

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL  
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

## **BIODEGRADAÇÃO DE ENDOSULFAN POR NANOEMULSÕES CONTENDO BIOSSURFACTANTE DE MICROALGAS**

**MARIA EDUARDA MURARI GIACHETTO<sup>1</sup>; JOSÉ FABIO FRANÇA ORLANDA<sup>1</sup>**

### **AFILIAÇÃO**

<sup>1</sup>Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL), Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas (CCENT), Rua Godofredo Viana, 1300 - Centro, Imperatriz – MA, 65.901-480.

### **RESUMO**

A contaminação ambiental pelos agrotóxicos causa grande impacto ambiental e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. Dentre eles, o endossulfan ( $C_9H_6Cl_6O_3S$ ), também conhecido como “Thiodan”, é um inseticida e acaricida organoclorado que foi introduzido no mercado nos anos de 1950. Os organoclorados são compostos conhecidos por serem poluentes orgânicos persistentes (POPs), pois permanecem no ambiente por um longo período após seu uso, apresentando baixa solubilidade em água, elevada persistência e bioacumulação no ambiente. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a biodegradação do endossulfan por nanoemulsões contendo biossurfactantes de microalgas. Os resultados obtidos demonstraram que foi possível isolar 3 (três) gêneros de microalgas filamentosas (*Batrachospermum sp.*, *Spirogyra sp.* e *Zygogonium sp.*). O gênero *Spirogyra sp.* apresentou melhor crescimento no meio ASM-1 e maior produção de biossurfactantes (34,2 %) e selecionada para as demais etapas experimentais. Dessa forma, as microalgas selecionadas poderão ser utilizadas para dar continuidade no estudo sobre o processo de biodegradação do endossulfan através da ação biosurfactante por nanoemulsão.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioacumulação; Agrotóxico; Filamentosas.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL  
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com a implantação da agricultura industrial, extensas áreas naturais têm sido substituídas por monoculturas que necessitam de grandes quantidades de agrotóxicos para controle de pragas ou doenças. O uso excessivo causa graves desequilíbrios ao meio ambiente, tornando esta atividade a principal fonte de contaminantes tóxicos (ZHANG et al., 2022; LYKOGIANNI et al., 2021).

Dentre os agrotóxicos, temos o organoclorado endossulfan (6,7,8,9,10,10-hexacloro1,5,5a,6,9,9a-hexaidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina-3-óxido), com propriedades inseticida e acaricida, largamente utilizado nas lavouras de algodão, café, cana-de-açúcar e soja. Pertence ao grupo dos poluentes orgânicos persistentes (POPs), pela elevada toxicidade, biomagnificação através da cadeia alimentar, persistência no ambiente e capacidade de serem transportados pelos diversos compartimentos ambientais, promovendo sérios riscos ao ecossistema e a saúde humana (MÉNDEZ-RIVERA et al., 2022).

Na tentativa de reduzir os efeitos negativos de contaminações por agrotóxicos organoclorados, diversas técnicas de remediação, por processos físicos, químicos e biológicos, vêm sendo utilizadas. As alternativas mais promissoras atualmente, derivam dos estudos de novas biotecnologias empregando microrganismos produtores de biossurfactantes, capazes de promover a total mineralização (SILVA et al., 2021).

Os biossurfactantes são classificados conforme a sua composição química e sua origem microbiana, as principais classes incluem os glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (PURWASENA et al., 2019).

Para ampliar a utilização de biossurfactantes em larga escala é necessário a busca por novos suportes que ofereçam transferência de massa, biodisponibilidade, baixo custo e a maior possibilidade de biodegradação. Nesse contexto, as nanoemulsões têm sido bastante estudadas por apresentarem possibilidades de expansão entre as necessidades ambientais em busca de alternativas tecnológicas, que promovam melhoria da disponibilidade biológica e solubilidade de agrotóxicos. Nessa escala de tamanho, os materiais apresentam novas propriedades, antes não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico, como

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL  
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

tolerância à temperatura e alterações da reatividade química (ADJONU et al., 2014).

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a biodegradação de endossulfan por nanoemulsões contendo biossurfactantes de microalgas.

## METODOLOGIA

A coleta das microalgas foi realizada na subsuperfície da água associada as plantas aquáticas ou flutuantes no riacho Mosquito (-4,9255828; -47,3853263), localizado no município de Açailândia (MA), nos meses de abril e agosto de 2023. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em frascos de polietileno e transportadas ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC) da UEMASUL.

O isolamento das microalgas foi realizado utilizando a metodologia proposta por Nichols e Bold (1965). O meio de cultura ASM-1 foi preparado com quatro soluções diferentes, como mostra a Tabela 1. Em seguida, o meio ASM-1 foi autoclavado em recipientes de vidro escuro e armazenados a  $4 \pm 1$  °C, para posterior análise. Dessa forma, a identificação ao nível de espécie foi realizada empregando chaves taxonômicas disponíveis (RAMOS et al., 2015; SOUZA; MELO, 2011).

A produção de biossurfactantes de microalgas foram realizadas conforme González et al. (2016). A determinação da presença de biossurfactantes foi realizada pelo método do índice de emulsificação (KREISCHER; SILVA, 2017). A extração e quantificação de lipídios utilizamos a metodologia propostas por Schmitz et al. (2015) e Radmann (2011). O processo de extração envolveu o uso dos solventes: clorofórmio:metanol (1:1 v/v) método de Bligh & Dyer. A solução de clorofórmio-metanol foi preparada em balão volumétrico de 100 mL, contendo 1 mL de clorofórmio, 1 mL de metanol e completada com água destilada. Depois de pronta foi transferida para um frasco de vidro escuro e adicionado 1mL das algas selecionadas e armazenada na incubadora BOD para a observação da degradação.

As nanoemulsões foram formuladas pelos métodos propostos por Lima et al. (2021) e Felizardo et al. (2021), com modificações. Em seguida, avaliadas os seguintes parâmetros: (a) determinação do sistema tensoativo; (b) avaliação da estabilidade das nanoemulsões; (c) definição do ponto de turvação (Cloud Point) do tensoativo hidrofílico; (d) indicação da temperatura de inversão de fases.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL  
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Os ensaios de biodegradação foram realizados em sistema fechado (microcosmo) com a presença do inseticida endosulfan, demonstrando a capacidade mineralizadora das nanoemulsões contendo biossurfactantes através da liberação de CO<sub>2</sub> pelo método respirométrico de Bartha e Pramer (1965). Os microcosmos consistiram em potes de vidro de 600 mL vedados, com um béquer contendo 30 mL de solução de KOH 0,50 mol L<sup>-1</sup> depositada no centro, 100 g de solo estéril suplementado com endosulfan (0 a 100 µg mL<sup>-1</sup>), 1 mL da nanoemulsão e água deionizada estéril para manter a umidade de campo. Em seguida, os microcosmos foram fechados e incubados a 28 ± 1,0 °C por um período de 21 dias. A cada 24 horas foram realizadas análises volumétricas ácido-base para determinar a quantidade de CO<sub>2</sub> gerado no interior do sistema e quantificação dos resíduos de endosulfan.

As análises espectrofotométricas dos resíduos de endosulfan foram realizadas conforme metodologia proposta por Wani et al. (2014).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, após o isolamento das microalgas filamentosas foram identificados os gêneros *Batrachospermum sp.*, *Zygogonium sp.* e *Spirogyra sp.* com capacidade de reprodução no meio ASM-1, como mostra as Figuras 1. Sendo que, o gênero predominante em todas as coletas realizadas durante esses meses, foi a *Spirogyra sp.*

Figura 1. Microalgas identificadas. (A) *Batrachospermum sp.*, (B) *Zygogonium sp.* e (C) *Spirogyra sp.*



Os resultados obtidos demonstraram que foi possível isolar 3 (três) gêneros de microalgas filamentosas (Figura 2). O gênero *Spirogyra sp.* apresentou melhor crescimento no meio ASM-1. A alga bentônica *Spirogyra sp.* pertence à divisão Chlorophyta (algas verdes)

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL  
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

e à família Zygnemataceae, onde estão inseridas as algas filamentosas não ramificadas (JÜRGENS et al., 2009).

No teste de emulsificação (IE<sub>24</sub>), o gênero *Spirogyra sp* apresentou maior produção de biossurfactantes (34,2 %), como mostra a Tabela 2. Com isso, foi selecionado para a realização das próximas etapas experimentais do projeto.

Tabela 1. Índice de emulsificação em (%).

| Código                                       | Índice de emulsificação (IE <sub>24</sub> ) |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Batrachospermum sp.</i> (B <sub>1</sub> ) | 6,80 ± 0,03                                 |
| <i>Spirogyra sp.</i> (S <sub>1</sub> )       | 34,2 ± 0,02                                 |
| <i>Zygogonium sp.</i> (Z <sub>1</sub> )      | 5,53 ± 0,02                                 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

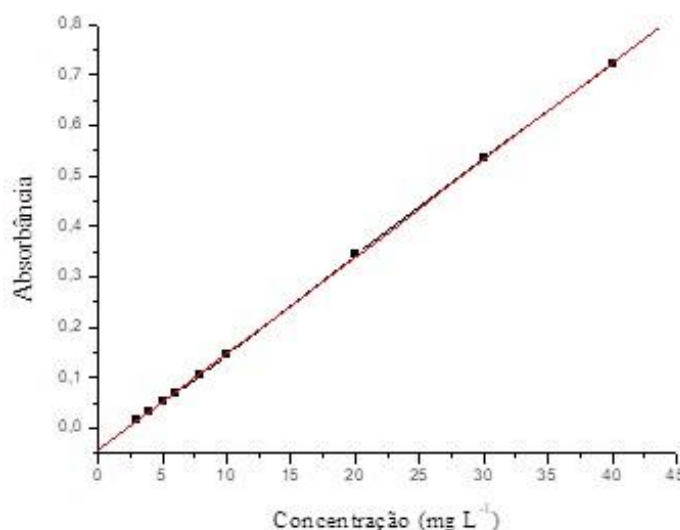
No teste de emulsificação (IE<sub>24</sub>), o gênero *Spirogyra sp* apresentou maior produção de biossurfactantes (34,2 %), como mostra a Tabela 1. Com isso, foi selecionado para a realização das próximas etapas experimentais do projeto.

As microalgas isoladas foram capazes de produzir biossurfactante em meio de cultura contendo endossulfan. O gênero *Spirogyra sp* apresentou maior produção de biossurfactantes de 34,2 %. O teste de emulsificação que consiste para determinar a capacidade que as microalgas filamentosas apresentam de emulsificar óleo em água, sugerindo assim se estes são capazes de produzir biossurfactantes (KREISCHER; SILVA, 2017).

A otimização da quantificação do endossulfan foi realizada por meio da curva padrão, através de regressão linear, com medidas espectrofotométricas em 490 nm (Gráfico 1). Na faixa de concentração entre 2,5 a 40,0 mg L<sup>-1</sup> de endossulfan e n = 9, apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,99993, desvio padrão de 0,0013 e com limite de detecção estimado de 0,728 mg L<sup>-1</sup>. Obtendo a equação: Absorbância = 0.20751 x concentração de endossulfan + 0,0645.

Gráfico 1. Curva padrão do endossulfan nas concentrações de 2,5 a 40,0 mg L<sup>-1</sup>

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL  
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

A análise de regressão linear indicou coeficiente de determinação de 0,99993, valor que comprova que mais de 99% da variabilidade experimental pode ser explicada pelos modelos lineares e que há adequação do método em relação entre as concentrações do analito e as respostas espectrofotométricas. Com isso, o método apresentou parâmetros de validação satisfatórios, podendo ser aplicado em análise de endossulfan após os ensaios de biodegradação.

## CONCLUSÕES

Nesse presente estudo, foi possível identificar 3 (três) gêneros de microalgas filamentosas, sendo elas: *Batrachospermum sp*, *Spirogyra sp* e *Zygogonium sp*. Destacamos que, as *Spirogyra sp* foram as predominantes em todas as coletas e as que melhores reproduziram no meio ASM-1.

Os métodos de extração utilizados envolveram o uso dos solventes: clorofórmio:metanol (1:1 v/v) método de Bligh & Dyer. Com esse método, demonstrou um grande potencial de biodegradação, sendo conhecido como um processo de desintegração de materiais realizados por bactérias, fungos e outros organismos, como no caso desse projeto as microalgas.

As microalgas isoladas foram capazes de produzir biossurfactante em meio de cultura contendo endossulfan. O gênero *Spirogyra sp* apresentou maior produção de biossurfactantes de 34,2 % e selecionada para as demais etapas experimentais.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL  
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

A otimização da quantificação do endosulfan empregando método espectrofotométrico relação proporcional entre as concentrações do analito e as respostas espectrofotométricas, podendo ser aplicado em análise de endosulfan após os ensaios de biodegradação.

## APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJONU, Randy; DORAN, Gregory; Torley, Peter; AGBOOLA, Samson. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. **Journal of Food Engineering, United Kingdom**, v. 122, n. 1, p. 15-27, 2014.

BARTHA, R.; Pramer, D. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, United States, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

FELIZARDO, Maria Giullia Alves Carneiro; PEREIRA, Ana Patrícia Matos; LIMA, Thaylanna Pinto de; SOUSA, Thayane Lopes de; GUTERRES, Cassiano Vasques Frota; OLIVEIRA, João Pedro Mesquita; MARTINS, Thércia Gabrielle Teixeira; MOUCHREK FILHO, Victor Elias; EVERTON, Gustavo Oliveira. Chemical profile, stability and fungicide activity of oil-in-water nanoemulsion (O/A) incorporated with Ba-har essential oil. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 43, n. 57, p. 1-22, 2021.

GONZÁLEZ, José Daniel Chávez; BARRERA, Miguel Ángel Rodríguez; RAMÍREZ, Yanet Romero; SÁNCHEZ, Alejandro Ayala; LEDEZMA, Jesús Carlos Ruvalcaba; TORIBIO-JIMÉNEZ, Jeiry. Pantoea agglomerans productora de biosurfactante aislada de rizosfera de pastos Tanzania y Llanero. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, México**, v. 7, n. 4, p. 961-968, 2016.

JÜRGENS, Birgit; HAINZ, Ursula; FUCHS, Dietmar; FELZMANN, Thomas, HEITGER, Andreas. Interferon- $\gamma$ -triggered indoleamine 2, 3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, [s.l.], v. 114, n. 15, p. 3235-3243, 2009.

KREISCHER, Ana Carolina; SILVA, Luciano Procopio. Bioprospecção de bactérias produtoras de biosurfactantes a partir de solo contaminado por agrotóxicos. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 35-47, 2017.

LIMA, Thaylanna Pinto de; SOUSA, Thayane Lopes de; OLIVEIRA, Joao Pedro Mesquita; FELIZARDO, Maria Giullia Alves Carneiro; EVERTON, Gustavo Oliveira; MOUCHREK FILHO, Victor Elias. Chemical profile, thermodynamic stability and fungicidal activity of the

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL  
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

nanoemulsion incorporated with essential oil and hydroalcoholic extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM.Perry. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 43, n. 77, p. 1-20, 2021.

LYKOGIANNI, Maira; BEMPELOU, Eleftheria; KARAMAOUNA, Filitsa; ALIFERIS, Konstantinos A. Do pesticides promote or hinder sustainability in agriculture? The challenge of sustainable use of pesticides in modern agriculture. **Science of the Total Environment**, Netherlands, v. 795, n. 1, p. 1-12, 2021.

MÉNDEZ-RIVERA, Michael; MENA, Freylan; PINNOCK-BRANFORD, Margaret; RUEPERT, Clemens; BARQUERO, Marco D.; JIMÉNEZ, Randall R.; ALVARADO, Gilbert. Effects of the insecticide  $\beta$ -endosulfan on tadpoles of *Isthmohyla pseudopuma* (Anura: Hylidae). **Aquatic Toxicology**, Bremerton, 2022. *In press*.

NICHOLS, H. Wayne; BOLD, Haroyld C. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. **Journal of Phycology**, United Kingdom, v. 1, n. 1, p. 34-38, 1965.

PURWASENA, Isty Adhitya; ASTUTI, Dea Indriani; SYUKRON, Muhamad; AMANIYAH, Maghfirotul; SUGAI, Yuichi. Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, Netherlands, v. 183, n.1, p. 1-9, 2019.

RADMANN, Elisângela Martha. **Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2011.

RAMOS, Geraldo José Peixoto; BICUDO, Carlos Eduardo de Mattos; MOURA, Carlos Wallace do Nascimento. Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 549-566, 2015.

SCHMITZ, Roberta; DECESARO, Andressa; SANTETI, Gabriela; REINEHR, Christian Oliveira; THOMÉ, Antônio; COLLA, Luciane Maria. Lipídios microalgais utilizados como biossurfactantes em processo de biorremediação de diesel e biodiesel em solo. **Ciência & Engenharia**, Uberlândia, v. 24, n. 1, p. 63-70, 2015.

SILVA, Rita de Cássia F. Soares da; LUNA, Juliana M.; RUFINO, Raquel D.; SARUBBO, Leonie A. Ecotoxicity of the formulated biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* CCT 6659 and application in the bioremediation of terrestrial and aquatic environments impacted by oil spills. **Process Safety and Environmental Protection**, United Kingdom, v. 154, n. 1, p. 338-347, 2021.

SOUZA, Karla Ferreira; MELO, Sergio. Levantamento taxonômico de desmídias (Chlorophyta) do lago Novo (Amapá, Brasil): Gêneros *Staurostrum*, *Staurodesmus* e



VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL  
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Xanthidium. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 41, n. 3, p. 335-346, 2011.

WANI, Kalpana; RAI, M. K.; KHATOON, Raisa. A new spectrophotometric determination of endosulfan and its application. **International Journal of Science and Research**, India, v. 3, n. 6, p. 202-205, 2012.

ZHANG, Yang; DONG, Zhaomin; PENG, Zheng; ZHU, Jingquan; ZHUO, Fuyan; LI, Yang; MA, Zhihong. A nation wide survey on the endosulfan residues in Chinese cotton field soil: Occurrence, trend, and ecological risk. **Environmental Pollution**, United Kingdom, v. 309, n. 15, 2022.