-hidroxi-
butirato)s (P(3HB)s) são os mais estudados devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e pelas propriedades mecânicas similares ao polipropileno (PP). Entretanto, apesar de suas características, seu custo de produção industrial é elevado devido, em grande parte, aos processos de extração e purificação do biopolímero do interior celular (LEE et al., 2000; MORSY; CASKEY, 1997; QUINES et al., 2015).

Desse modo, o objetivo principal do trabalho foi avaliar as possíveis interações entre o polímero P(3HB) adquirido comercialmente em contato com o LI, assim como métodos para quantificação do líquido iônico cloreto de 1-hexadecilimidazólio em etapas de purificação de poli(3-hidroxi-
butirato).

Portanto, para atingir o objetivo principal, objetivos específicos foram estabelecidos, como segue:

1. Avaliar interações entre o LI e o biopolímero poli(3-hidroxi-
butirato) adquirido comercialmente.
2. Estabelecer metodologia para a quantificação de cloreto de 1-
hexadecilimidazólio em solução, avaliando parâmetros como estabilidade ao longo do tempo, influência da temperatura, efeito da agitação e influência do solvente;

Este trabalho está subdividido em 5 capítulos, além deste introdutório. O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica acerca dos assuntos pertinentes a esse trabalho, entre eles, Lis, características, aplicações e metodologias de quantificação, além de métodos de produção e recuperação do biopolímero P(3HB). O Capítulo 3 apresenta metodologia adotada para os experimentos realizados. O Capítulo 4 discute e apresenta os resultados obtidos. Já o Capítulo 5 traz as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

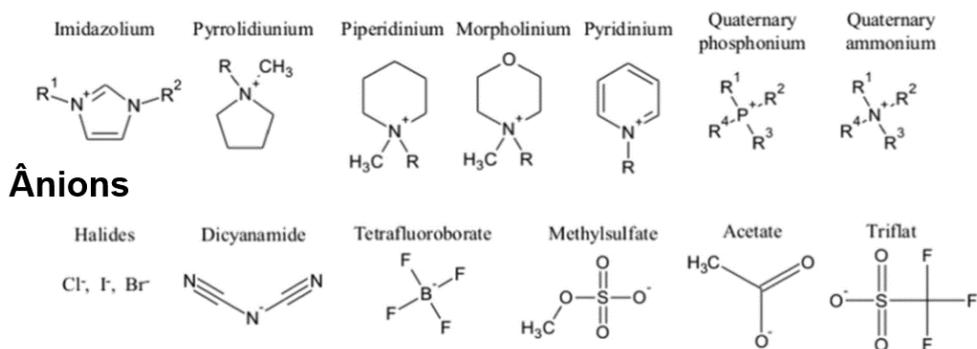
2 Revisão Bibliográfica

2.1 Líquidos Iônicos

Líquidos iônicos (LIs) são um grupo de sais orgânicos de peculiares características. Dentre essas características, destacam-se um ponto de fusão de 100 °C ou inferior, baixa pressão de vapor e não volatilidade em comparação com outros solventes orgânicos (ZHOU et al., 2018). Além disso, possuem alta estabilidade térmica e química, condutividade e capacidade de solubilização de compostos orgânicos e inorgânicos (TOLEDO HIJO et al., 2016). Essas substâncias são geralmente compostas por cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos. A parte catiônica geralmente é composta por um composto orgânico de elevado volume, já a região aniônica possui volume reduzido, em relação a seu cátion (VENTURA et al., 2017; EHSAN KIANFAR; SAJJAD MAFI, 2020). Na Figura 1 são apresentadas as estruturas mais comumente utilizadas nos LIs.

Figura 1: Cátions (acima) e Ânions (abaixo) comumente utilizados em LIs

Cátions



Fonte: Adaptado de MICHALSKI et al., 2023

Devido às características físico-químicas previamente descritas, os LIs apresentam grande potencial como “*solventes verdes*”, podendo proporcionar um baixo impacto ambiental ao substituir ou reduzir o uso de solventes orgânicos voláteis, tóxicos, perigosos e danosos ao meio ambiente e que atualmente são utilizados industrialmente (CANALES; BRENNECKE, 2016). Além disso, propriedades como viscosidade, densidade, hidrofobicidade e capacidade de solvatação podem ser modificadas pela alteração do grupo aniônico ou pela substituição da cadeia alquílica do cátion (WASSERSCHIED; KEIM, 2000).

2.1.1 Classificação dos líquidos iônicos

Os LIs podem ser classificados com base em suas diversas propriedades físico-químicas e em sua composição de seus cátions e ânions associados. Dentre essas categorias temos os líquidos iônicos de temperatura ambiente (LITAs), os próticos (LIPs), os apróticos (LIAs), os magnéticos (LIMs) e os poli(LI)s.

Os LITAs são caracterizados por possuírem grandes cátions orgânicos assimétricos, em grande parte derivados do 1-metilimidazólio, como o 1-alkil-3-metilimidazólio, 1-etil-3-metil- (EMIm), 1-butil-3-metil- (BMIm), 1-octil-3-metil- (OMIm), entre outros. Quanto aos ânions, sua variedade é ampla, podendo ser compostos simples, como

haletos, ou ânions inorgânicos, como o tetrafluoroborato, ou ainda orgânicos como o tosilato (HANDY, 2005). Além disso, devem possuir uma temperatura de fusão menor que 100 °C, sendo os principais fatores que influenciam essa característica a distribuição de cargas nos íons, a capacidade de formação de ligações de hidrogênio, a simetria dos íons e as interações de van der Waals (MARSH; BOXALL; LICHTENTHALER, 2004).

Diferente dos LITAs, os LIPs são classificados com base em sua rota de síntese, que envolve a transferência de um próton de um ácido de Brønsted para uma base de Brønsted. Como resultado, os LIPs possuem um próton disponível para realizar ligações de hidrogênio e possuem pressão de vapor significativa, ao contrário dos LITAs. Além disso, eles podem passar por processos de destilação, pois seu ponto de ebulição é inferior à temperatura de decomposição (GREAVES; DRUMMOND, 2008). Por outro lado, os LIAs não possuem um próton ácido e são geralmente formados por reações do tipo Menshutkin. Possuem pontos de fusão maiores que os LIPs, porém menor condutividade e fluidez (GHANDI, 2014; REID et al., 2018).

Os poli(LI)s são compostos por suportes poliméricos e líquidos iônicos em cada uma de suas unidades de repetição. Portanto, podem ter suas propriedades físico-químicas finamente ajustadas, como solubilidade, condutividade e estabilidade térmica, pela modificação da composição de seus íons ou pela substituição de seu suporte polimérico. Devido a essas características, esses materiais possuem grande potencial para o desenvolvimento de novos compósitos (ZHANG et al., 2020).

Já os LIMs, são Lis de temperatura ambiente que possuem propriedades paramagnéticas e usualmente contém complexos de metais ou lantanídeos em sua estrutura aniônica. Sua principal propriedade é a capacidade de serem responsivos a um campo magnético externo, podendo ser utilizados em processos de separação fluido-fluido e em reações químicas como catalisadores, solventes ou meios reacionais (SANTOS; ALBO; IRABIEN, 2014; ZHANG et al., 2017).

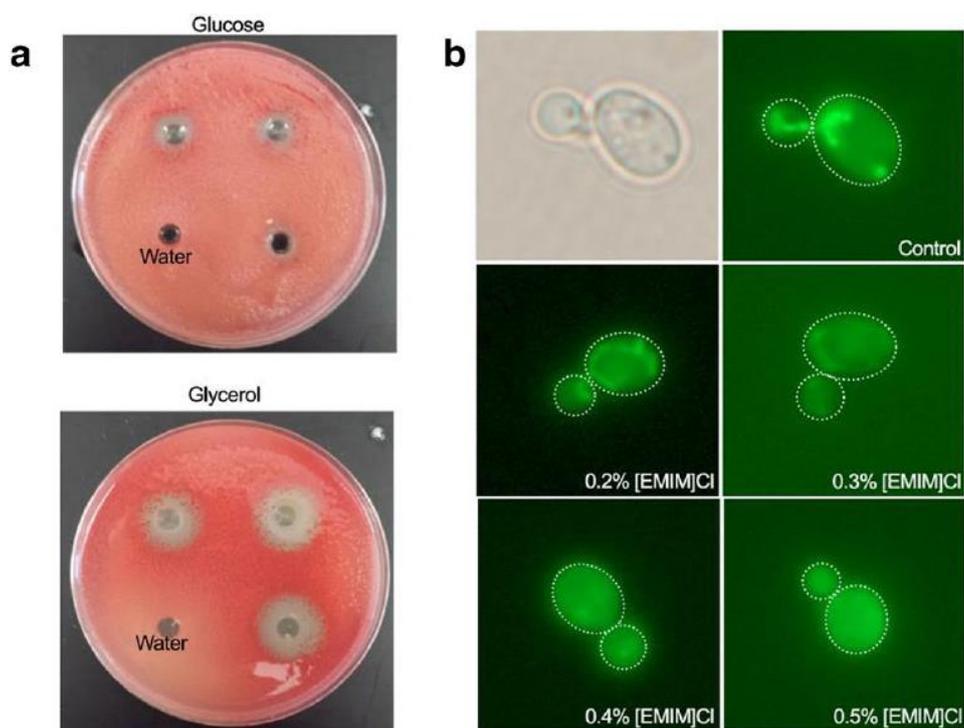
2.1.2 Aplicações dos líquidos iônicos

O crescente interesse em líquidos iônicos nos meios acadêmicos e industriais se dá, principalmente, devido a suas propriedades como solventes não tóxicos, sendo já amplamente utilizados em diversos processos como sínteses, extrações, catálises, eletroquímica entre outros (MUN; SIM, 2012). Idris et al. (2014) utilizaram LIPs para a extração e recuperação de queratina de penas. Verdía et al. (2014), também utilizaram LIPs, porém para o pré-tratamento e posterior fracionamento de biomassa lignocelulósica, obtendo uma polpa rica em celulose e lignina.

Sheldon et al. (2002) descreveram o uso de diferentes Lis como meio reacional alternativo aos solventes tradicionais em processos de biocatálise. Já Kuberský et al. (2015) estudaram o efeito da adição de LITAs em sensores eletroquímicos de NO₂. Essas substâncias também já foram utilizadas em catálise heterogênea, possibilitando a imobilização de catalisadores homogêneos, resultando em melhora da atividade do catalisador e sua estabilidade (GU; LI, 2009).

Na última década, devido à possibilidade de modificação de cátions e ânions presentes nos LIs, diversos trabalhos foram desenvolvidos com objetivo de avaliar quais e quão biocompatíveis ou tóxicos essas substâncias são para diversas células e suas possibilidades de aplicação. Dickinson et al. (2016) avaliaram os mecanismos de ação do LI imidazólico cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio (EMIMCl) que proporciona sua toxicidade a *Saccharomyces cerevisiae*. Em suas análises, o LI apresentou maior toxicidade durante os períodos de crescimento celular em glicerol, que requer processos de respiração. Além disso, usando perfis genômicos e proteômicos químicos, foi possível identificar que seu mecanismo de ação se baseia, principalmente, pela danificação das funções mitocondriais, conforme demonstrado na Figura 2, possivelmente pela indução de hiperpolarização da membrana mitocondrial, levando a elevada produção de espécies reativas de oxigênio e posterior apoptose celular. Essas substâncias são subprodutos das reações metabólicas de oxigênio comuns pelas células e também são responsáveis pela sinalização celular e controle de sua homeostasia (PEREIRA et al., 2008).

Figura 2: (a) Desaparecimento de estrutura tubulares mitocondriais, em glicerol, conforme aumento da concentração de EMIMCl; (b) Aumento da difusividade do indicador fluorescente, indicando rompimento mitocondrial



Fonte: Adaptado de Dickinson et al., 2016.

Diversos compostos catiônicos já foram relatados como materiais com propriedades biocidas para um grande grupo de bactérias entre eles amônia, imidazólio, piridina, e fosfônio e são amplamente utilizados como cátions de LIs (LI et al., 2014). De forma similar, Fernandes et al. (2022) testaram a atividade antimicrobiana de diferentes LIs imidazólicos e fosfônicos perante a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* e células de mamíferos. Bis(trifluorometilsulfonil) imida de 1-decil-3-metilimidazólio ([DMIM][TFSI]) e bis(trifluorometilsulfonil) imida de trihexiltetradecil fosfônio ([P_{6,6,6,14}][TFSI]) foram

capazes de induzir lise celular através do rompimento de sua parede. Já sulfato de hidrogênio de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIm][HSO₄]) apresentou grande efeito microbiano contra *E. coli*, porém não apresentou mesmo comportamento para células de mamíferos nas concentrações testadas. Hassan et al. (2022) também avaliaram a capacidade antibacteriana de 18 diferentes LIs imidazólicos, piridínicos e fosfônicos, com diferentes cátions e ânions associados, contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, entre elas *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*. Os LIs imidazólicos apresentaram alta atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, até maior do que o teste controle realizado com levofloxacina.

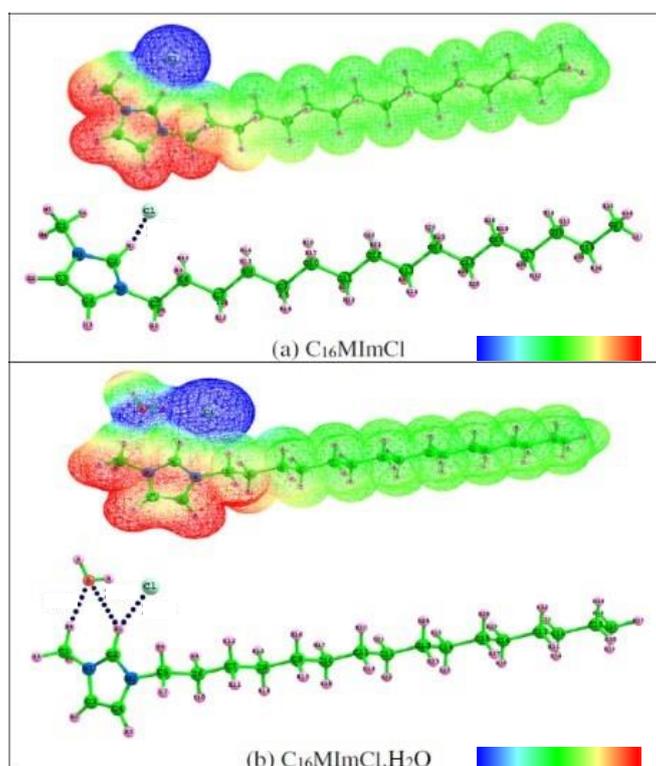
Docherty e Kulpa (2005) avaliaram a toxicidade e atividade antimicrobiana de LIs imidazólicos e piridínicos para diversas bactérias e o efeito do aumento do comprimento da cadeia alquílica. O aumento dessa cadeia resultou em maior inibição do crescimento celular em todas as espécies bacterianas testadas, com resultados promissores para os LIs brometo de 1-octil-3-metilpiridínio (OMPyrBr) e brometo de 1-metil-3-octilimidazólio (OMImBr) com tempo de contato de 5 a 15 minutos. Zheng et al. (2016) também investigaram a atividade antibacteriana de LIs imidazólicos e de seus respectivos poli(LI)s, assim como o efeito do aumento da cadeia carbônica e da densidade de cargas dos cátions (mono ou bis-imidazólicos), em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Tanto para os LIs como para os poli(LI)s, o aumento do comprimento da cadeia alquílica e da densidade de cargas (bi-cátions) levou ao aumento da atividade antibacteriana. Logo, LIs de cadeia alquílica maior se mostraram mais efetivos, mesmo em menores concentrações, para a lise celular. Tal mecanismo de ruptura se dá pela similaridade dos LIs imidazólicos e piridínicos de cadeia longa com detergentes, pesticidas e antibióticos que atacam a estrutura lipídica celular (PERNAK; ROGOZA; MIRSKA, 2001).

Recentemente, um crescente interesse nas capacidades antibacterianas e propriedades de solventes verdes dos líquidos iônicos levou ao desenvolvimento de diversos estudos com o objetivo de avaliar a eficácia de LIs para a recuperação de biopolímeros de inclusões bacterianas, substituindo solventes halogenados, como o clorofórmio. Filippi et al. (2021) avaliaram a extração de polihidroxialcanoatos (PHAs) de bactérias fotossintéticas *Rhodovulum sulfidophilum* por três diferentes LIs e os compararam com a utilização de clorofórmio e ciclohexanona. Dimetilfosfato de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIm][DMP]), dietilfosfato de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIm][DEP]) e metilfosfato de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIm][MP]) foram misturados em razões de 1:10 e 1:30 (v/v) de biomassa em relação ao LI, misturados a 60 °C entre 4 e 24 h. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos para recuperação do PHA insolúvel. O sobrenadante foi removido e a parte sólida lavado com metanol, quatro vezes, seguida de centrifugação e remoção do sobrenadante. Ao final, o sólido resultante foi colocado em estufa a vácuo a 60 °C durante 12 h. Entretanto, para os LIs [EMIm][DMP] e [EMIm][DEP], o PHA recuperado teve alta contaminação de resíduos celulares que não foram completamente solubilizados, apenas [EMIm][MP] apresentou boa pureza, quando comparado ao teste padrão utilizando clorofórmio.

Dubey et al. (2018) utilizaram dietilfosfato de 1-etil-3-metilimidazólio ($[\text{C}_2\text{MIm}][(\text{C}_2)_2\text{OPO}_3]$) para a recuperação de P(3HB) de células de *Halomonas hydrothermalis*. Líquido iônico (5 g) foi posto em contato com 0,5 g de células durante 24 h a 60 °C e, posteriormente, metanol foi adicionado como não-solvente para realizar a precipitação do P(3HB) em solução. Para determinar a pureza do biopolímero extraído, análise de CHNS foi realizada, indicando a presença de impurezas de amino ácidos e uma pureza de 86%. Já a recuperação foi de $60\% \pm 2\%$.

O cloreto de 1-hexadecilimidazólio ($\text{C}_{16}\text{MImCl}$) é um líquido iônico imidazólico de cadeia longa. Devido a essas características, possui propriedades similares a surfactantes catiônicos no qual seu anel imidazólico de carga positiva é hidrofílico e sua longa cadeia alquílica age como cauda hidrofóbica. Além disso, em soluções aquosas é capaz de formar micelas, possui alta atividade superficial, quando comparado a surfactantes iônicos convencionas, e é capaz de formar espontaneamente uma fase líquida cristalina liotrópica com a adição de um cossolvente, geralmente água (ŁUCZAK et al., 2009; CHEN et al., 2014). Sua estrutura molecular, potencial eletrostático, do azul para o vermelho o potencial eletrostático varia do negativo para positivo, conforme esquema de cores, e interação com molécula de água estão demonstradas na Figura 3. Portanto, o $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ possui propriedades propícias para a utilização na recuperação de biopolímeros de inclusão bacteriana, como o poli(3-hidroxi butirato), pela lise celular perante a interação da longa cadeia alquílica do LI com a parede celular lipídica.

Figura 3: (a) Estrutura química e mapeamento de potencial eletrostático molecular do cloreto de 1-hexadecilimidazólio ($\text{C}_{16}\text{MImCl}$); (b) interação do LI com molécula de água;



Fonte: Adaptado de THOMAS et al. (2018)

2.2 Caracterização e quantificação de líquidos iônicos

Devido à grande gama de líquidos iônicos, diversas técnicas são empregadas para a sua detecção e identificação. Entre elas, infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TGA), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia Raman, varredura diferencial de calorimetria (DSC), difração de raios X (XRD), UV-Vis, Pirólise-cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (Py-GC-MS), cromatografia líquida de fase reversa (RPLC), de pares iônicos, de polaridade reversa, de troca iônica, espectroscopia de massa, além de métodos de eletroforese (PASZKIEWICZ; STEPNOWSKI, 2011; THOMAS et al., 2018).

Entretanto, a quantificação de LIs e determinação de impurezas é complexa, geralmente qualitativa e de alto custo. Poucos estudos são encontrados na literatura sobre metodologias para a determinação de concentração de LIs em solução e se baseiam em técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massa. Hawkins et al. (2015) desenvolveram uma metodologia para a separação e quantificação de nove diferentes LIs N,N'-dialquilimidazólicas em HPLC-UV utilizando coluna de sílica de alta pureza e solução tampão de 90:10 acetonitrila-formiato de amônio, a detecção de espécies eluentes foi realizada a 210 nm e 30 °C, próximo ao máximo de absorvância para os cátions imidazólio. O tempo de retenção foi de 7 minutos para percurso dos nove líquidos iônicos homólogos testados, o limite inferior de quantificação foi entre 2 e 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e boa linearidade ($R^2 > 0,9999$) foi observada em concentrações entre 0,1 e 20 nmol de cada LI em solução. Entretanto, a partir de concentrações de 40 nmol de cada LI, efeitos de sobreposição e perda de definição dos picos, devido à sobrecarga da coluna, foram observados. Stepnowski e Mroziak (2005) avaliaram o comportamento cromatográfico de oito diferentes LIs, entre eles 7 homólogos do 1-alkil-3-metilimidazólio e 4-metil-N-butilpiridínio, em colunas cromatográficas de troca iônica e em HPLC de fase reversa. A fase móvel utilizada constitui em 40% (v/v) de acetonitrila em água e 30 mM de fosfato dipotássico (K_2HPO_4). Para o 1-butil-3-metilimidazólio, a faixa de quantificação da concentração foi de 1 até 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, com boa correlação de linearidade ($R^2 = 0,998$) em HPLC de fase reversa. Cabe salientar que, para LIs com quatro ou menos átomos de carbono em sua cadeia alquílica, uma seletividade muito inferior foi observada. Portanto, tais compostos devem ser separados e analisados preferencialmente por cromatografia iônica.

Cao et al. (2014) propuseram metodologia para a determinação e quantificação de 23 diferentes LIs em água, em sua maioria imidazólicos e piridínicos, utilizando UV-Vis. Os LIs foram seco a 50 °C por 96 h em estufa a vácuo e pentóxido de fósforo foi utilizado como agente dessecante. Posteriormente, soluções de LIs em água foram feitas nas concentrações de 0,625 mg/L até 80 mg/L. Para as baixas concentrações, de 0,625 a 10 mg/L, foi utilizada cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm. Para as soluções de alta concentração, de 2,5 a 80 mg/L, utilizou-se cubeta de quartzo de 1 mm, sem perda de linearidade, porém possibilitando a determinação de maiores concentrações. Para os LIs testados, o comprimento de onda de maior absorvância foi observado entre as faixas de 190 a 259 nm, para os LIs imidazólicos essa faixa se restringiu a valores entre 190 e 223 nm. Para a grande maioria dos LIs testados, uma boa linearidade foi observada ($R^2 > 0,98$), com exceção dos líquidos iônicos brometo de 1-butil-3-metilimidazólio

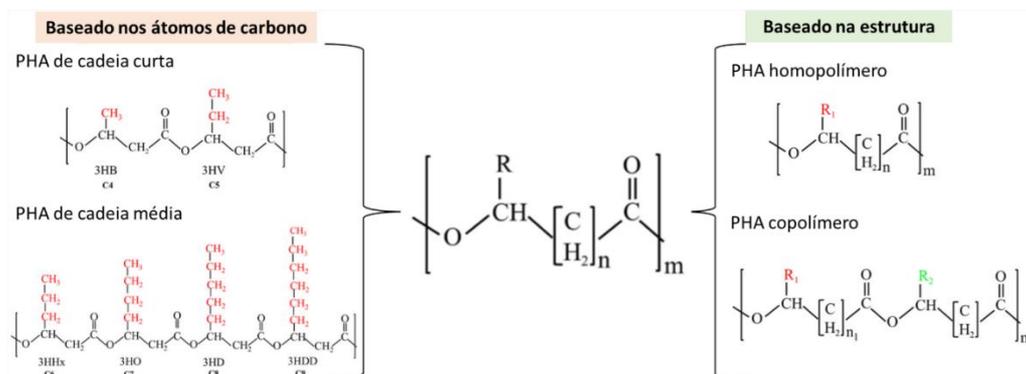
([BMIm][Br]), brometo de 1-aminoetil-3-metilimidazólio ([aEMIm][Br]) e acetato de 1-butil-3-metilimidazólio [BMMIm][Ac], para os quais os valores de R^2 obtidos foram de 0,93781, 0,96339 e 0,95268, respectivamente. Além disso, LIs que apresentam cátions conjugados (piridínio, imidazólio) puderam ser quantificados mais facilmente e com maior linearidade em relação a aqueles que não o possuem (pirrolidínio, tetraamônio, tetrafosfônio). Já para os ânions, iodo apresentou a melhor absorção no UV, em contrapartida acetato a menor. Dessa forma, a quantificação de LIs em solução aquosa se mostrou consistente e de fácil metodologia, porém, devido à grande variedade desses compostos, se faz necessária sua validação para cada um deles, considerando aspectos como definição do comprimento de onda de trabalho e possíveis interações solvente-líquido iônico.

2.3 Poli-(hidroxialcanoatos)

Os poli-(hidroxialcanoatos) (PHAs) são poliésteres constituídos de vários hidroxialcanoatos, tais moléculas apresentam uma simples estrutura macromolecular e são sintetizadas por uma grande gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, mais de 100 unidades monoméricas diferentes já foram identificadas como constituintes do PHA armazenado em células, possibilitando a produção de diversos tipos de polímeros biodegradáveis com variadas propriedades, entre elas, termo processabilidade, elastomericidade, barreira para gases e líquidos, atoxicidade, biocompatibilidade e pureza enantiomérica. Os PHAs são classificados conforme o número de átomos de carbono em sua cadeia polimérica, podendo ser de cadeia curta, de 3 a 5 átomos, ou de cadeia média, com 5 ou mais. Também podem ser classificados como homopolímeros ou copolímeros, assim como demonstrado na Figura 4 (BUGNICOURT et al., 2014; REDDY et al., 2003; ZHENG et al., 2020).

Esses biopolímeros são acumulados no interior celular em níveis de até 90% da massa celular seca, sendo produzidos sob condições de desbalanceamento de nutrientes no meio, como a falta de oxigênio e nitrogênio, e servindo como reserva de carbono e energia. Portanto, a escolha de microrganismos para a produção industrial de PHAs deve levar em consideração fatores como alta velocidade de crescimento, capacidade de utilização de diferentes substratos, custo relativo e altas capacidades de conversão e armazenamento do biopolímero pela célula, além de baixa demanda de oxigênio e serem seguras para contato com humanos e o meio ambiente (BYROM, 1987; CHEN, 2003).

Figura 4: Estrutura química geral de polihidroxiálcanoatos (PHAs) (ao centro), classificação baseada em átomos de carbono dentro da unidade monomérica (a esquerda) e baseada na estrutura homo ou copolímera (a direita).



Fonte: Adaptado de ZHOU et al. (2023)

O poli(3-hidroxiбутirato), P(3HB), é um homopolímero alifático e composto por monômeros de quatro átomos de carbono, solúvel em alguns solventes orgânicos, porém insolúvel em água. O crescente interesse industrial surgiu na década de 1960, quando suas propriedades mecânicas foram inicialmente descritas, conforme Tabela 1, resistindo a temperaturas de até 120 °C e possibilitando sua processabilidade como um termoplástico. Além disso, o P(3HB) possui a habilidade de se degradar hidroliticamente, diferente dos demais polímeros biodegradáveis que usualmente são sensíveis a luz, umidade ou até solúveis em água. Também possui alta resistência a óleos, gorduras e radiação UV, entretanto baixa resistência a ácidos e álcalis (ALVES et al., 2017; SHEN; HAUFE; PATEL, 2009).

Tabela 1: Propriedades de PHAs e do Polipropileno

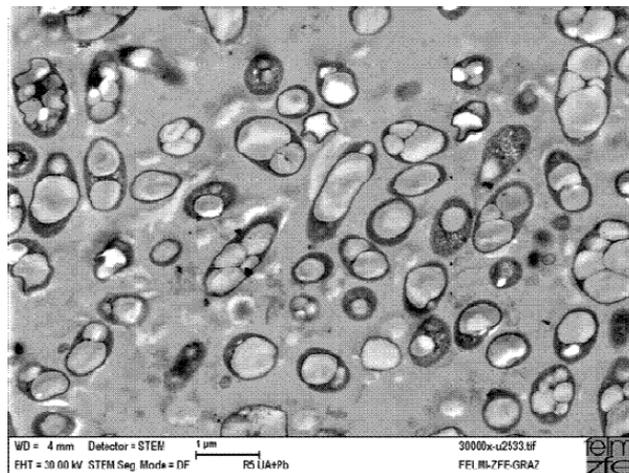
| | P(3HB) | P(3HB-3HV) | P(3HB-4HB) | P(3HO-3HH) | PP |
|----------------------------|--------|------------|------------|------------|-----|
| Temperatura de Fusão (°C) | 177 | 145 | 150 | 61 | 176 |
| Transição Vítre (°C) | 2 | -1 | -7 | -36 | -10 |
| Cristalinidade (%) | 70 | 56 | 45 | 30 | 60 |
| Alongamento em ruptura (%) | 5 | 50 | 444 | 300 | 400 |

Fonte: Adaptado de MADISON; HUISMAN (1999)

2.4 Produção de poli(3-hidroxiбутirato)

A síntese do P(3HB) tem início durante a fase de crescimento celular, a partir disso, o polímero é produzido e acumulado em seu interior. Entretanto, caso nutrientes essenciais como ferro, potássio, magnésio e nitrogênio, encontrem-se limitados no meio no qual há excesso de carbono disponível, um rápido crescimento celular com consumo total do carbono disponível e esgotamento dos nutrientes essenciais ocorrerá, resultando em limitação do crescimento e conversão do carbono excedente em PHAs, conforme Figura 5 (HOLMES, 1988).

Figura 5: Imagem em microscopia eletrônica de transmissão de células de *Cupriavidus necator* com grânulos de P(3HB) em seu interior



Fonte: KOLLER et al., 2012

A produção de PHA por diferentes cepas bacterianas é principalmente governada pela PHA sintase, das quais duas se destacam. A classe 1 da PHA sintase é capaz de polimerizar hidroxiacil-CoA com cadeias curtas, compostas de 3 a 5 átomos de carbono. Por outro lado, as PHA sintases de classe 2 apresentam especificidade para monômeros de cadeias médias, que variam de 6 a 14 átomos de carbono. Quando há predominância da classe 1, o PHA resultante possui propriedades termoplásticas, enquanto na presença da classe 2 são formados elastômeros (FERREIRA DA SILVA et al., 2007).

2.5 Métodos de extração de P(3HB)

Após a etapa de produção do biopolímero pelas células, a sua extração intracelular é necessária. O processo usualmente segue etapas de rompimento ou desestabilização celular, separação do meio de cultivo da biomassa, recuperação do biopolímero e sua purificação, essas etapas podem ser responsáveis por mais de 50% do valor do produto final. Portanto, aspectos como redução de perdas durante a extração, preservação das características físico-químicas e uso de químicos de baixa toxicidade e de baixo impacto ambiental são fundamentais para garantir a alta eficiência do processo de extração (ALVES et al., 2017; FERREIRA DA SILVA et al., 2007).

Entre os métodos de extração, aqueles que utilizam solventes orgânicos são os mais comuns e usualmente utilizam clorofórmio (RIEDEL et al., 2013), carbonato de propileno (QUINES et al., 2015) ou acetona (JIANG; RAMSAY; RAMSAY, 2006). Digestores químicos também são utilizados, como o dodecil sulfato de sódio (SDS) e o hidróxido de sódio (YANG et al., 2011). Recentemente técnicas que utilizam fluidos supercríticos e digestores biológicos com enzimas também vêm sendo estudados, obtendo-se recuperações de até 89% e 90%, respectivamente (HEJAZI; VASHEGHANI-FARAHANI; YAMINI, 2003; SUZUKI et al., 2008). Além dos químicos, os métodos mecânicos também são amplamente utilizados, como homogeneizadores de alta pressão, ultrassom ou métodos que combinem ambos os agentes (GHATNEKAR; PAI; GANESH, 2002).

A utilização de clorofórmio para a extração é amplamente utilizada pela sua alta recuperação e pureza do polímero após remoção do solvente, chegando a cerca de 96% e 98% \pm 1%, respectivamente. Tal extração se dá pelas etapas de solubilização do material polimérico, sua filtração ou centrifugação e remoção do solvente por secagem ou precipitação do biopolímero, pela adição de um não-solvente. Entretanto, apesar da sua alta recuperação, pureza e simplicidade de metodologia de extração, o clorofórmio apresenta alta toxicidade e alto custo (ARAMVASH; MOAZZENI ZAVAREH; GHOLAMI BANADKUKI, 2018; PACHECO, 2014; FINDLAY; WHITE, 1983).

Portanto, a busca por solventes não halogenados, atóxicos e de baixo custo é necessária para a viabilização da produção do poli(3-hidroxitirato) em escala industrial. Dessa forma, Rosengart et al. (2015) avaliaram a eficiência da extração de P(3HB) da bactéria gram-negativa *Burkholderia sacchari*, utilizando os solventes não halogenados anisol, ciclohexanona e etoxibenzeno e obtiveram as melhores recuperações e purezas para os solventes anisol e ciclohexanona, de 97% e 96% para o solvente anisol, e de 93% e 98% para a ciclohexanona. Já Aramvash et al. (2015) analisaram a utilização de diferentes solventes não halogenados e obtiveram resultados promissores para o etanoato de butila e para o acetato de etila, obtendo os melhores resultados para o acetato de etila a 103 °C, de 96% de recuperação e pureza de 99%. Além disso, em comparação com os outros solventes testados, e também em relação ao clorofórmio, a massa molar do polímero obtido foi maior.

Os trabalhos citados se incluem na procura por soluções de baixo custo, com baixo impacto ambiental e baixa toxicidade para a recuperação de poli-(hidroxialcanoatos), com foco no escalonamento e na viabilização econômica da produção industrial destes biopolímeros. Sob esta perspectiva, as diversas propriedades físico-químicas e de citotoxicidade dos LIs os tornam candidatos promissores para serem empregados em técnicas de extração celular, constituindo-se como possíveis solventes de escala industrial. Consequentemente, estudos para determinar as condições de processo e avaliar a efetividade da utilização dos LIs são fundamentais.

3 Materiais e Métodos

3.1 Quantificação de líquido iônico

Para quantificação de líquido iônico em solução utilizou-se metodologia adaptada de Cao (2014). Tal metodologia consiste na medição da absorbância da solução de LI em água em espectrofotômetro UV-Vis. Devido a simplicidade deste método, esses testes buscam compreender e avaliar a viabilidade da medição do LI cloreto de 1-hexadecilimidazólio ($C_{16}MImCl$), sua faixa de concentração de trabalho, comprimentos de onda e influências de diferentes solventes e da temperatura, assim como a sua estabilidade ao longo do tempo, visto que as demais metodologias existentes, como HPLC, possuem maior complexidade para preparação das amostras.

As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis modelo T80, marca PG Instruments Ltd, com varreduras entre os comprimentos de onda de 190 e 300 nm, visto que o pico do anel imidazólico se dá próximo a 210 nm, utilizando lâmpada de deutério D2, cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e água Milli-Q como branco. Avaliou-se o comportamento e linearidade da curva de concentração em relação à absorbância obtida para baixas concentrações, entre 1 e 2,5 mg/L, e para altas concentrações, entre 10 e 120 mg/L. Antes do preparo das soluções o LI foi colocado em estufa de secagem com circulação de ar forçada a 50°C durante 72 horas para remoção de umidade.

Para os testes iniciais em baixas concentrações, solução estoque de 18,8 mg/L foi produzida pela adição de 0,94 mg de LI em balão volumétrico de 50 mL com água Milli-Q. Em seguida, essa solução foi diluída pela remoção de alíquotas por micropipeta e transferida para balões volumétricos de 10 mL para alcançar as diferentes concentrações, conforme Tabela 2. Todos os pontos foram feitos em triplicata.

Tabela 2: Concentrações de $C_{16}MImCl$ em água Milli-Q para construção de curva padrão.

| Concentração de $C_{16}MImCl$ (mg/L) | Alíquota de solução estoque (mL) | Concentração de $C_{16}MImCl$ (mg/L) | Alíquota de solução estoque (mL) |
|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| 18,8 | Solução estoque | 120,10 | Solução estoque |
| 2,35 | 1,2 | 99,68 | 8,3 |
| 1,88 | 1,0 | 79,27 | 6,6 |
| 1,50 | 0,8 | 60,05 | 5,0 |
| 1,13 | 0,6 | 39,63 | 3,3 |
| 0,94 | 0,5 | 20,42 | 1,7 |
| - | - | 10,08 | 0,84 |

Já para altas concentrações, seguiu-se procedimento similar ao anteriormente descrito. Soluções estoque de 120 mg/L foram produzidas e diluídas em balão volumétrico de 10 mL para as concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L. Todos os pontos foram feitos em triplicata.

Para avaliação da estabilidade das soluções, novas medições foram realizadas após 48 e 96 h, em temperatura ambiente. Também se avaliou o efeito da agitação antes da medição da absorbância, devido à grande formação de bolhas em concentrações superiores a 80 mg/L, as amostras foram agitadas seis vezes em tubo de vidro e tiveram sua absorbância medida novamente.

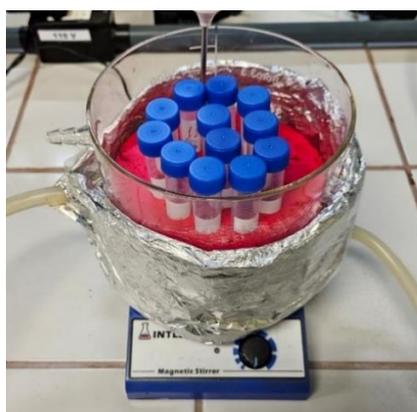
Para determinação do efeito da temperatura nos resultados obtidos por UV-Vis, soluções de 30, 60 e 120 mg/L foram colocadas em congelador para resfriamento durante 10 min, atingindo temperaturas próximas a 13 °C. Em seguida, foram submetidas a duas varreduras subsequentes, uma imediatamente após sua transferência para cubeta e outra após 10 min com a solução dentro da cubeta, tempo este suficiente para as amostras atingirem temperatura ambiente de aproximadamente 23 °C.

Soluções de LI em etanol e metanol foram feitas nas concentrações de 40, 60 e 80 mg/L para determinação da influência do solvente, intensidade e modificação dos picos característicos. Para essas soluções foi utilizado branco de etanol e metanol, respectivamente. Todos os pontos foram feitos em duplicata.

3.2 Testes de interação P(3HB) x líquido iônico

Com o objetivo de verificar possíveis interações entre o LI com a cadeia biopolimérica, realizou-se experimentos de contato entre solução de LI e o biopolímero. Para isto, duas soluções de concentração 1 mg/mL e 100 mg/mL de cloreto de 1-hexadecilimidazólio ($C_{16}MImCl$) com água Milli-Q foram feitas. Posteriormente, 1 mL de cada solução foi colocada em contato com 0,05 g de P(3HB) comercial (Sigma-Aldrich) por 24 h, sob agitação magnética a 30 °C, conforme a Figura 6.

Figura 6: Aparato experimental para contato de P(3HB) e solução de LI em banho térmico a 30°C.

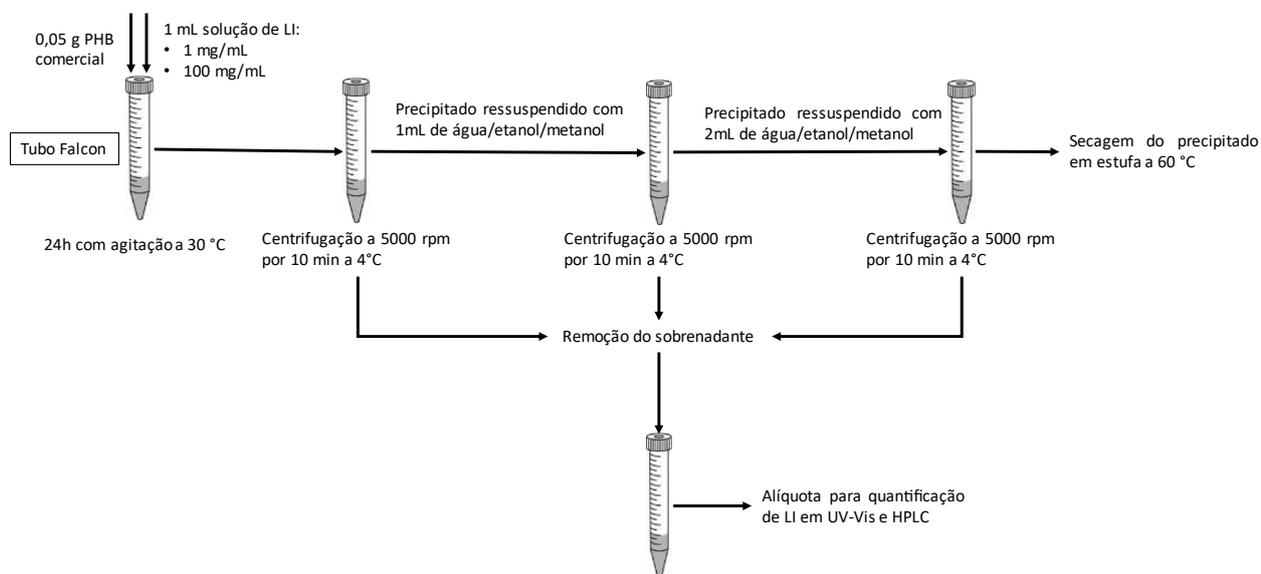


Fonte: Autor

Após o contato, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi separado em tubo Falcon, previamente seco em estufa, para posterior análise de concentração de LI por espectrofotometria UV-Vis e HPLC. Então, seguiu-se com duas lavagens com 1 mL e 2 mL de água, etanol ou metanol adicionado ao precipitado e ressuspendido, passando por nova centrifugação a cada lavagem, sob

mesmas condições e tendo o sobrenadante separado em tubo Falcon. Alíquotas foram retiradas e diluídas com água Milli-Q para quantificação de LI em cada lavagem. A metodologia descrita está representada esquematicamente na Figura 7, os testes foram realizados em duplicata.

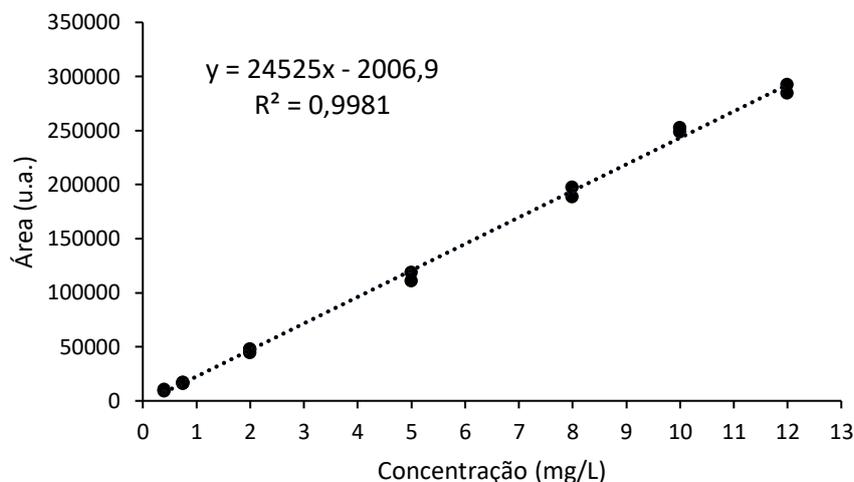
Figura 7: Diagrama de metodologia experimental para contato P(3HB) - LI.



Fonte: Autor

Para quantificação do LI no sobrenadante após as lavagens, utilizou-se metodologia de HPLC adaptada de Stepnowski e Mroziak (2005). Para tal, as amostras, previamente diluídas em água Milli-Q para análise de espectroscopia UV-Vis, foram filtradas em filtro de nylon, diâmetro de poro 0,45 μm , e diluídas com solução aquosa de acetonitrila 40% até atingirem proporção de 60:40 de acetonitrila. Por último, 10 μL das amostras foram injetadas em equipamento de HPLC com coluna Luna Omega 5 μm Polar C18 100A, 150 X 4,6 mm, usando uma solução de 80% de acetonitrila e 20% de solução tampão (5 mmol KH_2PO_4 e 7,5 mmol H_3PO_4) como fase móvel com vazão de 1 mL/min e temperatura da coluna de 35 °C. O detector utilizado foi do tipo DAD em comprimento de onda de 216 nm. A quantificação de LI foi realizada utilizando uma curva padrão previamente construída pelo Laboratório Tecnocat nas concentrações de 0,4 mg/L a 12 mg/L foi utilizada para determinação da concentração e está apresentada na Figura 8.

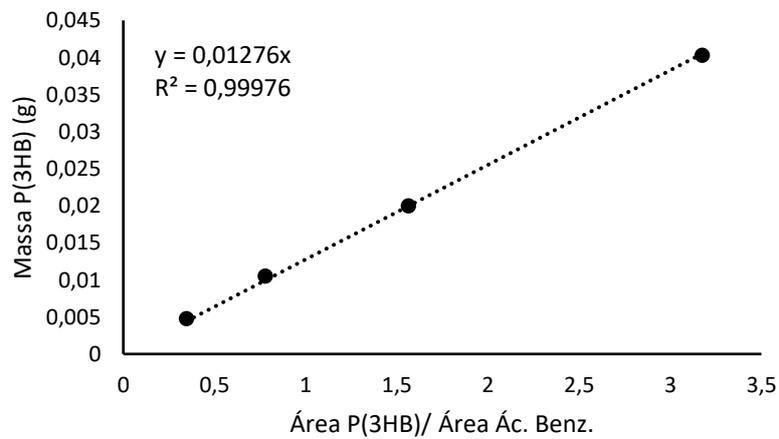
Figura 8: Curva padrão para quantificação de LI via HPLC



Fonte: Autor

Já a massa seca resultante do contato P(3HB)–LI teve sua pureza determinada por metodologia de propanólise e cromatografia gasosa (CG) descrita por Riss e Mai (1988). Para a construção de curva padrão quantidades de 5, 10, 20 e 40 mg de P(3HB) comercial foram pesadas, enquanto para as amostras analisadas 30 mg foram coletadas. As massas foram colocadas em frascos herméticos e submetidas à propanólise, levando a quebra da cadeia polimérica e posterior transesterificação para sua quantificação por cromatografia gasosa. Para a propanólise, 2 mL de n-propanol acidificado com ácido clorídrico (4:1 v/v), 2 mL de dicloroetano e 200 µL do padrão ácido benzoico (diluído em n-propanol) foram adicionados aos tubos. Em seguida, os tubos foram fechados hermeticamente e levados a banho térmico a 98 °C durante 2,5 h, sendo agitados manualmente a cada 20 min. Após, aguardou-se os tubos atingirem temperatura ambiente e adicionou-se 4 mL de água destilada com posterior agitação. A fase orgânica foi coletada e analisada em cromatógrafo gasoso. Utilizou-se N₂ como gás de arraste a 2 mL/min, coluna Elite-WAX e detector de ionização de chama. A curva padrão obtida que correlaciona massa de P(3HB) com a razão das áreas dos picos de P(3HB) e o padrão ácido benzoico está ilustrada na Figura 9.

Figura 9: Curva padrão para quantificação de P(3HB)



Fonte: Autor

A pureza do polímero foi calculada a partir da Equação 3.1, onde m_{p-CG} é a massa de biopolímero obtida pelo resultado da análise de cromatografia gasosa e m_{t-CG} é a massa total de amostra pesada para análise de cromatografia gasosa.

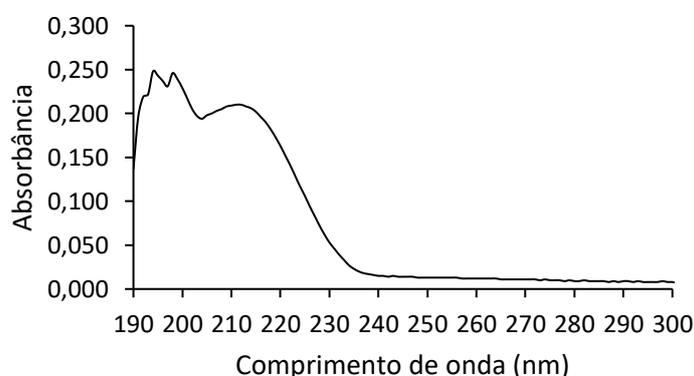
$$Pureza [\%] = \frac{m_{p-CG}}{m_{t-CG}} \times 100 \quad (3.1)$$

4 Resultados e Discussão

4.1 Quantificação de líquido iônico

Os testes iniciais realizados tiveram como objetivo a determinação de picos de absorvância e de seus comprimentos de ondas para solução de líquido iônico cloreto de 1-hexadecilimidazólio ($C_{16}MImCl$) em água Milli-Q, conforme metodologia descrita na Seção 3.1. Na Figura 10, está apresentado espectro obtido para solução de 20 mg/L entre a faixa de 190 a 300 nm, sendo possível identificar três picos característicos de absorvância para os comprimentos de onda de 194, 198 e banda larga próximo a região de 212 nm.

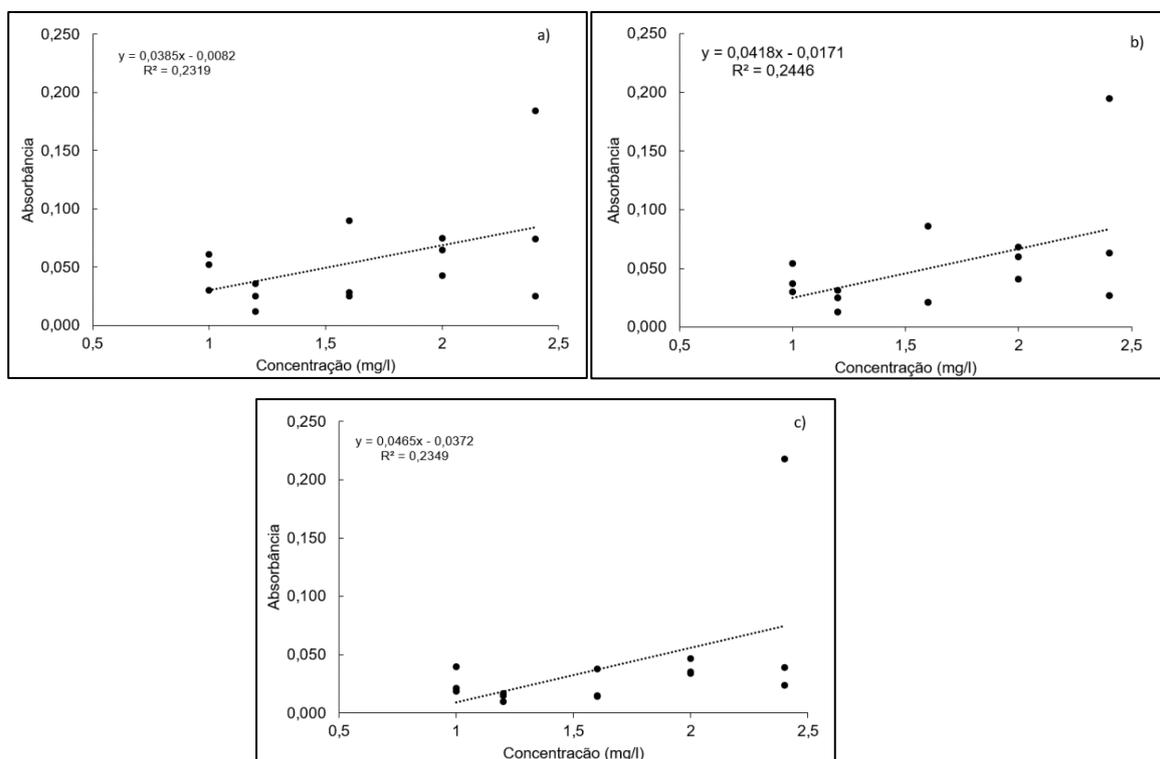
Figura 10: Espectro para solução de 20 mg/L de LI.



Fonte: Autor

Na Figura 11 apresenta-se as curvas padrão obtidas para os diferentes picos de absorvância identificados em baixas concentrações, entre 1 e 2,5 mg/L, de LI em solução. Observou-se baixa correlação de linearidade, podendo ser constatada a partir do valor de R^2 de, aproximadamente, 0,23 para os três comprimentos de onda. Além disso, é possível verificar similaridade nos valores de absorvância para 194 nm (a) e 198 nm (b).

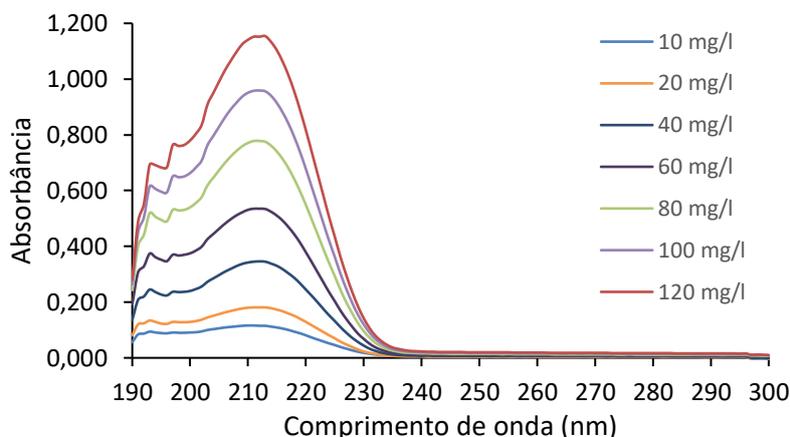
Figura 11: Curvas de calibração para soluções de LI entre 1 e 2,5 mg/L em diferentes comprimentos de onda: (a) 194 nm; (b) 198 nm; (c) 212nm.



Fonte: Autor

Devido à baixa linearidade na faixa de 1 a 2,5 mg/L, novas varreduras por comprimento de onda e novas curvas de calibração foram feitas para as concentrações de 10 a 120 mg/L. Nessa faixa de concentração, observou-se modificação dos picos previamente identificados para comprimentos de onda de 193, 197 e 212 nm. Esse comportamento pode ser parcialmente explicado pela maior interação solvente-soluto e soluto-soluto. Além disso, com o aumento da concentração de LI em solução, houve maior aumento da intensidade da absorbância na região próxima a 212 nm, em relação às demais, conforme demonstrado na Figura 12. Segundo HAWKINS (2015), o pico característico para o cátion imidazólio se encontra próxima a região de 210 nm. Portanto, o aumento da intensidade da absorbância na região de 212 nm se dá pelo aumento da concentração dos cátions em solução. Já os picos de 193 e 197 nm podem estar associados a transição das ligações $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo alceno (RCH=CHR) presente no anel imidazólico e suas interações com o solvente (KUBALL; HÖFER; KIESEWALTER, 2017).

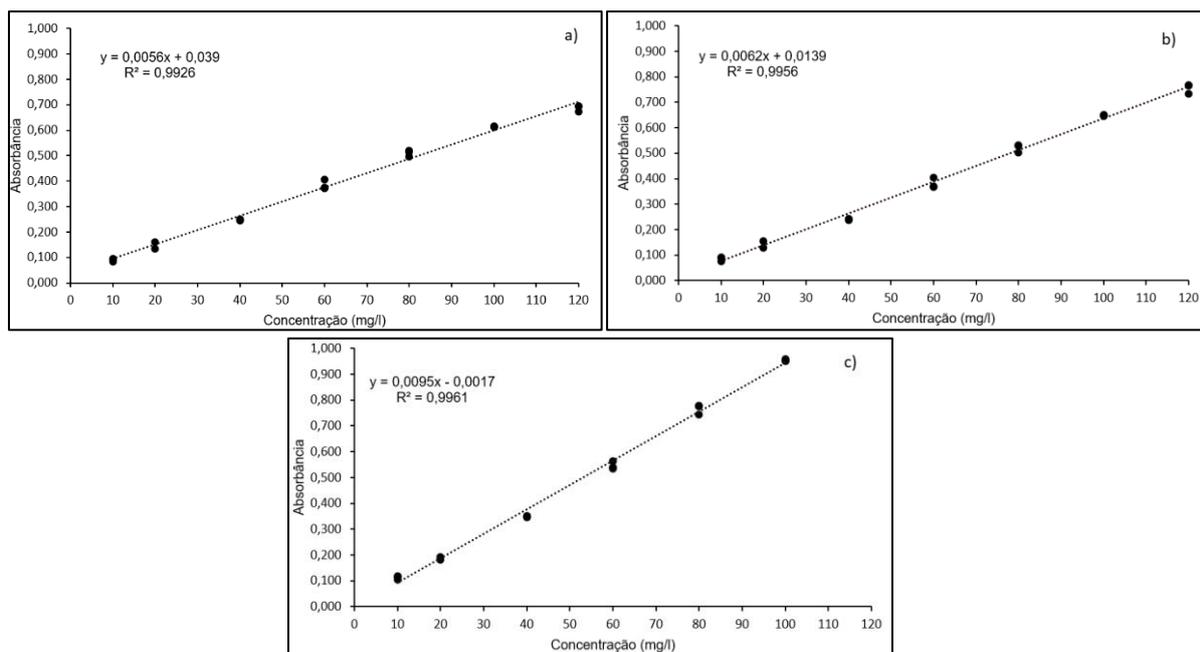
Figura 12: Espectro para soluções de 10 a 120 mg/L de LI.



Fonte: Autor

Na Figura 13 apresenta-se as curvas padrão obtidas para os diferentes picos identificados para altas concentrações, entre 10 e 120 mg/L. Para essa faixa de concentração observou-se uma correlação linear satisfatória para os três comprimentos de onda, que pode ser constatada a partir do valor de R^2 de 0,9926; 0,9956 e 0,9961 para os comprimentos de onda de 193 (a), 197 (b) e 212 nm (c), respectivamente. Além disso, para os comprimentos de onda de 193 e 197 nm os limites superiores de quantificação são, possivelmente, maiores que 120 mg/L, uma vez que o valor de absorvância é inferior a 1, para 212 nm o limite de quantificação é de, aproximadamente, 100 mg/L.

Figura 13: Curvas de calibração para soluções de LI entre 10 e 120 mg/L em diferentes comprimentos de onda: (a) 193 nm; (b) 197 nm; (c) 212 nm.



Fonte: Autor

Para averiguar a estabilidade das soluções, novas medidas foram feitas após 48 e 96 h de preparação das soluções de LI. Para o comprimento de onda de 193 nm, foram observados aumentos nos valores da absorvância em medidas realizadas imediatamente após preparo das soluções em relação a 96 h após, chegando a variações de até 93% para a concentração de 10 mg/L, conforme demonstrado na Tabela 3. Esse comportamento pode estar relacionado ao aumento das interações e coordenações entre o LI e o solvente.

Tabela 3: Resultados de absorvância em comprimento de onda de 193 nm para soluções de LI ao longo do tempo.

| Concentração (mg/L) | 0 h | 48 h | 96 h | Variação 0 - 96h (%) |
|---------------------|-----------------|-----------------|--------|----------------------|
| 10 | 0,094 ± 0,006 | 0,138 ± 0,014 | 0,175* | 93,73 |
| 20 | 0,148 ± 0,019** | 0,168 ± 0,011** | 0,216* | 46,44 |
| 40 | 0,310 ± 0,091** | 0,316 ± 0,010** | 0,325* | 5,01 |
| 60 | 0,384 ± 0,019 | 0,423 ± 0,033 | 0,400* | 4,26 |
| 80 | 0,509 ± 0,013 | 0,541 ± 0,026 | 0,645* | 26,64 |
| 100 | 0,614 ± 0,002 | 0,651 ± 0,005 | 0,705* | 14,88 |
| 120 | 0,687 ± 0,013 | 0,706 ± 0,016 | 0,729* | 6,17 |

* Foi realizada uma única medida

** Foi realizada duplicata

Um comportamento similar foi identificado para o comprimento de onda de 197 nm, com aumento da absorvância ao longo do tempo, porém com variações de até 59% para a concentração de 10 mg/L e menores variações para as soluções de maior concentração, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Resultados de absorvância em comprimento de onda de 197 nm para soluções de LI ao longo do tempo.

| Concentração (mg/L) | 0 h | 48 h | 96 h | Variação 0 - 96h (%) |
|---------------------|-----------------|-----------------|--------|----------------------|
| 10 | 0,085 ± 0,009 | 0,112 ± 0,006 | 0,135* | 59,45 |
| 20 | 0,142 ± 0,018** | 0,151 ± 0,013** | 0,205* | 44,37 |
| 40 | 0,240 ± 0,004** | 0,278 ± 0,004** | 0,284* | 18,58 |
| 60 | 0,381 ± 0,020 | 0,410 ± 0,032 | 0,386* | 1,40 |
| 80 | 0,521 ± 0,015 | 0,540 ± 0,021 | 0,623* | 19,65 |
| 100 | 0,648 ± 0,003 | 0,675 ± 0,001 | 0,715* | 10,28 |
| 120 | 0,755 ± 0,019 | 0,765 ± 0,022 | 0,799* | 5,83 |

* Foi realizada uma única medida

** Foi realizada duplicata

Entretanto, para o comprimento de onda de 212 nm as variações de absorvâncias foram menores, de até 15% para concentrações de até 20 mg/L, quando comparadas aos demais comprimentos de onda que chegaram até 94% para mesmas concentrações, conforme demonstrado na Tabela 5. Essa menor variação indica grande estabilidade da ligação correspondente a esse comprimento de onda, mesmo para grandes períodos entre a preparação das amostras e suas medições.

Tabela 5: Resultados de absorvância em comprimento de onda de 212 nm para soluções de LI ao longo do tempo.

| Concentração (mg/L) | 0 h | 48 h | 96 h | Varição 0 - 96h (%) |
|---------------------|-----------------|-----------------|--------|---------------------|
| 10 | 0,112 ± 0,006 | 0,124 ± 0,002 | 0,125* | 11,28 |
| 20 | 0,187 ± 0,008** | 0,190 ± 0,008** | 0,214* | 14,75 |
| 40 | 0,349 ± 0,004** | 0,363 ± 0,004** | 0,366* | 4,87 |
| 60 | 0,546 ± 0,015 | 0,557 ± 0,019 | 0,546* | 0,06 |
| 80 | 0,765 ± 0,019 | 0,769 ± 0,022 | 0,807* | 5,44 |
| 100 | 0,954 ± 0,005 | 0,962 ± 0,003 | 0,982* | 2,90 |
| 120 | 1,143 ± 0,027 | 1,144 ± 0,029 | 1,171* | 2,45 |

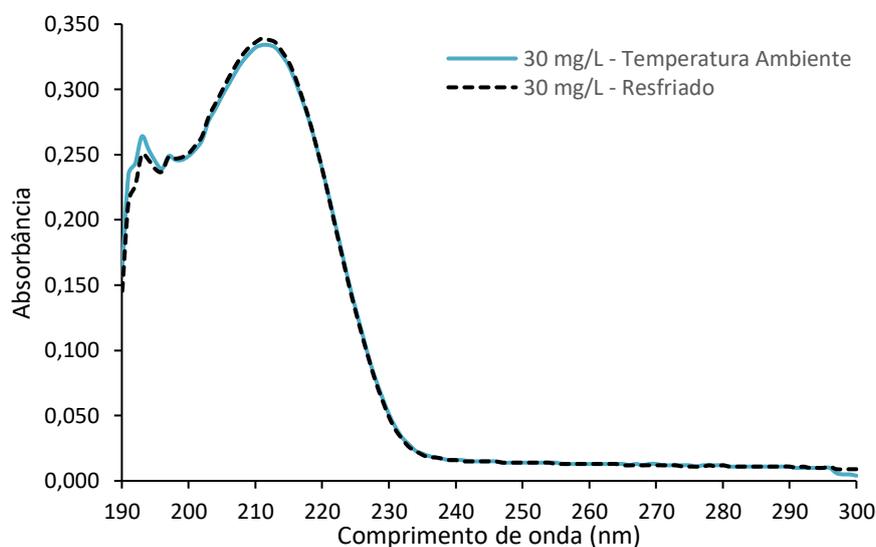
* Foi realizada uma única medida

** Foi realizada duplicata

Para compreender o efeito da temperatura nas análises de espectroscopia UV-Vis, as amostras de LI em concentrações de 30, 60 e 120 mg/L foram resfriadas conforme descrito na Seção 3.1 e tiveram sua absorvância medida nas temperaturas de aproximadamente 13 °C e 23 °C. Os espectros obtidos para solução de 30 mg/L nas duas temperaturas estão apresentados na Figura 14. É possível inferir que com a diminuição da temperatura a absorvância da amostra foi levemente maior para os comprimentos de onda de 197 e 212 nm, aumento de aproximadamente 1%. Além disso, é importante salientar o comportamento da região de 193 nm, onde, com o resfriamento, houve diminuição de sua absorvância, de aproximadamente 5%. Esse efeito também foi identificado para as demais concentrações avaliadas, porém de menor intensidade para 60 e 120 mg/L. Esse comportamento foi identificado por Yarborough, Haskin e Lambdin (1954) para diferentes compostos orgânicos em diferentes solventes, e pode ser explicado pela diminuição das interações solvente-soluto diminuindo seu grau de tautomerização quando em solventes polares. Além disso, as transições rotacionais diminuem em menores temperaturas levando a maior definição das bandas eletrônicas vibracionais. Portanto, podemos afirmar que os picos de 197 e 212 nm estão relacionados a bandas vibracionais, enquanto o pico de 193 nm está associado a interações entre o LI e o solvente.

É importante salientar que durante as medições ocorreu uma pequena formação de condensação de umidade ambiente na parte externa da cubeta contendo a amostra, levando a modificações na absorvância medida durante a análise. Para maior precisão da influência da temperatura nos picos identificados, se faz necessária a avaliação em espectrofotômetro com controle de temperatura. Contudo, a partir das análises já realizadas o pico de 212 nm demonstrou boa estabilidade ao longo do tempo e sob variações de temperatura.

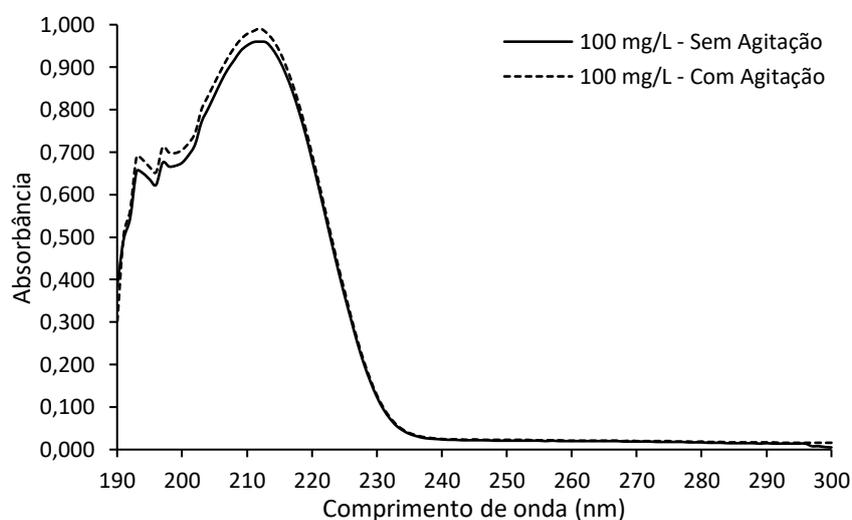
Figura 14: Espectro para solução de 30 mg/L em temperatura ambiente ($\approx 23\text{ }^{\circ}\text{C}$) e resfriada ($\approx 13\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Fonte: Autor

É importante salientar que devido a propriedades similares a surfactantes do cloreto de 1-hexadecilimidazólio uma grande formação de bolhas foi identificada para as soluções de concentração superiores a 80 mg/L. Portanto, efeitos de agitação foram avaliados. As soluções previamente preparadas foram agitadas seis vezes dentro de tubo de vidro e tiveram sua absorvância medida novamente. Conforme demonstrado na Figura 15, a agitação da amostra resultou em maiores valores de absorvância, com aumento de 3, 5 e 7% para os comprimentos de onda de 212, 197 e 193 nm, respectivamente. Esse efeito, possivelmente devido a maior interação soluto-solvente, foi identificado para todas as concentrações entre 10 e 120 mg/L, apesar da menor formação de bolhas para as concentrações inferiores a 40 mg/L.

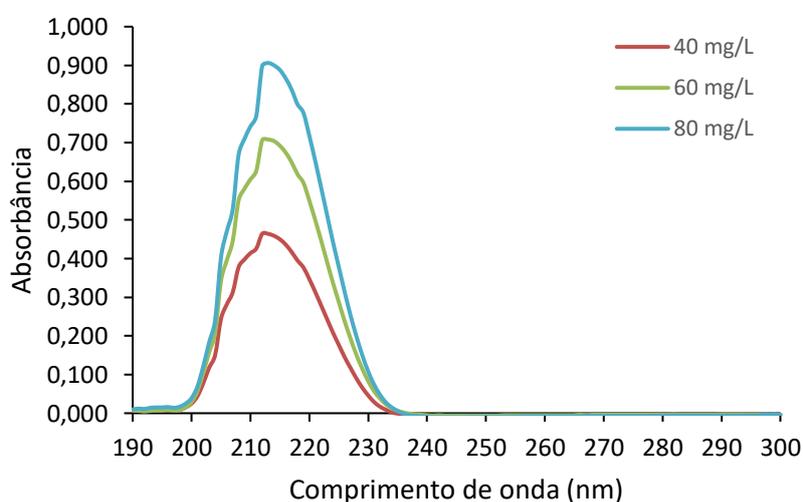
Figura 15: Espectro obtido para solução de 100 mg/L sem e com agitação



Fonte: Autor

Para avaliar a influência do solvente na espectroscopia UV-Vis soluções de LI em etanol e metanol foram produzidas nas concentrações de 40, 60 e 80 mg/L. A solução de LI em etanol apresentou um comportamento similar ao identificado para água Milli-Q, com pico característico próximo a região de 212 nm, mas não apresentou os picos em 193 e 197 nm, conforme demonstrado na Figura 16. Ademais, é importante destacar que tanto o etanol como o metanol possuem comprimento de onda de corte em 205 nm, portanto os picos característicos em menores comprimentos de onda não são visíveis na espectroscopia. O comprimento de onda de corte na espectroscopia UV-VIS está relacionado ao limite inferior de comprimento de onda em que um determinado material exibe absorção significativa de radiação ultravioleta ou visível e devido a utilização de branco com mesma substância esses picos são suprimidos do espectro obtido.

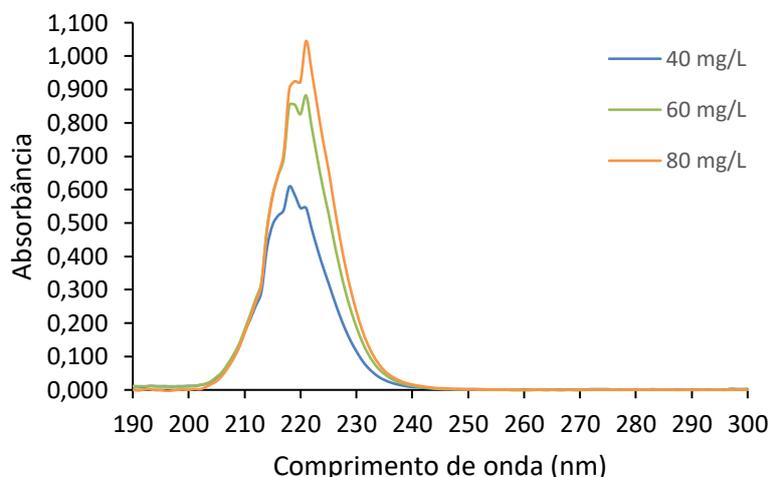
Figura 16: Espectro obtido para soluções de 40 a 80 mg/L de LI em etanol.



Fonte: Autor

Entretanto, para as soluções de LI em metanol, diferentes picos característicos foram identificados em 218 e 221 nm, porém para a solução de 80 mg/L os picos foram identificados em 219 nm e 221 nm. Além disso, com o aumento da concentração, o aumento da absorvância foi maior para o pico de 221 nm, estando possivelmente associado ao anel imidazólico do líquido iônico, assim como foi observado para solução em água Milli-Q no comprimento de onda de 212 nm. Cabe salientar que a absorvância para a solução de 80 mg/L em 221 nm foi superior a 1, portanto o limite de quantificação superior para o LI em metanol é inferior a esse valor.

Figura 17: Espectro obtido para soluções de 40 a 80 mg/L de LI em metanol.



Fonte: Autor

Para quantificar o LI $C_{16}MImCl$ em solução, é essencial considerar condições como temperatura, tempo de preparo, comprimento de onda, agitação e tipo de solvente ao construir curvas padrão e realizar a sua quantificação precisa. Portanto, para a quantificação de LI em solução, a adoção de condições padrão é fundamental para a obtenção de resultados precisos. Dessa forma, adotou-se o comprimento de onda de 212 nm, solução e branco com água Milli-Q, sem agitação da amostra e curva padrão realizada imediatamente após preparo das soluções e em temperatura ambiente, devido a maior estabilidade nessas condições.

4.2 Testes de interação P(3HB) x líquido iônico

Com o objetivo de avaliar possíveis interações entre o líquido iônico e o biopolímero, soluções de LI nas concentrações de 1 e 100 mg/mL em água Milli-Q foram colocadas em contato com massas conhecidas de P(3HB) comercial a 30 °C, lavadas com não-solvente, secas em estufa a 60 °C, conforme metodologia descrita na Seção 3.2, e comparou-se a massa seca final obtida ($M_3 - M_1$) e a massa de polímero inicialmente pesada (M_2), obtendo-se os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7, para as concentrações de 1 e 100 mg/mL, respectivamente.

Tabela 6: Valores de massa medidos antes (M_2) e após contato ($M_3 - M_1$) com solução de 1 mg/mL de LI

| Solvente | Amostra | Massa tubo Falcon [M1] | Massa P(3HB) [M2] | Massa Falcon + P(3HB) seca [M3] | M3 - M1 | Desvio (M3-M1-M2)/M2 |
|----------|---------|------------------------|-------------------|---------------------------------|---------|----------------------|
| Milli-Q | 1 | 5,1704 | 0,0500 | 5,2197 | 0,0493 | -1,400 % |
| | 2 | 5,1665 | 0,0499 | 5,2166 | 0,0501 | 0,401 % |
| Etanol | 3 | 5,1954 | 0,0513 | 5,2460 | 0,0506 | -1,365 % |
| | 4 | 5,1673 | 0,0509 | 5,2179 | 0,0506 | -0,589 % |
| Metanol | 5 | 5,3120 | 0,0510 | 5,3608 | 0,0488 | -4,314 % |
| | 6 | 5,2646 | 0,0506 | 5,3144 | 0,0498 | -1,581 % |

Tabela 7: Valores de massa medidos antes (M2) e após contato (M3-M1) com solução de 100 mg/mL de LI

| Solvente | Amostra | Massa tubo Falcon [M1] | Massa P(3HB) [M2] | Massa Falcon + P(3HB) seca [M3] | M3 - M1 | Desvio (M3-M1-M2)/M2 |
|----------|---------|------------------------|-------------------|---------------------------------|---------|----------------------|
| Milli-Q | 7 | 5,2143 | 0,0511 | 5,2665 | 0,0522 | 2,153 % |
| | 8 | 5,2642 | 0,0501 | 5,3148 | 0,0506 | 0,998 % |
| Etanol | 9 | 5,2110 | 0,0506 | 5,2660 | 0,0550 | 8,696 % |
| | 10 | 5,3065 | 0,0498 | 5,3582 | 0,0517 | 3,815 % |
| Metanol | 11 | 5,1628 | 0,0501 | 5,2133 | 0,0505 | 0,798 % |
| | 12 | 4,8738 | 0,0500 | 4,9250 | 0,0512 | 2,400 % |

A partir dos dados apresentados nas tabelas 6 e 7, é possível inferir que as lavagens com diferentes solventes foi efetiva na remoção do LI em contato com o biopolímero, de forma que os desvios obtidos não foram muito elevados. Os maiores desvios de massa pesada foram referentes às soluções que estiveram em contato com a solução de maior concentração, 100 mg/mL. O desvio de 8,7 % (4,4 mg) para a Amostra 9 pode ser explicado pela não remoção total do sobrenadante, levando a maior presença de LI após secagem. Entretanto, as demais amostras apresentaram desvios inferiores a 4%. Dessa forma, para a total remoção do LI presente, um maior número de lavagens deve ser realizado para aquelas que tiveram contato com soluções de concentração de 100 mg/mL. Contudo, é importante ressaltar que as massas em contato com a solução de 1 mg/mL apresentaram desvios negativos. Tais desvios foram ocasionados pela sucção do P(3HB) junto do sobrenadante, como posteriormente confirmado pelo aparecimento de pequena quantidade de precipitado branco nos tubos em que foram armazenados. Portanto, para essas massas não é possível afirmar quantitativamente a massa de LI ainda presente junto a massa de biopolímero.

Para a quantificação da concentração de LI ao longo das lavagens, utilizou-se espectroscopia UV-Vis nas condições e curva padrão definidas na Seção 4.1. Após remoção do sobrenadante, alíquotas foram retiradas e diluídas em água Milli-Q. É importante salientar que, para as amostras que passaram por lavagem com etanol ou metanol, a presença desses solventes junto a amostra pode levar a pequenos desvios na medição de sua absorbância e, conseqüentemente, desvios na quantificação de LI, não sendo possível a comparação direta das concentrações entre amostras, sendo necessária a utilização de branco adequado para cada solução. Nas Tabelas 8 e 9 estão apresentadas as concentrações do sobrenadante removido das amostras que estiveram em contato com solução de LI de 1 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente, onde L0 é a concentração do sobrenadante removido sem lavagem, L1 com lavagem utilizando 1 mL de solvente e L2 lavagem com 2 mL. A redução de concentração foi calculada pela variação entre a concentração da lavagem e a concentração do sobrenadante L0.

Tabela 8: Concentração e massa de LI no sobrenadante de amostras contendo P(3HB) em contato com solução de 1 mg/mL após sucessivas lavagens.

| Solvente | Amostra | Lavagem | Concentração alíquota (mg/L) | Concentração na amostra (mg/L) | Massa de LI removido (mg) | Redução (%) |
|----------|---------|---------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------|
| Milli-Q | 1 | L0 | 42,11 | 1052,67 | 1,053 | - |
| | | L1 | 22,53 | 375,47 | 0,375 | -64,3 |
| | | L2 | 16,74 | 278,98 | 0,558 | -73,5 |
| | 2 | L0 | 45,37 | 1134,25 | 1,134 | - |
| | | L1 | 26,21 | 436,87 | 0,437 | -61,5 |
| | | L2 | 15,26 | 254,41 | 0,509 | -77,6 |
| Etanol | 3 | L0 | 37,37 | 934,25 | 0,934 | - |
| | | L1 | 50,74 | 845,64 | 0,846 | -9,5 |
| | | L2 | 10,00 | 166,70 | 0,333 | -82,2 |
| | 4 | L0 | 40,63 | 1015,83 | 1,016 | - |
| | | L1 | 36,32 | 605,29 | 0,605 | -40,4 |
| | | L2 | 12,00 | 200,03 | 0,400 | -80,3 |
| Metanol | 5 | L0 | 42,95 | 1073,73 | 1,074 | - |
| | | L1 | 43,58 | 726,34 | 0,726 | -32,4 |
| | | L2 | 16,11 | 268,45 | 0,537 | -75,0 |
| | 6 | L0 | 40,84 | 1021,10 | 1,021 | - |
| | | L1 | 37,26 | 621,08 | 0,621 | -39,2 |
| | | L2 | 16,63 | 277,22 | 0,554 | -72,9 |

Tabela 9: Concentração e massa de LI no sobrenadante de amostras contendo P(3HB) em contato com solução de 100 mg/mL após sucessivas lavagens.

| Solvente | Amostra | Lavagem | Concentração alíquota (mg/L) | Concentração amostra (mg/L) | Massa de LI removido (mg) | Redução (%) |
|----------|---------|---------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------|
| Milli-Q | 7 | L0 | 68,74 | 114564,24 | 114,564 | - |
| | | L1 | 21,37 | 17808,43 | 17,808 | -84,5 |
| | | L2 | 2,95 | - | - | - |
| | 8 | L0 | 62,63 | 104388,80 | 104,389 | - |
| | | L1 | 20,21 | 16843,52 | 16,844 | -83,9 |
| | | L2 | 1,79 | - | - | - |
| Etanol | 9 | L0 | 74,00 | 123336,17 | 123,336 | - |
| | | L1 | 16,32 | 13597,91 | 13,598 | -89,0 |
| | | L2 | 0,95 | - | - | - |
| | 10 | L0 | 62,74 | 104564,24 | 104,564 | - |
| | | L1 | 18,00 | 15001,42 | 15,001 | -85,7 |
| | | L2 | 2,00 | - | - | - |
| Metanol | 11 | L0 | 68,95 | 114915,11 | 114,915 | - |
| | | L1 | 24,42 | 20352,29 | 20,352 | -82,3 |
| | | L2 | 1,48 | - | - | - |
| | 12 | L0 | 55,90 | 93160,73 | 93,161 | - |
| | | L1 | 17,16 | 14299,66 | 14,300 | -84,7 |
| | | L2 | 1,79 | - | - | - |

A partir dos dados apresentados, podemos concluir que, após sucessivas lavagens, ocorreu a diminuição da concentração de LI nas amostras a até 80% do valor inicial, para as amostras em contato com solução de 1 mg/mL de LI, e superiores a 82%, com apenas uma lavagem, para as amostras em contato com solução de 100 mg/mL. Entretanto, para a lavagem L1 da Amostra 3 uma redução de apenas 9,5% foi observada, o qual sugere a ocorrência de erro de procedimento na coleta do sobrenadante e/ou sua diluição. Além disso, devido a diluições excessivas, para as lavagens L2 das Amostras 7 a 12 foram obtidos valores inferiores ao limite do intervalo adequado para utilização da curva padrão, não sendo possível a determinação da concentração dessas amostras.

Além disso, é importante salientar que os valores de L0 para as Amostras 3 e 12 foram os únicos condizentes com as concentrações iniciais das soluções de LI adicionadas ao P(3HB), de 1 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente. Entretanto, para todas as amostras, o somatório da massa removida durante as lavagens foi superior a massa de LI adicionado inicialmente. Os valores superiores a concentração e a massa da solução adicionada podem estar associados a desvios durante procedimento de diluição das amostras, variações inerentes a metodologia de espectroscopia UV-Vis e, conseqüentemente, desvios devido a equação da curva padrão, assim como influência do etanol e metanol presente nas amostras que passaram por lavagem com esses solventes. Além disso, em análises realizadas previamente a este trabalho, uma pequena quantidade de ácido crotônico foi identificada nas amostras após contato do LI com o

P(3HB). Mojaverzadi et al. (2014) realizaram espectroscopia UV-Vis para PHA produzido por *P. oleovorans* e para o ácido crotônico solubilizados em clorofórmio e identificam pico de absorvância para essas substâncias entre 230 e 240 nm. Portanto, a presença de ácido crotônico junto as amostras de LI avaliadas em UV-Vis pode ser uma das causas para o aumento na absorvância, sendo necessária a varredura por comprimento de onda na região do UV para identificação desses picos.

Para validação dos resultados obtidos por espectroscopia UV-Vis, seguiu-se com análise em HPLC, conforme metodologia descrita na Seção 3.1. Devido ao tempo necessário para cada análise e o prazo disponível para finalização do presente trabalho, optou-se por não a realizar para as duplicatas. Os valores obtidos para as concentrações de LI por HPLC estão apresentados nas Tabelas 10 e 11 para as amostras em contato da solução de LI de concentrações de 1 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente, em comparação com os resultados obtidos por UV-Vis, assim como, a massa de LI removida em cada lavagem.

Tabela 10: Concentração e massa de LI nas lavagens das amostras em contato com solução de 1 mg/mL.

| Solvente | Amostra | Lavagem | Concentração UV-Vis (mg/L) [C1] | Massa LI UV-Vis (mg) | Concentração HPLC (mg/L) [C2] | Massa LI HPLC (mg) | Desvio (%) (C2-C1)/C1 |
|----------|---------|---------|---------------------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Milli-Q | 1 | L0 | 1052,67 | 1,053 | 360,99 | 0,361 | -65,71 |
| | | L1 | 375,47 | 0,375 | 213,50 | 0,213 | -43,14 |
| | | L2 | 278,98 | 0,558 | 56,64 | 0,113 | -79,70 |
| Etanol | 4 | L0 | 1015,83 | 1,016 | 428,08 | 0,428 | -57,86 |
| | | L1 | 605,29 | 0,605 | 302,75 | 0,303 | -49,98 |
| | | L2 | 200,03 | 0,400 | 72,57 | 0,145 | -63,72 |
| Metanol | 6 | L0 | 1021,10 | 1,021 | 342,75 | 0,343 | -66,43 |
| | | L1 | 621,08 | 0,621 | 264,80 | 0,265 | -57,36 |
| | | L2 | 277,22 | 0,554 | 49,42 | 0,099 | -82,17 |

Tabela 11: Concentração e massa de LI nas lavagens das amostras em contato com solução de 100 mg/mL.

| Solvente | Amostra | Lavagem | Concentração UV-Vis (mg/L) [C1] | Massa LI UV-Vis (mg) | Concentração HPLC (mg/L) [C2] | Massa LI HPLC (mg) | Desvio (%) (C2-C1)/C1 |
|----------|---------|---------|---------------------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Milli-Q | 7 | L0 | 114564,24 | 114,564 | 93288,66 | 93,289 | -18,57 |
| | | L1 | 17808,43 | 17,808 | 4845,96 | 4,846 | -72,79 |
| | | L2 | 2457,56 | 4,915 | 1162,86 | 2,326 | -52,68 |
| Etanol | 9 | L0 | 123336,17 | 123,336 | 97025,95 | 97,026 | -21,33 |
| | | L1 | 13597,91 | 13,598 | 9829,92 | 9,830 | -27,71 |
| | | L2 | 790,89 | 1,582 | 404,13 | 0,808 | -48,90 |
| Metanol | 11 | L0 | 114915,11 | 114,915 | 91667,89 | 91,668 | -20,23 |
| | | L1 | 20352,29 | 20,352 | 16505,14 | 16,505 | -18,90 |
| | | L2 | 1229,49 | 2,459 | 696,50 | 1,393 | -43,35 |

A partir dos resultados apresentados, é possível inferir que as amostras que estiveram em contato com solução de 1 mg/mL de LI apresentaram grandes desvios. Esses desvios podem estar relacionados a presença de ácido crotônico em todas as amostras, assim como a presença de etanol ou metanol nas amostras que passaram por lavagem com esses solventes. Além disso, devido as baixas concentrações nas lavagens L2 os resultados obtidos foram próximos, ou menores, ao limite inferior da curva padrão de HPLC utilizada resultando em maiores desvios. Porém, o somatório das massas removidas durante as lavagens foi condizente com a massa inicialmente adicionada de LI, tendo removido aproximadamente 0,7 mg para todos os solventes analisados.

Já para as amostras que estiveram em contato com solução de 100 mg/mL de LI esses desvios foram menores, que pode estar relacionado à menor presença de etanol ou metanol durante análise de UV-Vis devido a maior diluição da amostra em água Milli-Q. O grande desvio na lavagem L1 da Amostra 7 pode estar relacionado à maior solubilização do ácido crotônico em água Milli-Q do que nos demais solventes, sendo necessário novas análises para sua elucidação. É importante salientar que para as lavagens L2 das Amostras 7, 9 e 11 não foi possível a sua quantificação por UV-Vis devido a diluições excessivas e, conseqüentemente, valores de concentração fora da curva padrão.

Entretanto, apesar dos desvios observados, a redução nas concentrações obtidas por análise em HPLC confirma a eficiência das lavagens sucessivas para remoção do líquido iônico em contato com o biopolímero, sendo superior a 83% para as amostras em contato com solução de 1 mg/mL e superiores a 98% para as amostras em contato com solução de 100 mg/mL. Porém, para as Amostras 7, 9 e 11 o somatório das massas removidas durante as lavagens foi superior ao inicialmente adicionado de LI, possivelmente devido a valores próximos ao limite inferior de quantificação da curva padrão e/ou menor definição do pico característico em HPLC, mas, ainda assim, mais próximos ao valor de massa de LI adicionado do que aqueles observados por espectroscopia UV-Vis.

Para determinação da pureza do P(3HB) resultante procedeu-se com metodologia de propanólise e cromatografia gasosa, assim como descrito na Seção 3.2, e podem ser observadas na Tabela 12. Todas as corridas cromatográficas foram feitas em duplicatas e o valor considerado foi a média de ambos os resultados. A partir dos resultados, é possível ver inconsistência nos valores obtidos, visto que para todas as amostras, com exceção das de número 5, 9 e 11, a massa medida por CG-FID foi superior à massa pesada inicialmente. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido à quebra do líquido iônico em anel imidazólio e grupo alquil C₁₆ durante procedimento de propanólise ácida do P(3HB), levando a interferência nos sinais registrados na cromatografia, sendo necessário novos estudos para determinação dos mecanismos de reação e possíveis produtos formados (SIEDLECKA et al., 2011).

Tabela 12: Pureza obtida para amostras de P(3HB) após contato com solução de LI e sucessivas lavagens.

| 1 mg/mL | | | | 100 mg/mL | | | |
|---------|--------------------|--------------------|---------------|-----------|--------------------|--------------------|---------------|
| Amostra | m_{p_CG} (g) | m_{t_CG} (g) | Pureza (%) | Amostra | m_{p_CG} (g) | m_{t_CG} (g) | Pureza (%) |
| 1 | 0,0299 | 0,0315 | 105,4% | 7 | 0,0303 | 0,0332 | 109,5% |
| 2 | 0,0300 | 0,0333 | 111,0% | 8 | 0,0300 | 0,0311 | 103,7% |
| 3 | 0,0305 | 0,0350 | 114,9% | 9 | 0,0303 | 0,0298 | 98,3% |
| 4 | 0,0299 | 0,0325 | 108,8% | 10 | 0,0302 | 0,0340 | 112,5% |
| 5 | 0,0298 | 0,0280 | 94,5% | 11 | 0,0300 | 0,0265 | 88,3% |
| 6 | 0,0298 | 0,0322 | 108,1% | 12 | 0,0299 | 0,0299 | 100,0% |

Portanto, não foi possível determinar a pureza do biopolímero por metodologia de propanólise. Assim, faz-se necessário a realização de novos testes que elucidem a interferência do LI na precisão da metodologia de propanólise e cromatografia gasosa. Por exemplo, poderia ser realizada cromatografia em GC-MS para determinação da massa dos possíveis fragmentos formados.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

O presente trabalho teve como principais objetivos verificar interações do líquido iônico cloreto de 1-hexadecilimidazólio com o biopolímero poli(3-hidroxibutirato), além de avaliar metodologia para a quantificação do LI em solução por espectroscopia UV-Vis. A partir do desenvolvimento deste trabalho, foi possível chegar às seguintes conclusões:

1. Em relação aos testes para determinação de interações entre o LI e o polímero P(3HB), as sucessivas lavagens com água Milli-Q, etanol ou metanol se mostraram eficientes na remoção do LI após contato com o biopolímero, tendo redução na concentração de LI superiores a 80% para todos os solventes analisados.
2. O método testado para quantificação de cloreto de 1-hexadecilimidazólio, a partir de espectroscopia UV-Vis na região do UV apresentou resultados consistentes e com boa reprodutibilidade para faixa de concentração entre 10 e 100 mg/L em água Milli-Q e comprimento de onda de 212 nm. Entretanto, a influência do tipo de solvente, e possíveis traços presentes nas amostras, deve ser considerada nas análises, sendo necessária definição de novas curvas padrão e utilização de branco adequado.

Portanto, como sugestão para trabalhos futuros a partir dos resultados apresentados, uma investigação mais aprofundada da utilização do LI cloreto de 1-hexadecilimidazólio para a extração de P(3HB) intracelular é necessária. Das quais, análises de observação da ação do LI em células por microscopia óptica (aumento de 1000x) ou via microscopia eletrônica de varredura (MEV) ao longo do tempo

experimental de contato LI – células, assim como, otimização da concentração de LI para a ruptura da parede celular e maior recuperação do biopolímero são essenciais.

Entretanto, antes de estender o estudo à extração intracelular, se fazem necessárias novas análises, como FTIR e ^1H RMN, para quantificação da formação de ácido crotônico durante contato entre o LI e o biopolímero P(3HB), sendo essa uma das possíveis influências durante a quantificação do LI por metodologia de espectroscopia no UV-Vis.

Destaca-se também a necessidade de investigação mais aprofundada dos mecanismos reacionais do líquido iônico após processo de propanólise, através de análises de ^1H RMN, ^{13}C RMN, FTIR e GC-MS, visto a impossibilidade de determinação da pureza do biopolímero com a utilização dessa metodologia. Logo, também se faz necessária a realização de procedimento de propanólise e cromatografia gasosa em solução contendo apenas o LI para determinação de seus picos característicos e possível influência na análise de pureza de P(3HB).

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. I. et al. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of Production Process Technology. **Industrial Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 192–208, 2017.
- ARAMVASH, A. et al. An environmentally friendly and efficient method for extraction of PHB biopolymer with non-halogenated solvents. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1936–1943, 2015.
- ARAMVASH, A.; MOAZZENI ZAVAREH, F.; GHOLAMI BANADKUKI, N. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 1, p. 20–28, 2018.
- BUGNICOURT, E. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. **Express Polymer Letters**, v. 8, n. 11, p. 791–808, 2014.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v. 5, n. 9, p. 246–250, 1987.
- CANALES, R. I.; BRENNECKE, J. F. Comparison of Ionic Liquids to Conventional Organic Solvents for Extraction of Aromatics from Aliphatics. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 61, n. 5, p. 1685–1699, 2016.
- CAO, Y. et al. Quantification of Ionic Liquids Concentration in Water and Qualification of Conjugated and Inductive Effects of Ionic Liquids by UV Spectroscopy. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 42, n. 8, p. 1162–1169, 2014.
- CHEN, G.-Q. Production and Applications of Microbial Polyhydroxyalkanoates. **Biodegradable Polymers and Plastics**, 2003.
- CHEN, S. et al. Ionic liquid clusters: Structure, formation mechanism, and effect on the behavior of ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2014.
- PACHECO, M. **Universidade federal do Rio Grande Do Sul escola de engenharia departamento de engenharia química programa de pós-graduação em engenharia química**. Extração do biopolímero p(3hb) com solvente renovável. 2014.
- DICKINSON, Q. et al. Mechanism of imidazolium ionic liquids toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and rational engineering of a tolerant, xylose-fermenting strain. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, 2016.
- DOCHERTY, K. M.; KULPA, C. F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 185–189, 2005.
- DUBEY, S. et al. 1-Ethyl-3-methylimidazolium Diethylphosphate Based Extraction of Bioplastic “polyhydroxyalkanoates” from Bacteria: Green and Sustainable Approach. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 1, p. 766–773, 2018.
- EHSAN KIANFAR; SAJJAD MAFI. Ionic Liquids: Properties, Application, and Synthesis. **Fine Chemical Engineering**, p. 22–31, 2020.
- FERNANDES, M. M. et al. Ionic Liquids as Biocompatible Antibacterial Agents: A Case Study on Structure-Related Bioactivity on *Escherichia coli*. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 11, p. 5181–5189, 2022.

- FERREIRA DA SILVA, L. et al. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quim. Nova**, 2007.
- FILIPPI, S. et al. Extraction of polyhydroxyalkanoates from purple non-sulfur bacteria by non-chlorinated solvents. **Polymers**, v. 13, n. 23, 2021.
- FINDLAY, R. H.; WHITE, D. C. Polymeric Beta-Hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1983.
- GHANDI, K. A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 44–53, 2014.
- GHATNEKAR, M. S.; PAI, J.; GANESH, M. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp V49. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 444–448, 2002.
- GREAVES, T. L.; DRUMMOND, C. J. Protic ionic liquids: Properties and applications. **Chemical Reviews**, 2008.
- GU, Y.; LI, G. Ionic liquids-based catalysis with solids: State of the art. **Advanced Synthesis and Catalysis**, 2009.
- HANDY, S. T. Room Temperature Ionic Liquids: Different Classes and Physical Properties, 2023.
- HASSAN, R. et al. A comparative evaluation of antibacterial activities of imidazolium-, pyridinium-, and phosphonium-based ionic liquids containing octyl side chains. **Heliyon**, v. 8, n. 5, 2022.
- HAWKINS, C. A. et al. Rapid quantification of imidazolium-based ionic liquids by hydrophilic interaction liquid chromatography: Methodology and an investigation of the retention mechanisms. **Journal of Chromatography A**, v. 1400, p. 54–64, 2015.
- HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly(β -hydroxybutyrate) Recovery. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 5, p. 1519–1523, 2003.
- HOLMES, P. A. Biologically Produced (R)-3-Hydroxy- Alkanoate Polymers and Copolymers. Em: BASSETT, D. C. (Ed.). **Developments in Crystalline Polymers**. p. 1–65, 1988.
- IBRAHIM, N. I. et al. Overview of Bioplastic Introduction and Its Applications in Product Packaging. **Coatings**, v. 11, n. 11, 2021.
- IDRIS, A. et al. Distillable protic ionic liquids for keratin dissolution and recovery. ACS Sustainable Chemistry and Engineering. **American Chemical Society**, 2014.
- JIANG, X.; RAMSAY, J. A.; RAMSAY, B. A. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 2, p. 212–219, 2006.
- KOLLER, M. et al. Sugarcane as Feedstock for Biomediated Polymer Production. **Sugarcane: Production, Cultivation and Uses**. p. 105–136, 2012.
- KUBALL, H.-G.; HÖFER, T.; KIESEWALTER, S. Chiroptical Spectroscopy, General Theory. **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2017. p. 217–231, 2017.

- KUBERSKÝ, P. et al. An electrochemical NO₂ sensor based on ionic liquid: Influence of the morphology of the polymer electrolyte on sensor sensitivity. **Sensors**, v. 15, n. 11, p. 28421–28434, 2015.
- LEE, S. Y. et al. Production of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates by High-Cell-Density Cultivation of *Pseudomonas putida* Under Phosphorus Limitation. **Biotechnol Bioeng**, 2000.
- LI, Y. et al. Amphiphilic star copolymer-based bimodal fluorogenic/magnetic resonance probes for concomitant bacteria detection and inhibition. **Advanced Materials**, v. 26, n. 39, p. 6734–6741, 2014.
- ŁUCZAK, J. et al. Thermodynamics of micellization of imidazolium ionic liquids in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 336, n. 1, p. 111–116, 2009.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 1999.
- MARSH, K. N.; BOXALL, J. A.; LICHTENTHALER, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures - A review. **Fluid Phase Equilibria**, 2004.
- MICHALSKI, J. et al. Defeat undefeatable: Ionic liquids as novel antimicrobial agents. *Journal of Molecular Liquids*. **Elsevier B.V**, 2023.
- MOJAVERYAZDI, F. S. et al. Importance of Glucose and *Pseudomonas* in Producing Degradable Plastics. **Jurnal Teknologi**, v. 69, n. 5, 2014.
- MORSY, M. A.; CASKEY, C. T. Safe gene vectors made simpler. **Nat Biotechnol**, 1997.
- MUN, J.; SIM, H. **Handbook of Ionic Liquids: Properties, Applications and Hazards**. 2012.
- PASZKIEWICZ, M.; STEPNOWSKI, P. How Should Ionic Liquids be Analyzed. **Current Organic Chemistry**, 2011.
- PEREIRA, C. et al. Mitochondria-dependent apoptosis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 2008.
- 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, 2001.
- QUINES, L. K. et al. Extração de poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB)), produzido por *Cupriavidus necator*, com carbonato de propileno e ultrassom. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, 2015.
- QUINES, L. K. M. et al. Métodos de extração de poli-hidroxi-alcenoatos a partir de biomassa bacteriana. **Quimica Nova**, 2015.
- REDDY, C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137–146, 2003.
- REID, J. E. S. J. et al. Green profiling of aprotic versus protic ionic liquids: Synthesis and microbial toxicity of analogous structures. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 7, p. 17–26, 2018.

- RIEDEL, S. L. et al. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 461–470, 2013.
- RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography A**, v. 445, p. 285–289, 1988.
- ROSENGART, A. et al. Efficient P(3HB) extraction from *Burkholderia sacchari* cells using non-chlorinated solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 39–46, 2015.
- SANTOS, E.; ALBO, J.; IRABIEN, A. Magnetic ionic liquids: Synthesis, properties and applications. **RSC Advances**, 2014.
- SHELDON, R. A. et al. Biocatalysis in ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 147–151, 2002.
- SHEN, L.; HAUFE, J.; PATEL, M. K. Product overview and market projection of emerging bio-based plastics **PRO-BIP 2009 Utrecht**, 2009.
- SIEDLECKA, E. M. et al. Ionic Liquids: Methods of Degradation and Recovery. *Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches*. **InTech**, 2011.
- STEPNOWSKI, P.; MROZIK, W. Analysis of selected ionic liquid cations by ion exchange chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 2, p. 149–154, 2005a.
- STEPNOWSKI, P.; MROZIK, W. Analysis of selected ionic liquid cations by ion exchange chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 2, p. 149–154, 2005b.
- SUZUKI, D. et al. Purification of polyhydroxybutyrate produced by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 771–775, 2008.
- THOMAS, E. et al. 1-Hexadecyl-3-methylimidazolium chloride: Structure, thermal stability and decomposition mechanism. **Journal of Molecular Liquids**, v. 249, p. 404–411, 2018.
- TOKUDA, H. et al. Physicochemical properties and structures of room temperature ionic liquids. 2. variation of alkyl chain length in imidazolium cation. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 13, p. 6103–6110, 2005.
- TOLEDO HIJO, A. A. C. et al. Applications of Ionic Liquids in the Food and Bioproducts Industries. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, 2016.
- VENTURA, S. P. M. et al. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chemical Reviews*. **American Chemical Society**, 2017.
- VERDÍA, P. et al. Fractionation of lignocellulosic biomass with the ionic liquid 1-butylimidazolium hydrogen sulfate. **Green Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1617–1627, 2014.
- WASSERSCHIED, P.; KEIM, W. Ionic Liquids—New “Solutions” for Transition Metal Catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 21, p. 3772–3789, 2000.

- YANG, Y.-H. et al. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). **Biotechnol Lett**, v. 33, n. 5, 2011.
- YARBOROUGH, V. A.; HASKIN, J. F.; LAMBDIN, W. J. Temperature Dependence of Absorbance in Ultraviolet Spectra of Organic Molecules. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 1576–1578, 1954.
- ZHANG, J. et al. Application of ionic liquids for dissolving cellulose and fabricating cellulose-based materials: State of the art and future trends. **Materials Chemistry Frontiers**, 2017.
- ZHANG, S. Y. et al. Poly(ionic liquid) composites. **Chemical Society Reviews**, 2020.
- ZHENG, Y. et al. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. **Metabolic Engineering**, 2020.
- ZHENG, Z. et al. Structure-Antibacterial Activity Relationships of Imidazolium-Type Ionic Liquid Monomers, Poly(ionic liquids) and Poly(ionic liquid) Membranes: Effect of Alkyl Chain Length and Cations. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 20, p. 12684–12692, 2016.
- ZHOU, J. et al. Recovery and purification of ionic liquids from solutions: A review. **RSC Advances**, 2018.
- ZHOU, W. et al. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. **Journal of Environmental Management**, 2023.