

IV-225 - TESTE DE ECOTOXICIDADE DO ALQUIL BENZENO SULFONATO LINEAR (LAS) UTILIZANDO O MICROCRUSTÁCEO DAPHNIA MAGNA

Priscila da Silva dos Santos ⁽¹⁾

Técnica em Edificações pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), campus Quixadá. Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária pelo IFCE.

Francisco Wasleyson Gomes Rezende ⁽²⁾

Graduando em Engenharia Ambiental e Sanitária pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, campus Quixadá.

Renata Lee Martins Negreiro ⁽³⁾

Técnica em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, campus Quixadá.

Reinaldo Fontes Cavalcante ⁽⁴⁾

Graduação em Tecnologia em Gestão Ambiental pelo Instituto Federal do Ceará, Especialista em Saneamento Ambiental pela Faculdade Grande Fortaleza e Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental pelo Instituto Federal do Ceará. Doutorando em Saneamento pela Universidade Federal do Ceará, campus Fortaleza.

Glória Maria Marinho ⁽⁵⁾

Graduação em Farmácia-bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (1990), Mestrado em Engenharia Civil (Saneamento Ambiental) pela Universidade Federal do Ceará (2001) e Doutorado em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos/USP (2005), Pós-doutorado na Universidade do Minho - PT (out/2014 - mar/2016).

Endereço⁽¹⁾: Rua Passa Tempo, 176 - Carmo-Sion - Belo Horizonte - MG - CEP: 30310-760 - Brasil - Tel: (31) 225-9518 - e-mail: halfeld@sc.usp.br

RESUMO

O desenvolvimento populacional tem provocado o aumento do consumo de produtos e conseqüentemente acarretando no crescimento da produção e do lançamento de diferentes poluentes no meio ambiente, colaborando no desequilíbrio do ecossistema terrestre e aquática, principal receptor desses poluentes. Os surfactantes constituem um dos principais componentes orgânicos presentes nos efluentes das atividades antrópicas. Essas substâncias estão presentes em produtos de limpeza e fármacos que podem causar efeitos toxicológicos na biota aquática. A toxicidade desses compostos pode ser determinada a partir de um ensaio de ecotoxicidade, que consiste na avaliação toxicológica de poluentes através da sua exposição a determinados organismos-teste. O objetivo do presente trabalho é analisar o teste de ecotoxicidade aguda do Alquil Benzendo Sulfonato Linear (LAS) utilizando como organismo-teste a *Daphnia magna*, de acordo com as resoluções ambientais vigentes. A metodologia utilizada para a realização do teste será de acordo com o exigido pela NBR 12713 estabelecido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004) e metodologia adaptada de Miranda; Santos; Duarte (2015). A partir da análise dos resultados pode-se perceber que a *Daphnia magna* apresenta forte sensibilidade as concentrações de 0,5mg/L (357/05 CONAMA) e 0,2 mg/L (EUA) nas primeiras 24 horas de teste, e nas 48 horas de teste os organismos não resistiram as concentrações utilizadas, 0,5 mg/L, 0,2 mg/L, 0,027 mg/L e 0,01 mg/L, demonstrando que essas legislações se mostram muito brandas com os padrões de lançamento do LAS no meio ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Bioindicador, Poluição, Surfactantes.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento populacional tem contribuído com a crescente demanda por novos produtos e tecnologias, acarretando no aumento da produção industrial de diferentes poluentes distribuídos no meio ambiente, contribuindo no desequilíbrio da biota terrestre, atmosférica e aquática, principal receptor desses poluentes (BORRELY, 2001; BRAGA et al., 2002; ANDRADE et al., 2004).

Os efluentes podem ser classificados principalmente em dois tipos, domésticos e industriais. Efluentes domésticos constituem-se de águas que passam por alguma utilidade oriunda de residências e locais públicos, possuem 99,9% de água e 0,1% de matéria sólida suspensa, coloidal ou dissolvida. Os efluentes industriais

apresentam elevada relevância sobre a poluição do meio hídrico, caracterizando-se por apresentar uma diversidade de moléculas orgânicas sintéticas, desde substâncias simples a complexas, como substâncias tóxicas, fenóis, benzeno, pesticidas, detergentes e surfactantes, sendo os dois últimos também presentes no esgoto doméstico. Tais compostos influenciam na dinâmica do corpo receptor, contribuindo na diminuição das fontes de oxigênio livre, afetando as formas de vidas ali presente (ROMANELLI, 2004).

A toxicidade desses compostos pode ser determinada a partir de um teste de ecotoxicidade, que consiste na avaliação toxicológica de poluentes, avalia os riscos que tais compostos ou substâncias podem trazer ao meio ambiente. Autores definem os testes de ecotoxicidade como um estudo que avalia um organismo-teste utilizado representativamente como organismo do ambiente, em meio a exposição a várias concentrações de poluentes ou substâncias que representem potencial tóxico, em um período predeterminado de tempo (MIRANDA; SANTOS; DUARTE, 2015).

O teste com microcrustáceos é considerado uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade devido a sua rapidez, baixo custo e eficiência. Além disso, não requer equipamentos especiais sendo suficientes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes (HOCAYEN, 2012). A classificação para os tipos de ensaios de toxicidade leva em consideração os possíveis efeitos que possam surgir durante o tempo de exposição, com os organismos utilizados. O ensaio de toxicidade aguda a qual o trabalho se propõe, caracteriza-se por ser testes de curta duração e envolve parte do ciclo de vida do organismo-teste, se avalia normalmente a mortalidade ou a imobilidade dos mesmos, a influência em reações bioquímicas e metabolismo (NIPPER 2000; BORRELY, 2001).

Os surfactantes constituem um dos principais componentes orgânicos presentes nos efluentes das atividades antrópicas. São encontrados em concentrações suficientes para causar efeitos toxicológicos e alterar o funcionamento de ecossistemas aquáticos e terrestres (CAVALCANTE, 2014). Desde da década de 1960 se observou relatos sobre toxicidade de surfactantes, a partir de análises com peixes com concentrações de detergentes (0,5 ppm).

Alquil Benzeno Sulfonato Linear (LAS), composto presente em produtos de limpeza e fármacos faz parte do grupo dos surfactantes e apresenta significativa relevância econômica no cenário mundial (MARINHO et al., 2014). Entre os principais impactos ambientais associados aos surfactantes, e ao LAS de maneira específica, se destaca a formação de espumas, que causam poluição visual e inibem o processo de depuração dos corpos aquáticos, além de facilitar a difusão de impurezas e micro-organismos; a diminuição das trocas gasosas entre a atmosfera e a superfície aquática pela formação de uma película isolante na superfície da água e sua relativa toxicidade a organismos aquáticos e terrestres relacionados com sua persistência no ambiente (MORAIS, ANGELIS, 2012; IVANKOVIĆ, HRENOVIĆ; 2010) .

O LAS é constituído de uma mistura de vários homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares, com a quantidade de carbono variando principalmente entre 10 e 14 átomos. Na parte hidrofílica se observa um anel aromático sulfonato na posição para ligado a cadeia linear alquil. Esta ligação pode aparecer em qualquer posição na cadeia linear com exceção dos carbonos localizados nas extremidades da cadeia alquílica como observado na Figura 01 (CAVALCANTE, 2011). No entanto as concentrações presentes nos efluentes representam preocupações por apresentar possíveis efeitos toxicológicos e atingir o desempenho da biota aquática e terrestre (MIRANDA, SANTOS, DUARTE; 2015).

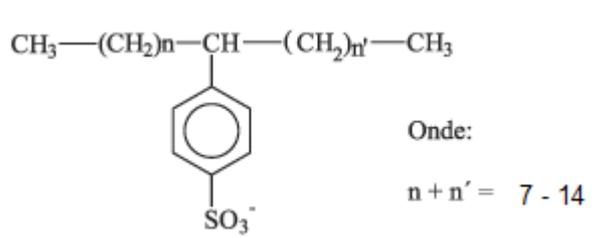


Figura 01 - Fórmula estrutural do LAS (Alquilbenzeno Sulfonato Linear).

Fonte: Oliveira et al. (2010)

Segundo Mungray e Kumar (2008), as concentrações de LAS no esgoto doméstico é de 3 a 21 mg L⁻¹. Nos esgotos nos Estados Unidos a média de LAS nos esgotos é de 4 a 5,7 mg L⁻¹, e na Europa a média é de 4,0 a 15,1 mg L⁻¹(MUNGRAY E KUMAR, 2009).

Os padrões de monitoramento para o LAS são limites estabelecidos internacionalmente. No Brasil o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na resolução N° 357/2005, o classifica como substância tenso-ativa que reage com azul de metileno e estabelece um limite para águas doces uma concentração de LAS de 0,5 mg L⁻¹ (MIRANDA; SANTOS; DUARTE, 2015). Desta forma se faz necessário a realização de trabalhos relacionadas a verificação dos efeitos toxicológicos do LAS, para conhecimento dos possíveis impactos que o lançamento desse poluente pode trazer para a biota aquática.

O objetivo do presente trabalho é analisar o teste de ecotoxicidade aguda do Alquil Benzendo Sulfonato Linear (LAS) utilizando como organismo-teste a *Daphnia magna*, de acordo com as resoluções ambientais vigentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismo Teste

Os microcrustáceos compõem a base da cadeia alimentar aquática, fazendo parte do zooplâncton, representando uma ligação entre os produtores primários e os consumidores secundários, ao se alimentarem de algas e servirem de alimento para peixes e outros invertebrados. Desse modo, as interferências causadas na saúde desses organismos por questões não naturais podem interferir em outros níveis tróficos do ecossistema aquático (ROMANELLI, 2004).

Organismos como esses são bastante utilizados em ensaios de toxicidade, por serem facilmente cultiváveis em laboratório e apresentarem sensibilidade a diversas classes de compostos químicos (BRENTANO, 2006). O Organismo *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) (Figura 02) utilizado no estudo é caracterizado por ser um microcrustáceo planctônico, de comprimento entre 5 e 6 mm, conhecido como pulga d'água, e alimenta-se por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Tais organismos possuem intensa distribuição no hemisfério norte (NBR 12.713, 2003a).

A *D. magna* possui dois pares de antenas, utilizadas para locomoção, funcionando como um remo e aumentando a área de contato com a água durante o movimento. A antena primária é pequena nas fêmeas e nos machos é maior, funcionando como órgão sensorial. Ainda na região anterior da cabeça, é possível observar um par de olhos grandes, móveis e compostos que estão embebidos no corte do cérebro (FINKER, 2002).

As daphnias se reproduzem de dois modos: sexuado e assexuado. Em condições ótimas, tais como fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 20°C as fêmeas se reproduzem de forma assexuada, sendo produzidas daphnias idênticas às suas progenitoras. Quando submetidas a condições diferentes desse padrão podem gerar machos de *Daphnia magna* (FLINKER, 2002).



Figura 02: Organismo-teste *Daphnia magna* adulta (40X).

Fonte: Autores, 2017.

Cultivo da Daphnia

Para a realização dos ensaios de toxicidade aguda foram utilizados organismos-teste *Daphnia magna*, cultivadas no Laboratório de Microbiologia e Limnologia (LAMILI) – IFCE, Quixadá.

Para o cultivo das *Daphnia* foi adotado a metodologia adaptada de Knapik, Andreatta (2013). Os indivíduos foram cultivados em recipientes com capacidade de 2000 ml e 1800 ml de água de cultivo (Figura 03), e cultivados 30 organismos por recipiente, com identificação de controle em cada béquer. Os cultivos foram mantidos em estufa controlada a 20°C e fotoperíodo de 16 horas/dia controlado por termômetro.

A cultura de daphnias foram alimentadas diariamente com cultura de algas produzidas no laboratório. Os cultivos foram mantidos em estufa incubadora controlada a 20°C e fotoperíodo de 16 horas/dia controlado por termômetro.

Durante a semana foi realizado as trocas de água dos recipientes de cultivo e limpos com álcool 70%. Para coleta dos organismos utilizou-se duas redes de aço-inox de malha de 1 mm e outra de 0,2 mm, onde a primeira foi retidos os organismos adultos (matrizes) e a segunda para coletar os organismos jovens. Após as trocas, as matrizes retornaram ao cultivo climatizado, e os jovens entre 2 e 24h de vida foram utilizados para o teste.



Figura 03: Organismo teste.
Fonte: Autores, 2017.

Ensaio de Toxicidade Aguda

A metodologia utilizada para a realização do teste será de acordo com o exigido pela NBR 12713 estabelecido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004) e metodologia adaptada de Miranda; Santos; Duarte (2015). Cada ensaio foi realizado em duplicata (Figura 04) com duração de 48h para cada concentração de LAS, inicializando em 0,01 mg/L e aumentando até 0,5 mg/L, de acordo com as concentrações de lançamento das legislações da União Europeia (0,027mg/L), dos Estados Unidos (0,2 mg/L) e do Brasil (CONAMA 357/05 0,5 mg/L).

Foi realizado a leitura do teste em 24 e 48 horas, onde foi verificado a mortalidade ou a imobilidade dos indivíduos nas primeiras 24 horas e posteriormente com 48 horas verificou-se a maior concentração em que se encontra 100% dos indivíduos mortos. E realizado juntamente com o teste de toxicidade o teste de controle, para certificar-se que apenas o LAS foi responsável pela morte da *Daphnia magna*.

Após a realização do teste foi analisado a porcentagem de indivíduos mortos e/ou lesionados. Para o cálculo da porcentagem de indivíduos inativos foi utilizado a fórmula (equação 01) empregada na metodologia por Bueno, 2009.

$$\% \text{mortas} = ((\text{controle} - \text{teste}) / \text{controle}) \times 100$$

equação 01

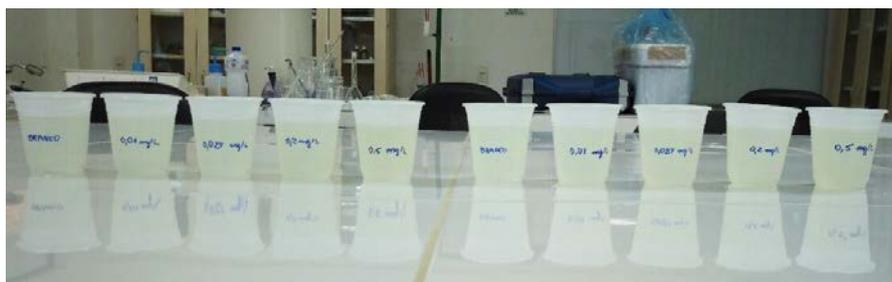


Figura 04: Recipiente com o poluente e cultura de *Daphnia magna*.
Fonte: Autores, 2017.

RESULTADOS

Depois de realizado o teste foi verificada a porcentagem de indivíduos mortos ou imobilizados após 24 horas de exposição ao (LAS) utilizando a equação 01. Os ensaios validados foram aqueles que não apresentaram mortes de indivíduos acima de 12,5% no teste de controle. A partir dos dados coletados no teste agudo pode-se observar o grau da toxicidade do LAS nas concentrações presentes na Tabela 01 a seguir:

Tabela 01: Resultado do teste agudo em 24 horas.

Concentração (mg/L)	Número de Indivíduos Teste 01	Número de Indivíduos Teste 02	Indivíduos Mortos ou lesionados (%)
0,5	0	0	100,0
0,2	0	0	100,0
0,027	3	3	62,50
0,01	1	1	87,50
Teste Branco	8	8	0,00

As doses administradas nos testes baseadas nas concentrações das legislações ambientais estudadas. Durante os testes os indivíduos apresentaram alto grau de sensibilidade, mostrando imobilidade nas concentrações de 0,5 e 0,2 mg/L poucos minutos após a exposição ao surfactante, demonstrando que a concentração de lançamento do LAS permitida pela 357/05 do CONAMA (0,5 mg/L) e pelos Estados Unidos (0,2 mg/L) ainda se mostram muito brandas, podendo causar sérios problemas na biota aquática. Além disso foram apresentadas mudanças significativas nas propriedades organolépticas da água como a forte mudança de cor para um tom amarelado.

Após as 48 horas de teste os indivíduos presentes nas concentrações de 0,5 e 0,2 estavam completamente mortos, sendo os mesmos observados em microscópio para constatar a ausência de qualquer movimentação. A tabela a seguir (Tabela 2) mostra a porcentagem de indivíduos mortos após 48 horas do teste:

Tabela 1: Resultado do teste agudo em 48 horas.

Concentração (mg/L)	Número de Indivíduos Teste 01	Número de Indivíduos Teste 02	Indivíduos Mortos (%)
0,5	0	0	100,0
0,2	0	0	100,0
0,027	0	0	100,0
0,01	0	0	100,0
Teste Branco	7	7	12,50

Segundo Miranda et. Al., (2015) as concentrações de LAS que apresentam efeito sobre a daphnia encontradas no ensaio de toxicidade são de 0,53 mg L⁻¹. O resultado demonstra estar muito próximo do apresentado na resolução N ° 357/2005 do CONAMA que estabelece para águas doces o limite de 0,5 mg.L⁻¹ e para salinas 0,2 mg.L⁻¹ de LAS, concentração essa que já se mostra altamente danosa ao zooplâncton segundo o teste com organismo modelo *D. laevis*. No entanto na presente pesquisa pode-se perceber que os organismos teste

apresentam sensibilidades em concentrações bem inferiores ao indicado segundo o autor, e segundo a legislação vigente.

Os indivíduos presentes nas concentrações de 0,027 e 0,01 perderam a movimentação apenas na última hora do teste, devido a fragilização provocada pela exposição contínua de 48 horas. O resultado em branco mostrou apresentou uma queda de 12,5% dos indivíduos demonstrando que no teste poderia ter algum indivíduo naturalmente fragilizado. Os resultados demonstram que as concentrações estudadas apresentam fortes efeitos sobre a *Daphnia magna*, sendo seus náuplios pouco resistentes a altas concentrações de LAS.

Um estudo desenvolvido por Pentead; El Seoud; Carvalho (2006), verificou que dentre 39 compostos que são utilizados na formulação dos detergentes domésticos, os tensoativos são responsáveis por 10,4 a 98,8% da toxicidade medida através de testes biológicos, comprovando o elevado potencial de toxicidade apresentado pelo LAS.

De acordo com Mungray e Kumar (2008), devido a sua grande área de contato e o comparecimento de um fino epitélio branquial nos peixes, o contato com o surfactante ocorre como preferência nas brânquias. Esse contato possibilita a formação e secreção de muco e como decorrência a diminuição das taxas respiratórias, além de espasmos musculares, movimentos erráticos e torção dos corpos também foram relatadas pelos autores. Estes feitos foram observados pelos autores em indivíduos jovens de *Pomatoschistus microps* em concentrações de 0,002 a 1,0 mg. L⁻¹ de LAS.

O potencial de toxicidade do LAS no ecossistema aquático varia de acordo com sua concentração e tamanho da cadeia alquila linear. O acúmulo dessa substância nos corpos hídricos pode provocar a diminuição de oxigênio dissolvido, redução da permeabilidade da luz e da tensão superficial da água, e até mesmo aumentar as concentrações de outras substâncias poluidoras presentes. Com isso, através dos resultados obtidos no teste de ecotoxicidade pode-se verificar que essas alterações afetam diretamente no comportamento da biota aquática provocando um desequilíbrio não suportado por esses organismos.

CONCLUSÕES

O LAS pode provocar desequilíbrio na biota aquática e conseqüentemente a saúde humana. Seus efeitos sobre a biota aquática são de grande interesse de pesquisadores e estudiosos da área ambiental. Apesar disso a legislação vigente no Brasil ainda se mostra muito branda, subestimando o poder tóxico desse poluente.

Os limites de concentração de LAS estabelecidos no CONAMA são de 0,5 mg.L⁻¹ para águas doces enquanto que na União Europeia e nos Estados Unidos apresentam menores valores, sendo 0,027 mg.L⁻¹ e 0,2 mg.L⁻¹ respectivamente. Quando aplicado no teste de ecotoxicidade realizado no presente estudo essas concentrações mostraram-se duvidosas quanto a garantia de não apresentarem riscos ao meio ambiente.

Sendo assim, os testes de toxicidade podem ser utilizados como forma de compreender e destacar os perigos dos compostos surfactantes no meio aquático e para a espécie humana. Os microcrustáceos por comporem a base da cadeia alimentar aquática e apresentarem genética e comportamento bem conhecidos facilitam a compreensão dos riscos a essas substâncias tóxicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, V. M.; FREITAS, T.R.O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, n. 560, p. 57-67, 2004.
2. **Aquática-Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Daphnia spp (Cladocera, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia**
3. BONFIM, J.H. **Remoção de surfactantes (LAS) no tratamento anaeróbio de esgoto doméstico. 2006. 113f.** Dissertação (mestrado em Tecnologia Ambiental e recursos hídricos) - Universidade Federal de Recife, Pernambuco, 2006.
4. BORRELY, S. I. **Avaliação da redução da toxicidade de efluentes tratados por irradiação com feixe de elétrons, por meio de testes de toxicidade aguda. 2001. 120f.** Tese (Doutorado em Ciências na Área

- de Tecnologia Nuclear-Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
5. BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. L.; BARROS, M. T. L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. Introdução à Engenharia Ambiental. São Paulo: Prentice-Hall, 2002.
 6. BRENTANO, D.M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário. 2006. 145f.** Dissertação (mestrado em Engenharia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
 7. BUENO, A.C; PIOVEZAN, M. Bioensaio toxicológico utilizando Artemia salina: fatores envolvidos em sua eficácia.
 8. CAVALCANTE, R. F. **DEGRADAÇÃO DE ALQUILBENZENO SULFONATO LINEAR POR FUNGO *Aspergillus niger* AN 400. 2014. 86f.** Dissertação (Mestrado em Gestão Ambiental) - Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental - Instituto Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
 9. FINKLER, Raquel et al. Avaliação do efeito tóxico de líquidos percolados sobre o sistema reprodutivo de *Daphnia magna*. 2002.
 10. KNAPIK, L.F.O; ANDREATTA, M. **Avaliação de toxicidade de três substâncias de referência ao microcrustáceo *Daphnia magna*. 2013. 69f.** Trabalho de Conclusão (Graduação no Curso-Tecnólogo em Processos Ambientais) -Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
 11. KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA, 288 p., 2004.
 12. MARINHO, Glória Maria et al. Impactos Ambientais do Alquil benzeno Sulfonado Linear. HOLOS, v. 4, p. 135-143, 2014.
 13. MIRANDA, B. S; DOS SANTOS, A. C. A; DUARTE, I. C. S. Avaliação do Efeito Tóxico do Alquilbenzeno Sulfonato Linear (Surfactante Aniônico) sobre a Eficiência de Depuração do Lodo Ativado e em *Daphnia Laevis*. **Revista Brasileira De Iniciação Científica**, v. 2, n. 2, 2015.
 14. MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Degradation of anionic surfactants during drying of UABSR sludges on sand drying beds. *Journal of Environmental Management*, v. 88, p.995-1002, 2008.
 15. MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. **Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review.** *International Biodeterioration & Biodegradation* 63. P. 981–987, 2009.
 16. NIPPER, M. Avaliação de Toxicidade de Efluentes. São Paulo. Apostila. 2000.
 17. PENTEADO, José Carlos P.; EL SEOUD, Omar A.; CARVALHO, Lilian RF. Alquilbenzeno Sulfonato linear: Uma abordagem ambiental e analítica. **Química Nova**, v.29, n. 5, p. 1038, 2006.
 18. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Alterado pela Resolução CONAMA 397/2008. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acesso em: 1 dez. 2016.
 19. ROMANELLI, M.F. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos surfactantes DSS e LAS submetidos à irradiação com feixes de elétrons. 2004. 156f.** Dissertação (mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
 20. HOCAYEN, Palloma de Almeida Soares et al. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **INSULA Revista de Botânica**, n. 41, p. 23-31, 2012.
 21. MORAIS, I.B.S.; ANGELIS, L.H. **E6 Farm 23-Biotensoativos: uma alternativa mais limpa para as indústrias de cosméticos.** 2012. Disponível em: < <http://blog.newtonpaiva.br/pos/e6-farm-23-biotensoativos-uma-alternativa-mais-limpa-para-as-industrias-de-cosmeticos/>>. Acesso em: 20/02/2017.
 22. IVANKOVIĆ, Tomislav; HRENOVIĆ, Jasna. Surfactants in the environment. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, v. 61, n. 1, p. 95-109, 2010.