

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VANESSA SANTANA VIEIRA SANTOS

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE TENSOATIVOS  
DE ORIGEM QUÍMICA E BIOLÓGICA**

PATOS DE MINAS - MG

JULHO DE 2018

VANESSA SANTANA VIEIRA SANTOS

# **AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE TENSOATIVOS DE ORIGEM QUÍMICA E BIOLÓGICA**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia.

**Prof. Dr. Edgar Silveira Campos**

PATOS DE MINAS - MG

JULHO DE 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S237a      Santos, Vanessa Santana Vieira, 1991-  
2018      Avaliação ecotoxicológica de tensoativos de origem química e  
biológica / Vanessa Santana Vieira Santos. - 2018.  
69 f. : il.

Orientador: Edgar Silveira Campos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1164>  
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia - Teses. 2. Saúde ambiental - Teses. 3. Toxicologia  
ambiental - Teses. I. Campos, Edgar Silveira. II. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

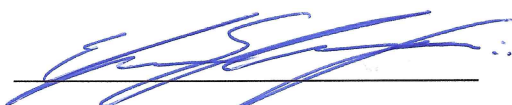
CDU: 60

# AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE TENSOATIVOS DE ORIGEM QUÍMICA E BIOLÓGICA

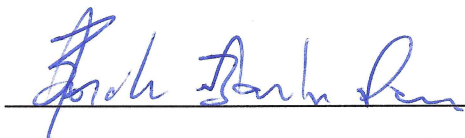
Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre  
em Biotecnologia.

Aprovado em 20/07/18

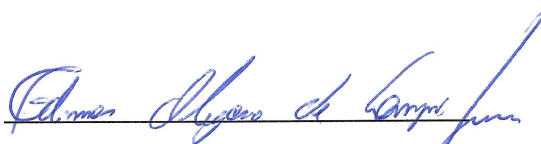
## BANCA EXAMINADORA



Prof. Edgar Silveira Campos



Prof. Boscolli Barbosa Pereira



Prof. Edimar Olegário de Campos Júnior

PATOS DE MINAS - MG

JULHO DE 2018

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela dádiva da vida, pelo amparo e por cada conquista alcançada.

Aos meus pais, Roberto e Mariza, pela confiança, incentivo e incansável apoio aos meus estudos. Meus exemplos de luta e persistência. Amo vocês!

À minha irmã, Bia, pela prática da psicologia reversa como forma dura de me incentivar, porém eficiente e descontraída.

Ao Prof. Dr. Edgar, por ter aceitado prontamente em me orientar e pela confiança depositada. Obrigada pelo apoio, compreensão e disponibilidade ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Boscolli, meu grande referencial, cujos ensinamentos transcendem o campo acadêmico. Obrigada pela confiança, parceria, amizade e por direcionar tão bem meu caminho profissional.

À Coordenação do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, em especial às Profs. Enyara e Cristina pela presteza e cordialidade, e ao Aparecido, por toda a ajuda concedida.

Aos amigos da minha adorável turma B3, por todos os anos de convivência e união. A todos os amigos que estão sempre presentes e torcem por mim, em especial à Nathiele, pela convivência diária e por todo o auxílio, à Natália e à Stéfani pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite e por todas as contribuições dispensadas.

À CAPES pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Uberlândia por permitir a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram ativamente para que essa etapa fosse concluída.

Muito obrigada!

## Resumo

A utilização em escala global e crescente liberação de tensoativos nos ecossistemas provoca o acúmulo de resíduos no ambiente, os quais alteram a característica original do meio e cujo potencial de impacto sobre os organismos permanece pouco conhecido e mal caracterizado. A ecotoxicologia é primordial na avaliação do impacto de compostos tóxicos sobre os sistemas biológicos. A espécie de microcrustáceo *Daphnia magna* é considerada um dos principais organismos-modelo de ensaios ecotoxicológicos padronizados. Porém, é importante considerar a utilização de espécies autóctones, como *Dendrocephalus brasiliensis*, em estudos realizados em regiões tropicais, pois estas estão adaptadas às especificidades do ecossistema local e fornecem resultados realísticos. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a segurança ecotoxicológica de tensoativos de origem química - dodecil sulfato de sódio e Triton X-100 - e de tensoativos de origem biológica - surfactina, iturina e fengicina – em diferentes concentrações empregando *D. magna* como organismo-modelo e *D. brasiliensis* como espécie representativa de regiões tropicais. De acordo com os resultados dos testes toxicológicos, *D. brasiliensis* demonstrou valores de  $EC_{50-48h}$  menores em comparação à *D. magna* para todos os compostos testados, indicando maior sensibilidade da espécie tropical em relação à espécie originária de regiões temperadas. O lipopeptídeo surfactina demonstrou baixa toxicidade, indicando que mesmo compostos biológicos podem provocar efeitos deletérios nos cladóceros testados. Por outro lado, os resultados dos bioensaios revelaram um comportamento ambientalmente seguro dos tensoativos biológicos fengicina e iturina. Já os tensoativos químicos provocaram imobilidade em ambas as espécies mesmo em baixas concentrações. De acordo com dados de concentração de uso recomendada, o tensoativo SDS apresentou maior efeito de toxicidade às espécies *D. magna* e *D. brasiliensis*. Os resultados confirmam efeito dependente da concentração utilizada de todos os tensoativos avaliados, os quais podem provocar efeitos adversos sobre o ecossistema aquático nas respectivas concentrações de uso. A maior capacidade de resposta de *D. brasiliensis* evidencia a espécie como uma promissora alternativa a ser utilizada em ensaios ecotoxicológicos considerando regiões tropicais.

**Palavras-chave:** Tensoativo; Biossurfactantes; Teste de toxicidade aguda; Saúde ambiental; Ecotoxicologia.

## Abstract

The employment on a global scale and the increasing release of surfactants on the ecosystems cause the accumulation of their residues on environment, consequently altering its original characteristics and whose potential impacts on organisms remain not elucidated. Ecotoxicology is an essential science regarding the assessment and knowledge about the impact of toxic compounds on biological systems. The waterflea *Daphnia magna* is one of the most sensitive species of ecotoxicological standardized assays. However, it is also important to consider the use of autochthonous species, such as *Dendrocephalus brasiliensis*, in studies performed in tropical regions, since they attend the specificities of local ecosystems and provide realistic results. In this sense, the aim of this study was to evaluate the ecotoxicological parameters for chemical surfactants – sodium dodecyl sulphate and Triton X-100 – and biogenic surfactants – surfactin, iturin and fengycin – at different concentrations using *D. magna* as model organism and *D. brasiliensis* as the representative species of tropical freshwaters. Data obtained through acute toxicity tests revealed a dose-dependent for all chemicals. *D. brasiliensis* showed lower EC<sub>50-48h</sub> values than *D. magna* considering all the tested compounds, indicating a higher sensitivity of the tropical species in relation to the species from temperate regions. The results confirmed an environmentally safe behaviour of fengycin and iturin. Nevertheless, surfactin was the less safety biosurfactant for both organisms, indicating that even biological compounds are able to cause deleterious effects on living organisms. Also, the synthetic surfactants exhibited high toxicity effects, as the compounds showed immobility impacts on both species even in low concentrations. Evaluations considering the recommended dosage revealed a higher toxicity of SDS for both species. The higher responsiveness of *D. brasiliensis* highlights the organism as a promising tool for ecotoxicological studies regarding tropical climates.

**Keywords:** Surfactants; Biosurfactants; Acute toxicity test; Environmental health; Ecotoxicology.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## CAPÍTULO I

<b>Fig. 1.</b> Comportamento dos tensoativos entre as fases fluida e superficial em função da tensão.....	06
<b>Fig. 2.</b> Estrutura química do SDS .....	08
<b>Fig. 3.</b> Fórmula estrutural do Triton X-100.....	09
<b>Fig. 4.</b> Estrutura cíclica da surfactina.....	13
<b>Fig. 5.</b> Estrutura da isoforma iturina.....	15
<b>Fig. 6.</b> Estrutura química da fengicina.....	16
<b>Fig. 7.</b> Microcrustáceo cladóceros de origem temperada <i>Daphnia magna</i> .....	20
<b>Fig. 8.</b> Microcrustáceo anostraco de origem subtropical e tropical <i>Dendrocephalus brasiliensis</i> .....	21



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1:</b> Composição nutricional de <i>Dendrocephalus brasiliensis</i> em comparação a outros crustáceos.....	23
--	----

### CAPÍTULO II

<b>Table 1:</b> Physico-chemical properties of the surfactants and biosurfactants tested for the acute toxicity assays.....	30
---	----

<b>Table 2:</b> Estimated median effective concentrations ( $EC_{50-24hr}$ and $EC_{50-48hr}$ ) values and 95% confidence intervals (CIs) of the surfactants and biosurfactants tested for <i>D. magna</i> and <i>D. brasiliensis</i> .....	32
---	----

<b>Table 3:</b> Ecotoxicological parameters and environmental risk assessment obtained from acute toxicity tests after exposure of chemicals on the <i>D. magna</i> species and <i>D. brasiliensis</i> .....	33
--	----

<b>Table 4:</b> Comparison of $EC_{50}$ values (48h) for the toxicity of selected compounds obtained from literature for different non target invertebrates and <i>D. magna</i> and <i>D. brasiliensis</i> (tested in this study).....	33
--	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA – Análise de Variância

CAS – Chemical Abstract Service

CE<sub>50</sub> – Concentração Efetiva Média

CENO – Concentração de Efeito Não Observado

CEO – Concentração de Efeito Observado

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

FDA – Food and Drug Administration

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

pH – Potencial hidrogeniônico

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

# SUMÁRIO

## 1. Capítulo I

<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Problema de Pesquisa .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Hipóteses .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Objetivos .....</b>	<b>3</b>
1.3.1. Objetivo Geral .....	3
1.3.2. Objetivos Específicos .....	3
<b>1.4. Justificativa.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Referencial Teórico.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Tensoativos Químicos .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Micelização .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Classificação e caracterização dos tensoativos .....</b>	<b>7</b>
2.3.1 Dodecil sulfato de sódio (SDS) .....	7
2.3.2. Triton X-100.....	9
<b>2.4. Tensoativos Biológicos .....</b>	<b>10</b>
<b>2.5. Gênero <i>Bacillus</i> na síntese de tensoativos lipopeptídeos .....</b>	<b>11</b>
2.5.1. Surfactina .....	12
2.5.2. Iturina .....	14
2.5.3. Fengicina .....	15
<b>2.6. A ecotoxicidade dos tensoativos químicos e biológicos.....</b>	<b>16</b>
<b>2.7. Ensaios de toxicidade e organismos-teste na ecotoxicologia .....</b>	<b>18</b>
2.7.1. Caracterização da espécie <i>Daphnia magna</i> .....	19
2.7.2. Caracterização da espécie <i>Dendrocephalus brasiliensis</i> .....	20

## 2. Capítulo II

Ecotoxicological assessment of synthetic and biogenic surfactants using freshwater cladoceran species .....	24
<b>Conclusões.....</b>	<b>41</b>
<b>Referências .....</b>	<b>42</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>54</b>

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi escrito conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

O estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros ecotoxicológicos de tensoativos de origem química e biológica em diferentes concentrações empregando as espécies de microcrustáceos *Daphnia magna* e *Dendrocephalus brasiliensis* originárias de clima temperado e tropical, respectivamente.

Para tanto, em seu Capítulo I, o texto dessa dissertação contempla uma análise conceitual e caracterização dos tensoativos químicos e biológicos utilizados, além de descrever a Ecotoxicologia como ciência, evidenciando a necessidade de explorar os efeitos ecotoxicológicos de diferentes compostos sobre os organismos vivos.

Fundamentados pelo primeiro capítulo, o Capítulo II apresenta o artigo experimental intitulado “Ecotoxicological assessment of synthetic and biogenic surfactants using freshwater cladoceran species”, o qual abrange os resultados obtidos a partir dos ensaios de toxicidade aguda e os discute com base em estudos previamente publicados.

O Capítulo I, composto pelo referencial teórico, foi escrito em português. O Capítulo II foi escrito no formato de artigo científico, em língua inglesa, de acordo com as normas do periódico ao qual foi submetido.

## Capítulo I

---

### INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Problema de Pesquisa

Tensoativos, também denominados surfactantes, são agentes ativos de superfície cuja obtenção se dá por processos químicos industriais ou por síntese biológica (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BOTTCHE; DRUSCH, 2017). A estrutura desses compostos é constituída por uma porção hidrofílica ligada a uma porção hidrofóbica, caracterizando uma estrutura global anfipática. Assim, os tensoativos são capazes de reduzir a energia livre do sistema, substituindo grande parte das moléculas de alta energia na interface e reduzindo, consequentemente, a tensão superficial e interfacial dos líquidos (PRADHAN; BHATTACHARYYA, 2017).

A característica estrutural concede aos tensoativos propriedades de emulsificação, detergência, umidificação, solubilização, lubrificação e dispersão de fases (COLLA; COSTA, 2003), viabilizando-os para que sejam amplamente empregados em diversos setores industriais (DAS *et al.*, 2017). No entanto, devido à origem petroquímica, os compostos sintéticos apresentam efeitos de toxicidade sobre organismos vivos e resistência à degradabilidade (DEVELTER; FLEURACKERS, 2010; JOHANN *et al.*, 2016). A disseminação de xenobióticos no meio aquático é fator de preocupação, não apenas devido às suas especificidades químicas e físicas, mas também quanto à liberação em quantidades crescentes de compostos e misturas complexas cujas propriedades e agravantes permanecem desconhecidos (ROSAL *et al.*, 2010).

Diante desse cenário, os tensoativos biológicos, ou biosurfactantes, surgem como alternativas biotecnológicas viáveis no sentido de competir com seus análogos químicos (PAULINO *et al.*, 2016). Porém, fatores como custo de produção e capacidade de rendimento devem ser otimizados a fim de que sua síntese seja vantajosa em escala industrial (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Resíduos de tensoativos têm sido amplamente encontrados nos ecossistemas aquáticos. A toxicidade de tais compostos se deve à capacidade de permeabilização na membrana celular de organismos vivos (MUNGRAY; KUMAR, 2008), fato este que pode provocar efeitos deletérios e irreversíveis, como despolarização e rompimento da membrana, inibição da respiração celular em microrganismos (GREGOROVÁ *et al.*, 1996), danos no crescimento e redução da capacidade de fixação do nitrogênio em cianobactérias (TÖZÜM-CALGAN; ATAY-GÜNEYMAN, 1994), alteração no

conteúdo lipídico e protéico de peixes (ROY, 1988) e perturbação da atividade enzimática e metabólica (CSERHÁTI et al., 2002).

Nesse sentido, torna-se necessária a análise do efeito de tensoativos de origem química e biológica no ambiente, mensurando o espectro de sua influência nos ecossistemas aquáticos. Nos últimos anos, a Ecotoxicologia vem emergindo como uma ciência estratégica para a investigação de efeitos adversos de compostos. Substâncias muito utilizadas pela indústria exigem uma análise de seu descarte no ambiente, além de uma caracterização ecotoxicológica (JOHANN *et al.*, 2016). Tais análises são empregadas também no monitoramento de efluentes industriais, a fim de minimizar o impacto ambiental e como requisito para a obtenção e manutenção de licenças perante os órgãos ambientais (SOUSA, 2002).

## **1.2. Hipóteses**

Diante do cenário de contínuo descarte de resíduos de tensoativos no ambiente, cujo destino final é o meio aquático, faz-se necessária a análise dos potenciais riscos toxicológicos desses compostos. Neste sentido, determinadas espécies de microcrustáceos são altamente utilizadas como organismos-modelo na condução de ensaios de toxicidade agudos e crônicos, uma vez que apresentam morfologia, estrutura e taxonomia elucidadas e, por vezes, o genoma completamente sequenciado (SANDBACKA; CHRISTIANSON; ISOMAA, 2000).

Análises químicas isoladas deixaram de ser eficientes no alcance de avaliações de risco satisfatórias em amostras ambientais, uma vez que não informam a fração de contaminantes disponível para os organismos nem seu potencial de efeito quando em misturas. Com isso, supõe-se que a realização de ensaios ecotoxicológicos utilizando organismos-modelo e organismos encontrados no nosso próprio ecossistema forneçam um retrato fiel do impacto dos surfactantes no ambiente, e permita determinar uma concentração padrão de uso para espécies do ecossistema brasileiro.

Além disso, os biossurfactantes lipopeptídeos surgem como substitutos viáveis dos seus análogos químicos, devido às inerentes propriedades tensoativas, antibactericidas e antifúngicas. Em teoria, esses compostos demonstram maior segurança ambiental devido à origem biológica a partir de *Bacillus subtilis*. Ensaios de toxicidade aguda permitiriam a comprovação de que tais compostos apresentam comportamento ambientalmente seguro.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a segurança ecotoxicológica de diferentes tensoativos de origem química e biológica.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

Determinar a toxicidade aguda dos tensoativos químicos dodecil sulfato de sódio e Triton X-100 sobre as espécies *Daphnia magna* e *Dendrocephalus brasiliensis*.

Determinar a toxicidade aguda dos tensoativos biológicos surfactina, fengicina e iturina sobre as espécies *Daphnia magna* e *Dendrocephalus brasiliensis*.

Avaliar a sensibilidade do organismo-modelo *Daphnia magna* e da espécie nativa de nosso ecossistema *Dendrocephalus brasiliensis*.

Avaliar o risco ambiental dos tensoativos químicos e biológicos em relação às suas concentrações de uso considerando as espécies testadas.

### **1.4. Justificativa**

O conhecimento e a compreensão das fontes de poluição, além de suas interações e efeitos, são fundamentais para seu controle no ambiente, a fim de garantir segurança e promover a sustentabilidade. No cenário atual, o intenso estímulo à produção industrial e agrícola, impulsionado pelo crescimento populacional, e a busca por melhor qualidade de vida têm gerado uma quantidade crescente de resíduos que, muitas vezes, são descartados de forma incorreta no ambiente.

Análises físico-químicas não são suficientes para investigar o efeito de substâncias tóxicas no ambiente. Portanto, ensaios ecotoxicológicos são fundamentais na avaliação dos impactos de poluentes sintéticos ou biológicos. Nesse sentido, a Ecotoxicologia, ciência a qual estuda os efeitos de compostos sobre os organismos vivos, é essencial na análise de potenciais efeitos deletérios provocados por tais estressores, além de estimar sua toxicidade em relação aos organismos empregados.

Embora biodegradáveis, os efeitos dos tensoativos biogênicos permanecem desconhecidos no ecossistema e demandam ensaios para a caracterização dos seus



impactos. Apesar de serem de origem biológica, tal fato não garante que estes compostos estejam isentos de provocar efeitos deletérios sobre os organismos vivos.

Além disso, o conhecimento dos efeitos toxicológicos sobre organismos de origem tropical é essencial, uma vez que estes fornecem dados realísticos sobre o impacto de poluentes e atendem às especificidades do ecossistema local.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Tensoativos Químicos**

Tensoativos, também conhecidos como surfactantes, são agentes químicos ativos de aplicação industrial diversa. Sua estrutura global é constituída por uma cadeia de hidrocarbonetos de tamanho variável acoplada a diferentes grupos polares, sendo a porção hidrofílica constituída por ésteres, hidroxilas, fosfatos, carboxilas ou carboidratos, e a porção hidrofóbica por proteínas, peptídeos ou lipídeos, os quais apresentam diferentes graus de insaturação (LECHUGA et al., 2016). A conformação estrutural concede aos tensoativos a tendência de se concentrarem na interface de dois líquidos imiscíveis, sobre a qual eles substituem grande parte das moléculas de alta energia e reduzem a tensão superficial e interfacial dos líquidos, evidenciando assim sua capacidade de reduzir a energia livre do sistema (MULLIGAN, 2005; PRADHAN; BHATTACHARYYA, 2017).

Devido à sua natureza anfipática, os tensoativos apresentam propriedades de emulsificação, detergência, umidificação, solubilização, lubrificação e dispersão de fases (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000), sendo, portanto, amplamente utilizados na indústria agroquímica, de cosméticos, óleos lubrificantes, detergentes, formulações farmacêuticas, na cerâmica, no tratamento de têxteis, no processamento de alimentos, além de estarem envolvidos em processos de biorremediação, sistemas de liberação de fármacos e na produção de petróleo (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; KUMAR; TYAGI, 2014; DAS et al., 2017).

Os tensoativos são, em sua maioria, obtidos a partir de derivados do petróleo. Nos países desenvolvidos, por exemplo, 75% desses compostos são de origem petroquímica (ANIS et al., 2017). O amplo uso nos âmbitos industrial, comercial e doméstico reflete-se no relevante impacto à economia. Em 2012, o mercado mundial de tensoativos gerou cerca de 26,9 milhões de dólares. Estima-se ainda uma taxa de crescimento anual de 1 - 5% no consumo desses produtos entre 2015 à 2020 (IHS MARKIT, 2016). No entanto, a

utilização do petróleo como matéria-prima tem sido um dos principais problemas ambientais dos últimos anos, cujos efeitos negativos de impacto imediato e a longo prazo refletem na saúde populacional e ambiental (CRAPÉZ et al., 2000).

Estima-se que os tensoativos compõem entre 15 – 40% das formulações de produtos de higiene pessoal e detergentes, por exemplo. Após o uso, esses compostos são descartados, os efluentes liberados nas águas superficiais e, por fim, são dispersos no ambiente. Devido à origem petroquímica, os tensoativos apresentam relativo grau de toxicidade e resistência à degradabilidade, os quais diferem em relação ao destino e comportamento no meio (YING, 2005).

## **2.2. Micelização**

A capacidade de formação de micelas em solução é uma característica fundamental dos tensoativos. Essa propriedade ocorre devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na sua estrutura molecular, responsável por conferir-lhes propriedades de detergência e solubilização (YING, 2005). Em baixas concentrações, os tensoativos atuam como eletrólitos e existem na forma de monômeros, estando orientados preferencialmente nas interfaces, de modo a reduzir a tensão interfacial. O aumento da concentração do tensoativo pode reduzir a tensão interfacial até um valor limite, o qual determina sua saturação. A partir dessa concentração, a energia livre do sistema pode ser reduzida pela agregação das moléculas em estruturas denominadas micelas, e seu aparecimento ocorre num valor de concentração denominado concentração micelar crítica (CMC) (SILVA, 2008). A Figura 1 demonstra a formação micelar de acordo com a concentração do tensoativo em função da tensão superficial:

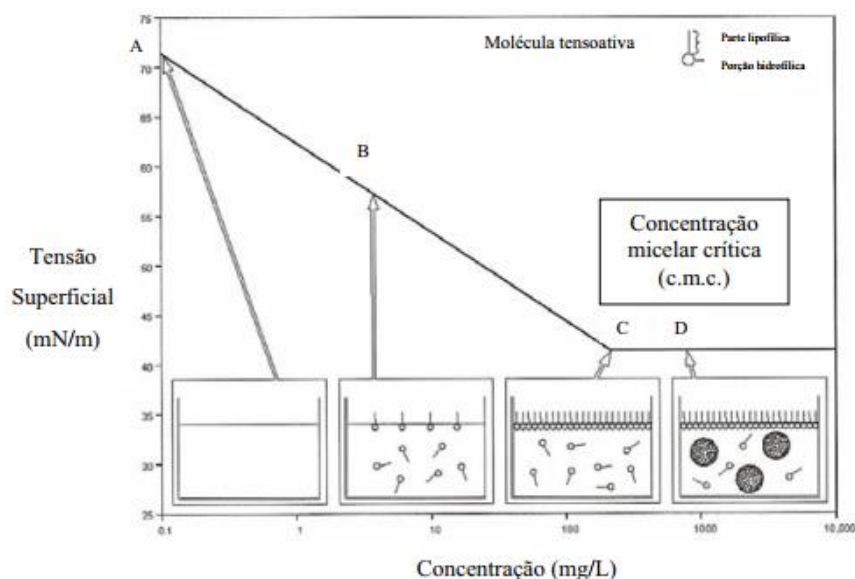


Figura 1 – Comportamento dos tensoativos entre as fases fluida e superficial em função da tensão (SANTOS et al., 2007).

No ponto A, não há presença de tensoativo no meio aquoso. O ponto B representa a formação de monômeros após a adição do composto e, no ponto C, já em maior concentração de tensoativo, ocorre a saturação da interface. A partir desse ponto, a tensão superficial não é mais alterada, e a adição de mais tensoativo culmina no fenômeno de micelização. Assim, a tensão superficial está correlacionada à concentração do tensoativo no meio. A concentração micelar crítica (CMC), portanto, representa o menor valor de concentração na qual começa a ocorrer a formação dessas estruturas. As micelas são termodinamicamente estáveis e formadas espontaneamente, e o valor de CMC caracteriza a eficiência do tensoativo, pois menores valores de CMC demandam uma baixa quantidade de tensoativo capaz de reduzir ao máximo a tensão interfacial (MULLIGAN, 2005; FENEUIL; PITOIS; ROUSSEL, 2017).

A CMC é influenciada basicamente pela natureza do tensoativo, temperatura e força iônica, e seu valor é determinado através da variação de propriedades físico-químicas, como condutividade, tensão interfacial ou superficial e pressão osmótica (ZDZIENNICKA et al., 2012). Em soluções polares, as micelas apresentam a porção hidrofóbica voltada para o centro, caracterizando-as como micelas diretas. Em meio apolar, a porção polar da molécula se agrupa em seu interior, enquanto as caudas hidrofóbicas permanecem voltadas para o meio, caracterizando a micela inversa (FELIPE; DIAS, 2017).

## **2.3. Classificação e caracterização dos tensoativos**

Os tensoativos são divididos basicamente em quatro diferentes classes de acordo com a natureza do grupamento hidrofílico: aniônicos, catiônicos, não-iônicos e zwitteriônicos (ADAK; BANDYOPADHYAY; PAL, 2005; AHMADI; SHADIZADEH, 2012). Os tensoativos aniônicos possuem região polar com carga negativa, os catiônicos região polar com carga positiva e os não-iônicos não apresentam cargas. Já os tensoativos zwitteriônicos apresentam duplo caráter iônico, cujo grupo hidrofílico pode estar carregado positiva ou negativamente, condição determinada pelo pH do meio, na qual baixos valores discriminam seu comportamento catiônico e em elevados valores apresentam-se como tensoativos aniônicos (CURBELO, 2006; SILVA, 2008).

Os tensoativos aniônicos e não-iônicos representam o primeiro e segundo subsegmento, respectivamente, em relação à relevância na economia. Os tensoativos aniônicos vêm sendo muito utilizados na indústria biotecnológica, em cosméticos e na indústria farmacêutica, uma vez que são capazes de se ligar a compostos ativos de formulações direcionando o fármaco ou aprimorando sua absorção e adsorção nos órgãos correspondentes (CSERHÁTI et al., 2002; YUSHIMANOV et al., 1994). Um exemplo prevalente dentre a classe dos aniônicos é o dodecil sulfato de sódio (SDS) (CURBELO, 2006).

Já a classe dos tensoativos não-iônicos apresenta características peculiares, cujas propriedades são pouco afetadas pelo pH, o que os tornam atrativos à indústria, além de serem compatíveis quimicamente com a maioria dos tensoativos. Eles são amplamente utilizados como agentes umidificantes, emulsificantes, estabilizadores de espuma, além de serem empregados em formulações de pesticidas (LECHUGA et al., 2016). Os tensoativos não-iônicos também apresentam propriedades interessantes à biologia molecular, uma vez que são capazes de proteger a conformação das proteínas do desdobramento induzido por tensoativos aniônicos (OTZEN, 2011). Embora o SDS seja capaz de provocar a desnaturação protéica, a adição de tensoativos não-iônicos no meio induz o redobramento de sua estrutura (KASPERSEN et al., 2017). Essa classe têm como um dos principais representantes comercializados tensoativos da classe Triton.

### **2.3.1 Dodecil sulfato de sódio (SDS)**

O tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS) é sintetizado a partir do álcool láurico e do ácido sulfúrico por uma reação de sulfonação, e apresenta massa molar de 288,3

g/mol. O SDS é uma molécula linear (Figura 2), de fórmula estrutural  $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ , a qual contém uma cadeia de 12 carbonos caracterizando a cauda apolar, ligados a um grupamento sulfato, representando a extremidade polar, conferindo-lhe as propriedades anfipáticas (REBELLO et al., 2014).

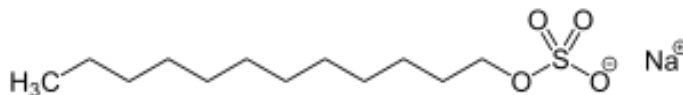


Figura 2 – Estrutura química do SDS

Sua principal aplicação é na indústria dos detergentes, produtos de higiene pessoal e limpeza, sendo amplamente empregado em formulações de shampoos, pastas de dente, sabões, sabonetes e óleos lubrificantes, cujas concentrações variam entre 1 – 50% da formulação total (SINGER; TJEERDEMA, 1993; KETOLA, 2016). Além disso, devido às suas propriedades físico-químicas, o SDS liga-se fortemente às moléculas carregadas positivamente e em resíduos hidrofóbicos de proteínas, referente ao sulfato e à cadeia alquílica presente em sua estrutura, respectivamente (HANSEN et al., 2009). Assim, o composto é um importante detergente também na biologia celular e molecular, como em estudos estruturais de moléculas, sendo capaz de induzir a formação de  $\alpha$ -hélices em proteínas, promover o dobramento e desdobramento protéico (OTZEN; OLIVEBERG, 2002), e auxiliar na extração de DNA e separação de biomoléculas (RATH et al., 2007).

O SDS é também um tensoativo utilizado em processos de remediação de solos contaminados. A adição de tensoativos pode melhorar a solubilização de muitos compostos orgânicos hidrofóbicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), bifenilas policloradas (PCBs) e hidrocarbonetos clorados, e ocasionar a desorção de metais pesados, como cádmio, chumbo e zinco (DOONG; WU; LEI, 1998).

No entanto, é importante ressaltar que diversas formulações e produtos farmacêuticos contêm tensoativos em sua composição, o que pode provocar irritação, toxicidade cutânea, e reações imunológicas em humanos (LÉMERY et al., 2015). A Sociedade Americana de Câncer nega que o SDS possa ser carcinogênico aos vertebrados superiores, indicando que a toxicidade desse tensoativo seja baixa nos humanos e animais selvagens (DOYLE, 2010). Por outro lado, alerta-se que seu consumo diário seja de aproximadamente 5 mg/pessoa, decorrente do uso de detergentes, produtos de higiene pessoal, alimentos e água potável (REBELLO et al., 2014), fato este que demanda cautela e cujos efeitos negativos devem ser investigados em relação aos humanos e animais.

Pesquisas já realizadas concluíram que tensoativos como o SDS afetam primeiramente o crescimento, a motilidade e a capacidade fotossintética das algas, sendo o impacto da toxicidade dependente do tipo e concentração do composto e do organismo (LEWIS, 1990). O SDS, mesmo nas concentrações de 0,1 mg/mL, provoca inibição da reprodução de *Closterium ehrenbergii*, impedindo a formação do zigoto ou resultando em esporos anormais (MATSUI; PARK, 2000). Diante desse cenário, ensaios toxicológicos revelariam o possível impacto e efeitos deste tensoativo sobre organismos vivos, uma vez que o composto é capaz de provocar efeitos negativos sobre o ecossistema aquático.

### 2.3.2. Triton X-100

O Triton X-100 [4- (1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil polietilenoglicol], representado pela Figura 3, de massa molar 625 g/mol, é um tensoativo não-iônico de fórmula estrutural  $(C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n)$ , o qual apresenta uma cadeia polar de óxido de etileno e um longo grupamento apolar aromático 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil (DOONG; WU; LEI, 2003; ABU-GHUNMI; BADAWI; FAYYAD, 2014).

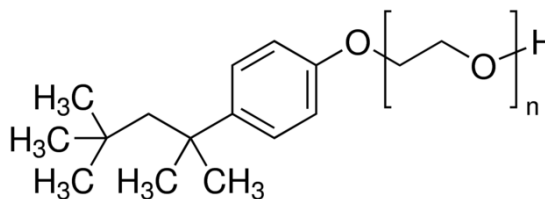


Figura 3 – Fórmula estrutural do Triton X-100

Além de ser encontrado em diversos produtos de limpeza, o Triton X-100 é amplamente utilizado em pesquisas laboratoriais. Devido às suas propriedades tensoativas e ausência de carga, esse detergente é menos destrutivo às biomoléculas, e pode ser empregado na lise celular para obtenção de extratos protéicos, organelas e ácidos nucleicos, na permeabilização da membrana plasmática de células vivas, em ensaios de imunoprecipitação, e também na remoção de SDS presente na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), por ser capaz de renaturar as proteínas presentes no gel (KARP, 2005; JAFARI et al., 2018).

Estudos fisiológicos sobre o efeito dos tensoativos da classe Triton revelaram fitotoxicidade na espécie de planta aquática *Lemna minor*. Concentrações de 10 µg/L de Triton X-100 provocaram a redução na multiplicação das folhas da espécie em 25% e 50% em relação ao uso de Triton X-15 e Triton X-35 (CAUX; WEINBERGER;

CARLISLE, 1988). Outro estudo avaliou a toxicidade do Triton X-114, o qual demonstrou um valor de EC<sub>50</sub> de 6,88 mg/L para a bactéria *Vibrio fischeri* (JAHAN; BALZER; MOSTO, 2008).

A capacidade de degradabilidade de óleo diesel promovida por um consórcio bacteriano também diminuiu com a adição do Triton X-100 (OWSIANIAK et al., 2009). Estudos caracterizaram o crescimento de consórcio microbiano sob influência do tensoativo, em concentrações variando entre 1 – 1000 mg/L. Os testes de toxicidade demonstraram perda de biomassa na concentração de 600 mg/L, e maiores concentrações provocaram forte inibição do crescimento microbiano, havendo uma perda de 50% dos organismos na concentração de 900 mg/L (WYRWAS et al., 2011).

O efeito inibitório do Triton X-100 foi testado em diversas espécies de microrganismos e consórcios microbianos. Enquanto os consórcios apresentaram maior tolerância, espécies fúngicas, como *Cladosporium herbarium* e *Doratomyces stemonitis*, apresentaram inibição do crescimento de no mínimo 30% (GARON et al., 2002).

## **2.4. Tensoativos Biológicos**

Na tentativa de sobrepor os impactos negativos relacionados à toxicidade dos tensoativos de origem petroquímica, os tensoativos biológicos, ou biossurfactantes, surgem como alternativa biotecnológica para competir com seus análogos químicos e minimizar os efeitos no ambiente (DAS et al., 2017; PAULINO et al., 2016). Tensoativos biológicos são compostos de superfície ativa sintetizados por microrganismos, sejam eles bactérias, fungos e leveduras, e classificados de acordo com sua natureza bioquímica que abrange diferentes estruturas, sendo elas lipopeptídeos, glicolipídeos, lipossacarídeos, fosfolipídeos além de ácidos graxos e lipídeos neutros (SARUBBO et al., 2015).

Nos últimos anos, os tensoativos biológicos têm despertado o interesse de pesquisadores quanto às propriedades e vantagens sobre os compostos químicos, como biodegradabilidade, síntese a partir de fontes renováveis, estabilidade sob condições adversas extremas, como pH, temperatura e salinidade, maior capacidade espumante e potencial de modificação estrutural, além da grande variabilidade na natureza polar e apolar (JOSHI et al., 2008).

A síntese de tensoativos biológicos em escala industrial ainda permanece como um desafio, principalmente devido aos custos de produção, capacidade de rendimento, produção de espuma nos biorreatores e purificação, os quais ainda devem ser otimizados.

Nesse sentido, diferentes estratégias visando a redução dos custos de produção e maiores rendimentos vêm sendo empregadas, como o uso de substratos renováveis, incluindo resíduos agroindustriais (BANAT et al., 2014), aplicação de modelos estatísticos para otimização dos parâmetros (JOSHI et al., 2008), manipulação genética de cepas (QIU et al., 2014) além de síntese química ou modificação estrutural (BOXLEY; PEMBERTON; MAIER, 2015).

Além disso, os tensoativos biológicos são compostos que fazem parte da denominada “tecnologia verde”, a qual visa a proteção e conservação da natureza, e que vem ganhando destaque no setor industrial. A previsão é de que a produção desses tensoativos atinja aproximadamente 470 toneladas em 2018 e movimente na economia 41 bilhões de dólares (PARASZKIEWICZ et al., 2018).

Devido à sua estrutura, tais compostos se ligam às membranas de diferentes organismos mesmo em baixas concentrações, afetando algumas de suas propriedades, como a permeabilidade. Em concentrações elevadas, efeitos como lise da membrana celular foram relatados, o que significa que mesmo os tensoativos biológicos necessitam uma caracterização de potenciais impactos sobre os organismos vivos (OLIVEIRA et al., 2016).

A toxicidade e a taxa de degradabilidade dos tensoativos biológicos determinam sua persistência e destino final nos ecossistemas terrestres e aquáticos. O conhecimento dos valores de toxicidade desses compostos é necessário a fim de determinar o potencial impacto sobre os organismos e estabelecer concentrações de uso seguras ao ambiente (OLIVEIRA et al., 2016).

Dentre as diversas classes de tensoativos biológicos, os lipopeptídeos sintetizados por cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* têm maior destaque devido a sua alta atividade de superfície e potencial terapêutico (NITSCHKE; PASTORE, 2005). Essa bactéria é capaz de sintetizar diferentes metabólitos secundários, dentre eles compostos extracelulares que estão crescendo progressivamente no mercado industrial, como surfactina, fengicina e iturina (AHIMOU; JACQUES; DELEU, 2000).

## **2.5. Gênero *Bacillus* na síntese de tensoativos lipopeptídeos**

O gênero bacteriano *Bacillus* apresenta como metabólito secundário resultante lipopeptídeos cíclicos com propriedades antibacterianas, antifúngicas e tensoativas (AGUIRRE, 2013). Os lipopeptídeos são sintetizados por enzimas multifuncionais



denominadas peptídeo não-ribossomais sintetases (NRPSs), sendo que os grupos mais estudados são compostos pelas surfactinas, iturinas e fengicinas (ONGENA; JACQUES, 2008; BÉCHET et al., 2012).

Os lipopeptídeos provenientes das cepas *Bacillus* apresentam ampla diversidade de isoformas, devido às ramificações e ao tamanho das cadeias alquílicas, além da composição dos aminoácidos, os quais são responsáveis pelas diferenças nas propriedades biológicas. Sua estrutura é composta por um anel peptídico de 7 (surfactina e iturina) ou 10 (fengicina)  $\alpha$ -aminoácidos ligados a uma cadeia de comprimento variável, composta por ácidos-graxo  $\beta$ -amino no caso das iturinas ou  $\beta$ -hidroxil presente nas surfactinas e fengicinas (AGUIRRE, 2013).

As linhagens de *Bacillus* são consideradas eficientes fábricas para a produção em larga escala dos lipopeptídeos. Devido às suas propriedades físico-químicas e característica anfipática, essas moléculas bioativas vêm sendo empregadas nos setores biomédico e farmacêutico, principalmente como agentes antimicrobianos, antitumorais e antifúngicos, sendo elas potenciais alternativas frente à resistência aos antibióticos convencionais e às infecções fúngicas (MEENA; KANWAR, 2015). Em 2003, o lipopeptídeo cíclico Cubicin® (Daptomicina) foi aprovado como antibiótico nos Estados Unidos pela Food and Drug Administration (FDA). O fármaco é responsável por provocar despolarização nas membranas das bactérias Gram-positivas, provocando falhas na síntese de DNA, RNA e proteínas, levando, conseqüentemente, à morte celular (STRAUS; HANCOCK, 2006).

Os lipopeptídeos vêm também se destacando na agricultura, principalmente na formulação e desenvolvimento de biopesticidas para o combate de pragas e doenças. O uso irracional e excessivo de pesticidas químicos leva à toxicidade ambiental, à diminuição ou perda de sua eficiência frente aos patógenos e acarreta em efeitos indesejados em organismos não-alvo do ecossistema. Os agentes de controle biológico podem ser utilizados em conjunto aos pesticidas químicos, seja para evitar resistência dos patógenos ou em uma estratégia de controle integrada, buscando minimizar o uso dos compostos sintéticos (ONGENA; JACQUES, 2008).

### **2.5.1. Surfactina**

A surfactina (massa molecular = 1036 Da) é caracterizada como um lipopeptídeo sintetizado por cepas do gênero bacteriano *Bacillus*. Sua estrutura é constituída por um

heptapeptídeo cíclico composto por aminoácidos hidrofóbicos (leucina e valina) e aminoácidos polares ácidos (aspartato e glutamato), ligado a uma cadeia de ácido graxo  $\beta$ -hidroxil (Figura 4), cujo tamanho varia entre 12 a 16 átomos de carbono, o que permite a existência de diversos compostos isômeros e homólogos (SEYDLOVÁ; SVODOBOVÁ, 2008).

As variantes da surfactina, denominadas isoformas, se diferenciam pela composição de aminoácidos na porção peptídica e dependem da composição do meio. Dentre as mais conhecidas, estão as isoformas classificadas de acordo com a posição do sétimo aminoácido, sendo eles leucina para a surfactina A, valina para a surfactina B e isoleucina no caso da surfactina C (MESQUITA, 2015).

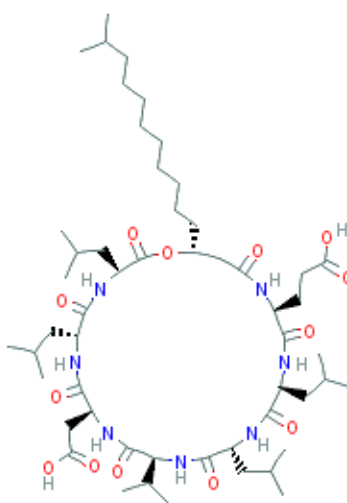


Figura 4 – Estrutura cíclica da surfactina A. Fonte: Kim et al., 2016.

A surfactina é considerada um dos mais poderosos tensoativos biológicos existentes, sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água de  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  para  $27 \text{ mN.m}^{-1}$  mesmo em concentrações menores que  $10 \text{ Mm}$  (NITSCHKE, 2004; SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

Diversos estudos têm demonstrado a estabilidade da surfactina quando submetida a diferentes condições. Concentrações de 2 a 3% de NaCl, por exemplo, são capazes de inativar tensoativos convencionais, enquanto a surfactina manteve-se estável (BARROS et al., 2007). Valores de temperatura variando entre 20 e  $100^\circ\text{C}$  durante 1 hora e limites de pH entre 5,0 e 9,5 também não foram capazes de inativar as propriedades do tensoativo, o qual manteve suas propriedades emulsificantes estáveis (KIM et al., 1997; BARROS et al., 2007).

Uma diferente linhagem sintetizada pela cepa *Bacillus subtilis* LB5a também demonstrou estabilidade em elevadas concentrações salinas ( $>15\%$ ), variações de

temperatura atingindo 135°C e também na presença das enzimas cisteíno-proteases bromelina, ficina, papaína e tripsina (COSTA, 2005).

A surfactina apresenta atividade de superfície e de membrana sobre diversos sistemas, além da capacidade de alterar as propriedades físico-químicas de interfaces. Como consequência, o tensoativo tem propriedade antibiótica (STEIN, 2005) e pode agir como antitumoral (KAMEDA et al., 1974), antiviral (VOLLENBROICH et al., 1997), imunomodulador (HUSSAIN et al., 2004), inibidor enzimático e de toxinas (KIKUCHI; HASUMI, 2002; COSTA, 2005), funções as quais a caracterizam como molécula biologicamente ativa. Por ser considerada um potente tensoativo, a surfactina é o tensoativo biológico mais amplamente comercializado, em especial na indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e na fitossanidade (MEENA; KANWAR, 2015).

Embora o alto custo de produção, purificação e baixos rendimentos sejam desafios a serem superados, o interesse de síntese em escala industrial da surfactina vem crescendo progressivamente devido às relevantes propriedades tensoativas e biológicas da molécula (PARASZKIEWICZ et al., 2018).

### 2.5.2. Iturina

A iturina é um grupo de compostos lipopeptídicos resultante dos metabólitos secundários de *Bacillus subtilis*. A iturina A, primeira molécula descoberta do grupo, foi isolada de uma amostra de solo em 1957 por pesquisadores em Ituri, Zaire, (DELCAMBE; DEVIGNAT, 1957). A denominação do grupo, iturinas, foi decorrente da descoberta posterior de outros cinco lipopolipeptídeos provenientes da mesma cepa e de padrão químico estrutural semelhante (BONMATIN; LAPRÉVOTE; PEYPOUX, 2003). Atualmente, a literatura cita sete homólogos os quais se diferenciam pelo comprimento da cadeia carbônica e pela presença de cadeias laterais, sejam eles iturina A<sub>L</sub>, iturina C, micosubtilina e bacilomicinas D, F, L e L<sub>C</sub> (MESQUITA, 2015).

A estrutura da iturina (Figura 5) é caracterizada pela presença de um ácido graxo β-amino (C<sub>14</sub> - C<sub>17</sub>) como porção hidrofóbica e pela cadeia polipeptídica contendo 7 aminoácidos a qual compõe a porção hidrofílica (MAGET-DANA; PEYPOUX, 1994).

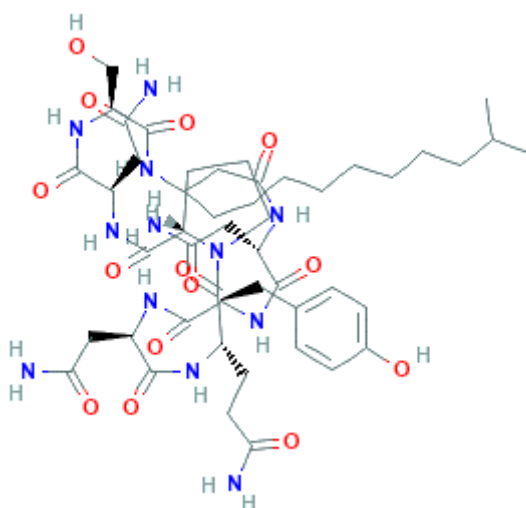


Figura 5 – Estrutura da isoforma iturina A. Fonte: Kim et al., 2016.

A principal propriedade da iturina é sua potente ação antifúngica contra diversos fungos e leveduras, além da atividade antibacteriana contra a espécie *Micrococcus luteus* e contra o fitopatógeno *Xanthomonas campestris* (BONMATIN; LAPRÉVOTE; PEYPOUX, 2003; AGUIRRE, 2013). No caso das leveduras, a iturina é capaz de romper a membrana através da formação de pequenas vesículas e agregação de partículas intramembranas. Ela também libera eletrólitos e compostos de alta massa molecular, e degrada fosfolipídeos (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

A atividade tensoativa e hemolítica da iturina, além de sua baixa toxicidade, alta degradabilidade e baixo potencial alergênico em humanos e animais a torna um potente agente de controle biológico, uma vez que sua eficácia contra diversos fungos fitopatogênicos e leveduras é semelhante aos pesticidas químicos comercializados (ROMERO et al., 2004; AGUIRRE, 2013). Sua capacidade hemolítica e antifúngica pode ainda ser incrementada em até 40% quando associada à surfactina. Ambas atuam em sinergismo e apresentam maior absorção e estabilidade na membrana citoplasmática do organismo-alvo (AGUIRRE, 2013).

### 2.5.3. Fengicina

A fengicina representa outra classe de lipopeptídeos sintetizada por cepas bacterianas *Bacillus*. Sua estrutura é composta por uma cadeia de ácidos graxos  $\beta$ -hidroxil contendo entre 15-19 carbonos (Figura 6), além da sequência de cadeia peptídica Glu – Orn – Tyr – Thr – Glu – Ala(Val) – Pro – Gln – Tyr – Ile. A tirosina da posição 3 se liga à isoleucina da posição 10, formando um ciclo peptídico (ZHAO et al., 2017).

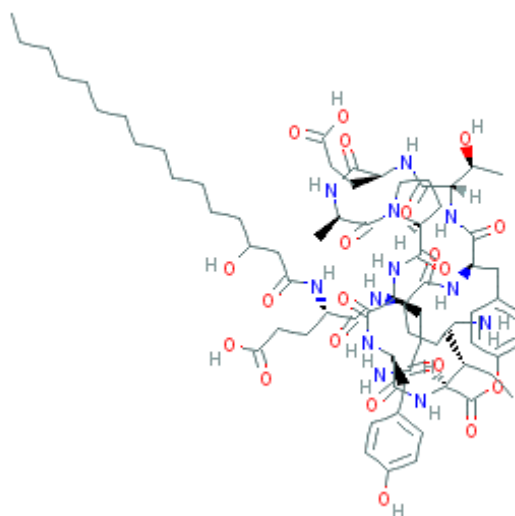


Figura 6 – Estrutura química da fengicina. Fonte: Kim et al., 2016.

A fengicina apresenta potencial propriedade antibacteriana e forte inibição do crescimento de fungos filamentosos, características importantes às indústrias farmacêutica e biotecnológica. A ação antifúngica da fengicina ocorre por perturbação da membrana plasmática, além de indução da apoptose em baixas concentrações e necrose em maiores concentrações (TANG et al., 2014), o que a torna atrativa como agente biológico para o controle de pragas (BIE; LU; LU, 2009; TANG et al., 2014).

Estudos prévios analisaram a capacidade inibitória do crescimento do fungo *Rizhopus stolonifer*, e demonstraram resultados significativos provocados pelas fengicinas A e B sintetizadas por cepas de *Bacillus subtilis* (BIE; LU; LU, 2009). Outro estudo caracterizou a ação da fengicina, demonstrando que ela ataca a integridade e a estrutura da membrana celular, alterando sua permeabilidade e induzindo, eventualmente, a morte celular por necrose (TAO et al., 2011).

## 2.6. A ecotoxicidade dos tensoativos químicos e biológicos

A detecção e presença constante dos tensoativos em águas residuais como consequência de seu uso extensivo fez com que esses compostos passassem a ser considerados contaminantes emergentes (PETROVIĆ; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003). Contaminantes emergentes são substâncias tóxicas que não apresentam regulamentação e cuja presença no ambiente e resultados acerca da toxicidade ainda permanecem pouco

conhecidos, como tensoativos, pesticidas, nanomateriais, cafeína, estrogênios e fármacos (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018). No caso dos tensoativos, eles permanecem no meio em concentrações relevantes a diversos microrganismos, acarretando-lhes toxicidade e efeitos deletérios (ALOUÏ; KCHAOU; SAYADI, 2009; RÍOS et al., 2017).

Os cursos d'água são bastante vulneráveis a influências externas por serem ecossistemas abertos. Diversos estudos já evidenciaram o efeito toxicológico de diferentes tensoativos nos organismos (ROSAL et al., 2010; LECHUGA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016). Dados toxicológicos sobre os principais tensoativos químicos comerciais utilizados estão disponíveis na literatura em relação a diferentes organismos, incluindo bactérias, algas e moluscos (LECHUGA et al., 2016).

Assim, os tensoativos biológicos surgiram como alternativas promissoras possivelmente mais seguras ao meio ambiente e apresentando também uma variedade de aplicações. No entanto, esses compostos também necessitam de uma caracterização em relação ao seu potencial ecotoxicológico (OLIVEIRA et al., 2016).

O termo ecotoxicologia foi definido pelo toxicologista francês René Truhaut em 1969 como um ramo específico da toxicologia, a qual está relacionada aos efeitos tóxicos de agentes físicos e químicos sobre os organismos vivos, cuja finalidade é estabelecer medidas de proteção contra os efeitos adversos provocados por estes poluentes (TRUHAUT, 1977).

A avaliação de ecossistemas aquáticos é geralmente realizada através de métodos tradicionais considerando parâmetros físicos e químicos. Porém, estes identificam e quantificam os compostos no meio e, por si só, não são capazes de retratar o impacto ambiental provocado pelos poluentes (NOVELLI, 2005). Por outro lado, os ensaios ecotoxicológicos demonstram o impacto dos contaminantes sobre sistemas biológicos. De fato, somente estes são capazes de detectar os efeitos e níveis de toxicidade (COSTA et al., 2008) por meio de análises que buscam elucidar a forma como os organismos metabolizam, transformam, degradam, eliminam, acumulam e sofrem efeitos de toxicidade aos compostos a eles submetidos (FERNICOLA; BOHRER-MOREL; BAINY, 2003), e possibilitam prever impactos futuros sobre o lançamento de despejos em determinado ambiente (WALKER et al., 2006; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

O objetivo da ecotoxicologia é proteger o meio como um todo, apontando implicações deletérias à saúde do homem e ao meio em que se enquadram, ou seja, ela difere da toxicologia por concentrar seus estudos nos efeitos provocados por substâncias

químicas, físicas e biológicas sobre a dinâmica de organismos de um determinado ecossistema, e não apenas sobre os seres alvo (MELO, 2012).

A ecotoxicologia aquática, especificamente, considera avaliar o efeito de agentes tóxicos sobre os organismos representativos do ecossistema aquático, a qual envolve a origem dos contaminantes, transporte, transformação, as respostas biológicas e seu destino final no ambiente. Os ensaios de toxicidade aquática são muito relevantes, uma vez que esse ecossistema constitui o principal receptor final de resíduos (COSTA et al., 2008; OLIVEIRA-FILHO; NAKANO; TALLARICO, 2017).

## **2.7. Ensaios de toxicidade e organismos-teste na ecotoxicologia**

Toxicidade é a propriedade inerente de um composto químico provocar efeitos deletérios, sejam eles agudos, subletais, crônicos ou letais, sobre um organismo (RAND, 1995), sendo ela função da concentração, composição e propriedades do composto, além do tempo de exposição (FERNICOLA et al., 2003).

Os testes ecotoxicológicos incluem tipo de exposição aguda e crônica, e seguem protocolos padronizados desenvolvidos por organizações nacionais, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e internacionais, como a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development* – OECD), que fornecem diretrizes para análise dos potenciais efeitos tóxicos de contaminantes sobre a saúde humana e o ambiente, e buscam minimizar divergências interlaboratoriais e permitir a reprodutibilidade dos resultados (NOVELLI, 2005; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; BARROSO, 2009). Os ensaios de toxicidade aguda, geralmente realizados entre 24 a 96 h, são amplamente utilizados na análise de toxicidade de compostos químicos e efluentes, e buscam analisar os efeitos que ocorrem de forma severa e rápida sobre os organismos quando expostos ao contaminante a ser avaliado (SARMA; NANDINI, 2006; MELO, 2012).

O parâmetro indicativo de toxicidade mais comumente analisado em organismos aquáticos é a letalidade ou, no caso dos invertebrados, imobilidade (COSTA et al., 2008). Os testes de toxicidade permitem a determinação dos valores de CE50 e CL50, ou seja, a concentração efetiva e concentração letal da amostra que provocam efeito agudo em 50% dos organismos testados (MELO, 2012), e também expressam os valores de concentração de efeito não observado (CENO), que representa a maior concentração do contaminante que não é capaz de provocar efeito deletério no organismo, e concentração de efeito

observado (CEO), ou seja, o menor valor de concentração capaz de provocar efeitos no organismo (CONNOR; GEIST; WERNER., 2012).

Os organismos-teste utilizados nos ensaios de ecotoxicidade são representados principalmente por algas, bactérias, invertebrados aquáticos planctônicos e bentônicos e os peixes (MELETTI, 2003; IVASK et al., 2013). Esses organismos devem atender alguns critérios, como disponibilidade e abundância no ambiente, sensibilidade aos contaminantes, uniformidade e estabilidade genética dentre as populações, representatividade de seu nível trófico, facilidade de cultivo e de adaptação às condições laboratoriais e devem ainda apresentar biologia conhecida (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Quando expostos a contaminantes, esses organismos podem sofrer implicações não só de forma isolada e individual, mas também acarretar em alterações a nível populacional e de ecossistema.

A espécie *Daphnia magna* é a mais comumente empregada em ensaios de ecotoxicidade, principalmente por ser considerada o organismo padrão por diferentes organizações de saúde pública e por atender todos os critérios necessários a esse tipo de teste (SARMA; NANDINI, 2006).

### **2.7.1. Caracterização da espécie *Daphnia magna***

Os microcrustáceos zooplânctônicos são organismos muito utilizados na ecotoxicologia. Eles apresentam relevante papel na dinâmica do ecossistema aquático, devido a sua posição intermediária na cadeia alimentar como consumidores primários (SANTOS et al., 2017). Os microcrustáceos estão amplamente distribuídos nos corpos d'água e são fonte de alimento aos consumidores secundários, como peixes e outros vertebrados. Além disso, demandam mínima manutenção laboratorial, são de fácil cultivo, apresentam rápidas taxas de crescimento populacional e sensibilidade a diversas classes de contaminantes. A reprodução assexuada por partenogênese permite o nascimento de organismos geneticamente idênticos e garante, portanto, sensibilidade constante (SARMA; NANDINI, 2006; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Pertencente à ordem *Cladocera* e ao gênero *Daphnia*, a espécie de microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* Straus, 1820 (Figura 7) é a mais comumente empregada em ensaios toxicológicos, sobre a qual há um grande número de informações sobre técnicas de cultivo e condições apropriadas do experimento, como temperatura, luz, fotoperíodo e resposta em relação a diversos compostos tóxicos (COSTA et al., 2008).





Figura 7 – Microcrustáceo cladóceros de origem temperada *Daphnia magna*. Aumento 50x. Fonte: Freitas, 2013.

A espécie é popularmente conhecida como pulga d'água, devido ao movimento das antenas que dão-lhes aparência de estarem se deslocando em pequenos saltos (BARROSO, 2009). O cladóceros planctônico é amplamente encontrado no hemisfério norte, em regiões temperadas, tem comprimento entre 5-6 mm, atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e alimenta-se por filtração de algas, bactérias e matéria orgânica particulada em suspensão (BRENTANO, 2006).

Por outro lado, é importante considerar também a utilização de espécies nativas de regiões tropicais e subtropicais para a realização de estudos ecotoxicológicos, a fim de fornecerem resultados realísticos em relação aos contaminantes a serem testados e complementar os dados obtidos em relação a espécies já padronizadas (FREITAS; ROCHA, 2011). Assim, neste trabalho, foi considerada a utilização do microcrustáceo dulcícola tropical *Dendrocephalus brasiliensis*.

### **2.7.2. Caracterização da espécie *Dendrocephalus brasiliensis***

O crustáceo *Dendrocephalus brasiliensis* Pesta, 1921, conhecido como branchoneta e pertencente à ordem *Anostraca* (Figura 8), é amplamente encontrado na América Central e América do Sul. As branchonetas são essencialmente filtradoras e seu ciclo de vida completo é curto, de aproximadamente 90 dias. A partir do 7º dia de vida, é possível encontrá-las como formas jovens com ovários em formação. Neste estágio, as fêmeas já são consideradas adultas e capazes de realizar a postura de cistos. Os cistos são

ovos resistentes e asseguram a sobrevivência dos microcrustáceos sob condições ambientais adversas extremas (LOPES et al., 2007).



Figura 8 – Microcrustáceo anostraco de origem subtropical e tropical *Dendrocephalus brasiliensis*

A reprodução das branchonetas é sexuada e o primeiro estágio larval é denominado náuplio. Antes da cópula, o macho elabora uma corte e persegue a fêmea, provocando o ato sexual e, posteriormente, ocorre a fecundação, com consequente liberação de cistos (AMARAL, 2013). Originária de países tropicais, a branchoneta sofre influência da temperatura sobre seu desenvolvimento sexual. Cultivos de *D. brasiliensis* em ambiente externo revelaram que a idade reprodutiva do organismo ocorre em 22 dias no inverno, e em apenas 8 dias no verão, demonstrando a viabilidade de cultivo nos meses mais quentes do ano (VASCONCELLOS, 2010).

As branchonetas apresentam dimorfismo sexual facilmente notado quando adultas, sendo essa diferenciação baseada sobretudo nas características sexuais externas e na estrutura das antenas. Os machos possuem antenas em formato de gancho, que os auxiliam na apreensão das fêmeas no momento da cópula, enquanto as fêmeas possuem sacos ovígeros, nos quais elas carregam os cistos que eclodem depois de hidratados em ambiente favorável. A cor é outra variável de diferenciação, sendo os machos verde-azulados e as fêmeas verde-rosadas (LOPES, 2007; AMARAL, 2013).

O principal representante e expoente do grupo da Ordem Anostraca é a *Artemia*. No entanto, por ser de água salina, seu cultivo muitas vezes torna-se inviável fora de regiões salineiras, devido à demanda e custo de adequação com tanques e sais exigidos no seu cultivo, como o NaCl. Nesse sentido, a branchoneta vem surgindo como potencial substituto desse crustáceo na piscicultura nacional e mundial (VASCONCELLOS, 2010).

Outras características das branchonetas propiciam-lhes vantagens sobre as artêmias. Os cistos de *D. brasiliensis* são esféricos, de coloração escura, possuem sulcos de superfície lisa e apresentam comprimento de 213 - 233 µm (RABET; THIÉRY, 1996), em contraste com o tamanho dos cistos de *Artemia* sp., que possuem comprimento médio de 270 µm. O menor tamanho dos cistos de branchoneta promove um melhor aproveitamento destes como alimento para larvas de camarões e peixes (LOPES, 2007). Além disso, após eclodirem, as branchonetas são capazes de atingir entre 1,5 – 2,0 cm de comprimento, propiciando um maior rendimento de biomassa, que poderá ser utilizado em atividades de piscicultura como alimento vivo ou congelado (LOPES, 2007).

A tabela 1 descreve os índices comparativos de proteína bruta em diferentes espécies de microcrustáceos. A espécie *D. brasiliensis* é ainda considerada negligenciada pelos pesquisadores, uma vez que apresenta elevados índices protéicos, característica esta que a torna interessante à atividades de piscicultura e aquacultura. Em relação ao valor nutricional, *D. brasiliensis* apresenta em sua composição 67,05 % de proteína bruta, valor inferior apenas para a *Daphnia* sp., cujo índice proteico é equivalente a 70,1 % (AMARAL, 2013).

Tabela 1: Composição nutricional de *Dendrocephalus brasiliensis* em comparação a outros crustáceos. Fonte: Amaral (2013).

Organismos	Proteína bruta (%)	P (%)	Ca (%)	Cinzas (%)
<i>Artemia</i> sp.	61,60			10,10
<i>Brachionus plicatilis</i>	56,92	1,42		
<i>D. brasiliensis</i>	67,05	0,54	1,71	14,82
<i>Daphnia</i> sp.	70,10	1,46	0,21	
<i>Moina</i> sp.	59,12	1,32	0,16	

Pesquisas sobre a sensibilidade a componentes tóxicos são escassas considerando essa espécie anostraca neotropical. A branchoneta exige pouco espaço, além de apresentar baixo custo de cultivo, mínima manipulação experimental e alta taxa de reprodução. Assim, considerando que tal espécie apresenta as características ideais de um organismo-modelo e é representativa do ecossistema tropical, *D. brasiliensis* foi a segunda espécie de microcrustáceo escolhida para a análise ecotoxicológica dos diferentes tensoativos citados neste trabalho.

## **Capítulo II**

---

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

**Título: Ecotoxicological assessment of synthetic and biogenic surfactants using freshwater cladoceran species**

**Periódico: Environmental Science and Pollution Research**

**Fator de impacto do periódico: 2,80**

Vanessa Santana Vieira Santos<sup>1,2\*</sup>, Boscolli Barbosa Pereira<sup>1</sup>, Edgar Silveira Campos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Uberlândia, Department of Environmental Health, Laboratory of Environmental Health, Santa Mônica Campus, Avenida João Naves de Ávila, 2121, 38.408-100, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Federal University of Uberlândia, Institute of Biotechnology, Department of Biotechnology, Umuarama Campus, Avenida Pará, 1720, 38.400-902 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

\*Corresponding author. Phone +55 34 3291 5989.

E-mail address:

vanessasvs2009@hotmail.com (V. S. V. Santos)

boscolli86@hotmail.com (B. B. Pereira)

silveiraedgar@gmail.com

### **Acknowledgements**

Financial support is acknowledge to “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES).

## **Abstract**

Surfactants have been continuously detected within aquatic environments as a consequence of their use on a global scale. Lipopeptides are biosurfactants naturally produced by *Bacillus subtilis* that have been explored as green alternatives. The assessment of ecotoxicological parameters of synthetic and biogenic surfactants are required for evaluating toxicity values and to verify the eco-friendly behaviour of the biological compounds. This study aimed to conduct toxicity testing for different surfactants and biosurfactants at different concentrations using *Daphnia magna* and *Dendrocephalus brasiliensis* as alternative test species for monitoring of pollutants in tropical freshwaters. *D. magna* and *D. brasiliensis* showed high sensitivity for SDS concerning the recommended dosage use. Iturin and fengycin revealed very low toxicity effects on both organisms. Data exhibited a higher responsiveness of *D. brasiliensis* for all tested compounds in comparison to *D. magna*, highlighting the importance of this species for monitoring of pollutants in tropical and subtropical environments.

**Key-words:** Surfactants, Biosurfactants, Acute toxicity tests, Environmental health, Lipopeptides, Ecotoxicology.

## 1. Introduction

Surfactants are surface active molecules constituted of a polar hydrophilic and a non-polar lipophilic domain. The amphiphilic nature and physico-chemical characteristics of surfactants are responsible for detergency, emulsification, solubilisation, sterilisation and wetting properties, thus highlighting their importance for industry applications (Schramm et al. 2003; Wang et al. 2015). These synthetic compounds are petroleum derived produced through organic chemical reactions, exhibiting low-biodegradability and relative toxicity to organisms (Bahia et al. 2018).

The toxicity of these chemicals is primarily a function of the intrinsic property to adsorb and penetrate the cell membrane of living organisms (Mungray and Kumar 2008), which may causes serious and irreversible damage, including membrane disruption, inhibition of respiration in microorganisms (Gregorová et al. 1996), damage on growth and nitrogen fixing capacity of cyanobacteria (Tözüm-Calgan and Atay-Güneyman 1994), alterations in lipid and protein contents of fish (Roy 1988) and disturbance in activity of enzymes and metabolism (Cserháti et al. 2002).

Advances in biotechnology along with the increasing environmental health concern have drawn attention to the development of novel, safe and biologically active agents, known as biosurfactants, as a green alternatives (Bahia et al. 2018). The surface-active behaviour and potential biological properties allow the owing following advantages over synthetic surfactants, beyond the higher degradability and low toxicity on environments (Mandal et al. 2013; Chen et al. 2015; Ines and Dhouha 2015). Biosurfactants are synthesized as secondary metabolites by a wide variety of growing microorganisms (Chen *et al.* 2015). *Bacillus subtilis* strains are rod-shaped, endospore-producing, gram-positive bacteria which have great economic importance owing to the ability of synthesizing the major class of biosurfactants, namely cyclic lipopeptides, that includes surfactin, fengycin and iturin (Das and Mukherjee 2007; Sabaté and Audisio 2013).

Aquatic ecosystem assessment based solely on physicochemical analysis has been hampered since it just provides quantitative data caused by the presence of toxic contaminants, enhancing the importance of ecotoxicological parameter evaluations. Residues of surfactants have been widely detected throughout aquatic ecosystems, as these compounds are discharged into sewage treatment-plants followed by release of

effluents into water bodies, ending up in aquatic systems and chronically exposing nontarget organisms (Sobrino-Figueroa 2018).

*Daphnia magna*, a crustacean cladoceran invertebrate, is widely applied as a model organism in aquatic toxicology due to their responsiveness to environmental pollutants, ease of handling, high growth rate and parthenogenetic reproduction (Sarma and Nandini 2006; Sucahyo et al. 2008; Jiang et al. 2018). Also, this cladoceran species displays an essential role in the dynamics and energy metabolism of aquatic ecosystems, owing to the intermediate position in the food chain as primary consumers (Zhu et al. 2010; Santos et al. 2017).

On the other hand, there is a growing need to evaluate the realistic impacts on autochthonous species in tropical freshwaters, as most ecotoxicological studies is performed with acclimated exotic species from temperate areas (Freitas and Rocha 2011; Rodgher and Espíndola 2008; Artal et al. 2017). Few studies in tropical and subtropical areas have been conducted with local species, and the use of temperate organisms constitutes a limiting factor for aquatic toxicity assessment of pollutants (Santos et al. 2018).

*Dendrocephalus brasiliensis* Pesta, 1921 (Crustacea: Anostraca) are freshwater branchiopods naturally distributed under tropical and subtropical climates of the Central and Southern Americans (Rabet and Thiéry 1996; Chaves et al. 2011). Although still considered a neglected species, *D. brasiliensis* have been explored by aquaculture industry as a promising food source due to their high protein content and relevant biomass production rates (Freita et al. 2017). Also, studies have been encouraged owing the short life cycle, abundance in environment, thermal tolerance and high reproduction rate of the species. Owing these properties, *D. brasiliensis* are emerging as an attractive alternative test organism for monitoring of contaminants in tropical and subtropical freshwaters (Santos et al. 2018).

To further assess the environmental impact of synthetic and biogenic surfactants, this study aimed to evaluate the ecotoxicity of the common industrial surfactants, sodium dodecyl sulfate (SDS) and triton X-100, and three biosurfactants, surfactin, iturin and fengycin, at different concentrations on the microcrustaceans *D. magna* and *D. brasiliensis*, in order to assess ecotoxicological parameters through acute toxicity tests and to compare the sensitivity of tropical and temperate species.

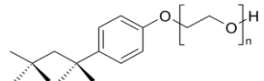
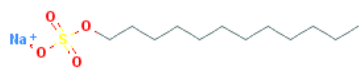
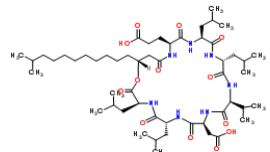
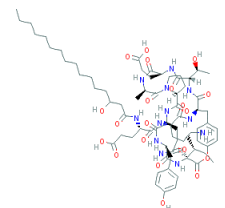
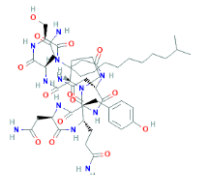


## **2. Material and Methods**

### **2.1. Test solutions of surfactants and reference substance**

The chemical surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) and Triton X-100, and the biosurfactants surfactin, iturin and fengycin were obtained from Sigma-Aldrich. The physico-chemical properties and the range of the nominal testing concentrations for each surfactant are shown in Table 1. The reference substance potassium dichromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) was chosen as a positive control (OECD 2004). All compounds had a high purity (>90%) and stock solutions were prepared by dissolving the chemicals directly in water immediately before each bioassay.

Table 1: Physico-chemical properties of the surfactants and biosurfactants tested for the acute toxicity assays.

Chemicals	Type of surfactant	CAS No.	Chemical structure	Molecular formula	MW (Da)	Degradability	Nominal concentration range
Triton X-100	Nonionic	9002-93-1		$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ (n=9-10)	625	By-product not readily degradable	12.5-200 mg/L
SDS	Anionic	151-21-3		$NaC_{12}H_{25}SO_4$	288.3	Persistent by-product	6.25-100 mg/L
Surfactin	Lipopeptide	24730-31-2		$C_{53}H_{93}N_7O_{13}$	1036.3	High	25.0-400 mg/L
Fengycin	Lipopeptide	102577-03-7		$C_{72}H_{110}N_{12}O_{20}$	1463.7	High	2.5-40.0 mg/L
Iturin	Lipopeptide	52229-90-0		$C_{37}H_{51}N_{12}O_{14}$	1044.2	High	1.25-20 mg/L

## 2.2. Biological sample and culturing

*Daphnia magna* were cultured in the Laboratory of Ecotoxicology, Federal University of Uberlandia, Brazil, according to Organisation for Economic Co-operation and Development Guideline 202 (OECD 2004). Daphnids were maintained in acclimated aquaria at  $20 \pm 1$  °C with a light/dark cycle of 16:8 h. The culture medium [synthetic Elendt M4 medium (pH  $7.8 \pm 0.2$ ; total hardness  $47 \pm 5$  mg/L in  $\text{CaCO}_3$ )] was renewed three times per week and the organisms were fed daily with *Arthrospira platensis* algal suspension on a basis of 150 µg/organism/day prior the experimental tests. The reconstituted water applied for stock maintenance and acclimatization of daphnids in aquaria was used as negative control and for preparation of all test solutions.

Neonates of *D. brasiliensis* were obtained from cultures grown in 2-L glass aquaria with reconstituted water (0.03 g/L of  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.061 g/L of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.048 g/L of  $\text{NaHCO}_3$  and 0.002 g/L of KCl) dissolved in 1L of distilled water, with pH  $7.2 \pm 0.1$ , total hardness  $44 \pm 3$  mg/L in  $\text{CaCO}_3$  and conductivity of 160 µS/cm. The culture medium was renewed three times per week and the organisms were fed daily with *Spirulina platensis* suspension on a basis of  $10^5$  cells/L/organism. *D. brasiliensis* were maintained in warm-acclimated aquaria at  $25 \pm 1$  °C, under a 16:8 h light/dark photoperiod. The reconstituted water employed for stock maintenance and acclimatization was used as negative control and for preparation of all test solutions.

## 2.3. Acute toxicity tests

The acute toxicity tests of all chemicals were performed according to OECD Guideline 202 (OECD 2004). Tests were conducted in a static system, in 20 mL glass beakers, using ten neonate daphnids (aged less than 24h at the start of the test) and ten nauplii of *D. brasiliensis* exposed to 10 mL solution for 48h of six different nominal concentration ranges of each compound diluted in reconstituted water (with dilution factor 0.5), and to a negative control (dilution water only). The tested species organisms were not fed during the acute toxicity tests and the exposure conditions were maintained at  $20 \pm 1$  °C for *D. magna* and  $25 \pm 2$  °C for *D. brasiliensis*.

The test conditions were identical to the culture conditions relative to both species and were carried out separately owing to the temperature difference of the protocols. All tests using *D. magna* and *D. brasiliensis* were performed in quintuplicate for each compound. The organisms were observed through a stereomicroscope and the

immobilization rate was recorded at 24 and 48 h. The crustaceans were considered immobile in absence of reaction for 15 s after exposure to a luminous stimulus followed by gentle prodding of the glass beaker.

## 2.4. Statistical Analysis

Immobility data were used as the evaluation criteria of the acute toxicity tests to assess the median immobility concentration ( $EC_{50-48h}$ ) and the endpoints No Observed Effect Concentration (NOEC) and Lowest Observed Effect Concentration (LOEC). Data were evaluated according to OECD Guideline 171 (OECD 2012). Maximum accepted mortality in the negative controls did not exceed 10%.

To determine the  $EC_{50}$  and respective 95% confidence interval, data were analyzed by regression using Probit-analysis considering log-normal distribution of the values. The NOEC and LOEC were determined using Fisher's Exact Binomial Test with Bonferroni Correction. For all analyses, p values <0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results

Data obtained from the acute toxicity tests performed with all chemicals after 24 and 48h exposure of *D. magna* and *D. brasiliensis* are depicted in Table 2. According to OECD guidelines (2004), for all tests the mortality of the controls did not exceed 10%.  $EC_{50-48h}$  values for potassium dichromate were 32.7 and 13.8  $\mu\text{g/L}$  for *D. magna* and *D. brasiliensis*, respectively.

This study performed a toxicity assessment of non-ionic, anionic and biogenic surfactants. The effects of the chemicals on *D. magna* and *D. brasiliensis* depended significantly on the concentration. According results, the exposure of *D. brasiliensis* revealed  $EC_{50-48h}$  values lower than *D. magna* for all tested compounds, implying higher sensitivity of the tropical crustacean in comparison to the temperate waterflea.

Table 2: Estimated median effective concentrations ( $EC_{50-24hr}$  and  $EC_{50-48hr}$ ) values and 95% confidence intervals (CIs) of the surfactants and biosurfactants tested for *D. magna* and *D. brasiliensis*.

Chemical (mg/L)	<i>D. magna</i>		<i>D. brasiliensis</i>	
	EC <sub>50-24hr</sub> (95% CI)	EC <sub>50-48hr</sub> (95% CI)	EC <sub>50-24hr</sub> (95% CI)	EC <sub>50-48hr</sub> (95% CI)
SDS	61.8 (37.2-102.7)	24.1 (17.2-36.5)	24.5 (17.7-34.1)	15.4 (9.6-24.7)
Triton X-100	118.2 (75.3-185.5)	72.2 (49.6-105.0)	54.1 (38.8-75.3)	43.6 (30.1-63.2)
Surfactin	245.4 (150.5-399.9)	161.5 (106.1-245.6)	227.5 (153.5-337.1)	158.2 (102.9 -243.4)
Fengycin	310.2 (90.4-1064.7)	288.4 (86.8-957.8)	212.2 (69.8-645.5)	202.1 (66.9 - 609.7)
Iturin	927.9 (130.3-6609.8)	321.6 (62.4-1657.1)	253.1 (58.8-1089.2)	173.6 (45.5-661.7)

The ecotoxicological parameters NOEC and LOEC were also evaluated regarding the acute toxicity tests. Accordingly with results, the endpoints were similar for both organisms considering all chemicals. Notwithstanding, the NOEC and LOEC parameters were estimated at concentrations of 2.5 and 5.0 mg/L iturin, respectively, for *D. magna*, and 1.25 and 2.5 mg/L for *D. brasiliensis*, confirming higher sensitivity of the tropical species.

Table 3: Ecotoxicological parameters and environmental risk assessment obtained from acute toxicity tests after exposure of chemicals on the *D. magna* species and *D. brasiliensis*.

Chemical (mg/L)	<i>D. magna</i>		<i>D. brasiliensis</i>	
	NOEC	LOEC	NOEC	LOEC
SDS	6.125	12.5	6.125	12.5
Triton X-100	12.5	25.0	12.5	25.0
Surfactin	25.0	50.0	25.0	50.0
Fengycin	2.5	5.0	2.5	5.0
Iturin	2.5	5.0	1.25	2.5

### Toxicity degree of the chemicals

Table 4 summarizes published sensitivity data of the selected chemicals for several aquatic species.

Table 4: Comparison of EC50 values (48h) for the toxicity of selected compounds obtained from literature for different non target invertebrates and *D. magna* and *D. brasiliensis* (tested in this study).

Chemical (mg/L)	Species	EC <sub>50-48hr</sub>	Reference
SDS	<i>Daphnia magna</i>	24.1	Tested in this study
	<i>Dendrocephalus brasiliensis</i>	15.4	Tested in this study
	<i>Daphnia magna</i>	31.0	Martins et al (2007)
	<i>Ceriodaphnia rigaudii</i>	20.8	Mohammed 2007
	<i>Pseudosida ramosa</i>	13.9	Freitas and Rocha 2011
Triton X100	<i>Daphnia magna</i>	72.2	Tested in this study
	<i>Dendrocephalus brasiliensis</i>	43.6	Tested in this study
	<i>Daphnia magna</i>	26.0	Mohammed 2007
	<i>Diaphanosoma brachyurum</i>	30.7	Mohammed and Agard 2006
	<i>Artemia</i> sp.	58.3	Sasikumar et al 1995
Surfactin	<i>Daphnia magna</i>	161.4	Tested in this study
	<i>Dendrocephalus brasiliensis</i>	158.2	Tested in this study
	<i>Daphnia magna</i>	170.1	De Oliveira et al 2017
Iturin	<i>Daphnia magna</i>	321.6	Tested in this study
	<i>Dendrocephalus brasiliensis</i>	173.6	Tested in this study
Fengycin	<i>Daphnia magna</i>	288.4	Tested in this study
	<i>Dendrocephalus brasiliensis</i>	202.1	Tested in this study
	<i>Daphnia similis</i>	> 340.0	Martinez et al 2014

## Discussion

Although SDS is a versatile molecule owing to the favourable physico-chemical properties, low cost and a wide variety of applications, the global use of this anionic surfactant have been detected on aquatic environments in a greater extent (Ambily and Jisha 2014). EC<sub>50-48h</sub> values were twofold and threefold lower for *D. magna* and *D. brasiliensis*, respectively, considering the recommended dosage used (50 mg/L), inferring a high sensitivity of both species for SDS. Data obtained in this study are in agreement with other studies (Table 4) towards different tropical species, which confirm a similar sensitivity of the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa* and *D. brasiliensis* (Freitas and Rocha 2011). In nature, this anionic compound has low degradability rate (Hosseini et al.

2007). The primary degradation, characterized by the occurrence of the loss of the ester sulphate group, may still yield recalcitrant and toxic metabolites (Roig et al. 1998).

Also,  $EC_{50-48h}$  values of Triton X-100 were slightly lower for *D. magna* and more than twofold lower for *D. brasiliensis* regarding the usage concentration (100 mg/L), indicating relevant toxicity of this chemical. Despite the biodegradability behaviour of Triton X-100, the by-product resulting from the degradation process do not readily degrade and potentially causes toxicity on aquatic environment (Sidim 2012). In fact, estrogenic effects and bioaccumulation ability of this surfactant in living organisms have been found (Ying 2006).

Amongst the biosurfactants tested, surfactin showed the less safety behaviour, indicating that even biological compounds have the ability to cause toxicity in living organisms. Surfactin is the most powerful biosurfactant ever discovered, owing to the strong surface active properties and high performance in environmental and therapeutic applications, including enhanced oil recovery and bioremediation (Al-Wahaibi et al. 2014), antibacterial (Heerklotz and Seelig 2007) and antiviral activities (Vollenbroich et al. 1997). Minor alterations in the chemical structure of surfactin have been considered in order to modify the toxicity profile of the compound (Symmank et al. 2002). However, results showed  $EC_{50-48h}$  values of 161.5 and 158.2 mg/L for *D. magna* and *D. brasiliensis*, respectively. Studies performed with surfactin (40 mg/L) revealed a strong biodegradation rate of diesel, indicating a high removal efficiency of hydrocarbons in low concentrations (Whang et al. 2008). Also, it was reported that surfactin was able to remove total petroleum hydrocarbon of soil with much higher efficiency than Triton X-100 and Tween 80, highlighting the potential of the molecule as a naturally derived alternative to chemical surfactants (Lai et al. 2009).

Iturin and fengycin showed the lowest toxicity effects for both organisms, confirming their eco-friendly behaviour. The compounds have been investigated due to the strong antifungal activity against pathogens (Romero et al. 2007; Tao et al. 2011). The mechanism of interaction between these lipopeptides involves the permeabilisation of the cytoplasmic membrane of the target cells, most prominent by forming ion-conducting pores that promote electrolyte permeability (Patel et al. 2011; Deravel et al. 2014), highlighting their potential action as biocontrol agents. The high degradability rate of biosurfactants in water and soil environments justified the low toxicity and safety to living organisms, hence the lipopeptides degrade before they can elicit toxic effects in aquatic organisms (Poremba et al. 1991).

The use of temperate species to perform ecotoxicological studies in tropical and subtropical climates has been discussed by several authors (Freitas and Rocha 2010; Sobrino-Figueroa 2018). *D. magna* is one of the most sensitive organisms to chemical substances and a model organism in the standardized protocols of toxicology studies (USEPA 1982; Ino et al. 2017). Notwithstanding that, ecotoxicological assessment of toxicants using tropical species would provide more realistic data in tropical and subtropical environments. In this work, the tropical cladoceran *D. brasiliensis* showed higher sensitivity in comparison to *D. magna* for all tested compounds. Sucahyo et al. (2008) confirmed that tropical organisms have higher responsiveness in relation to standard representative organisms from temperate regions. Sobrino-Figueroa (2018) also revealed higher sensitivity of tropical cladoceran, amphipods and ostracods exposed to different commercial surfactants in comparison to *D. magna*.

In conclusion, chemical surfactants revealed higher toxic effects regarding the recommended concentration dosage in comparison to the biogenic compounds. Iturin and fengycin exhibited the most environmentally safe behaviour regarding all chemicals. *D. brasiliensis* showed higher sensitivity than the temperate species *D. magna*, indicating the organism as a potentially suitable freshwater ecotoxicity species for circumtropical regions.

## References

- Al-Wahaibi Y, Joshi S, Al-Bahry S, Elshafie A, Al-Bemani A, Shibulal B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;114:324-33.
- Ambily PS, Jisha MS. Metabolic profile of sodium dodecyl sulphate (SDS) biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 10311). *J Environ Biol*. 2014. 35:827-831.
- Artal MC, Santos A, Henry TB, Umbuzeiro GA. Development of an acute toxicity test with the tropical marine amphipod *Parhyale hawaiiensis*. *Ecotoxicology*. 2017;27(2):103-108.
- Bahia FM, de Almeida GC, de Andrade LP, Campos CG, Queiroz LR, da Silva RLV, et al. Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*. 2018;8(1).



- Chaves TP, Lacau S, Rabet N. Illustrated key to the Brazilian *Dendrocephalus* (Crustacea: Anostraca: Thamnocephalidae). *Nauplius*. 2011;19(1):1-5.
- Chen W-C, Juang R-S, Wei Y-H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*. 2015;103:158-69.
- Cserhádi T, Forgács E, Oros G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environmental international*. 2002;28:337-48.
- Das K, Mukherjee AK. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*. 2007;42(8):1191-9.
- De Oliveira DWF, Cara AB, Lechuga-Villena M, García-Román M, Melo VMM, Gonçalves LRB, et al. Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by *Bacillus subtilis* ICA56. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2017;52(2):174-81.
- Deravel J, Lemiere S, Coutte F, Krier F, Van Hese N, Bechet M, et al. Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(14):6255-64.
- Freita FRV, Lucena IC, Alencar DR, Santos IJM, Pinheiro AP. Occurrence of *Dendrocephalus brasiliensis* Pesta, 1921 (Crustacea, Anostraca) in the Caras river, southern Ceara, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2017;89(2):1047-9.
- Freitas EC, Rocha O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: The importance of using native species as test organisms. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 2011;60(2):241-9.
- Gregorová D, Augustin J, Vrbanová A, Sládek D. effect of dialkyl sulphosuccinates on respiration activity of degradative and nondegradative bacteria. *Biologia (Bratisl)* 1996;76:153-76.
- Heerklotz H, Seelig J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J*. 2007;36(4-5):305-14.
- Hosseini F, Malekzadeh F, Amirmozafari N, Ghaemi N. Biodegradation of anionic surfactants by isolated bacteria from activated sludge. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2007;4(1):127-32.

- Ines M, Dhouha G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*. 2015;71:100-12.
- Ino K, Kanno Y, Inoue KY, Suda A, Kunikata R, Matsudaira M, et al. Electrochemical Motion Tracking of Microorganisms Using a Large-Scale-Integration-Based Amperometric Device. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2017;56(24):6818-22.
- Jiang J, Shan Z, Wang X, Zhu Y, Zhou J. Ecotoxicity of the nonsteroidal ecdysone mimic RH-5849 to *Daphnia magna*. *Environmental science and pollution research international*. 2018;25(11):10730-9.
- Lai CC, Huang YC, Wei YH, Chang JS. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;167:609-14.
- Mandal SM, Barbosa AEAD, Franco OL. Lipopeptides in microbial infection control: Scope and reality for industry. *Biotechnology Advances*. 2013;31(2):338-45.
- Martinez DST, Faria AF, Berni E, Souza Filho AG, Almeida G, Caloto-Oliveira A, et al. Exploring the use of biosurfactants from *Bacillus subtilis* in bionanotechnology: A potential dispersing agent for carbon nanotube ecotoxicological studies. *Process Biochemistry*. 2014;49(7):1162-8.
- Martins J, Oliva Teles L, Vasconcelos V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ Int*. 2007;33(3):414-25.
- Mohammed A. Comparative sensitivities of the tropical cladoceran, *Ceriodaphnia rigaudi* and the temperate species *Daphnia magna* to seven toxicants. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2007;89(2):347-52.
- Mohammed A, Agard JB. Comparative sensitivity of three tropical cladoceran species (*Diaphanosoma brachyurum*, *Ceriodaphnia rigaudi* and *Moinodaphnia macleayi*) to six chemicals. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2006;41(12):2713-20.
- Mungray AK, Kumar P. Occurrence of anionic surfactants in treated sewage: risk assessment to aquatic environment. *Journal of hazardous materials*. 2008;160(2-3):362-70.

Organisation for Economic Cooperation and Development. 2004. Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems. Test Number 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. Paris, France: OECD.

Organisation for Economic Cooperation and Development. 2012. Series on Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications number 171. Fish Toxicity Testing Framework. Paris, France: OECD.

Patel H, Tscheka C, Edwards K, Karlsson G, Heerklotz H. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1808(8):2000-8.

Poremba K, Gunkel W, Lang S, Wagner F. Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. *Zeitschrift für Naturforschung*. 1991;46, 210-216.

Rabet N, Thiéry A. The neotropical genus *Dendrocephalus* (Crustacea: Anostraca: Thamnocephalidae) in Brazil (South America), with a description of two new species. *Journal of Natural History*. 1996;30(4):479-503.

Rodgher S, Luiz Gaeta Espindola E. Effects of interactions between algal densities and cadmium concentrations on *Ceriodaphnia dubia* fecundity and survival. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2008;71(3):765-73.

Roig MG, Pedraz MA, Sanchez JM, Huska J, Tóth D. Sorption isotherms and kinetics in the primary biodegradation of anionic surfactants by immobilized bacteria: II. *Comamonas terrigena* N3H. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1998;4(5):271-81.

Romero D, Vicente A, Rakotoaly R H, Dufour S E, Veening J W, Arrebola E, Cazorla F M, Kuipers O P, Paquot M, Pérez-García A. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2007;20(4):430-40.

Roy D. Impact of detergents on the protein histochemistry of various cell types of the gill epithelium of *Rita rita*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1988;15(2):206-12.

Sabaté DC, Audisio MC. Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. *Microbiological research*. 2013;168(3):125-9.

Santos VSV, Caixeta ES, Campos Junior EO, Pereira BB. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2017;80(3):155-60.

Santos VSV, Campos CF, de Campos Júnior EO, Pereira BB (2018) Acute ecotoxicity bioassay using *Dendrocephalus brasiliensis*: alternative test species for monitoring of contaminants in tropical and subtropical freshwaters. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1951-3>.

Sarma SS, Nandini S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. *Journal of environmental science and health Part B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*. 2006;41(8):1417-30.

Sasikumar N, Clare AS, Gerhart DJ, Stover D, Rittschof D. Comparative toxicities of selected compounds to nauplii of *Balanus Amphitrite* Darwin and *Artemia* sp. *Bull. Environm. Contam. Toxicol*. 1995;54:289-96.

Schramm LL, Stasiuk EN, Marangoni DG. 2 Surfactants and their applications. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)*. 2003;99(0):3-48.

Sidim T. some physicochemical properties of octylphenol ethoxylate nonionics (Triton X-100, Triton X-14 and Triton X-405) and the temperature effect on this properties. *Trakya Univ. J. Nat. Sci*. 2012. 13(2):101-116.

Sobrino-Figueroa A. Toxic effect of commercial detergents on organisms from different trophic levels. *Environmental science and pollution research international*. 2018;25(14):13283-91.

Sucahyo D, Van Straalen NM, Krave A, Van Gestel CAM. Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp *Caridina laevis*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2008;69:421-427.

Symmank H, Franke P, Saenger W, Bernhard F. Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2002;15(11):913-21.

Tao Y, Bie XM, Lv FX, Zhao HZ, Lu ZX. Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. *J Microbiol*. 2011;49(1):146-50.

Tözüm-Calgan SRD, Atay-Güneyman NZ. The effects of an anionic and a non-ionic surfactant on growth and nitrogen fixing ability of a cyanobacterium, *Gloeocapsa*. Journal of Environmental Science and Health Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology. 1994;29(2):355-69.

USEPA (1982) Environmental Effects Test Guidelines, ES-1 EPA 560/682-002. Office of Toxic Substances, Environmental Protection Agency, Washington DC.

Vollenbroich D, Ozel M, Vater J, Kamp RM, Pauli G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. Biologicals. 1997;25(3):289-97.

Wang Y, Zhang Y, Li X, Sun M, Wei Z, Wang Y, et al. Exploring the Effects of Different Types of Surfactants on Zebrafish Embryos and Larvae. Sci Rep. 2015;5:10107.

Whang LM, Liu PW, Ma CC, Cheng SS. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of hazardous materials. 2008;151(1):155-63.

Ying GG. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. Environ Int. 2006;32(3):417-31.

Zhu X, Chang Y, Chen Y. Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. Chemosphere. 2010;78(3):209-15.

## CONCLUSÕES

---

Os resultados obtidos a partir dos testes de toxicidade aguda realizados nas espécies de microcrustáceos *Daphnia magna* e *Dendrocephalus brasiliensis* revelaram uma maior toxicidade dos tensoativos químicos em relação aos tensoativos biológicos considerando os respectivos valores de concentração de uso. Os efeitos de letalidade para os organismos foram dependentes da concentração de tensoativo utilizada. Os lipopeptídeos fengicina e iturina foram ambientalmente seguros à ambas as espécies. Os tensoativos SDS e Triton X-100 demonstraram efeitos ecotoxicológicos consistentes em ambos os organismos, no qual destacou-se a alta toxicidade do tensoativo não-iônico (SDS) à espécie de origem tropical. Não obstante, a surfactina demonstrou resultado similar de toxicidade considerando ambas as espécies na concentração de uso empregada, comprovando que mesmo os compostos de origem biológica têm capacidade de provocar efeitos de toxicidade sobre os organismos vivos. No entanto, a segurança ambiental deste lipopeptídeo baseia-se na sua alta atividade tensoativa mesmo em menores concentrações.

A espécie de origem tropical *Dendrocephalus brasiliensis* revelou maior sensibilidade em relação a todos os tensoativos testados quando comparada à espécie de origem temperada *Daphnia magna*, fato este que está de acordo com outros estudos. A capacidade de resposta deste organismo, além de outras características fundamentais, como facilidade de cultivo e alta taxa de reprodução, o evidencia como uma alternativa ecotoxicológica promissora para estudos em regiões tropicais.

## REFERÊNCIAS

ABU-GHUNMI, L.; BADAWI, M.; FAYYAD, M. Fate of Triton X-100 Applications on Water and Soil Environments: A Review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 17, n. 5, p. 833-838, 2014.

ADAK, A.; BANDYOPADHYAY, M.; PAL, A. Adsorption of anionic surfactant on alumina and reuse of the surfactant-modified alumina for the removal of crystal violet from aquatic environment. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 40, n. 1, p. 167-182, 2005.

AGUIRRE, C. A. P. **Estudo da produção de iturina por *Bacillus subtilis*, em fermentação semi-sólida utilizando como substrato farelos de soja, arroz, trigo e casca de arroz**. 2013. 159 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 10, p. 749-754, 2000.

AHMADI, M. A.; SHADIZADEH, S. R. Adsorption of novel nonionic surfactant and particles mixture in carbonates: enhanced oil recovery implications. **Energy & Fuels**, v. 26, p. 4655-4663, 2012.

ALOUI, F.; KCHAOU, S.; SAYADI, S. Physicochemical treatments of anionic surfactants wastewater: effect on aerobic biodegradability. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p. 353-359, 2009.

AMARAL, A. B. L. **Produção de *Dendrocephalus brasiliensis* Pesta, 1921 alimentado com *Chlorella vulgaris* em sistema experimental de cultivo**. 74 p. 2012. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2013.

ANIS, M.; ALTAHER, G.; SARHAN, W.; ELSEMARY, M. Manufacturing applications. In: **Nanovate**. Springer, Cham. 2017.

BANAT, I. M.; MAKKAR, CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BANAT, I. M.; SATPUTE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 697, p. 1-18, 2014.

BARRIOS-ESTRADA, C.; ROSTRO-ALANIS, M. J.; MUÑOZ-GUTIÉRREZ, B. D.; IQBAL, H. M. N.; KANNAN, S.; PARRA-SALDÍVAR, R. Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1516-1531, 2018.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BARROSO, M. F. S. **Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e factores abióticos em *Daphnia magna***. 70 p. 2009. Dissertação (Mestre em Contaminação e Toxicologia Ambiental) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade do Porto, Porto, 2009.

BÉCHET, M.; CARADEC, T.; HUSSEIN, W.; ABDERRAHMANI, A.; CHOLLET, M.; LECLÈRE, V.; DUBOIS, T.; LECLERUS, D.; PUPIN, M.; JACQUES, P. Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 593-600, 2012.

BIE, X.; LU, Z.; LU, F. Identification of fengycin homologues from *Bacillus subtilis* with ESI-MS/CID. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, p. 272-278, 2009.

BONMATIN, J. M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 6, p. 541-556, 2003.

BOTTCHER, S.; DRUSCH, S. Saponins – self-assembly and behaviour at aqueous interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 243, p. 105-113, 2017.

BUENO, M. S.; DA SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biosurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

BOXLEY, C. J.; PEMBERTON, J. E.; MAIER, R. M. Rhamnolipids and related biosurfactants for cosmetics and cosmeceutical markets. *Inf.-Int. News Fats Oils Relat. Mat.* 26, p. 206-215, 2015.



BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.** 145 p. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: estudos de produção e caracterização.** 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CAUX, P. Y.; WEINBERGER, P.; CARLISLE, D. B. A physiological study of the effects of triton surfactants on *Lemna minor* L. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 671-676, 1988.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v. 13, pp. 85-103, 2003.

CONNOR, R. E.; GEIST, J.; WERNER, I. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12741-12771, 2011.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações.** Campinas, 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CURBELO, F. D. S. **Recuperação avançada de petróleo utilizando tensoativos.** 190 p. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

CRAPEZ, M. A. C.; TOSTA, Z. T.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Acute and chronic impacts caused by aromatic hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco beaches, Guanabara Bay, Brazil. **Environmental Pollution**, v. 108, n. 2, p. 291-295, 2000.

CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environmental International**, v. 28, n. 5, p. 337-348, 2002.

DAS, A. J.; LAL, S.; KUMAR, R.; VERMA, C. Bacterial biosurfactants can be an ecofriendly and advanced technology for remediation of heavy metals and co-contaminated soil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, n. 6, p. 1343-1354, 2017.

DELCAMBE, L.; DEVIGNAT, R. L'iturine, nouvel antibiotique d'origine congolaise. **Académie Royale des Sciences Coloniales**, v. 6, p. 1-77, 1957.

DEVELTER, D.W., FLEURACKERS, S.J. Sophorolipids and rhamnolipids. In: **Surfactants from renewable resources**. p. 213. 2010.

DOONG, R.; WU, Y. W.; LEI, W. G. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 96, n. 1, p. 15-27, 2003.

DOONG, R.; WU, Y. W.; LEI, W. G. Surfactant enhanced remediation of cadmium contaminated soils. **Water Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 65-71, 1998.

DOYLE, C. Powerful choices podcast: dispelling cancer myths. 2010. Disponível em <[www.cancer.org](http://www.cancer.org)>. Acesso em 12/05/2018.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química e Sociedade**, v. 39, n. 3, p. 228-236, 2017.

FENEUIL, B.; PITOIS, O.; ROUSSEL, N. Effect of surfactants on the yield stress of cement paste. **Cement and Concrete Research**, v. 100, p. 32-39, 2017.

FERNICOLA, N. A. G. G.; BOHRER-MOREL, M. B. C.; BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. In: *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*, ed. Intertox, 340 p, 2003.

FREITAS, E. C. **Avaliação dos efeitos neurotóxicos de cianotoxinas em cladóceros com ênfase na utilização de um biomarcador bioquímico para sua detecção**. 219 p. 2013. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 241-249, 2011.

GARON, D.; KRIVOBOK, S.; WOUESSIDJEW, D.; SEIGLE-MURANDI, F. influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. **Chemosphere**, v. 47, p. 303-309, 2002.

GREGOROVÁ, D.; AUGUSTIN, J.; VRBANOVÁ, A.; SLÁDEKOVÁ, D. Effect of dialkyl sulphosuccinates on respiration activity of degradative and nondegradative bacteria. **Biologia (Bratisl)**, v. 76, p. 153-176, 1996.

HANSEN, J. H.; PETERSEN, S. V.; ANDERSEN, K. K.; ENGHILD, J. J.; DAMHUS, T.; OTZEN, D. Stable intermediates determine proteins' primary unfolding sites in the presence of surfactants. **Biopolymers**, v. 91, n. 3, p. 221-231, 2009.

HUSSAIN, A.; ARNOLD, J. J.; KHAN, M. A.; AHSAN, F. Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 94, p. 15-24, 2004.

IHS MARKIT. Surfactants, household detergents and their raw materials. CEH Marketing Research Report. **Chemical Economics Handbook**, 2016. Disponível em: <ihsmarkit.com/products/detergent-alcohols-chemical-economics-handbook.html>. Acesso em: 15 Jan. 2018.

IVASK, A.; JUGANSON, K.; BONDARENKO, O.; MORTIMER, M.; ARUOJA, V.; KASEMETS, K.; BLINOVA, I.; HEINLAAN, M.; SLAVEYKOVA, V.; KAHRU, A. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: A comparative review. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 57-71, 2013.

JAFARI, M.; MEHRNEJAD, F.; RAHIMI, F.; ASGHARI, M. The molecular basis of the sodium dodecyl sulfate effect on human ubiquitin structure: a molecular dynamics simulation study. **Scientific Reports**, v. 8, n. 2150, 2018.

JAHAN, K.; BALZER, S.; MOSTO, P. Toxicity of nonionic surfactants. **Environmental Toxicology II**, v. 110, p. 281-290, 2008.

JOHANN, S.; SEILER, T.; TISO, T.; BLUHM, K.; BLANK, L. M.; HOLLERT, H. Mechanism specific and whole – organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. **Science of the Total Environment**, p. 155-163, 2016.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 195-199, 2008.

KAMEDA, Y.; OUHIRA, S.; MATSUI, K.; KANAMOTO, S.; HASE, T.; ATSUSAKA, T. Antitumor activity of Bacillus natto. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of Bacillus natto KMD 2311. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p. 938-944, 1974.

KARP, G. A estrutura e a função da membrana plasmática. In: *Biologia Celular e Molecular – Conceitos e Experimentos*. In: A estrutura e a função da membrana plasmática. Ed. Manole, Barueri, 2005.

KASPERSEN, J. D.; SONDERGAARD, A.; MADSEN, D. J.; OTZEN, D. E.; PEDERSEN, J. S. Refolding of SDS-Unfolded Proteins by Nonionic Surfactant. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 8, p. 1609-1620, 2017.

KETOLA, A. Determination of surfactants in industrial waters of paper and board mills. 2016. 213 p. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química Orgânica, University of Jyväskylä, Jyväskylä, 2016.

KIKUCHI, T.; HASUMI, K. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1596, p. 234-245, 2002.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.

KIM, S.; THIESSEN, P. A.; BOLTON, E. E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B. A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S. H. **PubChem Substance and Compound databases**. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4; 44(D1):D1202-13.

KUMAR, N.; TYAGI, R. Industrial applications of dimeric surfactants: a review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 205-214, 2014.

LECHUGA, M.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; JURADO, E.; NÚÑES-OLEA, J.; RÍOS, F. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 125, p. 1-8, 2016.

LÉMERY, E.; BRIANÇON, S.; CHEVALIER, Y.; BORDES, C.; ODDOS, T.; GOHIER, A.; BOLZINGER, M. A. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 469, p. 166-179, 2015.

LEWIS, M. A. Chronic toxicities of surfactants and detergent builders to algae: a review and risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 20, p. 123-140, 1990.

LOPES, J. P.; GURGEL, H. C. B.; GÁLVEZ, A. O.; PONTES, C. S. Produção de cistos de branchoneta “*Dendrocephalus brasiliensis*” (Crustacea: Anostraca). **Biotemas**, v. 20, n. 2, p. 33-39, 2007.

MAGET-DANA, R.; PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. **Toxicology**, v. 87, p. 151-174, 1994.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 58, p. 428-434, 2002.

MATSUI, S.; PARK, H. Morphological effects and ecotoxicity of nonionic and anionic surfactants to *Closterium ehrenbergii* using AGZI (algal growth and zygospore inhibition) test. **Environmental Engineering Research**, v. 5, n. 2, p. 63-69, 2000.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and theapeutics. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MELETTI, P. C. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. 231 p. 2003. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

MELO, E. D. **Avaliação e identificação da toxicidade de efluentes líquidos de uma indústria de cosméticos**. 2012. 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

MESQUITA, A. S. S. **Seleção de bactérias endofíticas amazônicas produtoras de lipopeptídeos bioativos**. 2015. 141 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 3, p. 183-198, 2005.

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Occurrence of anionic surfactants in treated sewage: risk assessment to aquatic environment. **Journal of hazardous materials**, v. 160, n. 2-3, p. 362-370, 2008.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.

NITSCHKE, M. **Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato**. 2004. 99 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NOVELLI, A. **Estudo limnológico e ecotoxicológico da água e sedimento do Rio Monjolinho – São Carlos (SP), com ênfase nas substâncias de referência cádmio e cobre**. 229 p. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

OLIVEIRA, D. W. F.; CARA, A. B.; LECHUGA-VILLENA, M.; GARCÍA-ROMÁN, L.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by *Bacillus subtilis* ICA56. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 52, n. 2, 2016.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; NAKANO, E.; TALLARICO, L. F. Bioassays with freshwater snails *Biomphalaria* sp.: from control of hosts in public health to alternative tools in ecotoxicology. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 61, n. 1, p. 49-57, 2017.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

OTZEN, D. Protein-surfactant interactions: a tale of many states. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, n. 5, p. 562-591, 2011.

OTZEN, D.; OLIVEBERG, M. Burst-phase expansion of native protein prior to global unfolding in SDS. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 5, p. 1231-1240, 2002.

OWSIANIAK, M.; SZULE, A.; CHRZANOWSKI, L.; CYPLIC, P.; BOGACKI, M.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; HEIPIEPER, H. J. Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 84, p. 545-553, 2009.

PARASZKIEWICZ, K.; BERNAT, P.; KUSMIERSKA, A.; CHOJNIAK, J.; PLAZA, G. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. **Journal on Environmental Management**, v. 209, p. 65-70, 2018.

PAULINO, B. N.; PESSÔA, M. G.; MANO, M. C. R.; MOLINA, G.; NERI-NUMA, I. A.; PASTORE, G. M. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 24, p. 10265-10293, 2016.

PETROVIĆ, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 10, p. 685-696, 2003.

PRADHAN, A.; BHATTACHARYYA, A. Quest for an eco-friendly alternative surfactant: Surface and foam characteristics of natural surfactants. **Journal of Cleaner Production**, v. 150, p. 127-134, 2017.

QIU, Y.; XIAO, F.; WEI, X.; WEN, Z.; CHEN, S. Improvement of lichenysin production in *Bacillus licheniformis* by replacement of native promoter of lichenysin biosynthesis operon and medium optimization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 8895-8903, 2014.

RABET, N.; THIÉRY, A. The neotropical genus *Dendrocephalus* (Crustacea: Anostraca: Thamnocephalidae) in Brazil (South America) with a description of two new species. *Journal of Natural History*, v. 30, n. 4, p. 479-503, 1996.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology**: effects, environmental fate and risk assessment. 2. Ed. Washington, D. C.: Taylor and Francis, 1995.

RATH, A.; GLIBOWICKA, M.; NADEAU, V. G.; CHEN, G.; DEBER, C. M. Detergent binding explain anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. **Proceeding of the National Academy of Sciences - USA**, v. 106, n. 6, p. 1760-1765, 2009.

REBELLO, S.; ASOK, A. K.; MUNDAYOOR, S.; JISHA, M. S. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 2, p. 275-287, 2014.

RÍOS, F.; FERNÁNDEZ-ARTEAGA, A.; LECHUGA, M.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M. Ecotoxicological characterization of polyoxyethylene glycerol ester non-ionic surfactants and their mixtures with anionic and non-ionic surfactants. **Environmental and Science Pollution Research**, v. 24, p. 10121-10130, 2017.

ROMERO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; RIVERA, M. E.; CAZORLA, F. M.; DE VICENTE, A. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 263-269, 2004.

ROSAL, R.; RODEA-PALOMARES, I.; BOLTES, K.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, S.; LEGANÉS, F.; PETRE, A. Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants. **Chemosphere**. v. 81, pp. 288-293, 2010.

ROY, D. Impact of detergents on the protein histochemistry of various cell types of the gill epithelium of *Rita rita*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 15, p. 206-212, 1988.

SANDBACKA, M.; CHRISTIANSON, I.; ISOMAA, B. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish – a comparative study. **Toxicology in Vitro**, v. p. 61-68, 2000.

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. V. A.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; DUTRA, T. V.; NETO, E. L. B. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. 4º Congresso Brasileiro de Petróleo e Gás – 4º PDPETRO, Campinas, SP. 2007.

SANTOS, V. S. S.; CAIXETA, E. S.; CAMPOS JÚNIOR, E. O.; PEREIRA, B. B. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on non target organisms: redefining the use of pyriproxyfen. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, v. 80, n. 3, p. 155-160, 2017.

SARMA, S. S.; NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. **Journal of Environmental Science And Health Part B, Pesticides, Food Contaminants, And Agricultural Wastes**, v. 41, n. 8, p. 1417-1430, 2006.

SARUBBO, L. A.; ROCHA-JUNIOR, R. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Some aspects of heavy metals contamination remeiation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n. 8, p. 707-723, 2015.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, n. 2, p. 123-133, 2008.

SILVA, S. G. **Desenvolvimento de procedimentos limpos para extração de íons metálicos em ponto nuvem**. 84 p. 2008. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SINGER, M. M.; TJEERDEMA, R. S. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 133. New York: Springer-Verlag, 1993. p. 95-134.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 142-146, 2004.

SOUSA, E. C. P. M. Toxicologia marinha: histórico. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Sousa, & M. Nipper (Ed.). **Métodos em ecotoxicologia marinha**. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p. 9-12, 2002.



STEIN, T. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

STRAUS, S. K.; HANCOCK, R. E. W. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, n. 9, p. 1215-1223, 2006.

TANG, Q.; BIE, X.; LU, Z.; LV, F.; TAO, Y.; QU, X. Effects of fengycin from Bacillus subtilis fmbJ on apoptosis and necrosis in Rhizopus stolonifer. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 675-680, 2014.

TAO, Y.; BIE, X. M.; LV, F. X.; ZHAO, H. Z.; LU, Z. X. Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against Rhizopus stolonifer. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 146-150, 2011.

TÖZÜM-CALGAN, S. R. D.; ATAY-GÜNEYMAN, N. Z. The effects of an anionic and a non-ionic surfactant on growth and nitrogen fixing ability of a cyanobacterium, Gloeocapsa. **Journal of Environmental Science and Health Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 355-369, 1994.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, 1994.

VASCONCELLOS, M. G. Características populacionais, desenvolvimento e produção de Dendrocephalus Pesta, 1921 sob as condições climáticas da região sudeste do país. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 12, n. 2, p. 125-132, 2010.

VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R. M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by biosurfactant surfactin from Bacillus subtilis. **Biologicals**, v. 25, p. 289-297, 1997.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. Principles of Ecotoxicology. **Environmental Toxicology**. 3 ed. New York, CRC Press, 2006.

WYRWAS, B.; CHRZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; SZULC, A.; CYPLIC, P.; BIALAS, W.; SZYMANSKI, A.; HOLDERNA-ODACHOWSKA, A. Utilization of Triton X-100 and polyethylene glycols during surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel. **Journal of Hazardous Materials**, v. 197, p. 97-103, 2011.

YING, G. G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environmental International**, v. 32, p. 417-431, 2005.

YUSHIMANOV, V. E.; PERUSSI, J. R.; IMASATO, H.; TABAC, M. Interaction of papaverine with micelles of surfactants with different charge studied by H-NMR. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1189, n. 1, p. 74-80, 1994.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. In: **Ecotoxicologia**. São Carlos: Editora Rima, 2006. p. 413-427.

ZDZIENNICKA, A.; SZYMCZYK, K.; KRAWCZYK, J.; JAŃCZUK, B. Critical micelle concentration of some surfactants and thermodynamic parameters of their micellization. **Fluid Phase Equilibria**, v. 322, p. 126-134, 2012.

ZHAO, H.; SHAO, D.; JIANG, C.; SHI, J.; LI, Q.; HUANG, Q.; RAJOKA, M. S. R.; YANG, H.; JIN, M. Biological activity of lipopeptides from Bacillus. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 5951-5960, 2017.

## ANEXOS

### 1. Conformidade com os padrões éticos

Todas as recomendações nacionais e internacionais quanto ao cultivo e manipulação dos organismos foram atendidas.

### 2. Normas da revista selecionada para submissão do artigo científico

## Environmental Science and Pollution Research

Editor-in-Chief: Philippe Garrigues  
ISSN: 0944-1344 (print version)  
ISSN: 1614-7499 (electronic version)  
Journal no. 11356

2017 Impact Factor 2.800



## Instructions for Authors

### *Types of Papers*

- Peer-reviewed contributions:
  - Research Articles (full papers)
  - Short Original Communications and Discussion Articles
  - Review Articles
  - Research Communications

Please ensure that the length of your paper is in harmony with your research area and with the science presented.

All papers – excluding Editorials, Letters to the Editor, Conference Reports – are subject to peer-review by a minimum of two and a maximum of three experts.

While submitting your paper you will be asked for three potential reviewers. Indicating three reviewers is mandatory.

- To authors from non-English language countries:  
To have the best possible pre-requisition for the review process, please ask a native speaker to check the quality of the English, before you submit the complete paper.

### MANUSCRIPT SUBMISSION

### *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

## *Online Submission*

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### **TITLE PAGE**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
  - Please avoid acronyms in the title of your article
  - For local studies, please indicate the name of the region and country in the title.
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

## *Abstract*

Please provide an abstract of about 10 to 15 lines.

## *Keywords*

Please provide 6 to 8 keywords which can be used for indexing purposes.

### **TEXT**

## *Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

## *Headings*

Please use no more than three levels of displayed headings.

## *Abbreviations*

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## *Footnotes*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

## *Acknowledgments*

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

## REFERENCES

### *Citation*

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- **Journal article**

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- **Article by DOI**

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- **Book**

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- **Book chapter**

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- **Online document**

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. *IOP Publishing PhysicsWeb*. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- **Dissertation**

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- **ISSN LTWA**

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- **EndNote style (zip, 2 kB)**

### *Specific Remarks*

- **Online documents:**  
wikipedia documents are not acceptable as references.
- **Language**

References should be in English with an appropriate title in English. If it's in a different language the language should be indicated

Zhu J, Wu F-C, Deng Q-J, Shao S-X, Mo C-L, Pan X-L, Li W, Zhang R-Y (2009) Environmental characteristics of water near the Xikuangshan antimony mine. *Acta Scientiae Circumstantiae* 29:655-661 (in Chinese)

#### TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

#### Important note:

Please note that—contrary to the text above—according to the policy of ESPR, any addition/removal of authors or change in order list are prohibited during all the review process. The original authorship must remain the same during all the review process.