

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**GABRIELA VALÉRIO VALADÃO**

**EFEITOS ECOTÓXICOS DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR  
*RHODOTORULA MUCILAGINOSA* UTILIZANDO ESPÉCIE DE CLADÓCERO DE  
ÁGUA DOCE**

**UBERLÂNDIA**

**2023**

GABRIELA VALÉRIO VALADÃO

**EFEITOS ECOTÓXICOS DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR  
*RHODOTORULA MUCILAGINOSA* UTILIZANDO ESPÉCIE DE CLADÓCERO DE  
ÁGUA DOCE**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como pré-requisito para  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia pelo curso de  
Biotecnologia da Universidade Federal  
de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Cristina  
Cavalcanti Dantas.

**UBERLÂNDIA**

**2023**

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Gabriela Valério Valadão

Efeitos ecotóxicos do biossurfactante produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando espécie de cladóceros de água doce

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas.

Uberlândia, 28 de novembro de 2023.

### **BANCA EXAMINADORA**

(Orientadora): Dra. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas.

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Instituto de Biotecnologia).

Nome: Iara Rossi Gonçalves.

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Faculdade de Engenharia Química).

Nome: Amanda Carmelo da Rocha.

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (Faculdade de Engenharia Química).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por me sempre me apoiarem e me incentivarem em todas as importantes etapas de minha vida. Agradeço minha mãe e irmão, Caroline e Felipe, em especial por estarem comigo durante as partes boas e ruins sem exceções. Sem vocês, eu não teria conseguido!

Aos meus amores peludinhos, Fred e Natsu, por sempre me animarem e sempre me fazerem companhia.

Agradeço ao LABBIO, pela oportunidade de aprendizado e de realizar este trabalho. Aos meus colegas de laboratório, pelas conversas e auxílio.

Agradeço ao NUCBIO e equipe, pela gentileza e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho. Ao RELAM e equipe, por fornecer recursos necessários para as etapas desse trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Raquel, pela paciência e ensinamentos durante meu tempo sob sua orientação. Obrigada por ser um exemplo de mulher na ciência!

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e ao CNPq pela oportunidade de concluir esse trabalho e me inserir no âmbito científico.

Agradeço aos meus amigos que fiz durante o curso que sempre estiveram comigo. Ao Vinícius, que conheci sem querer e se tornou muito especial e importante. À Maria Eduarda, que me aguentou durante muito tempo dentro e fora do curso. Sem você, esse trabalho não seria o que é hoje. Obrigada por me formarem em uma pessoa melhor!

Por fim, agradeço a todos que me apoiaram e me acolheram direta ou indiretamente durante a minha graduação. Cada um de vocês são parte de mim e estarão guardados em meu coração.

## RESUMO

VALADÃO, G. V. **Efeitos ecotóxicos do biossurfactante produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando espécie de cladóceros de água doce.** 2023. p. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) – Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de metabólitos produzidos por microrganismos, com alta atividade de superfície e atividade emulsificante, baixa toxicidade e boa compatibilidade ambiental, sendo aplicados em diversos segmentos, como setores industriais e petrolífero, para biorremediação de vazamento de óleo. Portanto, há crescente interesse na produção industrial de biossurfactantes devido às vantagens sobre a produção de surfactantes químicos. Os biossurfactantes possibilitam o uso de substratos renováveis, como resíduos ou subprodutos agroindustriais, gerando menor custos de produção. Essas biomoléculas são consideradas biodegradáveis e menos tóxicas que suas contrapartes sintéticas, mas ainda necessitam estudos quanto sua ação tóxica ambiental. Assim, o presente trabalho visou a avaliação da ecotoxicidade do biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, isolada de algas marinhas da Antártica, sob o organismo modelo *Daphnia magna*. A produção da biomolécula foi conduzida a partir de fermentação submersa da levedura utilizando resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*) como fonte de carbono. O método da acetona fria como solvente foi utilizado para a extração da biomolécula. O composto apresentou concentração total de 30 g.L<sup>-1</sup>, verificada através de metodologia gravimétrica. Os efeitos de ecotoxicidade *in vivo* de cinco diferentes concentrações da biomolécula extraída foram avaliados (15 g.L<sup>-1</sup>, 10 g.L<sup>-1</sup>, 7,5 g.L<sup>-1</sup>, 5 g.L<sup>-1</sup> e 3,75 g.L<sup>-1</sup>). A taxa de imobilização e comportamentos anormais dos dafnídeos neonatos foram observados após 24 horas e 48 horas. O valor da concentração equivalente ao Efeito de Concentração Máxima a 50% (EC<sub>50</sub>) após 24 horas obtido foi de 6 g.L<sup>-1</sup> enquanto o valor obtido após 48 horas foi de 2 g.L<sup>-1</sup>. Esses dados sugerem a baixa toxicidade ambiental do composto estudado.

**Palavras-chaves:** biossurfactante; efeitos ecotóxicos; *Daphnia magna*; *Rhodotorula mucilaginosa*.

## ABSTRACT

VALADÃO, G. V. **Ecotoxic effects of biosurfactant produced by *Rhodotorula mucilaginosa* using freshwater cladoceran species.** 2023. p. Final paper (Monography) – Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Biosurfactants are one of the main classes of metabolites produced by microorganisms, with high surface and emulsifying activity, low toxicity, and good environmental compatibility, and are applied in various segments such as industrial and oil sectors, for bioremediation of oil spillage. Therefore, there's a rising interest in the industrial production of biosurfactants due to their advantages over the production of chemical surfactants. Biosurfactants make the use of renewable substrates possible, such as agro-industrial waste and by-products, generating lower production costs. These biomolecules are biodegradable and less toxic than their synthetic counterparts, but there is still a need of being studied in terms of their environmental toxicity. Hence, the aim of the present study was to assess the ecotoxicity of the biosurfactant produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*, isolated from Antarctic seaweed, on the model organism *Daphnia magna*. The biomolecule was produced by submerged fermentation of the yeast using pineapple (*Ananas comosus*) waste as the carbon source. The cold acetone method was used to extract the biomolecule. The compound demonstrated a total concentration of 30 g.L<sup>-1</sup>, which was verified applying a gravimetric method. The *in vivo* ecotoxic effects of five different concentrations of the extracted biomolecule were assessed (15 g.L<sup>-1</sup>, 10 g.L<sup>-1</sup>, 7,5 g.L<sup>-1</sup>, 5 g.L<sup>-1</sup>e 3,75 g.L<sup>-1</sup>). The immobilization rate and abnormal behavior of neonate daphnids were observed after 24 hours and 48 hours. The concentration equivalent to the Maximal Concentration Effect at 50% (EC<sub>50</sub>) obtained after 24 hours was 6 g.L<sup>-1</sup> while the value obtained after 48 hours was 2 g.L<sup>-1</sup>. These data suggest the low environmental toxicity of the compound studied.

**Keywords:** biosurfactant; ecotoxic effects; *Daphnia magna*; *Rhodotorula mucilaginosa*.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
2.1. Objetivo geral	11
2.2. Objetivos específicos	11
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>12</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
4.1. Microrganismo e Conservação	12
4.2. Preparo do extrato de abacaxi a partir de seus resíduos	13
4.3. Reativação microbiana e Pré-inóculo	13
4.4. Produção do biossurfactante através de fermentação submersa	13
4.5. Extração por acetona fria	14
4.6. Obtenção da concentração da biomolécula	14
4.7. Cultivo da amostra biológica	15
4.8. Testes de toxicidade aguda	15
4.9. Análise estatística	16
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>16</b>
5.1. Produção do biossurfactante através de fermentação submersa	16
5.2. Extração por acetona fria	17
5.3. Obtenção da concentração da biomolécula	19
5.4. Cultivo da amostra biológica	20
5.5. Testes de toxicidade aguda	20
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>27</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>28</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Teste de toxicidade aguda em <i>D. magna</i> utilizando biossurfactante produzido por <i>R. mucilaginosa</i> .....	21
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Extração do biossurfactante em Erlenmeyers a partir do método da acetona fria. .....	18
<b>Figura 2.</b> Biossurfactante extraído apresentando formação de espuma .....	18
<b>Figura 3.</b> Pó obtido pela liofilização do biossurfactante purificado .....	19
<b>Figura 4.</b> Solução padrão para aquário do organismo <i>D. magna</i> .....	20
<b>Figura 5.</b> Organismo <i>D. magna</i> imóvel após 48 horas de exposição ao biossurfactante ....	22
<b>Figura 6.</b> Gráfico de organismos considerados imóveis em 24 horas após exposição à diferentes concentrações do biossurfactante.....	23
<b>Figura 7.</b> Gráfico de organismos considerados imóveis em 48 horas após exposição à diferentes concentrações do biossurfactante.....	23
<b>Figura 8.</b> Ensaio de toxicidade aguda a partir de cinco diferentes concentrações do biossurfactante produzido por <i>R. mucilaginosa</i> .....	24
<b>Figura 9.</b> Ensaio de toxicidade aguda a partir de cinco diferentes concentrações do biossurfactante produzido por <i>R. mucilaginosa</i> .....	24

## 1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos tensoativos anfipáticos, ou seja, possuem tanto uma parte hidrofílica como uma parte hidrofóbica. São comumente utilizados em formulações de diferentes produtos, tais como em tintas, adesivos e detergentes. Esses compostos são de interesse científico devido ao seu potencial de aplicação em grandes setores, como no setor industrial e petrolífero, visto sua capacidade de solubilização, complexação e mobilização de poluentes em soluções líquidas, permitindo, assim, a recuperação e/ou reutilização do material. No entanto, grande parte desses surfactantes são de origem química e causam desastrosos efeitos quando em contato com a natureza e, portanto, faz-se necessária a busca de alternativas sustentáveis e menos agressivas para a aplicação. Neste contexto, observa-se um aumento de pesquisas para produção de biossurfactantes, compostos biológicos que surgem como alternativa aos surfactantes químicos (Fracchia *et al.*, 2012).

Os biossurfactantes podem ser produzidos através de metabólitos secundários de microrganismos, como bactérias e leveduras, e possuem alta atividade de superfície e emulsificante, baixa toxicidade e boa compatibilidade ambiental. Logo, essas biomoléculas apresentam potencial para uso em setores industriais e petrolíferos, como na biorremediação de derramamentos de óleos, além de aplicação em setores de cosméticos, farmacêuticos e alimentícios (Jimoh; Lin, 2019). Ademais, foram elucidadas propriedades antimicrobianas contra cepas patogênicas em biossurfactantes como nos experimentos demonstrados por Anjum e colaboradores em 2016, nos quais avaliaram a inibição do crescimento de microrganismos e obtiveram resultados promissores. Dessa forma, a produção industrial de biossurfactantes a partir de microrganismos apresenta diversas vantagens sobre o uso de surfactantes sintéticos/químicos. Não obstante, a maior desvantagem introduzida por esses tensoativos biológicos está no elevado custo da condução das técnicas necessárias para uma produção efetiva e lucrativa (Anjum *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a busca por formas de produção com menor custo e que permitam um bom cultivo do microrganismo e eficiência na obtenção da biomolécula pode exigir a aplicação de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes. Tais resíduos podem advir de diferentes matérias vegetais e são utilizados como fonte de carbono e nitrogênio para o meio

de cultura, reduzindo o custo final e auxiliando para redução dos impactos ambientais causados pelo descarte inadequado desses resíduos. Entretanto, a adequação e otimização da composição de nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos e formação dos compostos de interesse exprime como substancial revés (Assis *et al*, 2014; Freitas, 2021). Estudos prévios conduzidos por Sousa (2021) relataram que o emprego de suplementação com extrato de abacaxi (*Ananas comosus*) produzido a partir de seus resíduos agroindústrias atribui para a alta produtividade do biossurfactante produzido por *R. mucilaginosa* e além de preservar suas propriedades tensoativas e emulsificantes.

Além da aplicação de resíduos agroindustriais, observa-se crescente interesse na funcionalidade dos microrganismos extremófilos em razão a sua plasticidade genética e produção de metabólitos adaptados a tais condições, os conferindo vantagens sobre microrganismos comuns. Dentre as vantagens, tem-se a capacidade termolábil, proliferação em diferentes pH e necessidade de menores concentrações de nutrientes para seu desenvolvimento (Martorell *et al*, 2019; Rosa *et al*, 2019). Diante disso, o ambiente antártico conta com uma alta diversidade de microrganismos extremófilos adaptados para sobreviver as baixas temperaturas, tal como a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.

O gênero *Rhodotorula* é descrito como grupamento extremamente polifilético, englobando diversas espécies com traços distintos, mas representado por leveduras de pigmentação avermelhada. A *R. mucilaginosa* apresenta alto crescimento em matéria-prima barata e sua efetividade e aplicabilidade na produção de biossurfactantes foi elucidada previamente por estudos conduzidos por Sousa (2021) e Camargo (2019). Entretanto, os efeitos e impactos sobre o meio ambiente e material biológico de tal biossurfactante não foram esclarecidos em tais estudos.

Ainda, é possível observar esses efeitos e impactos ambientais através da realização de testes de toxicidade aguda dos compostos de interesse. Espécies de cladocéros de água doce, tal como o organismo modelo *Daphnia magna*, são vastamente utilizadas para a execução desses testes. A imobilização ou alterações comportamentais são os parâmetros majoritariamente utilizados para a análise dos compostos aos quais os organismos serão expostos devido à sua alta sensibilidade. Além disso, observa-se a aplicação desses testes

para avaliação de diversos compostos como farmacêuticos e pesticidas (Bownik, 2020). Dessa forma, o presente estudo objetiva-se avaliar os efeitos ecotóxicos causados pela aplicação do biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* através de ensaios *in vivo* realizados em microcrustáceo modelo, *Daphnia magna*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a ecotoxicidade *in vivo* do biossurfactante produzido pela levedura antártica *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando espécie de cladócero de água doce *Daphnia magna*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Produzir o biossurfactante a partir da fermentação submersa utilizando resíduos de abacaxi como fonte de carbono;
- Realizar a extração do biossurfactante através do uso de acetona fria como solvente;
- Analisar a concentração total do biossurfactante a partir do método gravimétrico de liofilização obtido após a fermentação submersa;
- Avaliar a sobrevivência do organismo, *Daphnia magna*, quando exposto à cinco diferentes concentrações do biossurfactante;
- Calcular o Efeito de Concentração Máxima a 50% dos cladóceros após a exposição às diferentes concentrações do biossurfactante.

### 3. JUSTIFICATIVA

Diante a crescente preocupação com a saúde ambiental, assim como os avanços na biotecnologia, o desenvolvimento de novos agentes seguros e biologicamente ativos, denominados biossurfactantes, torna-se uma opção sustentável e alternativa ao uso de tensoativos sintéticos. Embora os biossurfactantes sejam amplamente vantajosos em relação aos surfactantes químicos, seus efeitos ecotóxicos necessitam ser elucidados antes da viabilização de sua aplicação no meio ambiente, como por exemplo, em processos de biorremediação.

Atrelado a isso, estudos prévios foram conduzidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABBIO) da Universidade Federal de Uberlândia, e foram obtidos dados que solidificam o elevado potencial biotecnológico do biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, além de demonstrarem a sua capacidade de alta produtividade utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Entretanto, seus efeitos de toxicidade sobre material biológico *in vivo* permaneceram desconhecidos.

Assim, este estudo objetiva analisar os efeitos de ecotoxicidade provocados pelo biossurfactante produzido pela *R. mucilaginosa*, a fim de viabilizar o uso dessa biomolécula com potencial para aplicações industriais e ambientais.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Microrganismo e Conservação

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, com codificação de isolamento L69, foi obtida a partir de algas marinhas provenientes de Punta Plaza (Admiralty Bay, Ilha King George, Antártica) e sua taxonomia foi identificada conforme descrito por Duarte e colaboradores (2013). A cepa se encontrada armazenada no Centro de Recursos Microbianos (CRM –

UNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Brasil) sob o número de acesso CRM 747 e no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABBIO) da Universidade Federal de Uberlândia, onde encontra-se conservada pelo método de criopreservação, em ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com 50% (v/v) de glicerol.

#### **4.2. Preparo do extrato de abacaxi a partir de seus resíduos**

De acordo com a metodologia de Viera e colaboradores (2017) que demonstrou bons resultados com a suplementação do meio de fermentação, o extrato de abacaxi (*Ananas comosus*) foi preparado a partir da casca do fruto. Os resíduos foram lavados com solução de hipoclorito de sódio a 10% (v/v) por 15 minutos e após retirada da solução, as cascas foram trituradas em água utilizando um liquidificador industrial. O caldo foi peneirado e centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , para remoção das partículas insolúveis e obtenção do extrato de abacaxi. O extrato de abacaxi foi congelado em freezer comum a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

#### **4.3. Reativação microbiana e Pré-inóculo**

Inicialmente, a levedura foi reativada em meio de cultura sólido ágar YPD ( $\text{g.L}^{-1}$ ): glicose (10), peptona (5), extrato de levedura (3) e ágar (20), incubada a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24-48 horas para formação das colônias. Para o pré-inóculo, 2-3 colônias isoladas e puras foram incubadas em 100 mL de meio líquido YPD (sem acréscimo do ágar), incubadas em agitador de bancada a temperatura ambiente e 120 rpm, por 24 horas, sendo o tempo necessário para o fim da fase de crescimento e início da fase estacionária.

#### **4.4. Produção do biossurfactante através de fermentação submersa**

Para a produção do biossurfactante, uma amostra contendo uma unidade de densidade óptica (DO), a 600nm, do pré-inóculo descrito anteriormente foi transferida para Erlenmeyer

de 200 ml contendo 150 ml do meio de cultivo de fermentação previamente otimizado conforme estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABBIO) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O meio de cultivo otimizado para fermentação submersa apresenta ( $\text{g.L}^{-1}$ ): extrato de abacaxi (25), extrato de levedura (15), peptona (1,5), sulfato de amônio (1), e em solução salina ( $\text{g.L}^{-1}$ ): NaCl (10),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (5),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2). A fermentação foi conduzida a  $15^\circ\text{C}$  e 120 rpm por 24 horas, com suplementação da fonte de carbono (extrato de abacaxi) após 10 horas de fermentação. O extrato de abacaxi foi adicionado com o propósito de atingir  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose na concentração final do meio. Após as 24 horas de fermentação submersa, as células da levedura foram separadas do caldo fermentado a partir de centrifugação, por 20 minutos a 8000 rpm, e o sobrenadante contendo os metabólitos microbianos, incluindo o biossurfactante, foi recuperado e congelado em freezer comum a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da extração. A tensão superficial foi determinada com auxílio de um tensiomêtro em temperatura ambiente.

#### **4.5. Extração por acetona fria**

A extração foi realizada pela adição de acetona fria nas amostras na proporção 1:3 (v/v), como descrito por Ilori e Amund (2001) e avaliado por Sousa (2021). As amostras foram incubadas por 10 horas a  $4^\circ\text{C}$  e o biossurfactante precipitado foi ressuspenso em água destilada. Posteriormente, o biossurfactante extraído foi armazenado em geladeira comum.

#### **4.6. Obtenção da concentração da biomolécula**

A concentração foi calculada de acordo com o método gravimétrico descrito por Machado e colaboradores (2020), aplicando a liofilização. Assim, 2 ml do biossurfactante extraído foi transferido para um Eppendorf de 5 ml, o qual vedado com parafilme perfurado para permitir a passagem de ar e evitar acidentes como o rompimento dos tubos no equipamento. A análise foi conduzida em triplicata e as amostras foram congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  no dia anterior a

liofilização. O ciclo de liofilização empregado foi de 24 horas e, após esse período, o pó obtido foi pesado em balança analítica e a concentração foi calculada.

#### **4.7. Cultivo da amostra biológica**

O cultivo de *Daphnia magna* foi feito de acordo com a Diretriz 202 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2004). Desse modo, os dafnídeos foram obtidos comercialmente e mantidos em aquários aclimatados a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  em um ciclo claro/escuro de 16:8 horas. Para o meio de cultura foi utilizado água reconstituída composta por  $11,76 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $4,93 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $2,59 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  e  $0,23 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KCl}$  e dissolvida em 1 litro de água destilada ajustado em pH  $7,8 \pm 0,2$  e com dureza total de  $47 \pm 5 \text{ mg.L}^{-1}$  em  $\text{CaCO}_3$ , e tal meio foi renovado três vezes por semana. Os organismos foram alimentados com aproximadamente  $150 \mu\text{g}$  /organismo três a quatro vezes semanalmente, anterior aos experimentos, com suspensão de algas *Spirulina platensis*. Foi aplicada água reconstituída para a manutenção e aclimação dos dafnídeos nos aquários, sendo também utilizada para preparação das soluções dos testes. Água de diluição foi utilizada como controle negativo.

#### **4.8. Testes de toxicidade aguda**

Todos os testes foram conduzidos de acordo com a Diretriz 202 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2004). Os testes foram realizados em sistema estático, em placas de Petri utilizando 5 dafnídeos neonatos com menos de 24 horas de vida. Os organismos foram expostos a 10 mL de solução com cinco diferentes concentrações do biossurfactante por 48 horas, sendo que cada solução foi diluída com água reconstituída e fator de diluição a 0,5. O controle negativo constituiu-se apenas de água reconstituída. Os organismos não foram alimentados durante os testes e as condições de sobrevivência foram as mesmas utilizadas para o cultivo dos organismos. Os testes foram performados em quadruplicata e organismos foram observados através de um

estereomicroscópio para registrar a imobilização após 24 e 48 horas do contato com o biossurfactante. Os crustáceos foram considerados imóveis na ausência de reação por 15 segundos após a exposição a estímulo luminoso seguido de leves toques na placa.

#### **4.9. Análise estatística**

O critério de avaliação dos testes de toxicidade aguda foram os dados de imobilidade obtidos previamente. Tais dados foram utilizados para avaliar a Efeito de Concentração Máxima a 50% dos organismos em 48 horas ( $EC_{50-48h}$ ), sendo analisados em conformidade a Diretriz 202 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2004), aceitando-se o máximo de 10% de mortalidade dos organismos no controle negativo.

Para determinação de  $EC_{50}$  com intervalo de confiança de 95%, os dados foram submetidos à análise de regressão *Probit*, considerando a distribuição normal de logarítmico dos valores. Ainda, a sensibilidade do organismo *D. magna*, os dados foram comparados a partir do Teste One-way ANOVA. Para as análises, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Produção do biossurfactante através de fermentação submersa**

A partir da fermentação foi possível obter 750ml de sobrenadante contendo o biossurfactante. A aplicação de resíduos agroindustriais como fonte alternativa de carbono para a produção de biossurfactantes mostra-se vantajosa ao reduzir os custos do processo, sem interferir com a qualidade e produtividade. É possível observar o uso de resíduos e subprodutos do processamento de óleo, da indústria de açúcar, da destilação e, ainda, resíduos de frutas e vegetais para a produção de biossurfactantes (Rivera *et al*, 2019). Assim, o uso do extrato obtido a partir de resíduos de abacaxi como fonte de carbono é promissor, visto

que contêm açúcares fermentáveis e nutrientes, e capacidade de aumentar da concentração final da biomolécula, como evidenciado por estudos conduzidos por Vieira e colaboradores (2021) e, também, por Santos e colaboradores (2022). Ademais, estudos prévios demonstrados por Sousa em 2021, conduzidos pela equipe do LABBIO demonstrou tal vantagem do extrato de abacaxi na fermentação da levedura *R. mucilaginosa* para a produção de biossurfactante. Diante disso, a fermentação suplementada com o extrato de abacaxi mostrou-se adequada para o fornecimento de carbono necessário para o crescimento, desenvolvimento e produção de metabólitos pela levedura.

Ademais, constatou-se uma tensão superficial do biossurfactante de  $45 \text{ mN.m}^{-1}$ . Os biossurfactantes, assim como os surfactantes químicos, são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial por ação de sua estrutura anfipática que age em fases de fluídos tais como óleo e água (Mukherjee; Das, 2010; Kumar *et al*, 2021). Desta forma, a presença de surfactante no meio de fermentação reduz a tensão superficial (Vieira, 2021), e o estudo realizado por Sousa (2021) demonstrou uma redução da tensão superficial do caldo fermentado de *R. mucilaginosa*, com suplementação do extrato de abacaxi de  $60 \text{ mN.m}^{-1}$ , para  $43 \text{ mN.m}^{-1}$ . Portanto, a tensão superficial obtida neste estudo encontra-se em conformidade com estudos anteriores, observando-se uma produção adequada do biossurfactante para os ensaios de ecotoxicidade.

## **5.2. Extração por acetona fria**

A extração do biossurfactante é uma etapa importante para o processo de recuperação da biomolécula após o processo de fermentação, considerada a etapa com maior custo da produção. Assim, vários métodos têm sido analisados para a recuperação dessas moléculas visando reduzir o custo sem afetar a produtividade e rendimento final do produto (Bhardwaj *et al*, 2013; Sanches *et al*, 2021). Dentre estas técnicas, observa-se a precipitação do produto de interesse pela adição de solventes às soluções, tais como etanol e acetona.

O método de adição de acetona fria descrita por Ilori (2001), é aplicado para extração de biossurfactante produzido por *Penicillium* sp. (Luna-Velasco *et al*, 2007), por *Pseudomonas*

*putida* com suplementação por melação de açúcar de beterraba como fonte carbono (Rokni *et al.*, 2022) e, ainda, biossurfactante produzido por *R. mucilaginosa* (Camargo, 2019; Sousa, 2021). No presente trabalho, a adição de acetona ao biossurfactante bruto produziu uma solução de tom amarelado (**Figura 1**) que foi incubada a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 10 horas. Após a incubação, o líquido foi descartado e o pellet contendo a biomolécula, de coloração alaranjada, foi ressuscitado com água destilada (**Figura 2**), obtendo-se o biossurfactante de mesma coloração e formação de espuma. A formação de espuma ocorre devido às propriedades dos biossurfactantes, consistindo em pequenas bolhas formadas pela dispersão de gás pela solução (Vu; Mulligan, 2022). O biossurfactante foi armazenado em tubos Falcon a  $4^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 1.** Extração do biossurfactante em Erlenmeyers a partir do método da acetona fria. **Fonte:** Próprio autor.



**Figura 2.** Biossurfactante extraído apresentando formação de espuma. **Fonte:** Próprio autor.

### 5.3. Obtenção da concentração da biomolécula

A liofilização, técnica de desidratação através da sublimação, como método gravimétrico para a quantificação e armazenamento de biossurfactantes é descrita na literatura, como em estudos com biossurfactante produzido por *Marinobacter litoralis* conduzidos por Haque e colaboradores (2020) e estudos conduzidos por Machado e colaboradores (2020) com biossurfactante produzido por *Bacillus methylotrophicus*. Neste estudo, a média dos valores obtidos na pesagem do biossurfactante em pó produzido foi de 0,06 gramas. A partir deste valor e levando em consideração que foi utilizada amostras de 2 ml, foi possível calcular a concentração e foi obtida de 30 g.L<sup>-1</sup>. Estudos realizados com leveduras do gênero *Rhodotorula* apresentou concentrações de 19,27 g.L<sup>-1</sup> e 17,81 g.L<sup>-1</sup> para biossurfactante produzido por *R. babjevae*, utilizando subprodutos de destilarias de grãos com milho e arroz, respectivamente (Sen *et al*, 2021). Outro estudo conduzido em biorreator Minifor para produção de biossurfactante por *Rhodotorula* sp. YBR, considerada uma levedura com sequências de genes e propriedades bioquímicas similares a *R. mucilaginosa*, apresentou concentração de 10,08 g.L<sup>-1</sup> (Derguine-Mecheri *et al*, 2021). Dessa forma, o valor de concentração obtido nessa pesquisa é comparável àquele aferido nos estudos de Camargo (2019) e Sousa (2021), que obtiveram uma concentração de 27 g.L<sup>-1</sup> para o biossurfactante produzido por *R. mucilaginosa*, o que representa a produção alta da biomolécula. Ademais, o pó obtido apresentou coloração esbranquiçada e aspecto leve e fino (**Figura 3**).

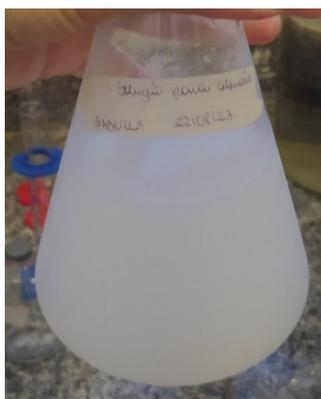


**Figura 3.** Pó obtido pela liofilização do biossurfactante purificado. **Fonte:** Próprio autor.

#### 5.4. Cultivo da amostra biológica

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) é uma instituição internacional que visa a construção de melhores políticas e, dentre elas, destacam-se as diretrizes projetadas para a realização de diversos testes científicos. A diretriz 202, elaborada para os testes de toxicidade aguda em dafnídeos, foi utilizada para padronizar o meio de cultivo dos organismos, em conformidade ao descrito pela OCDE.

O preparo da solução padrão do meio aplicado no cultivo dos organismos apresentou uma coloração branca, decorrente dos sais adicionados (**Figura 4**). Não houve complicações quanto a aclimatização dos organismos, de forma que todos os dafnídeos obtidos seguiram um ciclo de vida normal e saudável. A reprodução aconteceu 12 dias após a aclimatização, e ocorreu, uma segunda vez, 14 dias após a primeira reprodução. Os neonatos não apresentaram qualquer tipo de anomalias, tanto morfológicas como comportamentais.



**Figura 4.** Solução padrão para aquário do organismo *D. magna*. **Fonte:** Próprio autor.

#### 5.5. Testes de toxicidade aguda

O biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* mostra potencial para aplicações biotecnológicas ambientais, além de ser uma biomolécula com alta produtividade. Após os estudos iniciais com essa levedura em laboratório (LABBIO – UFU), as etapas seguintes visam a caracterização da molécula e aplicação direta em áreas da biotecnologia, como na remediação de solo, o que faz-se necessário a avaliação da sua

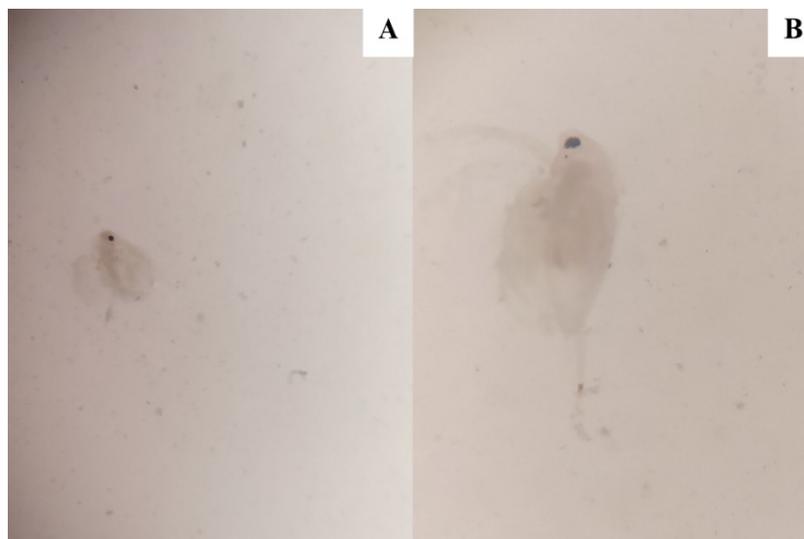
toxicidade. Portanto, os seguintes dados corroboram para a análise dos efeitos ecotóxicos produzidos pelo biossurfactante.

A Tabela 1 descreve os dados de imobilização obtidos nos testes de toxicidade aguda realizados em intervalos de 24 e 48 horas. As concentrações das diluições do biossurfactante, obtidas após a análise de sua concentração total, foram as seguintes: 15 g. L<sup>-1</sup> (diluição 1), 10 g. L<sup>-1</sup> (diluição 1.5), 7,5 g. L<sup>-1</sup> (diluição 2), 5 g. L<sup>-1</sup> (diluição 2.5) e 3,75 g. L<sup>-1</sup> (diluição 3). As taxas de imobilização estão expressas na tabela 1. Seguindo as normas vigentes da OCDE (2004), a mortalidade dos controles não excedeu 10%, ou seja, apenas 2 neonatos imóveis foram aceitos. A **Figura 5** exemplifica um neonato considerado imóvel.

**Tabela 1.** Teste de toxicidade aguda em *D. magna* utilizando biossurfactante produzido por *R. mucilaginosa*

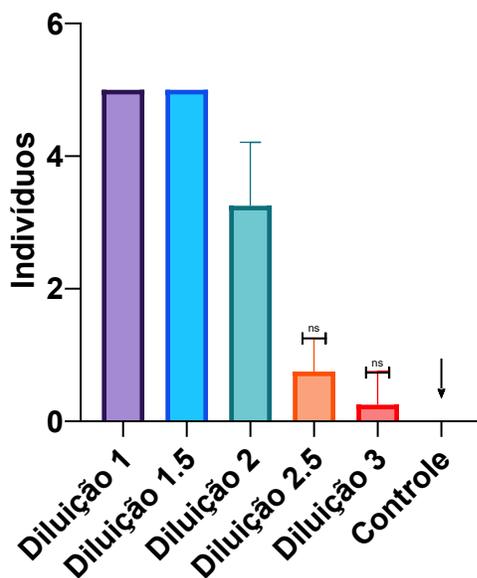
	<b>Biossurfactante (g/L)</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>24h (%)</b>	<b>48h (%)</b>	<b>DP 24h</b>	<b>DP 48h</b>
<b>Controle</b>	0	0 imóvel	0 imóvel	0	0	0,00	0,50
	0	0 imóvel	0 imóvel	0	0		
	0	0 imóvel	1 imóvel	0	20		
	0	0 imóvel	1 imóvel	0	20		
<b>Diluição 1</b>	15	5 imóveis	5 imóveis	100	100	0,00	0,00
	15	5 imóveis	5 imóveis	100	100		
	15	5 imóveis	5 imóveis	100	100		
	15	5 imóveis	5 imóveis	100	100		
<b>Diluição 1.5</b>	10	5 imóveis	5 imóveis	100	100	0,00	0,00
	10	5 imóveis	5 imóveis	100	100		
	10	5 imóveis	5 imóveis	100	100		
	10	5 imóveis	5 imóveis	100	100		
<b>Diluição 2</b>	7,5	2 imóveis	5 imóveis	40	100	0,83	0,00
	7,5	4 imóveis	5 imóveis	80	100		
	7,5	3 imóveis	5 imóveis	60	100		
	7,5	4 imóveis	5 imóveis	80	100		
<b>Diluição 2.5</b>	5	1 imóvel	4 imóveis	20	80	0,43	0,43
	5	1 imóvel	5 imóveis	20	100		
	5	0 imóvel	5 imóveis	0	100		
	5	1 imóvel	5 imóveis	20	100		
<b>Diluição 3</b>	3,75	1 imóvel	3 imóveis	20	60	0,43	0,83
	3,75	0 imóvel	5 imóveis	0	100		
	3,75	0 imóvel	4 imóveis	0	80		
	3,75	0 imóvel	3 imóveis	0	60		

Fonte: Próprio autor.

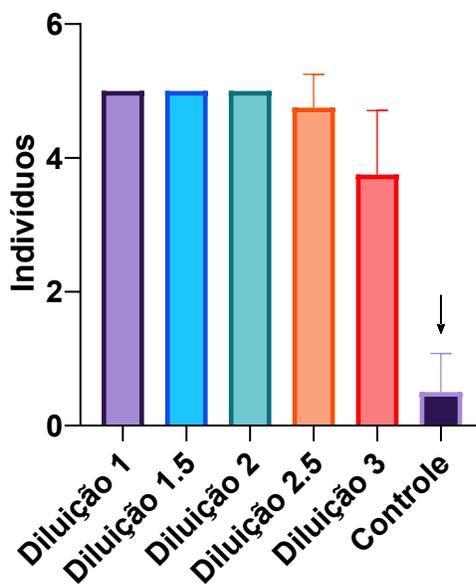


**Figura 5.** Organismo *D. magna* imóvel após 48 horas de exposição ao biossurfactante. A, neonato imóvel. B, ampliação da imagem A. **Fonte:** Próprio autor.

Com auxílio do software *GraphPad Prism 8*, foi possível analisar a sensibilidade dos organismos pelo teste ANOVA. A partir dos dados obtidos, foi confirmada a significância da sensibilidade. Além disso, a análise dos gráficos (**Figuras 6 e 7**) plotados para exposição em 24 horas e 48 horas, respectivamente, demonstrando que as diluições 2.5 e 3 possuem menores taxas de imobilização quando comparada aos controles. E, ainda, com 24 horas, as diluições citadas anteriormente não apresentam alterações significativas, e representam as doses na qual o Efeito de Concentração Máxima a 50% ( $EC_{50}$ ) pode ser observado. Enquanto isso, para 48 horas, todas as diluições apresentam alterações significantes em relação ao controle, embora as diluições 2.5 e 3 apresentarem menor mortalidade. Desse modo, concluiu-se que a  $EC_{50}$  para as 48 horas de exposição possui valor de imobilização menor que a concentração de  $3,75 \text{ g. L}^{-1}$  da última diluição testada.



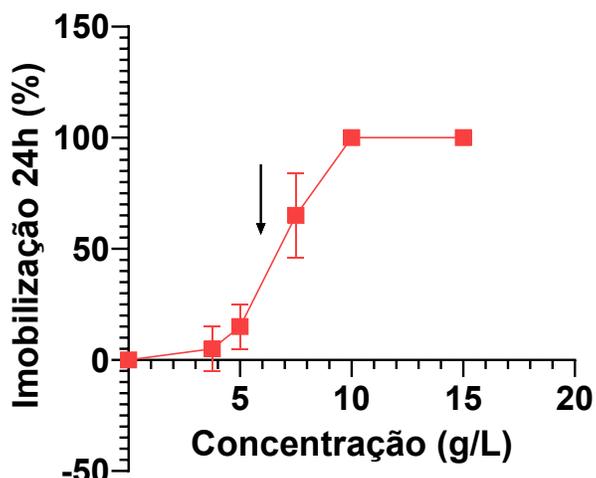
**Figura 6.** Gráfico de organismos considerados imóveis em 24 horas após exposição à diferentes concentrações do biossurfactante. A seta (↓) demarca o controle, usado como comparativo para as outras diluições. (ns) diferença não significativa em relação ao controle (One-way ANOVA,  $p < 0,05$ ). **Fonte:** Próprio autor.



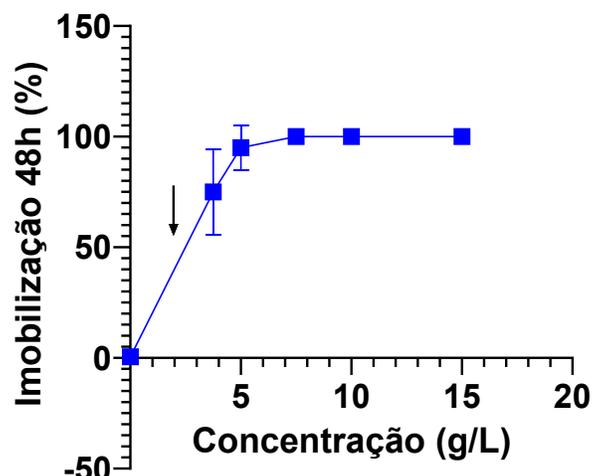
**Figura 7.** Gráfico de organismos considerados imóveis em 48 horas após exposição à diferentes concentrações do biossurfactante. A seta (↓) demarca o controle, usado como comparativo para as outras diluições. (One-way ANOVA,  $p < 0,05$ ). **Fonte:** Próprio autor.

Após a análise da sensibilidade, o teste de regressão *Probit* foi executado para analisar a  $EC_{50}$ , sendo observado que os efeitos do biossurfactante sobre *D. magna* dependeram

significativamente das concentrações em que os organismos foram expostos (**Figuras 8 e 9**). Foi observado que a quantidade de organismos imóveis em 24 horas foi inferior a imobilidade em 48 horas, e os valores de  $EC_{50}$  foram maiores com 24 horas de exposição. Portanto, a  $EC_{50-24h}$  obtida foi em concentração de  $6 \text{ g. L}^{-1}$ , enquanto a  $EC_{50-48h}$  foi de  $2 \text{ g. L}^{-1}$ .



**Figura 8.** Ensaio de toxicidade aguda a partir de cinco diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *R. mucilaginosa*. A seta ( $\downarrow$ ) indica a aproximação da concentração da  $EC_{50}$  obtida. (Regressão *Probit*,  $p < 0,05$ ). **Fonte:** Próprio autor.



**Figura 9.** Ensaio de toxicidade aguda a partir de cinco diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *R. mucilaginosa*. A seta ( $\downarrow$ ) indica a aproximação da concentração da  $EC_{50}$  obtida. (Regressão *Probit*,  $p < 0,05$ ). **Fonte:** Próprio autor.

*Daphnia magna* pertence a um gênero de pequenos crustáceos de ampla distribuição geográfica e com mais de 100 espécies descritas, caracterizadas por uma estrutura corporal semelhante e possuindo uma cabeça larga e um corpo envolto por uma casca similar à dos seres bivalves. São comumente encontrados em água fresca e podem ser mantidos em laboratórios com alimentação de algas verdes, sendo o principal organismo modelo em pesquisas ecológicas e testes de ecotoxicidade, devido a sua adaptabilidade e facilidade de monitoramento de seu comportamento (Ebert, 2022). Com isso, a espécie é utilizada em inúmeros ensaios ecológicos, visando determinar os efeitos ecotóxicos de diferentes matérias, como estudos de toxicidade de microplásticos (Kokalj *et al*, 2022; Zink *et al*, 2023), toxicidade de sedimentos (Hafner *et al*, 2015), toxicidade de biocidas (Marzo *et al*, 2020), toxicidade de fármacos como antibióticos (Nguyen *et al*, 2021) e toxicidade de efluentes tratadas (Lach *et al*, 2022). Em todas as pesquisas, o modelo *D. magna* selecionado ofereceu informações úteis para o esclarecimento das hipóteses propostas. Logo, o organismo vem sendo amplamente utilizado para os testes de toxicidade de biossurfactantes produzidos por diferentes gêneros de fungos, leveduras e bactérias.

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua composição química e o tipo de microrganismo que os produzem, subdivididos em cinco principais grupos: glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídios, hidroxilado e ácidos orgânicos e surfactantes poliméricos e particulados (Mukherjee; Das, 2010). Os biossurfactantes produzidos por *Rhodotorula* semelhantes a *R. mucilaginosa* são principalmente glicolipídios e lipopeptídeos (Derguine-Mecheri *et al*, 2021; Azevedo *et al*, 2023). Porém, o biossurfactante produzido no presente estudo ainda requer caracterização para melhor classificação.

O estudo de Kumano e colaboradores (2019) avaliou a ecotoxicidade e tensão superficial do biossurfactante produzido por *Starmerella bombicola* classificado como soforolipídios, demonstrou que a biomolécula não apresentou efeitos observáveis na capacidade natatória dos dafnídeos, quando expostos às concentrações menores que 20,3 mg. L<sup>-1</sup> e EC<sub>50</sub> de 48,2 mg. L<sup>-1</sup>, após 48 horas de exposição. A biomolécula foi considerada como um soforolipídio de baixa toxicidade, especialmente em contraste a suas contrapartes sintéticas. Em outro estudo conduzido para avaliar a toxicidade do biossurfactante produzido *Pseudomonas* H6, classificado como lipopeptídeo, demonstrou que concentrações maiores

que 40 mg. L<sup>-1</sup> levaram a 100% de imobilização dos organismos e exibiu EC<sub>50</sub> de 20 mg. L<sup>-1</sup>, determinando-se que esse biossurfactante possui menor toxicidade que surfactantes químicos. Além disso, esse estudo reafirma a sensibilidade de *D. magna* como organismo modelo para testes ecológicos, uma vez que também foram feitos testes utilizando algas (*Raphidocelis subcapitata*), cianobactérias (*Phormidium autumnale*) e zebrafish (Korbut *et al.*, 2022). Um terceiro estudo que avaliou a toxicidade de biossurfactante mono-rhamnolipídio produzido por *Pseudomonas putida* identificou uma EC<sub>50</sub> de 0,05 g. L<sup>-1</sup> e 0,03 g. L<sup>-1</sup> após 24 e 48 horas, respectivamente, e esses valores são considerados de baixa toxicidade (Johann *et al.*, 2016). Com a análise desses dados, é possível inferir que o biossurfactante desse estudo apresenta baixa toxicidade ecológica, em virtude da elevada EC<sub>50</sub> após 24 e 48 horas de exposição aos dafnídeos, evidenciando-se valores de 6 g. L<sup>-1</sup> e 2 g. L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os efeitos ecotóxicos também são investigados em surfactantes sintéticos como no estudo de Garcia e colaboradores (2019), que avaliaram a biodegradabilidade e toxicidade de surfactantes oligoméricos e catiônicos, observando-se concentrações de EC<sub>50</sub> após 48 horas de 50 mg. L<sup>-1</sup> e 7,5 mg. L<sup>-1</sup> para os surfactantes diméricos PMTH2E8 (cadeia de 8 carbonos) e PMTH2E10 (cadeia de 10 carbonos), e valores de 37 mg. L<sup>-1</sup>, 8,1 mg. L<sup>-1</sup> e 1,5 mg. L<sup>-1</sup> para os surfactantes triméricos PMTH3E8 (cadeia de 8 carbonos), PMTH3E10 (cadeia de 10 carbonos) e PMTH3E12 (cadeia de 12 carbonos), sendo classificados como menos tóxicos que surfactantes monoméricos. Surfactantes químicos como dodecilsulfato de sódio (SDS) e triton X-100 foram avaliados por Santos e colaboradores (2021) e exibiram EC<sub>50</sub> de 61,8 mg. L<sup>-1</sup> e 24,1 mg. L<sup>-1</sup>, em 24 e 48 horas, respectivamente, para SDS e 118,2 mg. L<sup>-1</sup> e 72,2 mg. L<sup>-1</sup> para triton X-100, e ambos compostos demonstraram ecotoxicidade relevante. Novamente, esses dados corroboram para supor que o biossurfactante produzido por *R. mucilaginosa* apresenta baixa ecotoxicidade, e demonstra potencial para aplicações biotecnológicas, tais como a biorremediação.

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi produzido o biossurfactante a partir da fermentação submersa da levedura antártica *Rhodotorula mucilaginosa* com o emprego de resíduos agroindustriais de abacaxi como fonte alternativa de carbono. Sua concentração foi encontrada a partir de sua liofilização, apresentando valor de 30 g. L<sup>-1</sup> e possuindo alta produtividade. A ecotoxicidade foi averiguada através do teste de toxicidade aguda em *Daphnia magna*. Os resultados obtidos demonstram que o composto apresenta valores altos de EC<sub>50</sub>, 2 g. L<sup>-1</sup> e 6 g. L<sup>-1</sup> para 24 e 48 horas, respectivamente, e causa efeitos ecotóxicos consideravelmente menores à suas contrapartes sintéticas. Observou-se que os valores encontrados condizem com aqueles demonstrados por estudos de biossurfactantes. Além disso, a pesquisa para a caracterização do biossurfactante e maior elucidação de efeitos tóxicos faz-se necessária. Por fim, esses resultados demonstram a baixa toxicidade ecológica do biossurfactante e auxiliam para o conhecimento desse composto de grande potencial biotecnológico.

## 7. REFERÊNCIAS

- ANJUM, F. *et al.* Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. **Bioresource technology**, v. 213, p. 262-269, 2016.
- ASSIS, D. J. *et al.* Influência da natureza do rejeito agroindustrial fermentado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* nas propriedades das gomas xantana resultantes. **Polímeros**, v. 24, p. 176-183, 2014.
- AZEVEDO, M. A. *et al.* Potential Brewer's Spent Grain as a Carbon Source Alternative for Biosurfactant Production by *Rhodotorula Mucilaginosa* (Lbp4). Disponível em: SSRN 4511348. Acesso em: 30 de outubro de 2023.
- BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 3, p. 1-5, 2013.
- BOWNIK, A. Physiological endpoints in daphnid acute toxicity tests. **Science of The Total Environment**, v. 700, 2020.
- CAMARGO, H. A. **Produção, purificação, caracterização e aplicação do biossurfactante produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* de ambiente antártico**. Monografia (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Biotecnologia – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
- DERGUINE-MECHERI, L.; KEBBOUCHE-GANA, S.; DJENANE, D. Biosurfactant production from newly isolated *Rhodotorula* sp. YBR and its great potential in enhanced removal of hydrocarbons from contaminated soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1-18, 2021.
- EBERT, D. *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. **EvoDevo**, v. 13, p. 16. 2022.
- FRACCHIA, L. *et al.* Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications—present status and future potentials. **Biomedical science, engineering and technology**, v. 14, p. 1-49, 2012.

FREITAS, E. L. **Biotransformação de resíduos agroindustriais por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na síntese de biosurfactante aplicados na biodeterioração de petroderivados.** Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Química – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2021.

GARCIA, M. T. et al. Biodegradability and aquatic toxicity of new cleavable betainate cationic oligomeric surfactants. **Journal of hazardous materials**, v. 371, p. 108-114, 2019.

HAFNER, C. *et al.* Investigations on sediment toxicity of German rivers applying a standardized bioassay battery. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 16358-16370, 2015.

HAQUE, E.; KAYALVIZHI, K.; HASSAN, S. Biocompatibility, Antioxidant and Anti-Infective Effect of Biosurfactant Produced by *Marinobacter litoralis* MB15. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 10, 2020.

ILORI, M. O.; AMUND, D. I. Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. **Zeitschrift für naturforschung c**, v. 56, p. 547-552, 2001.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental safety**, v. 184, 2019.

JOHANN, S. *et al.* Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of monorhamnolipids. **Science of the Total Environment**, v. 548, p. 155-163, 2016.

KOKALJ, A. J. *et al.* Environmental hazard of polypropylene microplastics from disposable medical masks: acute toxicity towards *Daphnia magna* and current knowledge on other polypropylene microplastics. **Microplastics and nanoplastics**, v. 2, p.1-15, 2022.

KORBUT, R. *et al.* Toxicity of the antiparasitic lipopeptide biosurfactant SPH6 to green algae, cyanobacteria, crustaceans and zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 243, p. 106072, 2022.

KUMANO, W. *et al.* Low toxicity and high surface activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* in aquatic species: a preliminary study. **Journal of Environmental Biology**, v. 40, p. 595-600, 2019.

KUMAR, A. *et al.* Microbial biosurfactant: a new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. **Antioxidants**, v. 10, p. 1472, 2021.

LACH, C. E. *et al.* Investigating the process of electrocoagulation in the removal of azo dye from synthetic textile effluents and the effects of acute toxicity on *Daphnia magna* test organisms. **Journal of Water Process Engineering**, v. 45, p. 102485, 2022.

LUNA-VELASCO, M. A. *et al.* Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 310-314, 2007.

MACHADO, T. S. *et al.* Effects of homemade biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* on bioremediation efficiency of a clay soil contaminated with diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, p. 110798, 2020.

MARTORELL, M. M. *et al.* Antarctic yeasts as a source of enzymes for biotechnological applications. **Fungi of Antarctica: diversity, ecology and biotechnological applications**, p. 285-304, 2019.

MARZO, M. *et al.* QSAR models for biocides: The example of the prediction of *Daphnia magna* acute toxicity. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 31, p. 227-243, 2020.

NGUYEN, T. *et al.* Chronic ecotoxicology and statistical investigation of ciprofloxacin and ofloxacin to *Daphnia magna* under extendedly long-term exposure. **Environmental Pollution**, v. 291, p. 118095, 2021.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. **Effects on biotic systems: guidelines for the testing of chemicals**. Section 2, n. 202. Paris, France, 2004.

RIVERA., A. D.; URBINA, M. A. M.; LÓPEZ, V. E. L. Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 155, 2019.

ROKNI, M. S. *et al.* Sugar beet molasses bioconversion into biosurfactant: optimization and comparison with other carbon sources. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-13, 2022.

ROSA, L. H. *et al.* Fungi in Antarctica: diversity, ecology, effects of climate change, and bioprospection for bioactive compounds. **Fungi of Antarctica: diversity, ecology and biotechnological applications**, p. 1-17, 2019.

SANCHES, M. A. *et al.* Production of biosurfactants by Ascomycetes. **International Journal of Microbiology**, 2021.

SANTOS, C. V. M. *et al.* Biosurfactant Production from Pineapple Waste and Application of Experimental Design and Statistical Analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, p. 386-400, 2023.

SANTOS, V. S.; VIEIRA, E. S.; BOSCOLLI, B. P. Ecotoxicological assessment of synthetic and biogenic surfactants using freshwater cladoceran species. **Chemosphere**, v. 221, p. 519-525, 2021.

SEN, S. *et al.* Utilization of distillers dried grains with solubles as a cheaper substrate for sophorolipid production by *Rhodotorula babjevae* YS3. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, p. 105494, 2021.

SOUSA, T. G. C. **Produção de biossurfactante pela levedura da antártica *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747**: desenvolvimento de um meio de cultura ótimo e aplicação biotecnológica. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Curso de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2021.

VIEIRA, E. C. S. *et al.* Aceitabilidade e características físico-químicas de geleia mista de casca de abacaxi e polpa de pêsego. **Científica**, v. 45, p. 115-122, 2017.

VIEIRA, I. M. M. *et al.* Potential of pineapple peel in the alternative composition of culture media for biosurfactant production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 68957-68971, 2021.

VU, K. A.; MULLIGAN C. N. Utilization of a biosurfactant foam/nanoparticle mixture for treatment of oil pollutants in soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 88618-88629, 2022.

ZINK, L. *et al.* Effects of exposure to cadmium, microplastics, and their mixture on survival, growth, feeding, and life history of *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 42, p. 1401-1408, 2023.