



AURELIANO AGOSTINHO DIAS MEIRELLES

**O PAPEL DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* NA ESTABILIZAÇÃO DE
EMULSÕES ENVOLVENDO HEXADECANO E UMA FASE AQUOSA**

**CAMPINAS
2016**

AURELIANO AGOSTINHO DIAS MEIRELLES

**O PAPEL DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* NA ESTABILIZAÇÃO DE
EMULSÕES ENVOLVENDO HEXADECANO E UMA FASE AQUOSA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Mestre em
Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO
AURELIANO AGOSTINHO DIAS MEIRELLES, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. Andreas Karoly
Gombert

CAMPINAS 2016

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M478p Meirelles, Aureliano Agostinho Dias, 1991-
O papel levedura *saccharomyces cerevisiae* na estabilização de emulsões envolvendo hexadecano e uma fase aquosa. / Aureliano Agostinho Dias Meirelles. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Andreas Karoly Gombert.
Coorientador: Rosiane Lopes da Cunha.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biocombustíveis. 2. Emulsões. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Gombert, Andreas Karoly. II. Cunha, Rosiane Lopes da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of yeast *saccharomyces cerevisiae* in stabilization of emulsions involving hexadecane and a water phase

Palavras-chave em inglês:

Biofuels

Emulsions

Saccharomyces cerevisiae

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Andreas Karoly Gombert [Orientador]

Maria Claudia Cuellar Soares

Flavio Luis Schmidt

Data de defesa: 19-04-2016

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert - Orientador

(Departamento de Engenharia de Alimentos / FEA / UNICAMP)

Profa. Dra. Maria C. Cuellar - Membro titular

(Departamento de Biotecnologia / Delft University of Technology/ Delft - Holanda)

Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt - Membro titular

(Departamento de Tecnologia de Alimentos / FEA/ UNICAMP)

Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni - Membro suplente

(Departamento de Engenharia Química / Escola Politécnica / USP)

Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano -Membro suplente

(Departamento de Engenharia Química / FEQ / UNICAMP)

A ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde, paz e disposição para encarar os desafios que temos nessa vida.

Aos meus pais, Elizabeth e Agostinho, a quem sou muito grato pela paciência e ensinamentos, por sempre me apoiarem em tudo o que eu faço e por me motivarem. Sem o suporte de vocês eu não estaria chegando tão longe. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida.

Ao meu orientador professor Andreas Karoly Gombert, por ter me dado a oportunidade de trabalhar em sua equipe. Sempre serei grato pelas oportunidades que me foram concedidas, sendo paciente em todos os momentos da realização deste trabalho.

À professora Rosiane Lopes da Cunha, sempre sendo paciente e acessível em todos os momentos de dúvidas.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo e à Unicamp pela oportunidade de realizar o mestrado.

À empresa Itaiquara, pelas informações cedidas e a Fundação André Tosello, que cedeu gentilmente a linhagem de *L. fermentum*.

As técnicas de laboratório Priscila (LEMeB) e Vanessa (LEP), pela paciência e por ensinar a manusear os equipamentos nos laboratórios.

Aos colegas de mestrado e amigos que fiz LEMeB, LEP, DEA e FEA, onde passei a maior parte do meu tempo nos últimos dois anos. Enfim, muito obrigado a todos os amigos que fiz durante esses dois anos aqui na Unicamp e a todos que ajudaram na concretização desse trabalho.

*“Todos os nossos sonhos podem tornar-se realidade se tivermos a coragem de persegui-los, a diferença entre o possível e o impossível está na determinação de cada um de nós”
(Walt Disney)*

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça aquilo que a maioria não faz. ” (Bill Gates)

Resumo

Os biocombustíveis têm sido objeto de crescente interesse nos últimos anos, uma vez que sua utilização contribui para reduzir a emissão de gases ligados ao efeito estufa. O farnesano apresenta potencial para substituir o diesel de petróleo, podendo ser obtido por processos biotecnológicos. Entretanto, durante as etapas de purificação deste composto (após a fermentação), ocorre a formação de uma emulsão relativamente estável composta por gotas de óleo, microrganismos, meio fermentativo e gases, dificultando a purificação do biocombustível. O microrganismo protagonista neste processo é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No presente projeto de mestrado objetivou-se aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pela estabilização de emulsões óleo em água, contendo a levedura *S. cerevisiae*, o que pode levar a novas estratégias de separação do óleo que sejam mais eficientes e/ou econômicas que as atuais. Para alcançar esse objetivo, foram realizados os seguintes experimentos com levedura de panificação e com *S. cerevisiae* PE-2 (linhagem da produção industrial de etanol combustível): cinéticas de crescimento em frascos agitados, preparo de emulsões com leveduras pré-cultivadas em meios complexos ou sintéticos, com leveduras em diferentes estados fisiológicos, com extratos celulares de leveduras, com levedura e bactéria (*Lactobacillus fermentum*) e ensaio de crescimento de levedura em placa de Petri contendo substratos lipídicos (oleato ou hexadecano). No preparo das emulsões, em que se usou hexadecano como óleo, formou-se sempre um sistema trifásico, com as seguintes fases: superior (emulsão óleo em água), intermediária (leveduras e gotas de óleo em suspensão aquosa) e inferior (sedimentado de leveduras). Observou-se que alguns compostos presentes na água de lavagem da levedura fresca, adquirida em supermercado, auxiliam no processo de emulsificação. Por isto, optou-se por preparar emulsões a partir de leveduras estocadas e cultivadas em laboratório. Células de levedura em fase estacionária pós-diáuxica promovem a formação de emulsões menos estáveis do que células em fase estacionária pré-diáuxica. A linhagem PE-2 promoveu emulsões mais estáveis do que as emulsões com levedura de panificação. A emulsão com extrato celular da linhagem de panificação, ao final dos 6 dias de repouso, foi a emulsão menos estável. A presença de um contaminante, típico da indústria de fermentação (*L. fermentum*) influencia bastante na formação e na estabilidade das emulsões. Ao final de 6 dias de repouso, a maior parte do volume de óleo estava desprendido no topo da proveta, apenas uma emulsão residual na interface entre o óleo e água permaneceu. A interação entre a bactéria e a levedura pode estar favorecendo o fenômeno da floculação celular (aglomeração). O último conjunto de experimentos permitiu concluir que

S. cerevisiae é capaz de crescer e assimilar o oleato, porém não podemos concluir que ela consome o hexadecano. De maneira geral, os resultados permitiram concluir que as leveduras têm uma grande importância tanto na formação, como na estabilidade de emulsões e muitas variáveis influenciam na formação das mesmas.

Palavras-chave: Biocombustíveis, estabilidade de emulsões, hexadecano, levedura, e *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

Biofuels have been the subject of growing interest in recent years, as they can replace the use of fossil fuels, reducing the emission of greenhouse gases, which is a major factor in climate change. One advanced biofuel is farnesane, which has potential to replace diesel oil, and it can be produced using biotechnological processes. However, during the purification steps of this compound (*i.e.* downstream operations), a relatively stable emulsion consisting of lipid droplets, microorganisms (yeast *Saccharomyces cerevisiae*), fermentation medium and gases is observed, which is undesirable. This work aimed at increasing our knowledge on the mechanisms responsible for stabilizing these oil in water emulsions, which might lead to better separation strategies that are more efficient and/or cost effective than the current process. The following experiments with baker's yeast and an industrial fuel ethanol strain (PE-2) were performed: growth kinetics in shake-flasks; preparation of emulsions containing pre-cultured yeast in complex or synthetic media; yeast in different physiological states; yeast cell extracts; a mixture of yeast and bacteria (*Lactobacillus fermentum*, a typical contaminant of industrial processes). To test if *S.cerevisiae* consumes hexadecane, which was used as the oil phase always, growth was tested on petri dishes with hexadecane or oleic acid. A three-phase system was always observed in the prepared emulsions: top (oil in water emulsion), intermediate (yeast and lipid droplets in aqueous suspension) and lower (yeast sediment). We observed that some compounds present in the water used to wash fresh yeast, purchased from the supermarket, increase the stability of emulsions. Hence, it was decided to prepare emulsions from yeast stocked and cultured in the laboratory. Yeast cells in stationary, post-diauxic phase, favor the formation of less stable emulsions, when compared to those prepared with cells in stationary, pre-diauxic phase. The PE-2 strain promoted more stable emulsions than baker's yeast. Emulsions with cell extract of baker's yeast were the least stable ones, among those prepared in this work. The presence of a contaminant (*L. fermentum*) greatly influences the formation and stability of emulsions. After 6 days, most of the oil was at the top of the cylinder where only one residual emulsion in the interface between the oil and water remained. The interaction between bacteria and yeast could favor cell flocculation of yeast. Finally, *S. cerevisiae* is able to grow and assimilate oleic acid, but we are unable to conclude whether or not it consumes hexadecane. Overall, our results show that yeast cells constitute an important factor in the formation and in the stabilization of emulsions and numerous variables are involved in this process.

Keywords: Biofuels, stability of emulsions, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, hexadecane

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Especificos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Emulsões.....	15
3.2 Emulsões contendo microrganismos	18
3.3 Biocombustíveis	20
3.4 Biocombustíveis provenientes de emulsões	22
3.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
3.6 Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e aplicações	26
3.7 Fisiologia do crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3.8 A superfície da célula de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
4. METODOLOGIA.....	36
4.1 Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> e preservação	36
4.1.1 Elaboração das emulsões	36
4.1.2 Cinéticas de crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	37
4.1.3 Elaboração das emulsões com <i>S. cerevisiae</i> : linhagem de panificação cultivada em meio complexo e sintético e linhagem PE-2 cultivada em meio complexo	38
4.1.4 Elaboração das emulsões com os extratos celulares de <i>S. cerevisiae</i> : linhagens de Panificação e PE-2 cultivadas em meio complexo.....	39
4.1.5 Elaboração das emulsões com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> . ..	39
4.1.6 Ensaio de crescimento em placa com diluições seriadas.....	39
4.2 Estabilidade das fases à cremeação	42
4.3 Caracterização físico-química das leveduras.....	42

4.4 Determinação da viabilidade celular	42
4.5 Distribuição do tamanho de gotas	42
4.6 Microscopia ótica	43
4.7 Densidade de carga superficial	43
4.8 Reologia em estado estacionário	43
4.9 Tensiometria	43
4.10 Tratamento de dados e análise estatística	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Reprodutibilidade das emulsões geradas com <i>S. cerevisiae</i>	49
5.2 Cinética de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> em frascos agitados	60
5.2.1 Cinética de crescimento da linhagem de panificação em meio totalmente definido	60
5.2.2 Cinética de crescimento da linhagem de panificação e PE-2 em meio complexo	67
5.3 Influência do meio cultivo da levedura <i>S. cerevisiae</i> na formação e estabilidade das emulsões	64
5.4 Influência da linhagem e do estado fisiológico da <i>S.cerevisiae</i> na estabilidade das emulsões	80
5.5 Influência do rompimento da parede celular da <i>S.cerevisiae</i> na estabilidade das emulsões	93
5.6 Emulsões com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i>	104
5.7 Ensaio de crescimento em placa com diluições seriadas	113
6. CONCLUSÕES	116
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	118
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
9. APÊNDICE	132

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, matérias-primas fósseis são empregadas para suprir 86% da demanda energética mundial, sendo 36% petróleo, 27% carvão e 23% gás natural (MAGGIO; CACCIOLA, 2012). Essa grande dependência pelos combustíveis fósseis causa algumas preocupações, como: o impacto ambiental devido à emissão crescente de carbono na atmosfera, a dependência econômica em relação a estes combustíveis, pois os principais polos de produção de petróleo no mundo estão localizados em regiões com instabilidade social e política, além do esgotamento previsto dessas fontes nas próximas décadas (KERSCHNER et al., 2013). Os biocombustíveis etanol e biodiesel destacam-se como alternativas promissoras para uso em motores baseados no ciclo de Otto e em motores Diesel, respectivamente. A literatura mostra uma redução significativa na emissão dos gases do efeito estufa em decorrência da substituição gradativa dos combustíveis fósseis derivados do petróleo por estes combustíveis renováveis (BLANCH, 2012).

O papel da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é bem conhecido nas fermentações tradicionais que ocorrem nas indústrias de panificação e bebidas, produtos alimentícios consolidados no mercado (FERREIRA et al., 2010). Na área de biocombustíveis, *S. cerevisiae* possui aplicação na indústria sucro-alcooleira na produção do etanol combustível, tanto em processos de primeira, como de segunda geração. Hoje, o Brasil é o segundo produtor mundial e o maior exportador mundial de etanol, com uma produção de aproximadamente 30 bilhões de litros na safra de 2013/2014 (AJANOVIC; HAAS, 2014).

Empregando-se diferentes estratégias de engenharia metabólica e evolutiva, *Saccharomyces cerevisiae* pode ser geneticamente modificada para produzir diferentes biocombustíveis, como: 1-butanol, isobutanol, bisaboleno, amorfadieno, ésteres etílicos de ácidos graxos e o farneseno (JANG et al., 2012; VALLE-RODRÍGUEZ et al., 2014). O farneseno possui características que permitem sua aplicação não somente na área de combustíveis, mas também de lubrificantes, plásticos, fragrâncias, cosméticos e surfactantes (RUDE; SCHIRMER, 2009).

Na produção do farneseno ocorre a formação de uma mistura composta por gotas de óleo, microrganismos, meio fermentativo e gases formados durante a fermentação (HEERES et al., 2014; PERALTA-YAHYA et al., 2012). As operações utilizadas para desestabilizar essa emulsão, como a aplicação de força centrífuga e/ou gravitacional, resultam num maior tempo de processo e num maior custo de produção. A dificuldade de separação do farneseno neste processo também é, em parte, devido à presença dos microrganismos no meio, que atuam como

estabilizantes da emulsão, mas não se sabe exatamente quais moléculas ou mecanismos estão envolvidos (FURTADO et al., 2015; HEERES et al, 2014).

Emulsões ocorrem em diferentes situações, como: em alimentos, em produtos farmacêuticos, cosméticos, pigmentos, tintas, lubrificantes, entre outros (LEAL-CALDERON; THIVILLIERS; SCHMITT, 2007). Estudos com emulsões estão ligados a três áreas do conhecimento principais: as propriedades dos materiais que irão compor a emulsão (fase hidrofóbica, fase hidrofílica e emulsificantes), as características físicas, químicas, óticas e reológicas dos sistemas formados e os processos tecnológicos utilizados, seja para formar ou separar esses sistemas (MCCLEMENTS, 2012).

Furtado (2014) estudou métodos químicos e físicos para desestabilizar emulsões contendo a levedura *S. cerevisiae*, com o objetivo de propor alternativas mais baratas ao método atualmente empregado no processo industrial, que é baseado no uso de forças centrífugas e/ou gravitacionais, obtendo bons resultados usando nano partículas magnéticas na recuperação do óleo. Moreira (2015) estudou os mecanismos de estabilização de emulsões compostas por hexadecano, água e a levedura *S. cerevisiae*, com o objetivo de contribuir ao desenvolvimento de processos de separação do óleo. Os resultados permitiram concluir que as leveduras apresentam um importante papel na estabilidade da emulsão, proporcionando emulsões estáveis, independentemente da viabilidade celular da levedura. Neste contexto, no presente projeto de mestrado objetivou-se aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pela estabilização de emulsões água em óleo, contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o que pode levar a novas estratégias de separação do óleo que sejam mais eficientes e/ou econômicas que as atuais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o papel da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na estabilização de emulsões de hexadecano em fase aquosa.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito da linhagem;
- Estudar o efeito das condições fisiológicas (meio de cultura, fases do crescimento, viabilidade) das células de levedura;
- Estudar o efeito do rompimento da parede celular das leveduras;
- Estudar o efeito da presença de contaminantes (*Lactobacillus fermentum*);
- Estudar o crescimento em placa com substratos lipídicos (oleato e hexadecano).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Emulsões

Uma emulsão pode ser definida como um sistema que apresenta uma mistura heterogênea de duas ou mais fases imiscíveis, a maioria das vezes sendo água e óleo, dispersas uma na outra no formato de gotas esféricas, junto com a presença de emulsificante/surfactante para estabilizar as gotas dispersas (GUTIÉRREZ, 2008, MCCLEMENTS, 2010).

As emulsões surgem em várias aplicações tecnológicas e estão presentes em diferentes áreas do conhecimento e em vários momentos do cotidiano, podendo ser desejáveis ou não. Muitos produtos podem ser encontrados na forma de emulsões durante seu processamento ou na forma do produto acabado (Figura 1) (AMPATZIDIS; VARKA; KARAPANTSIOS, 2014; CHUNG; MCCLEMENTS, 2014).

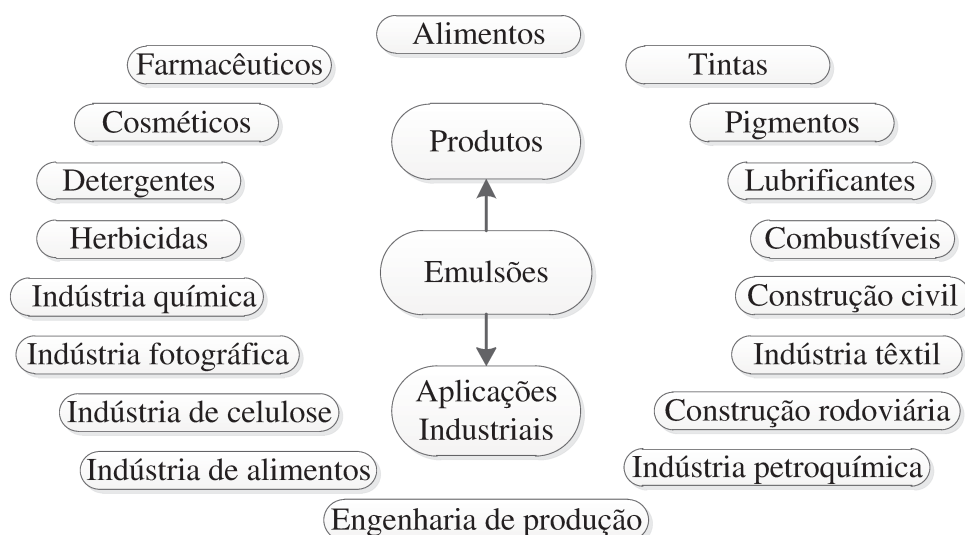


Figura 1. Emulsões e suas aplicações, baseado em (SCHUBERT; ENGEL, 2004).

As emulsões podem ser classificadas de acordo com as fases que as constituem, podendo ser: emulsões óleo em água (O/A), nas quais as gotículas de óleo estão dispersas (fase dispersa) na água (fase contínua) ou emulsões água em óleo (A/O), em que a água (fase dispersa) está dispersa em óleo (fase contínua) (MCCLEMENTS, 2005). Mais recentemente, estudos têm demonstrado estruturas mais complexas, tais como: emulsões óleo em água em água (O/A/A), água em óleo em óleo (A/O/O) ou emulsões óleo em água em óleo (O/A/O) (TADROS, 2013; VAN DER GRAAF; SCHROËN; BOOM, 2005).

As emulsões também podem ser classificadas de acordo com o tamanho das gotículas presentes, tais como: nanoemulsões, com raios de gotas variando de 1 a 100 nm, microemulsões com raios de gotas variando de 100 a 1000 nm e macroemulsões com raios de gotas variando de 0,5 a 1000 µm (SANTANA, R. C.; PERRECHIL; CUNHA, 2013).

A estabilidade de uma emulsão está relacionada com a capacidade desta em conservar suas propriedades frente a mudanças, durante o tempo. Estas podem ser estabilizadas por diferentes métodos e mecanismos, como por exemplo pela presença de surfactantes, que são moléculas compostas por uma parte hidrofóbica, que fica em contato com o óleo, e uma parte hidrofílica, que fica em contato com a água. Deste modo, eles promovem a diminuição da tensão interfacial ao se ligarem à superfície das gotículas, formando uma camada em volta destas que impede sua agregação devido às forças eletrostáticas de repulsão. Outras moléculas capazes de estabilizar emulsões são íons, que podem ser adsorvidos na superfície da gotícula de óleo, sem aumentar ou diminuir a tensão interfacial, porém promovem uma barreira eletrostática, evitando a agregação das gotículas. Os sólidos coloidais não surfactantes também são capazes de estabilizar emulsões, promovendo a formação de uma barreira física entre as gotas, evitando também a agregação das gotículas. Os biopolímeros são moléculas que conseguem também estabilizar emulsões, promovendo a diminuição da tensão interfacial, através de interações estéricas e eletrostáticas, contribuindo para mudanças na viscosidade e na elasticidade na fase contínua da emulsão. (PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2013; SANFELD; STEINCHEN, 2008; SANTANA, R. C. et al., 2013).

As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, devido à grande tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa, e sensíveis a variações de temperatura. Com o decorrer do tempo, esse sistema procura chegar a um estado de menor energia através da coalescência das gotas, ocorrendo a separação das fases através de diferentes mecanismos físico-químicos, tais como: a separação devido à ação da gravidade (cremeação e sedimentação), a agregação das gotículas (floculação e coalescência) ou a transferência de massa (amadurecimento de Ostwald) (JAFARI et al., 2008; MCCLEMENTS, 2005; ZEEB et al., 2012) (figura 2).

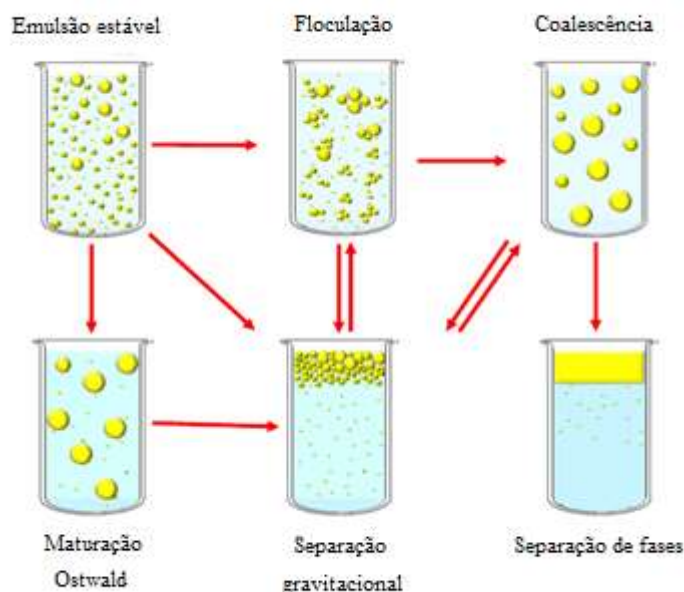


Figura 2. Mecanismos de instabilidade das emulsões. Adaptado de (CHUNG; MCCLEMENTS, 2014).

A estabilidade cinética das emulsões pode ser obtida pela redução da diferença entre as densidades das fases contínua e dispersa, pela diminuição do tamanho médio das gotículas, pelo aumento da viscosidade da fase contínua e pela manipulação da carga elétrica da gotícula, influenciando diretamente a repulsão ou atração entre as mesmas (afetando os processos de coalescência ou floculação). Além disso, para aumentar a estabilidade de uma emulsão, é necessário mantê-la sob uma pequena variação de pH, preferencialmente constante, para que não ocorram modificações nas cargas elétricas na interface entre a fase hidrofílica e hidrofóbica, que pode aumentar a força de repulsão entre as gotículas (evitando a coalescência e/ou floculação) (IVANOV; KRALCHEVSKY, 1997; MCCLEMENTS, 2012; WILDE, 2000).

Os mecanismos de estabilização de emulsões são importantes para o desenvolvimento de aplicações em novos materiais e produtos. Logo, é importante o conhecimento dos métodos tanto para estabilizar quanto desestabilizar estes sistemas, dependendo da aplicação desejada (TUFANO et al., 2008; VAN DINTHER; SCHROËN; BOOM, 2013). A tecnologia mais utilizada no preparo de emulsões nas indústrias é a homogeneização em alta pressão. Neste processo, uma grande quantidade de energia é direcionada à mistura inicial (que pode ser um sistema bifásico ou pré-emulsionado), favorecendo a formação de emulsões com tamanhos de gotas menores e distribuição mais homogênea dos emulsificantes sobre a interface das gotas (GUZEY; MCCLEMENTS, 2006;

MCCLEMENTS, 2005). Porém, o maior desafio das indústrias, ao aumentar a escala de produção durante o preparo de emulsões, é manter as características originais, tais como: a escolha da geometria adequada para a homogeneização, que pode afetar a microestrutura da emulsão (tamanho e distribuição de tamanho das gotículas), as características físicas, óticas e reológicas do sistema; a proporção, polaridade e concentração do emulsificante necessárias para que seja possível, em primeiro lugar, a dispersão das gotículas, a cinética de adsorção, a capacidade de reduzir a tensão interfacial e, posteriormente, conferir a estabilidade ao sistema (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; DICKINSON, 2009; SCHUBERT; ENGEL, 2004).

3.2 Emulsões contendo microrganismos

Estudos relatam que muitos microrganismos são capazes de produzir compostos tensoativos quando estão presentes em emulsões. Estes compostos têm muitas vezes características promissoras para o desenvolvimento de novos biossurfactantes, detergentes, solubilizantes de sólidos dispersos e inibidores de corrosão. Entre estes microrganismos destacam-se bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ALCANTARA, 2012; KANG et al., 2008a; LY et al., 2006; PARASZKIEWICZ; KANWAL; DŁUGOŃSKI, 2002; VAN DYKE; LEE; TREVORS, 1991).

Normalmente, os microrganismos produzem biossurfactantes quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento (DOROBANTU et al., 2004). Os biossurfactantes podem apresentar diferenças nas propriedades emulsificantes em razão dos diferentes tipos de substrato presentes no meio de cultivo, como: carboidratos, óleos vegetais ou hidrocarbonetos de alto peso molecular (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; KACZOREK et al., 2008).

Yarrowia lipolytica, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, têm por característica produzir biossurfactantes em meio extracelular quando estão presentes em emulsões, principalmente quando a fonte de carbono é um hidrocarboneto saturado (ACCORSINI et al., 2012; AMARAL et al., 2010; FONTES et al., 2008). Quando esses hidrocarbonetos são metabolizados pela levedura, a principal dificuldade é a hidrofobicidade destes compostos, o que vai estimular a produção do biossurfactante pela levedura. O principal objetivo da formação de biossurfactante, em meio extracelular, é facilitar a difusão passiva do hidrocarboneto para o interior da célula, o que irá reduzir a tensão interfacial e aumentar a área interfacial do substrato no meio (NITSCHKE; COSTA, 2007). Com a diminuição da tensão interfacial, o diâmetro médio das gotas de óleo decresce e a área interfacial aumenta (RÜHS et al., 2014). Essas gotículas menores assim formadas estarão disponíveis dentro da fase aquosa da emulsão (KANG et al., 2008b).

As leveduras podem produzir biossurfactantes tanto de maneira espontânea quanto induzida. Esta produção pode estar associada ao crescimento microbiano, induzido pela presença de substratos lipofílicos, ou à otimização da composição do meio de cultivo, tais como: pH, aeração, velocidade de agitação e mudanças na permeabilidade da parede celular; ou também mantendo a levedura sob condições de estresse, como: baixas concentrações de fonte de nitrogênio, sais minerais, vitaminas, mudanças de pH e temperatura (FONTES et al., 2008; KATEMAI, 2012).

Emulsões pickering podem ser emulsões óleo em água (O/A), emulsões água em óleo (A/O) ou com estruturas mais complexas. Porém, neste tipo de emulsões, a estabilidade é atribuída à presença de partículas sólidas, necessariamente com o tamanho menor que a gotícula dispersa, não havendo surfactantes (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013; HUNTER et al., 2008) (figura 3). Alguns estudos sugerem que nas emulsões em presença de microrganismos, a estabilização ocorre pelo mecanismo de Pickering, simultaneamente a um aumento da viscosidade da emulsão, principalmente quando há presença de bactérias. porém é pouco relatado na presença de leveduras a ocorrência da estabilização de emulsões pelo mecanismo de Pickering (COSSU et al., 2015; HEERES et al., 2015; SHEN et al., 2014; WONGKONGKATEP et al., 2012; ZHU et al., 2014). Leveduras apresentam baixa afinidade por óleos em interfaces óleo em água (O/A) em emulsões, logo apresentam uma capacidade menor de estabilizar emulsões em relação a bactérias (DOROBANTU et al., 2004; FURTADO et al., 2015; HEERES et al., 2015).

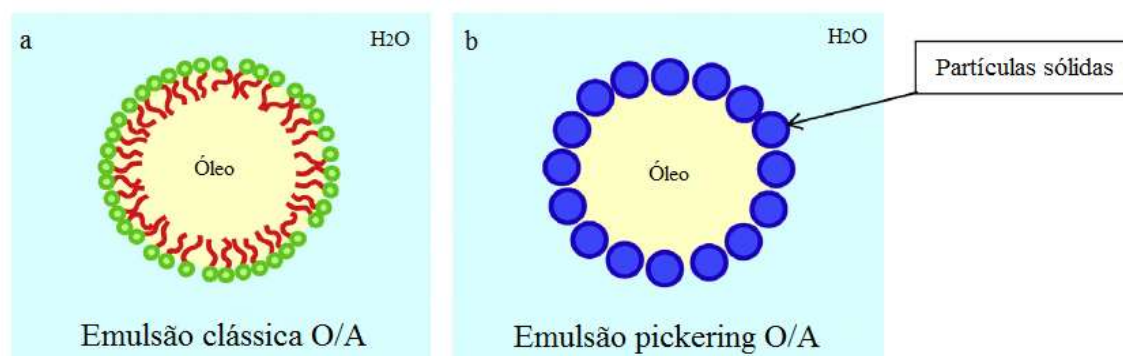


Figura 3. Emulsão estabilizada com surfactante (a), emulsão estabilizada com partículas sólidas, tipo Pickering (b). Adaptado de (CHEVALIER; BOLZINGER, 2013).

Emulsões Pickering apresentam parte das características das emulsões convencionais, porém o mecanismo de adsorção é diferente, pois as partículas sólidas não precisam ser necessariamente anfífilas. Quando as partículas estão presentes na interface óleo em água (O/A) da emulsão a mobilidade das partículas é menor, pois a energia cinética que é conferida ao movimento das gotículas é insuficiente para promover o deslocamento das

partículas sólidas aderidas nesta interface, logo, esse tipo de emulsão é menos susceptível à coalescência e à maturação de Ostwald. Esse fato pode ser desejável ou indesejável, dependendo da finalidade do processo envolvido (MURRAY et al., 2011; SHARMA et al., 2014).

O mecanismo de estabilidade nas emulsões Pickering depende de que maneira as partículas estão acumuladas na interface da emulsão. Essa camada de partículas forma uma barreira estérica evitando a floculação e/ou coalescência das gotas (DICKINSON, 2010). A força que essa barreira estérica exerce sobre a interface é dependente da dificuldade em remover as partículas dessa região. A eficiência da barreira estérica é maior quando as partículas estão preferencialmente envolvidas pela fase contínua da emulsão (DICKINSON, 2010; RAYNER et al., 2014) (figura 4).

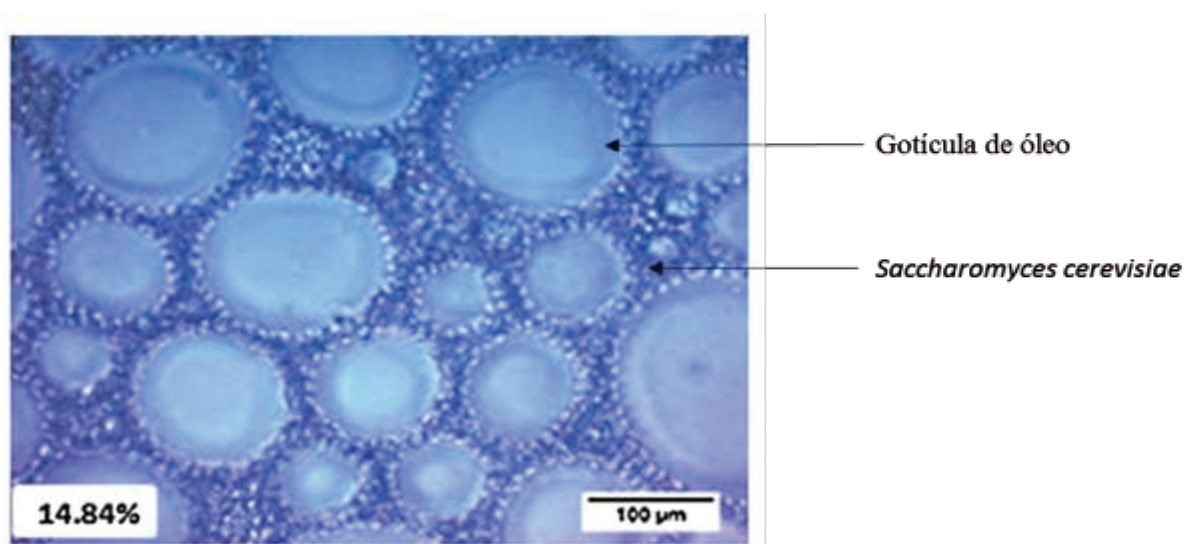


Figura 4. Micrografia de uma emulsão O/A estabilizada com *Saccharomyces cerevisiae*. Editado de (FURTADO et al., 2015).

O ângulo de contato da partícula na estabilização da gota de óleo determina a localização desta na interface e qual vai ser o tipo da emulsão. Ângulos de contato inferiores a 90° indicam que as partículas apresentam propriedades hidrofílicas, contribuindo para a formação de emulsões óleo em água (O/A). Ângulos de contato superiores a 90° indicam que as partículas apresentam propriedades hidrofóbicas, contribuindo para a formação de emulsões água em óleo (A/O) (LEE, G. J. et al., 2014; MARKU et al., 2012).

3.3 Biocombustíveis

O desenvolvimento de fontes de energia renováveis tem se destacado na economia mundial em razão de vários fatores, como: o máximo da produção de petróleo prevista até a metade do século XXI, e consequentemente a escassez iminente dos derivados desse

combustível fóssil (gasolina, diesel, querosene e gás liquefeito), como resultado da crescente demanda mundial, impulsionada pelos países em desenvolvimento. A produção centralizada destas fontes de energia em determinadas áreas do mundo, governada por fatores políticos e geográficos, o que resulta em vulnerabilidade dos preços. E finalmente, as questões relacionadas às mudanças climáticas e ao aquecimento global, principalmente quanto à presença de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera. As autoridades governamentais deverão se adequar e buscar alternativas e formas mais sustentáveis para produzir energia, aproveitando as potencialidades de cada região (GOLDEMBERG et al., 2014; MAGGIO; CACCIOLA, 2012).

Os biocombustíveis podem ser classificados de acordo com o estado físico, podendo ser líquidos ou gasosos. São produzidos a partir de biomassa vegetal, que é encontrada em abundância na natureza e em vários resíduos agroindustriais. Etanol, metanol, biodiesel e metano são alguns exemplos de biocombustíveis, apresentando baixo custo final de produção (sua competitividade sendo muito dependente do preço do barril de petróleo) e boa biodegradabilidade (BALAT; BALAT, 2009).

Os biocombustíveis também podem ser classificados em combustíveis de primeira, segunda e terceira geração. Os biocombustíveis da primeira geração são produzidos a partir de substratos provenientes de matérias-primas agroalimentares, através da aplicação de tecnologias convencionais de produção. A tecnologia de produção 1G já atingiu níveis de produção economicamente viáveis e bem estabelecidos no mercado, com a produção e comercialização em larga escala; exemplo disto é a produção do etanol combustível a partir da cana de açúcar no Brasil (NIGAM; SINGH, 2011). Os biocombustíveis da segunda geração são produzidos a partir da biomassa lignocelulósica, o que requer tecnologias de pré-tratamento (físicos, químicos ou biológicos) para aumentar a disponibilidade dos açúcares fermentescíveis presentes nesta biomassa (TIMILSINA; SHRESTHA, 2011). Os biocombustíveis de terceira geração surgiram a partir da utilização de microrganismos geneticamente modificados. Atualmente, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* geneticamente modificados podem produzir biocombustíveis como etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, ésteres etílicos de ácidos graxos, isoprenos, diterpenos, sesquiterpenos, bisaboleno e farneseno com diferentes rendimentos e produtividades (JANG et al., 2012).

A produção de biocombustíveis ainda encontra algumas dificuldades. Muitas vezes, em sua produção, são usadas matérias-primas que poderiam servir para a obtenção de alimentos, como é o caso do biodiesel, majoritariamente produzido a partir de óleos vegetais comestíveis. Esse fato ainda gera polêmicas referentes ao uso dessas matérias-primas para a produção de

alimentos ou para a produção de biocombustíveis (BRENNAN; OWENDE, 2010). Desta maneira, estudos estão sendo realizados com o objetivo de desenvolver novas tecnologias e novos microrganismos para a produção de biocombustíveis, de forma a se evitar o emprego de biomassas que poderiam ser usadas para a obtenção de alimentos.

3.4 Biocombustíveis provenientes de emulsões

O farnesano ($C_{15}H_{32}$), um hidrocarboneto saturado ramificado, possui características interessantes para ser um substituto ao diesel de petróleo, como mostra a tabela 1 (RUDE; SCHIRMER, 2009). O número de cetanos representa a qualidade de ignição do biocombustível, com um número de cetanos mais elevado, há um menor atraso da ignição e uma melhor qualidade de combustão no motor. O ponto de névoa é definido como a menor temperatura em que se observa a formação de uma turvação, indicando o início da cristalização (SANTANA, ROBERTO C. et al., 2006). O baixo valor do ponto de névoa e elevado poder calorífico são características interessantes ao farnesano, pois abre possibilidades do uso desse combustível no setor aeronáutico e em países que possuem inverno muito rigoroso.

Tabela 1 – Propriedades físicas e químicas de diferentes combustíveis.

	Farnesano	Biodiesel			Petróleo
		Soja	Mamona	Sebo bovino	Diesel
Densidade (Kg/l)	0,84 ^a	0,87 ^c	0,91 ^d	0,86 ^e	0,85 ^c
Número de cetanos	58 ^b	49 ^c	48,4 ^d	60,35 ^e	53 ^c
Ponto de névoa (°C)	-40 ^b	1 ^c	-1 ^d	-	7 ^c
Poder calorífico (MJ/ Kg)	43 ^b	38,81 ^c	37,5 ^d	42,7 ^e	42,5 ^c
Oxigênio (%)	0 ^b	11 ^c	11 ^d	11 ^e	0 ^c

Fonte: (RUDE; SCHIRMER, 2009)^a, (WESTFALL e GARDNER, 2011)^b, (QI; LEE, 2014)^c, (BERMAN; NIZRI; WIESMAN, 2011)^d (DA CUNHA et al., 2009)^e

Além de apresentar aplicação como biocombustível, podendo inclusive ser viável como combustível para aviação, devido ao baixo ponto de névoa e ao alto poder calorífico, o farnesano também apresenta aplicação na área de lubrificantes, plásticos, fragrâncias, cosméticos, surfactantes e precursores de vitaminas (RUDE; SCHIRMER, 2009). Na Figura 5, estão apresentadas as estruturas químicas do farneseno, produzido pelo metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*, e farnesano, que passou pelo processo de e hidrogenação.

usado para separar componentes distintos de uma mistura, membranas de filtração por ação da gravidade, força centrífuga ou diferença de pressão, além do uso de eletrocoalescedores.

Estudos recentes mostram que adotar mais de uma estratégia pode ser necessário para a separação de óleo em um meio fermentativo. A melhor escolha nas condições operacionais e a geometria do reator a ser utilizado, podem favorecer a coalescência das gotas de farneseno durante a fermentação, isso facilitaria os processos de separação e purificação, sendo possível a recuperação direta do produto durante o processo fermentativo (CUELLAR; VAN DER WIELEN, 2015).

Em 2012, o preço de venda do farnesano era de 7,7 US\$/l (BULLIS, 2012). Em 2014, Amyris S.A obteve o menor custo de produção até o momento para o farnesano, sendo 2,50 US\$/l (LANE, 2015). Mesmo assim, o preço de venda do farnesano ainda é além do custo de produção do diesel (variando entre 1,12 – 1,19 R\$/l), e do biodiesel (variando entre 1,66 – 1,75 R\$/l) no Brasil no ano de 2013 (AJANOVIC; HAAS, 2014; NOVACANA, 2014).

Atualmente, para a produção de biodiesel alguns estudos mostram que ocorre a adição de surfactantes durante a reação de transesterificação, formando um sistema emulsionado. Estes novos biocombustíveis apresentam uma capacidade de combustão mais eficiente e emitem menos poluentes (hidrocarbonetos, monóxido de carbono, dióxido de carbono e óxido de nitrogênio) para a atmosfera quando comparados ao diesel e biodiesel convencional (PRAKASH; SINGH; MURUGAN, 2015; REHAM et al., 2015).

3.5 *Saccharomyces cerevisiae*

Sabe-se que as leveduras são utilizadas na produção de alimentos e bebidas desde a antiguidade, porém apenas no século XIX Pasteur conseguiu confirmar que as leveduras são as promotoras da transformação do açúcar em etanol e gás carbônico na fermentação para produção de vinhos (BARNETT, 1998).

As leveduras são um grupo de microrganismos unicelulares, eucarióticos, heterotróficos, não filamentosos, pertencentes ao reino dos fungos. Diferenciam-se dos bolores por serem unicelulares e das bactérias por apresentarem um núcleo celular organizado separado do citoplasma, várias organelas com funções específicas, e um diâmetro maior de suas células, que varia entre 5 e 8 µm (JAY, 1992). Sua reprodução ocorre de maneira assexuada por brotamento ou por fissão celular (dependendo da espécie) e o seu crescimento é rápido em comparação com a maioria dos eucariotos. Em condições laboratoriais, o meio de cultivo para o crescimento de leveduras pode ser totalmente definido, facilitando o entendimento da fisiologia destes microrganismos (DEAK, 2009).

As condições ideais para o crescimento de leveduras ocorrem em temperaturas entre 25 °C e 30 °C, pH ácido e atividade de água acima de 0,8 (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). As leveduras são microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, na presença de oxigênio, as leveduras transformam toda a fonte de carbono em dióxido de carbono e biomassa. Já em condições anaeróbicas, as leveduras transformam a fonte de carbono em subprodutos de fermentação, tais como: etanol e glicerol (ANDRIETTA et al., 2007; WALKER, 2000).

O gênero *Saccharomyces* é heterogêneo e a multiplicação de suas células ocorre por brotamento multilateral ou através da formação de pseudomicélios. Todas as espécies possuem atividade fermentativa. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* pertence ao filo das *Ascomycotas*, subfilo das *Saccharomycotina*, ordem das *Saccharomycetales* e família das *Saccharomycetaceae* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Por ser um microrganismo eucariótico, apresenta em sua estrutura interna organelas com características importantes para as suas funções metabólicas, como: núcleo, ribossomos, complexo de Golgi, mitocôndrias, vacúolo, lisossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso (figura 6).

O citoplasma abriga todas as organelas e favorece a disposição destas dentro da célula. O núcleo conserva e transmite a informação genética na reprodução das leveduras. Os ribossomos sintetizam e decodificam as proteínas. O complexo de Golgi regula e concentra as proteínas a serem secretadas pela célula. Os vacúolos e lisossomos atuam no processo de digestão intracelular através da ação de enzimas hidrolíticas, favorecido pelo pH mais ácido do que no citoplasma. Os retículos endoplasmáticos, liso e rugoso, atuam na síntese de lipídios e transporte de proteínas. As mitocôndrias são responsáveis pela respiração celular e a quantidade e morfologia destas na célula da levedura depende da espécie, da fase do ciclo celular, das condições de crescimento, se o substrato está em excesso ou limitante para o crescimento da levedura e se o microrganismo está em aerobiose ou anaerobiose (BARNETT; ROBINOW, 2002; VAN DER KLEI et al., 2011).

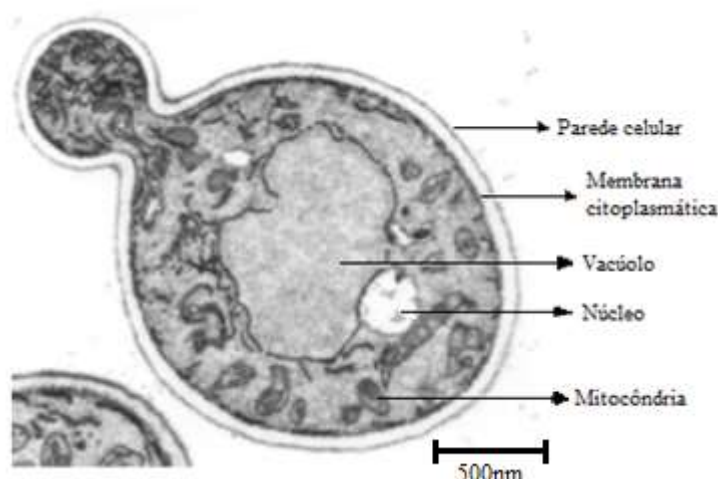


Figura 6. Micrografia eletrônica das estruturas e organelas da *Saccharomyces cerevisiae* editado de (VAN DER KLEI et al., 2011)

Saccharomyces cerevisiae pode ser encontrada na superfície de estruturas vegetais, como: flores, folhas, frutos, pólen, caules, raízes, em solos e em água do mar (FLEET, 2011; STARMER, LACHANCE, 2011). O pH ótimo de crescimento desta espécie é entre 4,0 e 5,0, sendo o pH mínimo próximo a 2,0; a atividade de água ótima situa-se entre 0,92 e 0,94 e a mínima de 0,90; a temperatura ótima de crescimento situa-se entre 30 e 35 °C, sendo a máxima de 35 a 43°C; a concentração de etanol no meio em que ainda ocorre crescimento é de aproximadamente 10%; e a concentração de NaCl máxima em que ainda ocorre proliferação celular é de aproximadamente 2,5 M. Essa espécie possui tolerância ao esgotamento de nutrientes (faz uso de carboidratos de reserva nestas condições) (ARONSSON; RÖNNER, 2001; DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013; DICKINSON, 2004; WALKER, 2000).

3.6 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e aplicações

Dentro da mesma espécie de um microrganismo, existem linhagens microbianas que possuem características genéticas, fisiológicas e fenotípicas diferentes entre si, como por exemplo: velocidade específica de crescimento, conversão de substratos em biomassa e produto, produtividade e tolerância a diferentes fatores de estresse. No entanto, essas diferenças não chegam a ser suficientes para mudar a identidade da espécie do microrganismo (WALKER, 2000).

Quando é realizado um estudo quantitativo sobre uma nova linhagem microbiana, características importantes a serem determinadas são o crescimento em meios de cultivo definidos sob condições anaeróbicas e aeróbicas, diferentes possibilidades de fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento, alto rendimento em biomassa, geneticamente estáveis e boa

produção de proteínas heterólogas, tanto de maneira intracelular e extracelular. (VAN DIJKEN et al., 2000).

Atualmente, existem diferentes linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae*, por exemplo: S288c, A634A, BY4716, CEN.PK, Σ 1278b, SK1, W303 (PETREZSELYOVA; ZAHRADKA; SYCHROVA, 2010). Além disto, há também diferentes linhagens usadas na indústria de panificação e linhagens empregadas na indústria do etanol combustível, como por exemplo PE-2, JP-1, CAT-1, BG-1, CR-1, SA-1, VR-1 (DELLA-BIANCA et al., 2013). Entre as linhagens existem diferenças genotípicas, fenotípicas e fisiológicas, logo cada linhagem é melhor adaptada para cada tipo de aplicação. Silva Filho et al (2005) relataram algumas diferenças nos parâmetros fisiológicos de linhagens industriais de *S. cerevisiae*, quando estas foram cultivadas em frascos agitados contendo 5% de melaço de cana de açúcar como fonte carbono (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros fisiológicos de diferentes linhagens de *S. cerevisiae**

Linhagem	μ_{\max} (h ⁻¹)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Rendimento etanol Yet/suc
BG-1	0,44	59,3	7,19	0,49
CR-1	0,47	60,3	7,76	0,50
PE-2	0,45	56,4	6,76	0,47
AS-1	0,45	60,3	6,4	0,50
IA1238	0,45	54,8	7,22	0,46
JP1	0,49	56,2	7,3	0,47

*As linhagens foram cultivadas em frascos agitados contendo 5% de melaço de cana de açúcar como fonte carbono, 30°C.

Devido a suas propriedades fisiológicas, *Saccharomyces cerevisiae* pode ser empregada em diferentes aplicações, como ilustrado na figura 7.

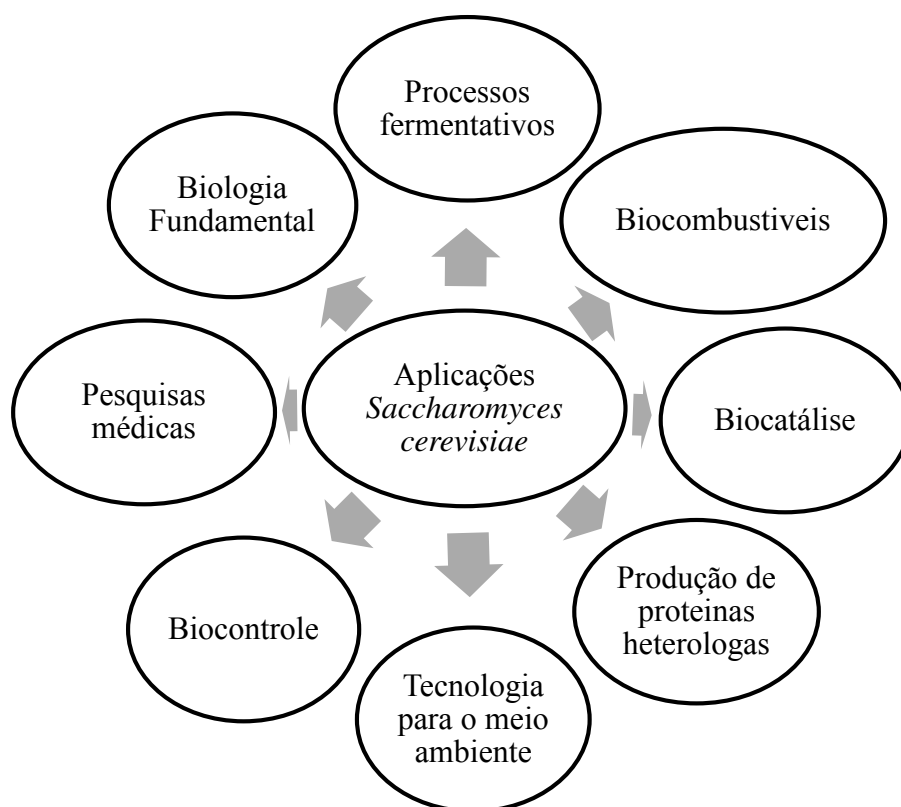


Figura 7. Aplicações de *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de (JOHNSON; ECHAVARRI-ERASUN, 2011; WALKER, 2000).

O papel da *Saccharomyces cerevisiae* é bem conhecido nas fermentações tradicionais das indústrias de panificação e bebidas, assim como na produção de enzimas, lipases e invertases, e aromas como o ácido p-hidroxibenzóico e o ácido p-aminobenzóico (AARTHY et al., 2014; BAMFORTH, 2014; BENITO et al., 2011; CHAE; JOO; IN, 2001; KRÖMER et al., 2013).

As linhagens utilizadas nas indústrias de cerveja e vinho normalmente são híbridos de mais de uma espécie de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum* e *Saccharomyces kudriavzevii*), logo é possível a formação de genomas poliplóides, aneuplóides ou alopoliplóides nas espécies híbridas formadas (DELLA-BIANCA et al., 2013; QUEROL; BOND, 2009).

As linhagens Pedra-2 (PE-2) e (CAT-1) de *S. cerevisiae* são aplicadas na indústria sucro-alcooleira na produção do etanol combustível, tanto em processos de primeira, como de segunda geração (BASSO et al., 2008). Estas duas linhagens estão presentes em mais de 80 % das indústrias de etanol de primeira geração no Brasil (BASSO; BASSO; ROCHA 2011). Estas linhagens apresentam algumas características importantes para uso neste tipo de processo, como: elevada produtividade em etanol, habilidade de fermentar soluções concentradas de

açúcares, acúmulo de carboidratos de reserva (glicogênio e trealose), alta viabilidade celular e boa tolerância ao reciclo de células, baixa produção de espuma, baixa floculação e boa tolerância a fatores de estresse, como: pH ácido, altas temperaturas e alta concentração de etanol no meio (BASSO et al., 2008). A linhagem CAT-1 ainda possui maior tolerância a altas concentrações de açúcares (maiores que 330 g/L), no início do processo de fermentação, quando comparada à linhagem PE-2 (PAULILLO; YOKOYA; BASSO, 2003).

A partir da análise dos parâmetros fisiológicos e tecnológicos durante o reciclo de células em processos de fermentação, a linhagem PE-2 apresenta melhor desempenho do que a linhagem de panificação, maior rendimento em etanol, menor formação de glicerol, maior formação de biomassa, alta viabilidade celular e maior acúmulo de carboidratos de reserva (BASSO et al., 2008) (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros das linhagens industriais de panificação e durante ciclos de fermentação, usando como substrato caldo de cana e melaço a 33°C e concentração de etanol no meio de 9,1% (v/v) *.

Parâmetros fermentação	Linhagem	
	Panificação	PE-2
Rendimento em etanol (%) ¹	88,1±1,01	92,0±1,12
Glicerol (%) ¹	5,40±0,25	3,38±0,33
Formação de Biomassa (%) ²	5,8±0,61	8,2±0,84
Viabilidade (%) ³	48±1,1	94±1,9
Trealose (% base seca) ⁴	4,0±0,22	9,5±0,29
Glicogênio (% base seca) ⁴	9,0±0,43	16,0±0,51

¹Fração de açúcares convertidos em etanol ou glicerol (grama por 100 gramas de açúcares);

²Aumento de biomassa por ciclo de fermentação; ³Viabilidade celular no final do último ciclo de fermentação (% de células viáveis); ⁴Armazenamento de carboidratos na célula no final do último ciclo de fermentação. *(BASSO et al., 2008).

Alves (2000) mostrou que a linhagem de panificação, não especificada, possui uma elevada velocidade específica de consumo de sacarose em relação a linhagem PE-2 durante a fermentação, a capacidade de absorção de sacarose é superior para a linhagem de panificação, desta maneira um maior acúmulo de hexoses é observado para esta linhagem.

Diferentes estratégias de engenharia metabólica têm sido usadas para modificar a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem PE-2, tornando-a capaz de gerar outros biocombustíveis, como por exemplo: 1-butanol, isobutanol, bisaboleno, amorfadieno, ésteres etílicos de ácidos graxos e o farneseno (FERREIRA et al., 2010; VALLE-RODRÍGUEZ et al., 2014; YUAN et al., 2011; ZHANG; RODRIGUEZ; KEASLING, 2011; ZHENG et al., 2011).

Alguns estudos com linhagens laboratoriais de *Saccharomyces cerevisiae* mostram que estas podem ser usadas na produção de proteínas heterólogas, não apresentando

endotoxinas e outros agentes patogênicos, de maneira que os produtos obtidos podem ser utilizados para fins terapêuticos, como por exemplo: insulina humana, vacinas contra hepatite ou papiloma (MARTÍNEZ et al., 2012; MEEHL; STADHEIM, 2014).

Nas tecnologias aplicadas no meio ambiente, a literatura relata o uso da *Saccharomyces cerevisiae* em biorremediação de solos e águas residuárias, na degradação de poluentes e na bioabsorção de metais pesados (BLEVE et al., 2011; RUMLOVA; DOLEZALOVA, 2012; WANG; CHEN, 2006).

Na área de biocontrole a *Saccharomyces cerevisiae* está sendo estudada para contribuir na agricultura, atuando como agente de controle biológico, protegendo a colheita para a obtenção de alimentos potencialmente seguros e como indicador de qualidade do meio ambiente (ORO et al., 2014; SCHISLER et al., 2011).

Em pesquisas médicas os estudos com *Saccharomyces cerevisiae* foram bem difundidos a partir do sequenciamento do seu genoma em 1996, o primeiro entre os eucariotos (GOFFEAU et al., 1996). Desde então, muitos estudos têm sido realizados em levedura na descoberta de novos medicamentos, na interpretação de mecanismos de doenças e como é o metabolismo e a resistência dos agentes hospedeiros (mamíferos de pequeno porte), na presença dessas novas drogas (CEREGHINO; CREGG, 1999; HOON et al., 2008; MELESE; HIETER, 2002; VOISSET et al., 2014).

Em biologia aplicada, muitos estudos são realizados na área de biologia molecular e celular, mapeamento de genes ativos no código genético e manipulação de rotas metabólicas, com o objetivo de aumentar a produção celular de biomoléculas com valor agregado como ácidos graxos, citrato, etanol e proteínas recombinantes, suprimindo a produção de metabólitos secundários (enzimas, glicerol, esteróis), o que diminui o gasto energético celular da levedura (LEE, S. K. et al., 2008; TANG; FENG; CHEN, 2013).

3.7 Fisiologia do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*

Quando células de *Saccharomyces cerevisiae* são inoculadas num meio de cultura líquido adequado e incubadas em condições propícias ao crescimento da população microbiana, uma curva de crescimento será obtida, conforme ilustrado na Figura 8.

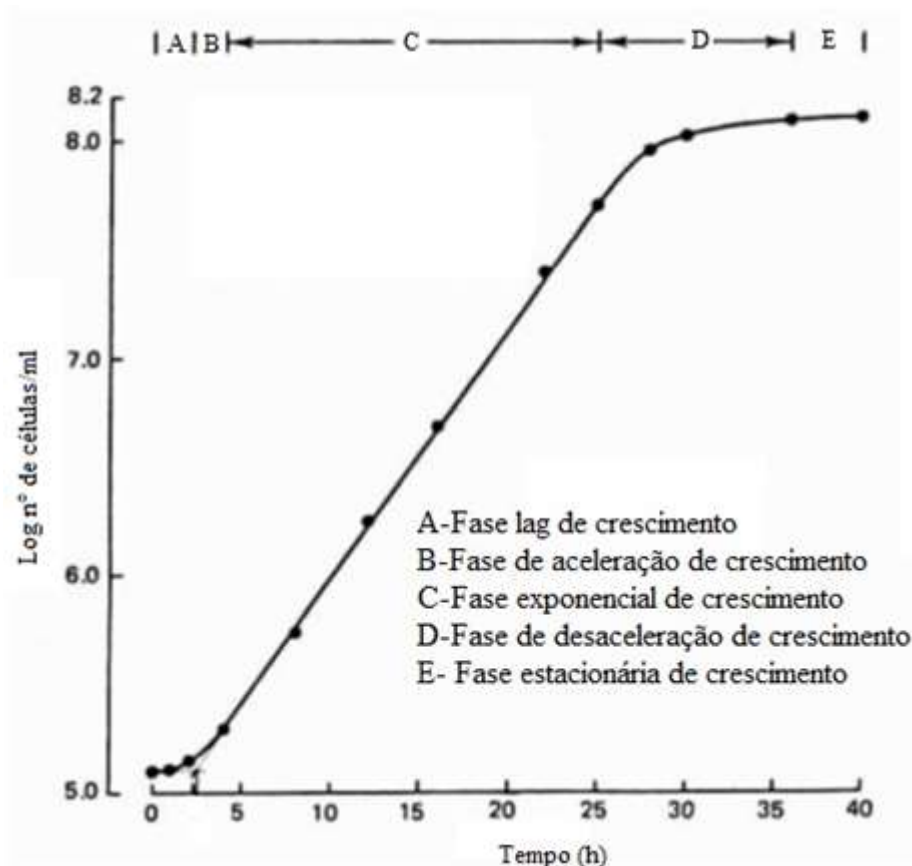


Figura 8. Curva de crescimento típica de *S. cerevisiae*, editado de (WALKER, 2000).

A fase lag de crescimento (A) representa um período em que ainda não há reprodução celular. Nesta fase as células estão se adaptando ao novo ambiente, sintetizando ribossomos e enzimas necessários ao metabolismo dos componentes presentes no meio. A duração desta fase depende das condições do cultivo, concentração do inóculo e o estado fisiológico deste (WALKER, 2000).

A fase de aceleração de crescimento (B) é considerada uma fase de transição, em que as células começam a divisão celular de maneira mais ativa, para posteriormente entrarem em fase exponencial (LOCHER et al., 1993; WALKER, 2000).

A fase exponencial de crescimento (C) representa um período de duplicações celulares a intervalos de tempo constantes, também conhecido como crescimento em escala logarítmica. Nesta fase, a velocidade específica de crescimento (μ_{max}) é constante e máxima. O valor de μ_{max} depende da espécie da levedura e das condições de cultivo. Nesta fase, é possível considerar que as células encontram-se num pseudo estado estacionário, pois as concentrações de todos os metabólitos e enzimas intracelulares são constantes (MONOD, 1949).

A fase de desaceleração do crescimento (D) ocorre devido ao esgotamento de um ou mais substratos do meio de cultura, que se torna limitante ao crescimento, ou ao acúmulo de metabólitos inibidores ou também devido à floculação celular.

A fase estacionária de crescimento (E) é alcançada quando a concentração celular atinge um valor máximo e constante e a velocidade específica de crescimento volta a ser zero. Quando as células de *S. cerevisiae* alcançam a fase estacionária de crescimento apresentam algumas características fisiológicas particulares, como: manutenção de alta viabilidade celular por longos períodos sem adição de nutrientes, uso de carboidratos de reserva (glicogênio e trealose), processos metabólicos mais lentos, com pouca síntese de proteínas, aumento da atividade da enzima superóxido dismutase, inibindo a ação de oxidantes, aumento da pressão de turgescência celular (resistência da membrana plasmática à entrada de água na célula), maior quantidade de mitocôndrias, a parede celular se torna mais espessa e menos porosa, sendo resistente à ação das enzimas zimolase e glucanases (LILLIE; PRINGLE, 1980; MARTINEZ DE MARANON; MARECHAL; GERVAIS, 1996; WERNER-WASHBURNE, M. et al., 1993; WERNER-WASHBURNE, MARGARET et al., 1996).

Em cultivos em batelada (ou descontínuos) realizados em meio contendo glicose como fonte de carbono e energia, *S. cerevisiae* pode passar por duas fases exponenciais de crescimento, o que é conhecido como crescimento diáuxico. Este fenômeno acontece quando a levedura pode consumir duas fontes de carbono em sequência, por exemplo: após a levedura consumir a glicose por fermentação, formando etanol e dióxido de carbono, ocorre o consumo de etanol pelas leveduras, através de metabolismo respiratório (WALKER, 2000; WERNER-WASHBURNE, MARGARET et al., 1996).

3.8 A superfície da célula de *Saccharomyces cerevisiae*

A superfície celular é a região que separa a parte interna da célula do meio externo, sendo composta pela parede celular, espaço periplasmático e membrana plasmática (listados aqui no sentido de fora para dentro da célula). A parede celular da *S. cerevisiae* corresponde a cerca de 25-30% da massa seca da célula e possui espessura entre 100-200 nm (KLIS et al., 2004; QUIRÓS et al., 2011). Esta parede é constituída principalmente por polissacarídeos (85%) e proteínas (15%), sendo: 60% de polímeros de glucose (β -glucanas) (50 a 60 % são 1,6- β -glucanas e 5% são 1,3- β -glucanas), 40% polímeros de manose ligados covalentemente a peptídeos (manoproteínas) e 2% de polímeros de n-acetilglucosamina (quitinas) (LIPKE; OVALLE, 1998; MAGNELLI; CIPOLLO; ABEIJON, 2002). (Figura 9).

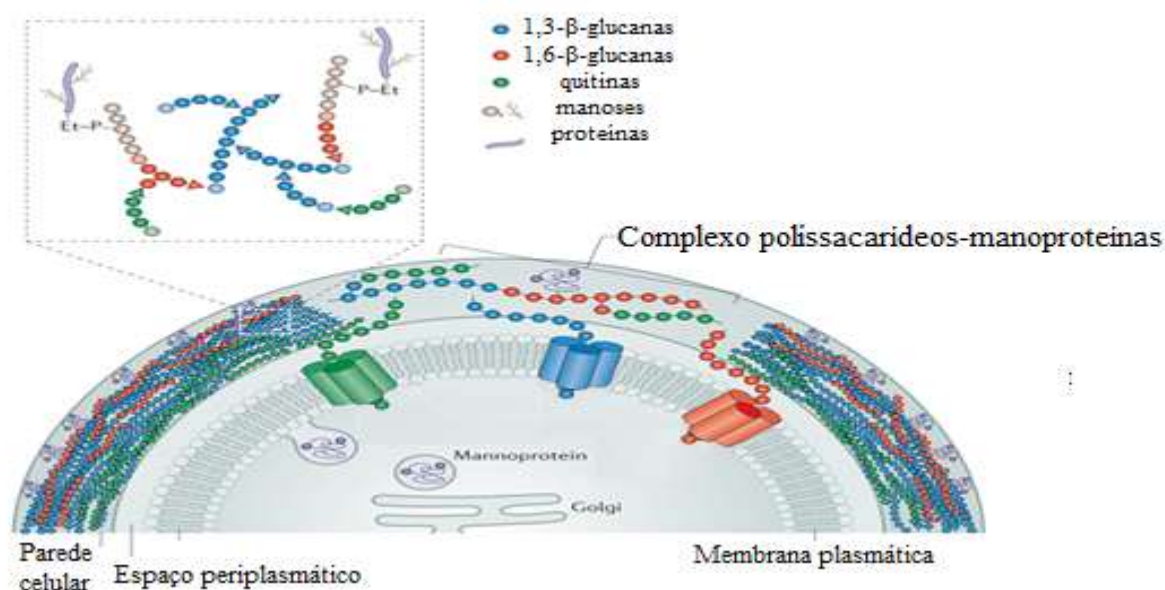


Figura 9. Estrutura da superfície celular da *Saccharomyces cerevisiae*. Editado de (CABIB; ARROYO, 2013)

A parede celular apresenta algumas características e funções vitais para a levedura, sendo elástica e resistente, o que ajuda a não causar inchamento excessivo da célula ou desidratação durante as diferentes situações às quais as células de levedura são expostas. A parede oferece uma proteção eficiente frente às tensões de cisalhamento, ao utilizar mecanismos que redistribuem as tensões por toda sua área, evitando possíveis danos. A parede celular também possui sítios de reconhecimento de feromônios, que são importantes para o crescimento e reprodução das leveduras (KAPTEYN; VAN DEN ENDE; KLIS, 1999; KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006; KLIS et al., 2002).

Os polissacarídeos da parede celular contribuem para o suporte das manoproteínas nesta região. As cadeias laterais das manoproteínas são ligadas ao nitrogênio, o que limita a permeabilidade da parede celular para macromoléculas e proteínas do meio extracelular. A presença de grupos fosfatos nas cadeias laterais dos polissacarídeos e a glicosilação das proteínas da parede celular contribuem para a retenção de água nesta região. A parede celular consegue absorver cátions de maneira satisfatória, incluído também metais pesados (CABIB; ARROYO, 2013; VAN DER KLEI et al. 2011).

O espaço periplasmático possui espessura entre 35- 45 angstroms e é o espaço que separa a parede celular da membrana plasmática. Esta região é descontínua, pois apresenta invaginações da membrana plasmática, e irregular devido às vilosidades da superfície interna da parede celular. O espaço periplasmático contribui para proteção da membrana plasmática (BOULTON; QUAIN, 2001).

Existem algumas enzimas, como glucanases e invertases, que são sintetizadas intracelularmente e em seguida transportadas para o espaço periplasmático. Essas enzimas irão catalisar a hidrólise de substratos para a levedura, para posteriormente facilitar seu transporte através da membrana plasmática (WALKER, 2000).

A membrana plasmática é uma estrutura dinâmica, possui espessura de aproximadamente 7,5 nm e é a região que separa o citoplasma do espaço periplasmático. A composição e a manutenção da sua integridade são essenciais para o funcionamento da célula e sua adaptação às constantes alterações do ambiente extracelular (KONINGS, 2006). Ela pode ser descrita como uma bicamada lipídica, composta predominantemente por lipídios, principalmente fosfolipídios, entre eles: fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, conferindo fluidez à membrana, e em menor proporção por esteróis, sendo o principal o ergosterol, que confere rigidez a membrana (HOFER, 1997).

A membrana plasmática possui uma permeabilidade seletiva, regulando o trânsito de moléculas para o interior e exterior da célula. Sendo sua composição majoritária em lipídios, ela possui propriedades hidrofóbicas, sendo uma barreira para a passagem de substâncias hidrofílicas (VAN DER KLEI et al., 2011).

A composição em lipídios da membrana plasmática é diferente quando a célula está em condições de limitação de oxigênio ou não. Em anaerobiose, a membrana plasmática apresenta maior quantidade de ácidos graxos saturados e menor quantidade de esteróis e ergosteróis, isto acontece devido à *S. cerevisiae* não ter a habilidade de sintetizar estes compostos, esteróis e ergosteróis, em ambiente sem oxigênio, desta maneira a membrana se torna menos rígida e mais permeável (SNOEK; STEENSMA, 2007).

A superfície, interna e externa, da membrana plasmática apresenta-se de forma irregular, principalmente por causa dos fenômenos de exocitose e endocitose, que são comuns nos organismos eucarióticos. Em alguns casos, a célula da levedura pode criar uma vesícula quando ela necessita absorver ou secretar substratos que não passam de forma passiva pela membrana plasmática, facilitando o transporte até o vacúolo (VALDEZ-TAUBAS; PELHAM, 2003; WALKER, 2000). As proteínas presentes na membrana plasmática, principalmente as que contêm aminoácidos com cadeias laterais apolares, podem ser classificadas de acordo com sua função, tais como: transporte de solutos, transdução do sinal de estímulos externos para ser o intermediário nas reações bioquímicas do metabolismo celular e no crescimento da célula, sustentação ao citoesqueleto da célula e a síntese de componentes na membrana (HOFER, 1997; VAN DER REST et al., 1995).

Alguns estudos relatam que as manoproteínas presentes na parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* podem atuar como bioemulsificantes, retardando a agregação das gotículas por coalescência. A estrutura de polímeros de manose ligados covalentemente a peptídeos confere propriedades anfífilas às manoproteínas. A fração proteica é responsável pelas propriedades emulsificantes, enquanto que os carboidratos, em cadeias menores, aumentam a estabilidade da emulsão (BARRIGA et al., 1999; DIKIT, P.; MANEERAT; H-KITTIKUN, 2012; DIKIT, PAWEENA et al., 2010; HEERES et al., 2015; TORABIZADEH; SHOJAOSADATI; TEHRANI, 1996).

4. METODOLOGIA

Para facilitar o entendimento da metodologia empregada ao longo deste trabalho, são apresentadas na figura 10 um esquema e na tabela 5 uma relação das medidas e experimentos realizados

4.1 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* e preservação

As seguintes linhagens de *S. cerevisiae* foram usadas nesse estudo: CEN.PK113-7D (laboratorial); PE-2 (industrial da produção de etanol combustível e do farneseno) e levedura de panificação. Todas as linhagens já se encontravam estocadas a -80 °C no Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos (LEMeB), à exceção da linhagem de panificação (Itaquara, Tapiratiba, Brasil), que foi adquirida num supermercado local no período entre março e maio de 2015. A linhagem de *Lactobacillus fermentum* usada neste estudo foi cedida gentilmente pela Fundação André Tosello – Coleção de Culturas Tropical (Campinas – SP). Para a execução dos experimentos dentro deste projeto de mestrado, foram gerados novos estoques para todas as linhagens indicadas acima, incluindo a linhagem de panificação. Primeiramente, as linhagens de levedura foram cultivadas a 30 °C em meio de cultivo complexo YPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona bacteriológica, 20 g/L e glicose, 20 g/L) até que fosse atingida a fase estacionária. A linhagem de *Lactobacillus fermentum* foi cultivada a 37 °C em meio de cultivo complexo MRS (extrato de levedura, 4 g/L, extrato de carne, 8 g/L, peptona bacteriológica, 10 g/L, glicose, 20 g/L, sorbitol, 1 g/L, fosfato dipotássico, 2 g/L, acetato de sódio triidratado, 2 g/L, citrato triamoniaco, 2 g/L, sulfato de magnésio heptaidratado, 0,2 g/L e sulfato de manganês tetraidratado, 0,05 g/L) até que fosse atingida a fase estacionária. Por fim, foi adicionado glicerol estéril até uma concentração final de 30 %. Após homogeneização, alíquotas de 1 mL foram armazenadas em tubos criogênicos a -80 °C, até utilização em experimentos.

4.1.1 Elaboração das emulsões com levedura de panificação fresca

As emulsões foram preparadas de acordo com Furtado (2014) e Moreira (2015). Emulsões de 50 mL continham 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de levedura, adquirida em comércio local, sem passar por um processo de cultivo em laboratório neste primeiro momento, na concentração de 10% (massa de levedura úmida/massa final de suspensão). Para realizar o processo de liofilização, o equipamento utilizado foi um liofilizador de bancada (marca terroni, São Carlos/SP, Brasil), a levedura comercial foi previamente congelada. Em seguida, as amostras foram dispostas no interior da câmara de secagem do liofilizador, o ciclo de operação do equipamento foi por um período de 24 h.

Para o preparo das emulsões, foi empregada agitação mecânica a 900 rpm durante 30 min num impulsor tipo hélice RW20 (IKA, Wilmington, USA). As emulsões foram obtidas em duplicata. Depois que as emulsões entravam em equilíbrio, num período de 24 h, eram realizadas as análises: estabilidade das fases, distribuição do tamanho de gotas e microscopia ótica (FURTADO, 2014).

4.1.2 Cinéticas de crescimento de *S. cerevisiae*

Os inóculos para estes cultivos foram obtidos da seguinte maneira. A partir do estoque em tubo conservado a -80 °C, as linhagens foram estriadas, usando a técnica da semeadura por esgotamento, em placa de Petri contendo meio YPD sólido. As placas foram então incubadas em estufa a 30 °C. Após 48 h, com o auxílio de uma alça estéril, células de uma colônia isolada foram transferidas para um frasco Erlenmeyer de 1000 mL com deflectores, para aumentar a transferência de oxigênio, contendo 200 mL dos meios de cultura: complexo YPD, sintético de acordo com Verduyn (1992) e sintético de acordo com Luttk (2000). Estes dois últimos são idênticos, a exceção da fonte de nitrogênio, que é amônio no meio Verduyn e a ureia no meio Luttk. Independentemente do meio utilizado, empregou-se a mesma quantidade inicial da fonte de carbono e energia, 20 g/l de glicose, tabela 4. Os frascos foram incubados a 30 °C e 200 rpm. Para a linhagem PE-2, o cultivo foi realizado apenas em meio complexo YPD.

Tabela 4 – Composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho

	Complexo	Sintéticos	
	YPD ¹	Verduyn ²	Luttk ³
Extrato de levedura	10 g/L		
Peptona	20 g/L		
Glicose	20 g/L	20 g/L	20 g/L
Fosfato de potássio monobásico		3 g/L	3g/L
Sulfato de potássio			6,6g/L
Sulfato de amônio		5 g/L	
Ureia			2,3 g/L
Sulfato de magnésio tetrahidratado		0,87 mg/L	0,87 mg/L
Sulfato de magnésio heptahidratado		0,5 g/L	0,5 g/L
Cloreto de cálcio dihidratado		4,5 mg/L	4,5 mg/L
Biotina		0,05 mg/L	0,05 mg/L
Panteonato de cálcio (Vit. B5)		1 mg/L	1 mg/L
Inositol		25 mg/L	25 mg/L
Niacina (Vit. B3)		1 mg/L	1mg/L
Ácido p-aminobenzóico		0,2 mg/L	0,2 mg/L
Piridoxina (Vit. B6)		1 mg/L	1 mg/L
Tiamina		1 mg/L	1 mg/L

Ácido bórico	1 mg/L	1 mg/L
Iodeto de potássio	0,1 mg/L	0,1 mg/L
Cloreto férrico hexahidratado	2,9 mg/L	2, 9 mg/L
Molibdato de sódio	0,87 mg/L	0,87 mg/L
Cloreto de cobalto (II)	0,3 mg/L	0,3 mg/L
EDTA	15 mg/L	15 mg/L
Sulfato de zinco heptahidratado	4,5 mg/L	4,5 mg/L

¹(DELLA-BIANCA, B. E. et al 2014); ²Verduyn (1992); ³Luttik (2000)

Amostras foram retiradas a cada 2 h durante 48 h de cultivo. As seguintes determinações analíticas foram realizadas após cada amostragem: pH, em pH-metro de bancada (AJX-512, Micronal SSA, Brasil); absorbância por espectrofotometria, a 600 nm (Genesys 20, Thermo Scientific, Waltham, EUA); quantificação de glicose de maneira qualitativa com o uso de fitas marcadoras, marca roche e modelo diabur-test 5000, e distribuição do tamanho das partículas de levedura, em equipamento Multi-Angle Static Light-Scattering Mastersizer (Malvern Instruments, Malvern, UK).

4.1.3 Elaboração das emulsões com *S. cerevisiae*: linhagem de panificação cultivada em meio complexo e sintético e linhagem PE-2 cultivada em meio complexo

A linhagem de panificação foi repicada do tubo criogênico para placas de Petri com meio YPD solidificado (meio YPD acrescido de ágar, 20 g/L), com o auxílio de uma alça de platina. O preparo do inóculo foi realizado retirando-se uma colônia do meio sólido e transferindo para o meio de cultivo complexo YPD, sintético descrito por Verduyn (1992), contendo glicose a 2% (w/v) e sintético descrito por Luttik (2000), contendo glicose a 2% (w/v). Em seguida, os inóculos foram levados a um incubador rotativo em frascos de 1 L com deflectores, para aumentar a transferência de oxigênio, contendo 300 mL dos meios de cultura, a 200 rpm e 30 °C até que fosse atingida a fase estacionária pré-diáuxica e pós-diáuxica em meio complexo e pré-diáuxica em meios sintéticos. A massa celular gerada foi centrifugada e ressuspenso em H₂O destilada estéril. Da mesma maneira procedeu-se com a linhagem PE-2, sendo que esta foi cultivada apenas em meio complexo. Para realizar o processo de liofilização, o equipamento utilizado foi um liofilizador de bancada (marca terroni, São Carlos/SP, Brasil), a massa celular foi previamente congelada. Em seguida, as amostras foram dispostas no interior da câmara de secagem do liofilizador, o ciclo de operação do equipamento foi por um período de 24 h.

As emulsões foram preparadas da mesma maneira descrita no item 4.1.1, com 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de levedura, após o cultivo, na concentração de 10% (m/m), empregando agitação mecânica a 900 rpm durante 30 min, em triplicata.

4.1.4 Elaboração das emulsões com os extratos celulares de *S. cerevisiae*: linhagens de Panificação e PE-2 cultivadas em meio complexo.

Após inoculação e crescimento, conforme descritos anteriormente, células da linhagem de panificação e PE-2 alcançaram a fase estacionária pós-diáuxica em meio complexo; a biomassa obtida foi centrifugada, lavada e ressuspensa com água destilada estéril. As suspensões de levedura passaram por um processo de rompimento celular por cisalhamento com pérolas de vidro (3,3 mm de diâmetro) e agitação em agitador tipo vórtex (5 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de repouso a 0°C entre dois ciclos consecutivos) (BELLAYER et al., 2004).

Em seguida, as emulsões foram preparadas da mesma maneira descrita no item 4.1.2, com 70% (v/v) de suspensão aquosa do extrato celular da *Saccharomyces cerevisiae*, em triplicata.

4.1.5 Elaboração das emulsões com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*.

Após inoculação e crescimento, conforme descritos anteriormente, células da linhagem de panificação e PE-2 alcançaram a fase estacionária pós-diáuxica em meio complexo, a biomassa obtida foi centrifugada, lavada e ressuspensa com água destilada estéril. Da mesma maneira, após as células de *Lactobacillus fermentum* alcançarem a fase estacionária em meio complexo (YPD), a biomassa obtida foi centrifugada, lavada e ressuspensa com água destilada estéril.

As emulsões foram preparadas com 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de *Saccharomyces cerevisiae*, linhagens de panificação ou PE-2 e *Lactobacillus fermentum*, na concentração de 5 % de levedura e 5 % de bactéria (m/m).

4.1.6 Ensaio de crescimento em placa com diluições seriadas.

O método aplicado nessa etapa foi adaptado do protocolo utilizado por Della-Bianca e Gombert (2013) e Lockshon e colaboradores (2007).

Primeiramente, realizou-se a preparação de um pré-inóculo: as linhagens Panificação, PE-2 e CEN.PK113-7D (controle positivo para crescimento em oleato), foram

repicadas dos tubos criogênicos para placas de Petri com meio YPD solidificado, com auxílio de uma alça de platina. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas; então, uma colônia isolada de cada linhagem foi escolhida para preparação de pré-inóculo em um tubo Falcon de 50 ml contendo 10 ml de meio YPD que era incubado em *skaker* rotativo a 30 °C e 200 rpm por um período de 8 a 12 h (*overnight*).

A partir do pré-inóculo feito em meio YPD, foram realizados cultivos com absorbância inicial de 0,2 em 100 mL do mesmo meio, por 3 horas a 30 °C e 200 rpm. Após esse tempo, suficiente para que fosse atingida a fase exponencial de crescimento, as células foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos, lavadas e ressuspensas em água destilada estéril, a fim de se obter 1 mL de uma suspensão celular com absorbância de 0,1.

A partir dessa suspensão, 4 diluições sucessivas (10^{-1}) foram realizadas em água destilada estéril, obtendo-se concentrações celulares de aproximadamente 5×10^3 células/5 μ L até 1 célula/5 μ L, conforme a relação de Birren et al. (1999), em que uma absorbância igual a 1 equivale a aproximadamente 1×10^7 células/mL.

O plaqueamento foi realizado em uma placa controle com meio sólido (YNB 0,17%, sulfato de amônio 0,5%, extrato de levedura 0,1%, 0,2 ml de oleato, 5 ml de tween 80 20%, ágar 2,4%, hidróxido de potássio para ajuste de pH para 6). No outro meio sólido utilizado, o oleato foi substituído pelo hexadecano na mesma proporção. Cada *spot* recebeu um volume de 5 μ L. As placas foram incubadas a 30 °C. A cada 24 h, foram tiradas fotografias das placas abertas contra fundo escuro em câmara de fluxo laminar para inspeção visual e avaliação quanto ao crescimento celular.

A figura 10 mostra as análises realizadas em cada fase da emulsão depois de 24 h de repouso e as análises realizadas nas suspensões de levedura antes do processo de emulsificação.

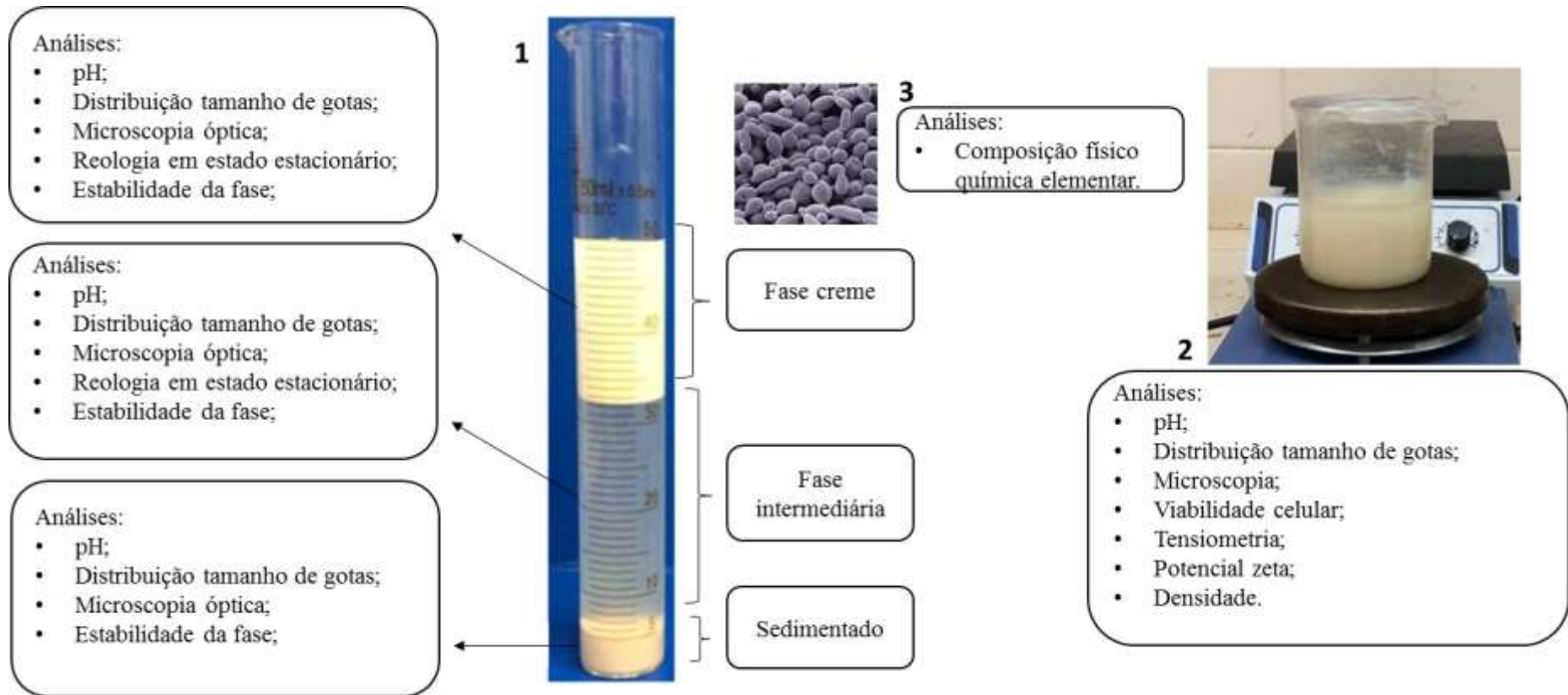


Figura 10. Análises realizadas em cada fase da emulsão depois de 24 h de repouso (1); análises realizadas nas suspensões de levedura 10% (massa de levedura úmida/massa final de suspensão) antes do processo de emulsificação (2); análises realizadas nas leveduras (3).

4.2 Estabilidade das fases à cremeação

As emulsões obtidas foram transferidas do agitador mecânico para provetas graduadas (50 ml com 21 mm de diâmetro) e armazenadas a 25 °C por 24 h, sendo o volume de cada fase determinado, de acordo com Furtado (2014). O percentual de cada fase (PF) foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$PF\% = 100 * \frac{H}{H_0} \quad (1)$$

Onde:

H representa a altura das fases (superior, intermediária e inferior) após 24 h, [ml];
H₀ representa a altura inicial do sistema trifásico, [ml].

4.3 Caracterização físico-química das leveduras

A concentração de proteínas nas células de levedura foi determinada pelo método Kjeldahl multiplicando com fator de correção proteína-nitrogênio de 5,5 (GERALD; TILAK, 1991). A umidade das células de levedura foi determinada gravimetricamente a 105 °C (AOAC, 1992), o teor de óleo das células de levedura pelo método Bligh & Dyer (BLIGH; DYER, 1959) e o percentual de matéria seca foi obtido por diferença, a partir do teor de umidade. A densidade da suspensão das células de levedura foi medida utilizando um densímetro DMA 4500 (Anton Paar, Áustria) à temperatura ambiente.

4.4 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular, determinada sempre antes do preparo das emulsões, foi medida através do método da coloração das células mortas pelo corante eritrosina através da contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico, o percentual de células viáveis foi calculado de acordo com a Equação 3 (CHERUBIN, 2003).

$$Células\ viáveis\ \% = 100 * \frac{C_v}{C_t} \quad (2)$$

Onde:

C_v representa a quantidade de células vivas, que não foram coradas pelo corante;
C_t representa a quantidade total de células, coradas e não coradas.

4.5 Distribuição do tamanho de partículas

Com o objetivo de avaliar a estabilidade das emulsões, a distribuição do tamanho das gotas de óleo foi determinada utilizando o Multi-Angle Static Light-Scattering Mastersizer, a 25 °C, que se baseia no espalhamento da luz, indicando o percentual de luz transmitida através da amostra (FURTADO, 2014).

4.6 Microscopia óptica

A análise de microscopia das emulsões foi realizada em microscópio Carl Zeiss Axio Scope A1. As amostras foram analisadas com lentes objetivas com aumento total de 1000 e 4000 vezes. As imagens obtidas foram analisadas no software Image J 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (FURTADO, 2014).

4.7 Densidade de carga superficial

A suspensão de leveduras foi diluída para uma concentração de 0,01% m/v em água Mili-Q, para a determinação da carga elétrica superficial (potencial ζ) utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) com intensidade do campo elétrico de 150 V. A carga superficial das partículas foi determinada através da medição da mobilidade eletroforética das partículas submetida a um campo elétrico (HUNTER, 2001).

4.8 Reologia em estado estacionário

Para a caracterização do comportamento reológico das emulsões foi utilizado o reômetro Physica MCR 301. Os experimentos foram realizados a 25°C. Para a determinação das curvas de escoamento das emulsões foi utilizada a geometria de cone placa para a fase creme (FURTADO, 2014).

Os dados de viscosidade em função da taxa de deformação foram obtidos mediante a realização de curvas de escoamento num intervalo de taxa de deformação entre 0 e 300 s, em três rampas com ciclo crescente, decrescente e crescente, para a eliminação de tixotropia e para o sistema alcançar o estado de regime estacionário (FURTADO, 2014).

4.9 Tensiometria

A princípio, para realizar o ensaio de tensiometria foram necessários os valores de densidade da fase oleosa (hexadecano) e da fase aquosa (suspensão de levedura). A densidade do hexadecano foi obtida por informação contida no rótulo do reagente e a densidade da suspensão de levedura foi obtida utilizando o picnômetro, de acordo com (FURTADO, 2014).

O tensiometro Tracker-S foi utilizado para a avaliação da tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa, pelo método da gota pendente, com a formação de uma gota da fase aquosa na fase oleosa. Os ensaios foram realizados a 25 °C, sendo o método baseado na deformação do perfil da gota em função da tensão interfacial entre as fases, o que é importante para a determinação das propriedades mecânicas da interface da emulsão (RAVERA; LOGLIO; KOVALCHUK, 2010).

4.10 Tratamento de dados e análise estatística

A estabilidade das emulsões foi avaliada por um conjunto de critérios, conforme detalhado na Tabela 5 e metodologias analíticas descritas acima.

Tabela 5. Critérios utilizados para avaliar a estabilidade das emulsões

Critérios	Análise	Resposta
1°	Estabilidade das fases	Constatação visual do volume das fases separadas após um determinado período de tempo (Mikula, 1992).
2°	Distribuição do tamanho de partícula	Um aumento no tamanho das gotas promove a coalescência das mesmas, causando a desestabilização da emulsão em menor intervalo de tempo (Gutierrez et al 2008)
3°	Comportamento reológico	O aumento na viscosidade pode contribuir para a redução da coalescência (McClements, 2005)
4°	Tensiometria	A presença de um componente com atividade de superfície reduz a tensão interfacial, pois estes compostos podem minimizar os contatos termodinamicamente desfavoráveis entre os diferentes tipos de moléculas na interface da emulsão (McClements, 2005)
5°	Potencial zeta	Uma medida da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade da emulsão. É possível saber se ocorre dispersão, agregação ou floculação.

Os dados obtidos foram analisados através do teste de Tukey para determinação da diferença entre as médias das triplicatas reais. Variáveis com nível de confiança superior a 95% ($p < 0,05$) foram consideradas estatisticamente significativas. O software STATISTIC 7.0 (StatSoft Inc, 2006, Tulsa, OK) foi utilizado.

Abaixo é apresentada a tabela 6, com a sequência de experimentos realizados durante este projeto de mestrado.

Tabela 6. Resumo dos experimentos realizados neste projeto de mestrado

Experimentos	Descrição	Objetivo
Geração dos estoques para as linhagens	Cultivos a 30°C em meio de cultivo complexo YPD até que seja atingida a fase estacionária. Em seguida, adição de glicerol 30%. Aliquotas de 1 mL foram armazenadas – 80°C	Utilizar nos experimentos posteriores em emulsões
Emulsões modelo - baseado em Furtado (2014) e Moreira (2015)	As emulsões foram preparadas com 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , adquirida em comércio local (Itaiquara), na concentração de 10% (m/m) na fase aquosa.	Avaliar o efeito de quatro condições da levedura na estabilidade das emulsões: levedura fresca, levedura fresca liofilizada, levedura fresca lavada e água de lavagem
Cinéticas de crescimento: linhagem Panificação - meio complexo e em meios sintéticos	A partir do estoque da linhagem de levedura de panificação (Itaiquara, Brasil), foram realizados cultivos em meio complexo YPD, meio totalmente definido descrito por Verduyn (1992) e meio totalmente definido descrito por Luttk (2000). O crescimento celular foi acompanhado indiretamente, através de medidas de absorbância (600 nm) ao longo do tempo e a medida do pH também foi realizada.	Descobrir em quanto tempo as células chegam na fase estacionária, para utilizar posteriormente nas emulsões.
Emulsões com a linhagem de Panificação cultivada em meio complexo e sintético	As emulsões foram preparadas com 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , linhagem de panificação, retiradas no	Avaliar o efeito de cinco condições da levedura na estabilidade das emulsões: cultivada em meio YPD, cultivada em

	momento em que a fase estacionária foi alcançada, na concentração de 10% (m/m).	meio YPD e liofilizada, cultivada em meio Verduyn, cultivada em meio Verduyn e liofilizada e cultivada em meio Luttik.
Emulsões com a linhagem de Panificação cultivada em meio complexo e lavadas	Idem ao item acima	Avaliar se o meio de cultura (YPD) contribui para a estabilidade das emulsões
Cinéticas de crescimento: linhagem Panificação e PE-2 - meio complexo (YPD)	A partir do estoque da linhagem de levedura de panificação e PE-2, foram realizados cultivos em meio complexo YPD. O crescimento celular foi acompanhado indiretamente, através de medidas de absorbância (600 nm) ao longo do tempo, medida do pH e a concentração de glicose através de fitas de medida de glicose	Descobrir em quanto tempo as células chegam em fase estacionária pré-diáuxica e em fase estacionária pós-diáuxica, para ambas as linhagens, para utilizar posteriormente em emulsões
Emulsões com a linhagem de Panificação e PE-2 cultivadas em meio complexo (YPD) e lavadas	As emulsões foram preparadas com 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , linhagens de panificação e PE-2, retiradas no momento em que se alcançou a fase estacionária pré-diáuxica e pós-diáuxica, na concentração de 10% (m/m).	Avaliar a influência do estado fisiológico das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> na estabilidade das emulsões
Emulsões com os extratos celulares das linhagens de panificação e PE-2 cultivadas em meio complexo (YPD) e lavadas	As emulsões foram preparadas com 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa do extrato celular da <i>Saccharomyces</i>	Verificar o efeito do rompimento da parede celular e membrana, sem

	<i>cerevisiae</i> , linhagens de panificação e PE-2, retiradas no momento em que se alcançou pós-diáuxica, na concentração de 10% (m/m).	o uso de centrifugação do extrato celular, na estabilidade das emulsões.
Emulsões com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i>	As emulsões foram preparadas com 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i> , linhagens de panificação e PE-2, retiradas no momento em que se alcançou a fase estacionária pré-diáuxica e pós-diáuxica, na concentração de 5% de levedura + 5% de bactéria (m/m).	Verificar a influência do contaminante <i>Lactobacillus fermentum</i> na estabilidade de emulsões para produção de farneseno.
Ensaio de crescimento em placa com diluições seriadas	O método aplicado nessa etapa teve como base o protocolo utilizado por Della-Bianca e Gombert (2013) e Lockshon e colaboradores (2007).	Avaliar de forma qualitativa, quais os efeitos observáveis no desenvolvimento das colônias formadas quando diferentes fontes de carbono eram adicionados no meio de cultivo (oleato e hexadecano).
















5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reprodutibilidade das emulsões geradas com *S. cerevisiae*

As emulsões preparadas, de acordo com Furtado (2014) e Moreira (2015), com as suspensões aquosas de levedura (10% m/m) (levedura fresca, levedura fresca lavada, água da lavagem da levedura, levedura fresca liofilizada), com hexadecano, após 24 h de repouso, formaram um sistema trifásico: superior (creme) emulsão óleo em água, intermediária leveduras e gotas de óleo em suspensão aquosa e inferior (sedimentado de leveduras).

Na figura 11 são apresentados os aspectos das emulsões logo depois do preparo e após 1, 3 e 6 dias de armazenamento estático em temperatura ambiente. É possível notar, neste primeiro conjunto de experimentos, que compostos presentes na água de lavagem da levedura fresca, adquirida em supermercado, ajudam no processo de emulsificação, formando um sistema bifásico: superior (creme) emulsão óleo em água e intermediária partículas em suspensão. Após 3 dias de repouso, é possível visualizar o início da liberação da fase óleo da fase creme da emulsão preparada com a levedura fresca lavada, mas ainda não é possível visualizar a separação da fase óleo na emulsão com levedura fresca. É possível concluir que a lavagem das células de levedura ajudou na remoção de compostos que poderiam estar contribuindo para a formação de emulsões mais estáveis.

A levedura fresca apresentou a viabilidade celular de 99%, após o processo de liofilização a viabilidade da levedura fresca liofilizada foi de 17%, logo este procedimento promoveu a diminuição da viabilidade celular da levedura fresca utilizada para fazer emulsão, em 83%. Mesmo assim, ocorreu a formação de emulsão, podendo-se observar uma liberação maior do óleo da fase creme para esta condição, em relação às demais, após os 6 dias de repouso. Este resultado está de acordo com o reportado por Shank (1974), que afirma que isto é algo indesejável do ponto de vista industrial, pois mesmo células não viáveis (que podem representar boa parte da população microbiana ao final do processo) contribuem para manter a estabilidade da emulsão, dificultando a recuperação do óleo.

F.A T (dias)	Branco	Levedura Fresca	Levedura fresca lavada	Água da lavagem	Levedura fresca lioofilizada
0					
1					
3					

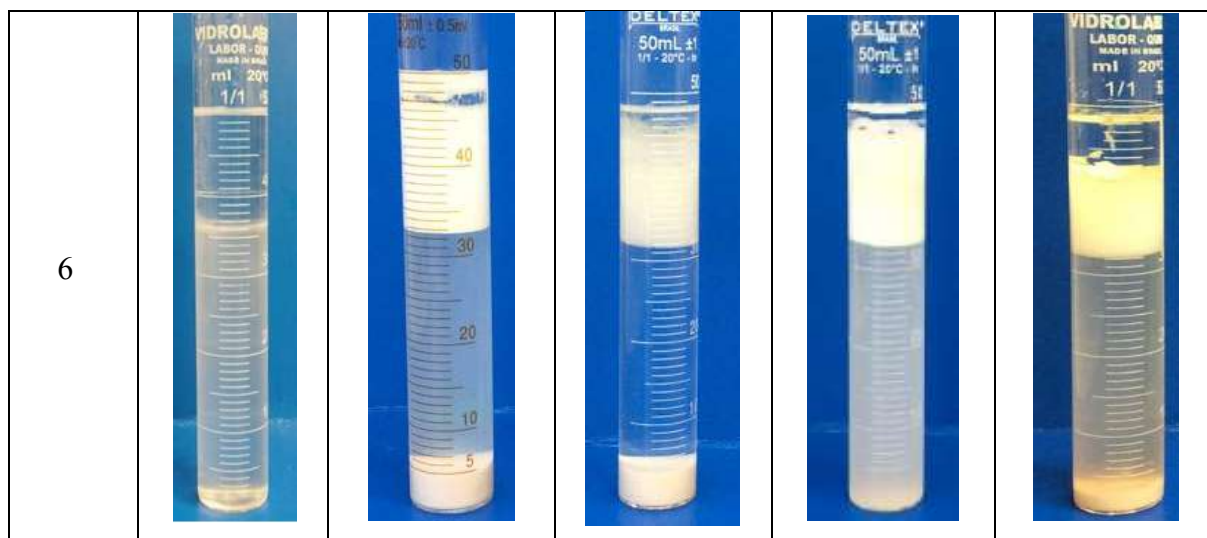


Figura 11. Aspecto visual de emulsões preparadas com hexadecano e levedura, em que são visíveis as 3 fases formadas: topo, intermediária e fundo. Branco (água e hexadecano), Levedura fresca (emulsão com levedura *S. cerevisiae* prensada fresca Itaquara), Levedura lavada (emulsão com levedura *S. cerevisiae* prensada fresca Itaquara, após lavagem com água destilada), Água de Lavagem (emulsão com água de lavagem da levedura), Levedura Liofilizada (emulsão com levedura *S. cerevisiae* Itaquara, após liofilização). São apresentadas imagens imediatamente após o preparo das emulsões e 1, 3 e 6 dias após o preparo, a temperatura ambiente. F.A Fase Aquosa, T: tempo.

As frações volumétricas das diferentes fases da emulsão permaneceram praticamente estáveis para as quatro condições propostas (levedura fresca, levedura fresca lavada, água da lavagem da levedura, levedura fresca liofilizada), dentro do período de tempo avaliado (Figura 12). Emulsões de 50 mL continham 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de levedura, na concentração de 10% (m/m). Para as quatro emulsões propostas, a fase creme (emulsão óleo em água) representou entre 33-35% do volume da proveta, a fase intermediária leveduras e gotas de óleo em suspensão aquosa representou entre 56 – 66% do volume da proveta e o sedimentado de leveduras representou entre 6 - 10% do volume da proveta, ao longo do período avaliado.

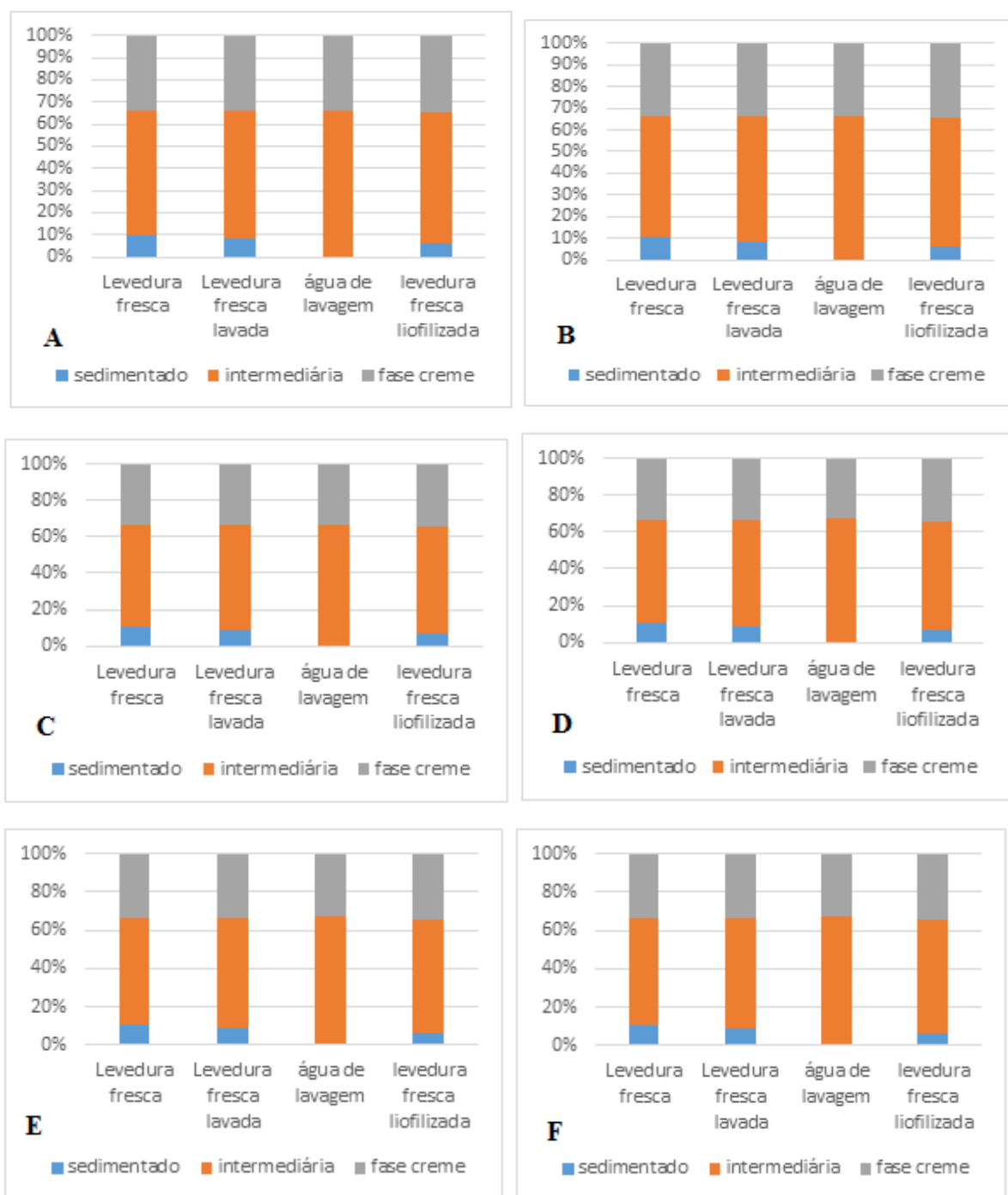


Figura 12. Fração volumétrica das fases superior (creme), intermediária e sedimentado das emulsões ao longo de seis dias de armazenamento. Primeiro dia (A), segunda dia (B), terceiro dia (C), quarto dia (D), quinto dia (E), sexto dia (F).

Aplicando-se a determinação do tamanho de partículas nas diferentes fases da emulsão, observou-se que, nas fases superior e intermediária, a distribuição do tamanho de partículas é bimodal, ou seja, há um grupo de partículas com diâmetro menor, em torno de 5 μm , correspondente às células de levedura e outro grupo de partículas com diâmetro maior, na faixa de 50 a 100 μm , correspondente às gotas de óleo (hexadecano) (Figuras 13, 14 e 15), conforme também observado por Furtado e colaboradores (2015).

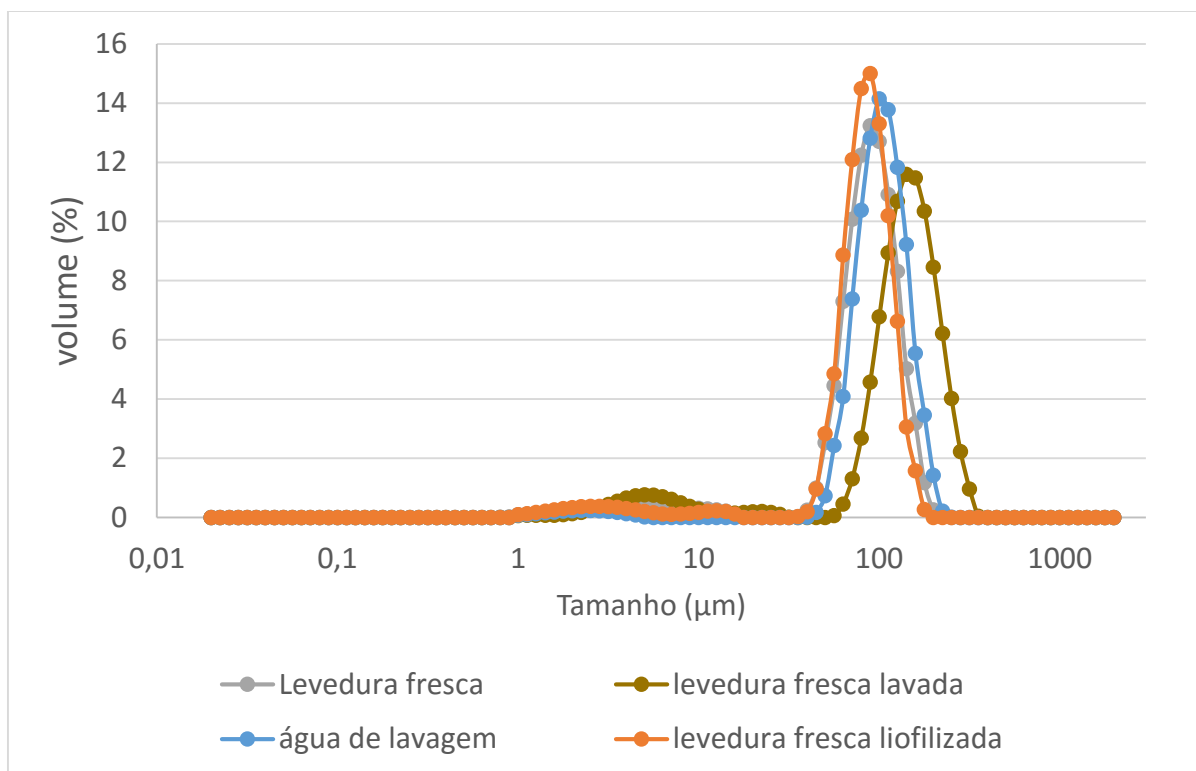


Figura 13. Distribuição do tamanho de partículas na fase superior (creme) das emulsões, preparadas com diferentes fases aquosas.

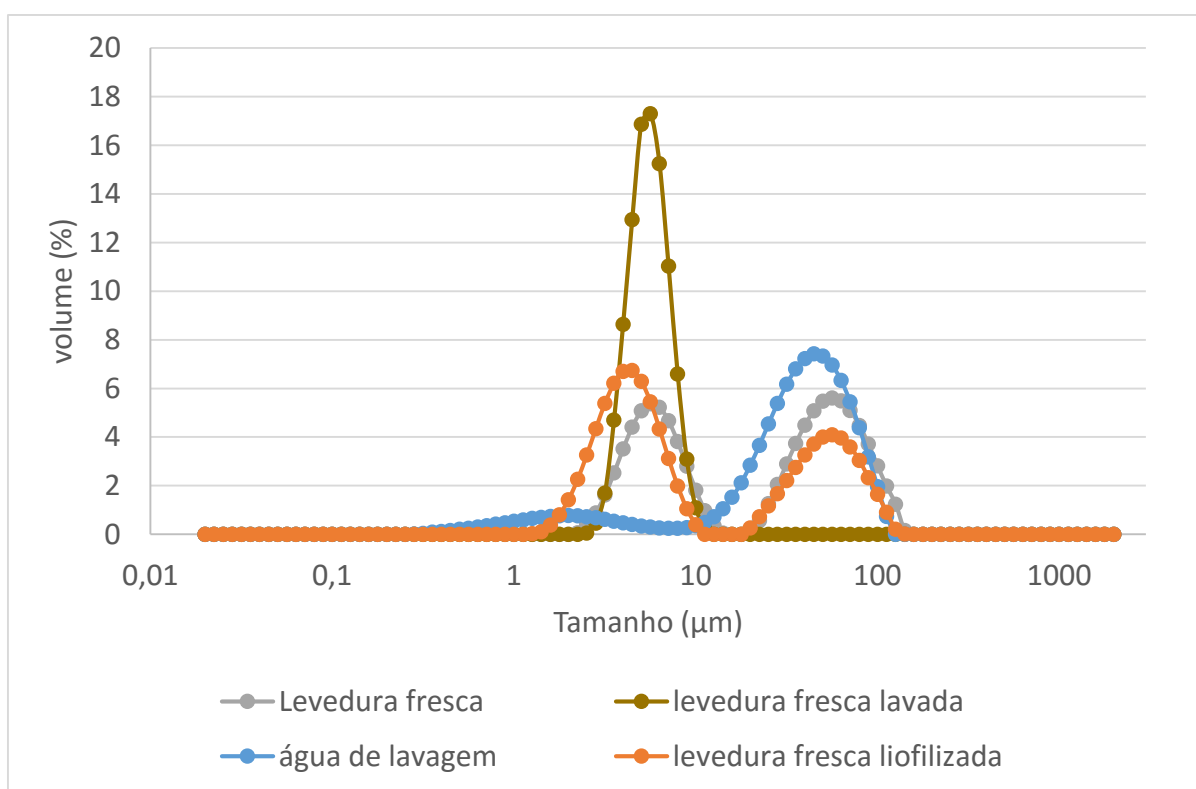


Figura 14. Distribuição do tamanho de partículas na fase intermediária das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

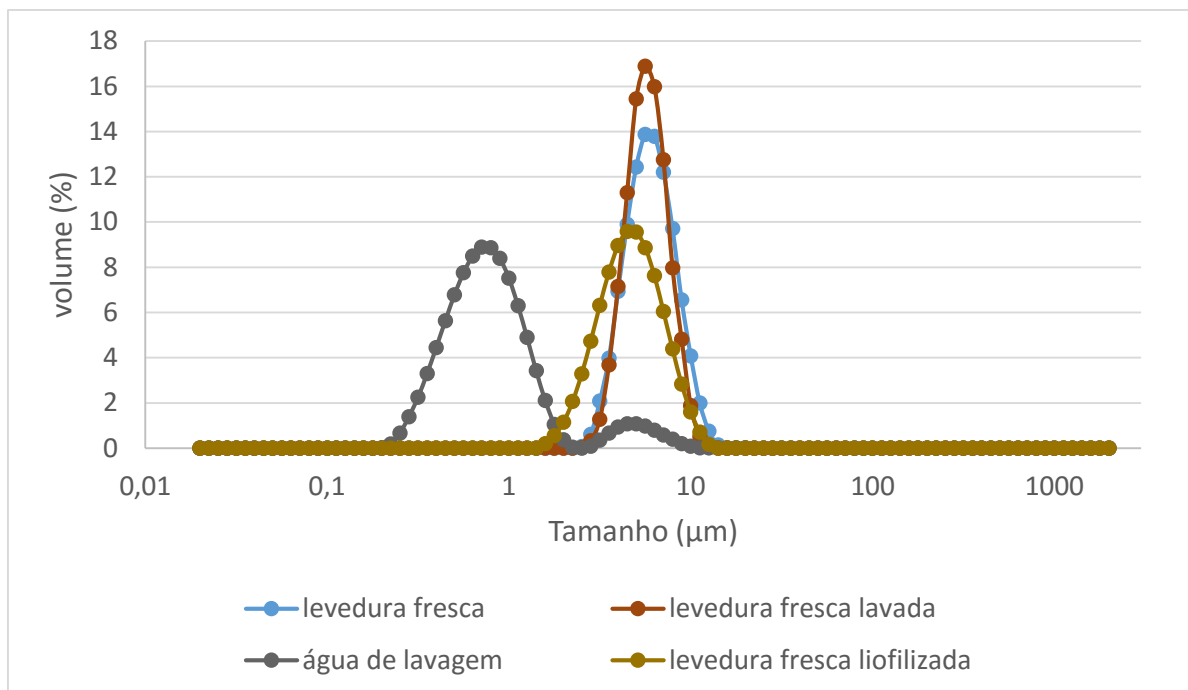


Figura 15. Distribuição do tamanho de partículas na fase sedimentada das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

A análise de distribuição de tamanho de partículas mostrou que menores tamanhos de gota foram obtidos na fase creme das emulsões preparadas com levedura fresca e fresca liofilizada, moda de 89,33 μm , ou seja, a levedura tem a capacidade de estabilizar a gota de óleo na emulsão independente de uma alta ou baixa viabilidade celular da levedura, tabela 7.

Tamanhos maiores de gotas foram obtidos na fase creme da emulsão preparada com a levedura lavada, moda de 141,59 μm . Um aumento no tamanho das gotas favorece a coalescência das mesmas, causando a liberação da fase óleo em um menor intervalo de tempo (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; MCCLEMENS, 2005). Não foi possível identificar quais compostos estavam presentes na água de lavagem, mas foi possível detectar que estes compostos apresentam um tamanho de aproximadamente 0,7 μm . Isso sugere que pode estar presente nesta água de lavagem partes da parede celular, manoproteínas, ou partículas presentes na matéria prima usada na produção industrial da levedura de panificação empregada, como por exemplo emulsificante a base de lecitina de soja ou melaço (Maria Angélica Nascimento, empresa Itaquara, Tapiratiba, São Paulo, informação pessoal obtida por e-mail em 20/08/2015).

Alguns estudos mostram que as manoproteínas presentes na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* podem atuar como bioemulsificantes, retardando a agregação das gotículas de óleo por coalescência. Barriga *et al.* (1999) separaram a parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* em duas partes, sendo uma majoritária em manoproteínas e outra em polissacarídeos, a fração rica em manoproteínas apresentou boa atividade emulsificante em

isooctano, e a fração de polissacarídeos não foi capaz de formar uma emulsão, pois os polissacarídeos ficaram solúveis em água, ocorrendo pouca interação com a fase óleo da emulsão. Foi observado também que a capacidade das manoproteínas para estabilizar uma emulsão era dependente da concentração das manoproteínas, pequenos aumentos na concentração poderiam causar um aumento da estabilidade das emulsões estudadas. Costa *et. al.* (2012) desenvolveram uma metodologia para a extração de manoproteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada na indústria cervejeira. O extrato rico em manoproteínas apresentou atividade emulsificante inferior quando comparado ao uso da lecitina de soja não purificada, porém valores próximos para estabilidade da emulsão quando comparado ao uso da lecitina de soja não purificada, de maneira geral as manoproteínas da parede celular apresentam boas propriedades emulsificantes.

Tabela 7. Distribuição de tamanho de partículas das diferentes fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras em diferentes condições.

Condição da		0,02 -20 μm		20 -2000 μm	
Fases	Levedura	% Volume*	Moda (μm)	% Volume*	Moda (μm)
Superior	Fresca	7,29	5,02	92,71	89,33
	Fresca lavada	8,66	5,02	91,34	141,59
	Água de lavagem	2,36	2,24	97,46	112,47
	Fresca liofilizada	5,63	2,82	94,37	89,33
Intermediária	Fresca	46,64	5,63	56,36	63,24
	Fresca lavada	100	5,63	0	0
	Água de lavagem	22,36	2	77,64	44,77
	Fresca liofilizada	60,62	4,47	39,38	56,36
Inferior	Fresca	100	5,63	0	0
	Fresca lavada	100	5,63	0	0
	Água de lavagem	92,96	0,7	7,04	5,02
	Fresca liofilizada	100	4,47	0	0

* Representa o percentual de volume em cada fase para as partículas de levedura e as gotas de óleo

Quando um campo elétrico é aplicado através de um eletrólito, as partículas carregadas suspensas no eletrólito são atraídas para o eletrodo de carga oposta. As forças viscosas que atuam sobre as partículas tendem a se contrapor a este movimento. Quando um equilíbrio é estabelecido entre estas duas forças opostas (atração e repulsão), as partículas movem-se com velocidade constante. Por sua vez, a velocidade da partícula é dependente da força do campo elétrico ou gradiente de voltagem, do potencial zeta, da constante dielétrica e da viscosidade do meio (SAVAJI; NIITSOO; COUZIS, 2014).

O potencial zeta é uma medida da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade da emulsão. Essa análise mostra como o emulsificante irá interagir quando estiver localizado na interface da emulsão. É possível saber se ocorrerá dispersão, agregação ou floculação. Na determinação da densidade de cargas quando um valor obtido é alto, as forças repulsivas predominam em relação às atrativas, indicando que as partículas se repeliram, ou seja, existe uma maior estabilidade da dispersão. Em casos de resultados com valores baixos, as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, representam instabilidade na dispersão, visto que as partículas se aproximaram umas das outras até se agregarem (FRANGE; GARCIA, 2009).

As densidades de carga das diferentes fases aquosas usadas no preparo das emulsões neste primeiro conjunto de experimentos estão apresentadas na Tabela 8. De acordo com Riddick (1968), valores de potencial zeta entre -41 e -60 mV indicam boa estabilidade das suspensões, valores entre -31 e -40 mV indicam estabilidade média, para uma faixa entre -16 e -30 mV é observada dispersão com baixa estabilidade e valores entre -10 e -15 mV apontam início de aglomeração. As suspensões de leveduras (fresca, fresca lavada, água da lavagem, fresca liofilizada) apresentaram estabilidade moderada, indicando que não apresentam comportamento para aglomeração ou precipitação instantânea (Tabela 8).

Tabela 8. Densidade de carga superficial em diferentes condições da levedura

	Potencial zeta (mV)	pH
Levedura fresca	-34,65±1,11 ^a	6,50±0,01 ^a
Levedura fresca lavada	-29,14±1,16 ^b	5,79±0,02 ^b
Água de lavagem	-37,74±2,13 ^a	5,63±0,02 ^c
Células frescas liofilizadas	-35,16±1,75 ^a	6,47±0,03 ^a

Letras iguais na mesma coluna significam que não há diferença significativa entre as medidas ($p < 0,05$).

Na Figura 16 estão descritas as cinéticas de tensão interfacial entre o hexadecano e as diferentes suspensões aquosas, e tensões interfaciais obtidas no equilíbrio. Todas foram

realizadas em uma hora e meia para o alcance do equilíbrio. A água Milli-Q foi utilizada como branco para as amostras. As maiores tensões finais, curvas mais acima no gráfico, foram das que tinham fase aquosa água da lavagem da levedura fresca, levedura fresca liofilizada, levedura fresca lavada e levedura fresca. É possível observar que as suspensões aquosas com as maiores tensões interfaciais foram as emulsões preparadas que mostraram maior instabilidade e separação de óleo da fase creme.

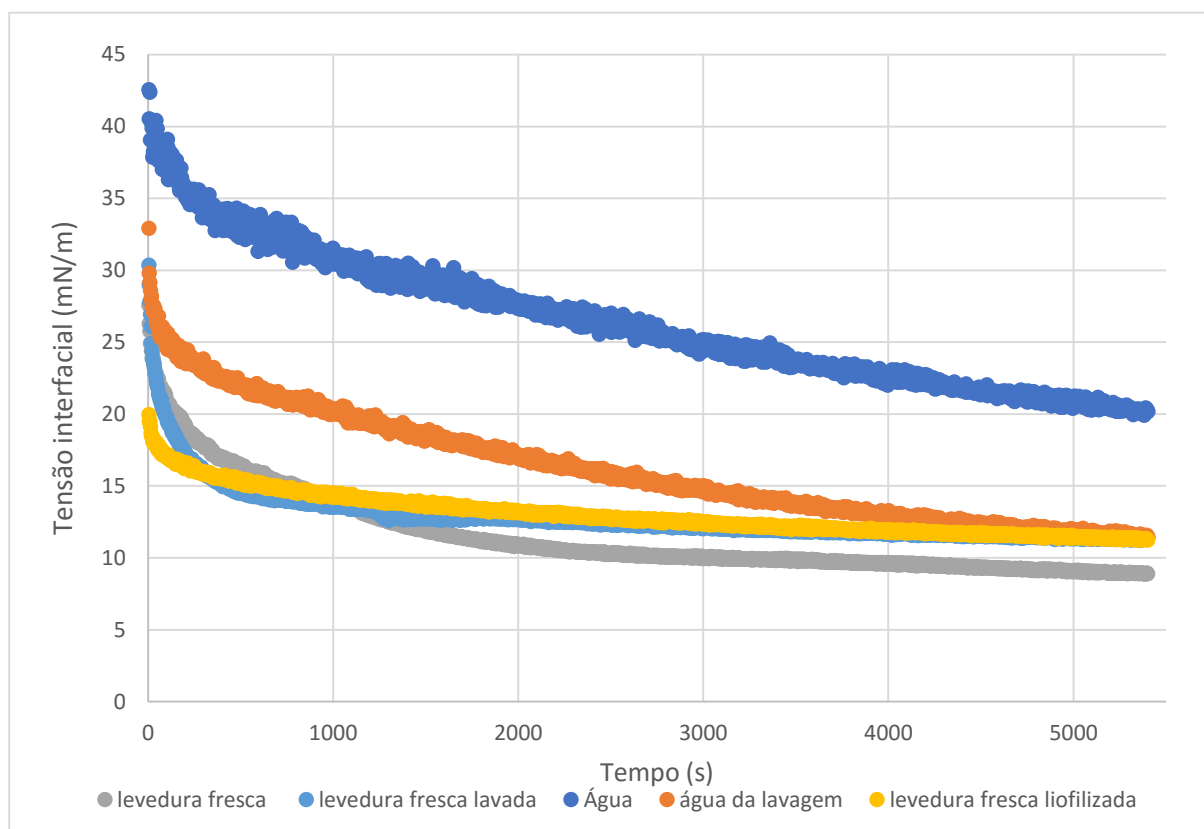


Figura 16. Cinética de tensão interfacial entre o hexadecano e diferentes suspensões aquosas

A presença de moléculas adsorvidas na superfície externa das gotas de óleo, tanto por meio da parede celular da levedura, como por material celular disperso no meio ou por substâncias dissolvidas, pode promover a redução da tensão interfacial e consequentemente a coalescência das gotas (MCCLEMENTS, 2008). A lavagem das células promoveu a remoção de compostos responsáveis pela redução de tensão, o que levou a maiores valores de tensões interfaciais atingidos no equilíbrio, em relação a levedura quando não foi lavada. Manoproteínas, polissacarídeos e outras moléculas presentes na água de lavagem das células contribuem com a atividade emulsificante e consequentemente favorecem uma maior queda da tensão interfacial (BARRIGA et al 1999; TORABIZADEH; SHOJAOSADATI; TEHRANI,

1996). Além disso, quanto maior a concentração de leveduras na fase aquosa, menor a tensão interfacial no equilíbrio (FURTADO et al 2015).

Na Figura 17 encontram-se apresentadas fotografias obtidas a partir de microscopias das fases separadas das emulsões preparadas com as quatro suspensões aquosas (levedura fresca, levedura fresca lavada, água da lavagem da levedura, levedura fresca liofilizada). As micrografias mostram que a interface da gota de óleo da fase superior (creme) está circundada por leveduras, impedindo a coalescência das gotas, esse fato também foi observado por Furtado e colaboradores (2015) e Moreira (2015). A presença de leveduras não foi um fator necessário para a formação de emulsões, pois foi possível preparar emulsões estáveis com a água de lavagem da levedura fresca, provavelmente em virtude da presença de material celular emulsificante, conforme discutido acima. Como pode ser observado pelas micrografias, as fases intermediárias são constituídas basicamente por água com algumas gotas de óleo dispersas e células de levedura em suspensão; e as fases inferiores, por células de levedura.

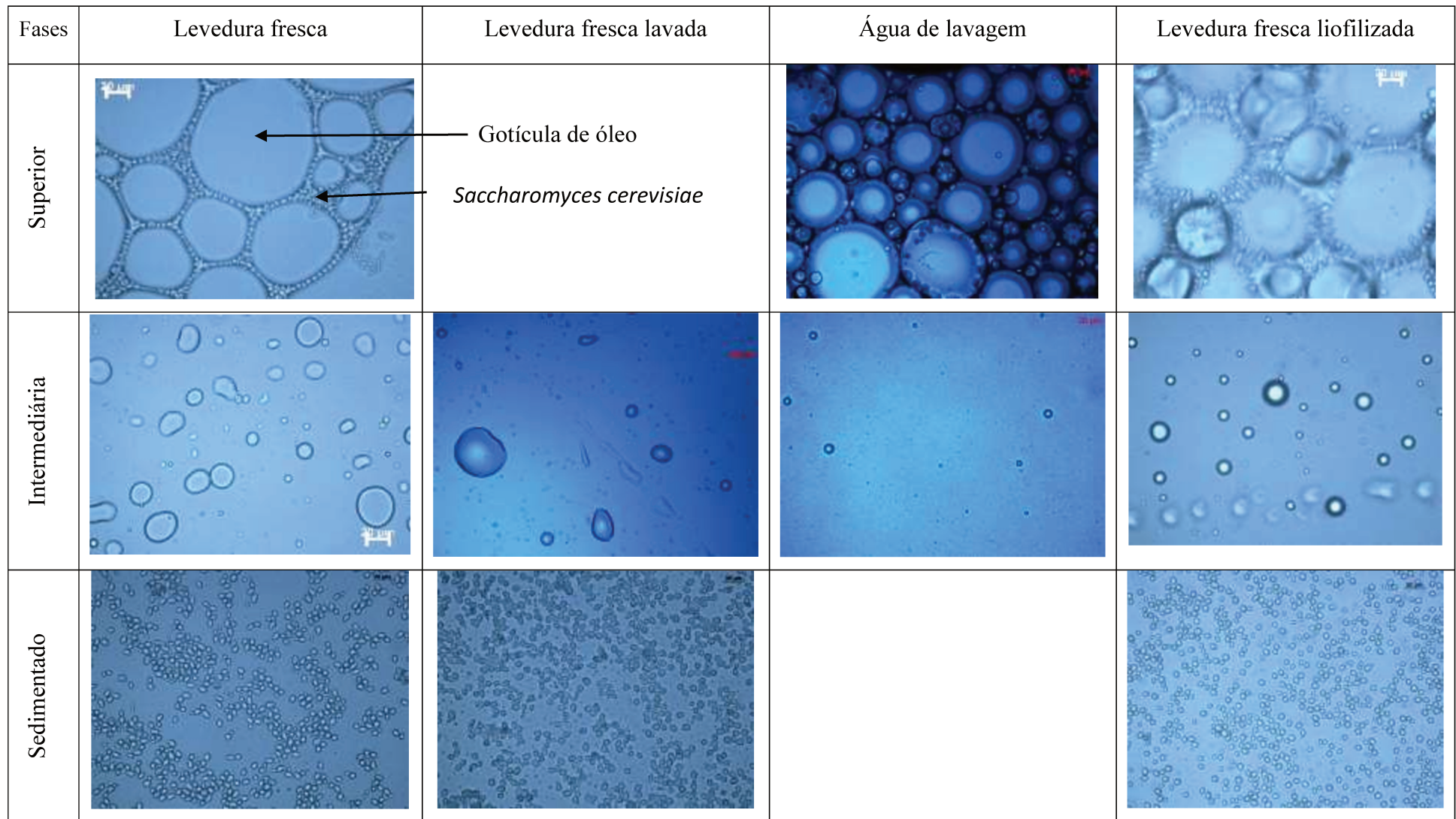


Figura 17. Micrografias das fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras. Aumento de 400 vezes

Foi possível concluir nesta primeira etapa de experimentos que compostos presentes na água de lavagem da levedura fresca, adquirida em supermercado, ajudam no processo de emulsificação. Com esta observação, a lavagem das células se tornou necessária antes do processo de emulsificação e o uso da levedura de tablete foi abandonado, para permitir uma melhor comparação entre as diferentes linhagens de levedura que se pretendia estudar, nos próximos experimentos. No anexo, as duplicatas das emulsões para cada situação proposta nesse item, como se pode observar, as emulsões foram reprodutíveis.

5.2 Cinética de crescimento de *S. cerevisiae* em frascos agitados

5.2.1 Cinética de crescimento da linhagem de panificação em meio totalmente definido

Conforme discutido acima, células de levedura fresca prensada adquirida em supermercado não são ideais para o estudo da estabilidade de emulsões industriais que ocorrem no contexto da produção de biocombustíveis. Isto ocorre principalmente porque a lavagem destas células demonstrou que substâncias emulsificantes são carregadas para a água de lavagem (item 5.1). Além disto, um dos objetivos deste trabalho era comparar o uso de diferentes linhagens de levedura no preparo e estabilidade de emulsões contendo óleo (hexadecano). Para isto, seria importante que todas as linhagens de levedura fossem preparadas da mesma forma, antes de sua utilização no preparo das emulsões. A forma com que isto seria feito em nosso laboratório segue os protocolos habituais de preservação e cultivo de leveduras, ou seja, estocagem em meio contendo glicerol a -80 °C e cultivo em frasco agitado.

Para se conhecer a cinética de crescimento da linhagem de panificação de *S. cerevisiae* (fermento biológico Itaquara, adquirido em supermercado local), foram realizados cultivos em frasco agitado, nos meios de cultivo definidos Verduyn (Verduyn et al, 1992) e Luttkik (Luttkik et al, 2000), sendo a glicose usada como fonte única de carbono e energia. Isto é importante para se saber em qual estado fisiológico as células se encontram, no momento do preparo das emulsões. É sabido que células microbianas em fase de crescimento exponencial são diferentes de células em fase estacionária, por exemplo em relação aos processos metabólicos serem mais lentos, maior quantidade de mitocôndrias e a parede celular se torna mais espessa e menos porosa (WERNER-WASHBURNE, M. et al., 1993; WERNER-WASHBURNE, MARGARET et al., 1996). Desta maneira, acreditamos que o estado fisiológico das células de levedura empregadas no preparo das emulsões possa também ter algum efeito sobre a estabilidade das mesmas e por isto consideramos importante determinar em que fase do crescimento as células seriam recolhidas, antes de serem usadas no preparo das emulsões.

O primeiro resultado de cinética de crescimento encontra-se apresentado na figura 18.

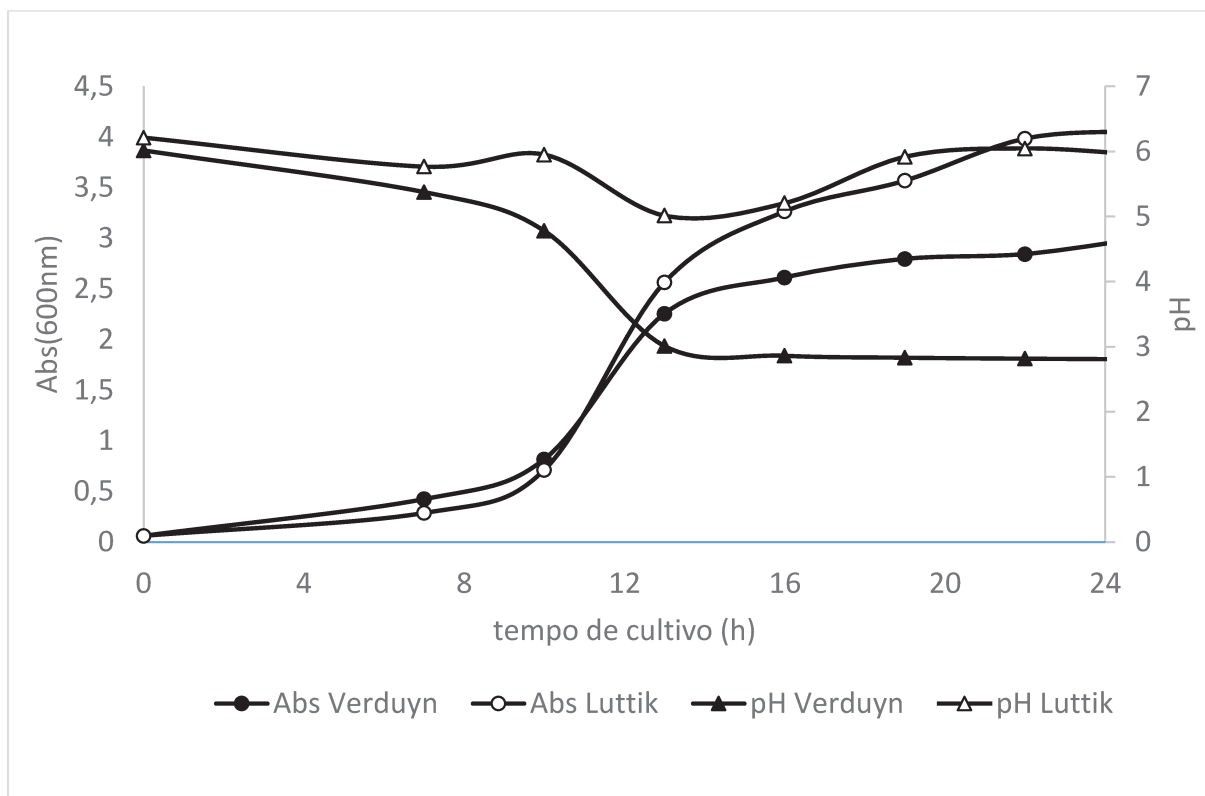


Figura 18. Cinética de crescimento da levedura *S. cerevisiae* de panificação em frasco agitado, em meio de cultivo definido. Absorbância a 600 nm e pH em função do tempo para cultivos realizados a 30°C, agitação de 200 rpm com fonte de carbono glicose (20 g/L iniciais). Cultivos foram realizados em duplicata. Uma das replicatas é apresentada nesta figura

Durante o cultivo da linhagem de panificação em meio Verduyn com glicose, foram observadas as seguintes fases de crescimento microbiano (Figura 14). Ocorreu uma fase de adaptação nas primeiras 7 horas de cultivo, seguido de uma fase de aceleração do crescimento entre 7 e 9 h de cultivo, posteriormente uma fase exponencial de entre 9 e 13 h de cultivo, e finalmente uma fase estacionária a partir de 16h de cultivo. Durante o cultivo da linhagem de panificação em meio Luttik com glicose, foram observadas as seguintes fases de crescimento microbiano, figura 14. Ocorreu uma fase de adaptação nas primeiras 7 horas de cultivo, seguido de uma fase de aceleração do crescimento entre 7 e 9 h de cultivo, posteriormente uma fase exponencial entre 9 e 15h de cultivo, e finalmente uma fase estacionária depois de 16h de cultivo.

A variação de pH no meio Luttik é menor que no meio Verduyn, pois neste último a fonte de nitrogênio é o amônio e um mol de prótons é liberado para o meio de cultivo por

cada mol de amônio consumido. No meio Luttik isto não ocorre, pois a fonte de nitrogênio é a uréia.

Em conclusão, empregando-se este protocolo de cultivo, para preparar emulsões com células em fase estacionária, as mesmas devem ser recolhidas entre 16 e 24 h de cultivo com o meio Verduyn e entre 18 e 24h com o meio Luttik. Neste protocolo de cultivo os experimentos foram interrompidos em 24 h por isso foi possível observar apenas uma fase estacionária.

5.2.2 Cinética de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* de panificação e PE-2 em meio complexo

Células microbianas cultivadas em meio de cultivo definido, em que apenas os nutrientes minimamente necessários ao crescimento microbiano são fornecidos, são diferentes das mesmas células, quando cultivadas em meio de cultivo complexo, que contém, além destes nutrientes minimamente necessários, outros compostos prontos, os quais as células podem incorporar diretamente do meio de cultivo, não sendo necessário sintetizá-los através do metabolismo, a partir de compostos mais simples, como a glicose, por exemplo. Entre outros aspectos, a composição e o *fitness* das células cultivadas nestes dois tipos de meio são diferentes (WEISS et al., 1975). Assim, um dos objetivos deste trabalho foi estudar o efeito do meio de cultivo (definido ou complexo) usado para crescimento das células de levedura, no preparo e estabilidade de emulsões contendo óleo (hexadecano).

Analogamente ao realizado com a linhagem de panificação (Itaquara) em meio definido, cultivou-se tanto esta mesma linhagem, como a *S. cerevisiae* PE-2, em meio de cultivo complexo YPD, que contém glicose como principal fonte de carbono e energia, além de extrato de levedura e peptona. Os resultados são apresentados na figura 19.

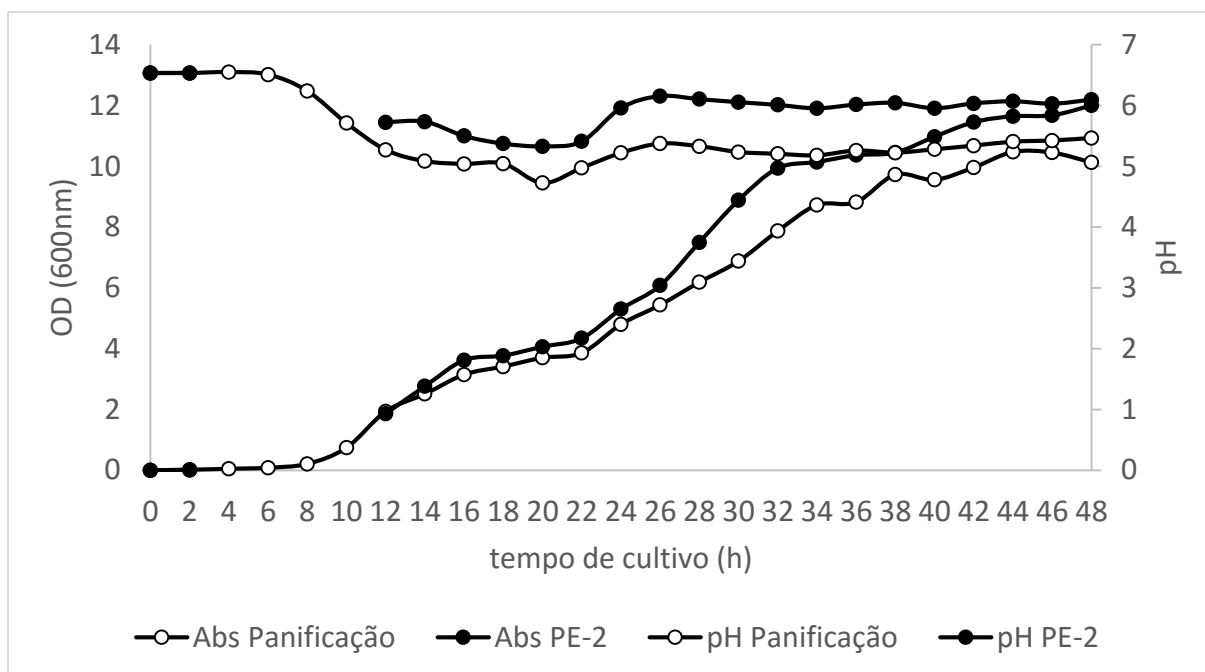


Figura 19. Cinética de crescimento da levedura *S. cerevisiae* de panificação e PE-2 em frasco agitado, em meio de cultivo complexo. Absorbância a 600 nm e pH em função do tempo para cultivos realizados a 30°C, agitação de 200 rpm com fonte de carbono glicose (20 g/L iniciais). Cultivos foram realizados em duplicata. Uma das replicatas é apresentada nesta figura

Em cultivos em batelada realizados em meio contendo glicose como fonte de carbono e energia, *Saccharomyces cerevisiae* pode passar por duas fases exponenciais de crescimento, o que é conhecido como crescimento diáuxico. Este fenômeno acontece quando a levedura pode consumir duas fontes de carbono em sequência, no caso: após a levedura consumir a glicose através do metabolismo fermentativo, formando etanol e dióxido de carbono, fase pré-diáuxica, ocorre o consumo de etanol pelas leveduras, através de metabolismo respiratório, sendo esta a fase pós-diáuxica (WALKER, 2000; WERNER-WASHBURN, MARGARET et al., 1996).

Durante o cultivo da linhagem de panificação, foram observadas as seguintes fases de crescimento microbiano (Figura 15). Ocorreu uma fase de adaptação nas primeiras 6 horas de cultivo, seguido de uma fase de aceleração do crescimento entre 6 e 8 h de cultivo, posteriormente uma fase exponencial entre 8 e 16 h de cultivo, seguido de uma primeira fase estacionária depois de 18 horas de cultivo com o fim da glicose, logo após um crescimento linear entre 22 e 32 h de cultivo com o consumo do etanol e finalmente após 38 horas de cultivo uma segunda fase estacionária. Durante o cultivo da linhagem PE-2, foram observadas as seguintes fases de crescimento microbiano, figura 15. Não foi possível ver por quanto tempo foi a fase de adaptação, fase de aceleração e qual foi o momento que começou a fase exponencial devido à perda de frascos durante a cinética de crescimento, mas foi possível

observar uma primeira fase estacionária depois de 18 h de cultivo com o fim da glicose, logo após um crescimento linear entre 22 e 34 h de cultivo com o consumo do etanol e finalmente após 40 horas de cultivo uma segunda fase estacionária.

Para ambos os cultivos, até o fim da primeira fase estacionária o pH encontrava-se entre 4,7-5,3. A partir do consumo do etanol, o pH do cultivo aumentou ligeiramente, no final do cultivo o pH ficou próximo a 6 para ambas as linhagens.

A biomassa no final do cultivo em meio YPD, 5,8 gramas de massa úmida após centrifugação foi maior do que as observadas nos cultivos com meios definidos, 3,4 gramas de massa úmida após centrifugação. Isso é muito provavelmente devido à presença de fontes nutricionais complexas, como o extrato de levedura e a peptona, que contém moléculas prontas para a levedura, e que, portanto, não precisam ser sintetizadas a partir da fonte de carbono e energia, como ocorre no caso dos meios definidos (KIM et al., 2000).

A tabela 9 mostra a evolução do crescimento do tamanho das células de levedura durante as cinéticas de crescimento. É possível observar que as células no estágio de pós-diáuxia apresentam um tamanho maior para ambas as linhagens, em relação à fase pré-diáuxica correspondente. Além disto, observa-se que as células da linhagem de panificação são aproximadamente 40% maiores que as células da linhagem PE-2

Tabela 9. Tamanho das células das linhagens durante o cultivo.

PE-2	Moda (µm)	Panificação	Moda (µm)
16h-28h	5,63	10h-38h	8,93
30h-48h	6,32	38h-48h	10,02

Em conclusão, empregando-se este protocolo de cultivo, para preparar emulsões com células da levedura de panificação em fase estacionária pré-diáuxica, as mesmas devem ser recolhidas entre 16 e 22 h de cultivo e em fase estacionária pós-diáuxica, as mesmas devem ser recolhidas entre 38 e 48 h de cultivo. Para preparar emulsões com células da levedura PE-2 em fase estacionária pré-diáuxica, as mesmas devem ser recolhidas entre 18 e 22 h de cultivo e em fase estacionária pós-diáuxica, as mesmas devem ser recolhidas entre 34 e 48 h de cultivo.

5.3 Influência do meio cultivo da levedura *S. cerevisiae* na formação e estabilidade das emulsões

A partir do conhecimento da cinética de crescimento das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* nos diferentes meios de cultivo, o inóculo da linhagem de panificação foi incubado em *shaker* em frascos de 1 L com defletores, para aumentar a transferência de oxigênio,

contendo 300 mL dos meios de cultura, a 200 rpm e 30 °C até que fosse atingida a fase estacionária pré-diáuxica, as mesmas foram recolhidas entre 16 e 24 h de cultivo com o meio Verduyn e entre 18 e 24 h com o meio Luttik. A massa celular gerada foi centrifugada e ressuspendida em H₂O destilada estéril.









As emulsões preparadas com as suspensões aquosas de levedura (10% m/m) (cultivada YPD, cultivada YPD lavada, água da lavagem do YPD, cultivada YPD liofilizada, cultivada Verduyn, cultivada Verduyn liofilizada, cultivada Luttik) com hexadecano, após 24 h de repouso, formaram um sistema trifásico: superior (creme) emulsão óleo em água, intermediária leveduras e gotas de óleo em suspensão aquosa e inferior (sedimentado de leveduras).

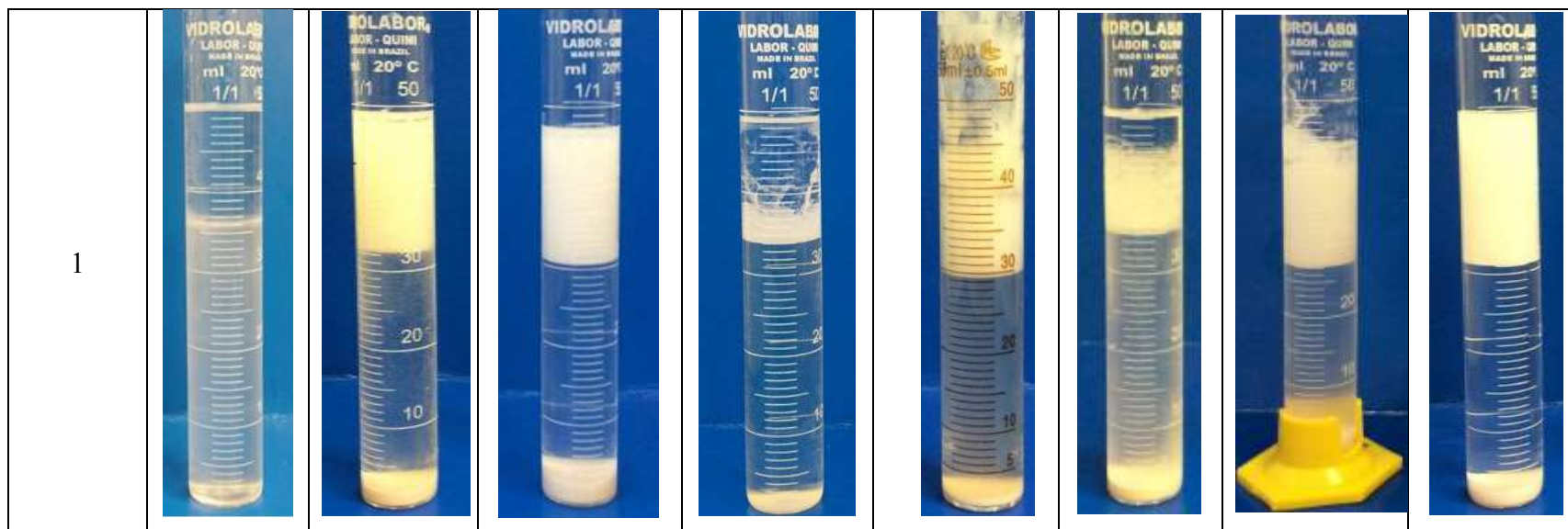
Na figura 20 são apresentados os aspectos das emulsões logo depois do preparo e após 1, 3 e 6 dias de armazenamento. É possível observar neste conjunto de experimentos que compostos presentes na água de lavagem das células cultivadas em meio YPD e centrifugadas para retirada do sobrenadante, também ajudam no processo de emulsificação, formando um sistema bifásico: superior (espuma) e intermediária. Logo depois do preparo, a emulsão com a linhagem de panificação cultivada em YPD e liofilizada, formou um sistema tetrafásico: espuma no topo da proveta, superior (creme) emulsão óleo em água, intermediária leveduras em suspensão e inferior (sedimentado de leveduras).

Após 1 dia de repouso, é possível visualizar o início da liberação do óleo da fase creme da emulsão preparada com a levedura cultivada com meio Verduyn. Após 3 dias de repouso, já é possível notar a liberação do óleo da fase creme em todas as emulsões. Após 6 dias de repouso, é possível visualizar que aconteceu a liberação do óleo quase completa da fase creme nas emulsões cultivadas com meio sintético, ficando apenas uma emulsão residual na interface entre o hexadecano e a água. A liberação do óleo da fase creme na emulsão com células cultivadas com meio complexo é menor quando comparado com células cultivadas com meio sintético, porém é possível notar mais uma vez que para as células cultivadas em meio complexo e lavadas ocorre uma maior liberação do óleo da fase creme quando comparado com a emulsão com células não lavadas.

As frações volumétricas para as sete condições propostas (cultivada YPD, cultivada YPD lavada, água da lavagem do YPD, cultivada YPD liofilizada, cultivada Verduyn, cultivada Verduyn liofilizada, cultivada Luttik) permaneceram praticamente estáveis dentro do período de tempo avaliado, figura 21. Emulsões de 50 mL continham 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de levedura, na concentração de 10% (m/m). Para as sete emulsões propostas, a fase creme representou entre 27-37% do volume da proveta, a fase intermediária

representou entre 57 – 70% do volume da proveta e o sedimentado representou entre 4 - 7% do volume da proveta ao longo do período avaliado para as sete emulsões.

FA T (dias)	Branco	Células cultivadas YPD	Cultivadas YPD lavada	Água lavagem YPD	Cultivada YPD liofilizada	Células cultivadas Verduyn	Cultivadas Verduyn liofilizada	Cultivadas Luttik
0								





















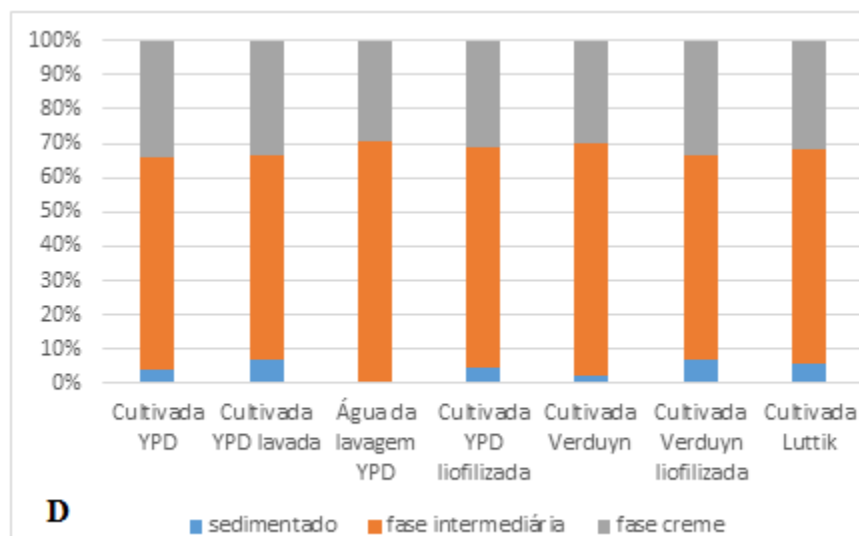
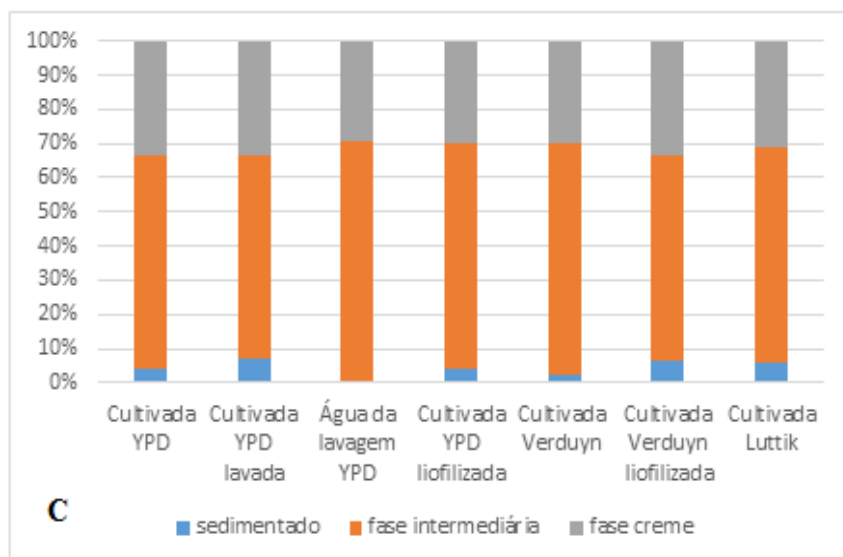
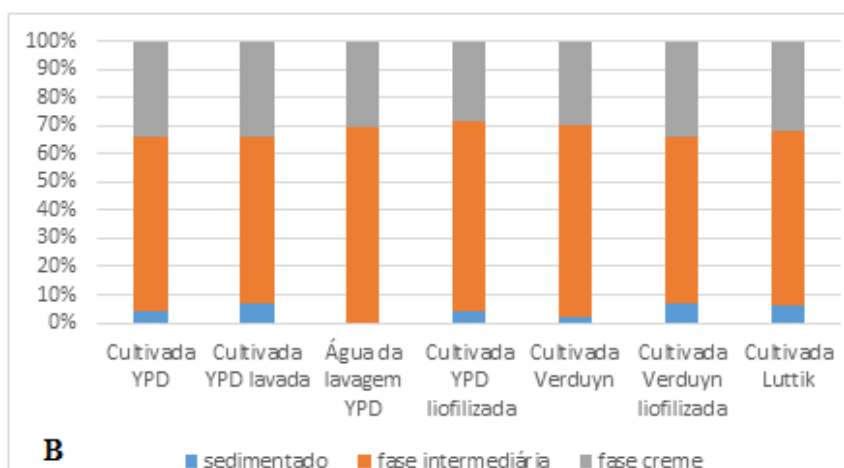
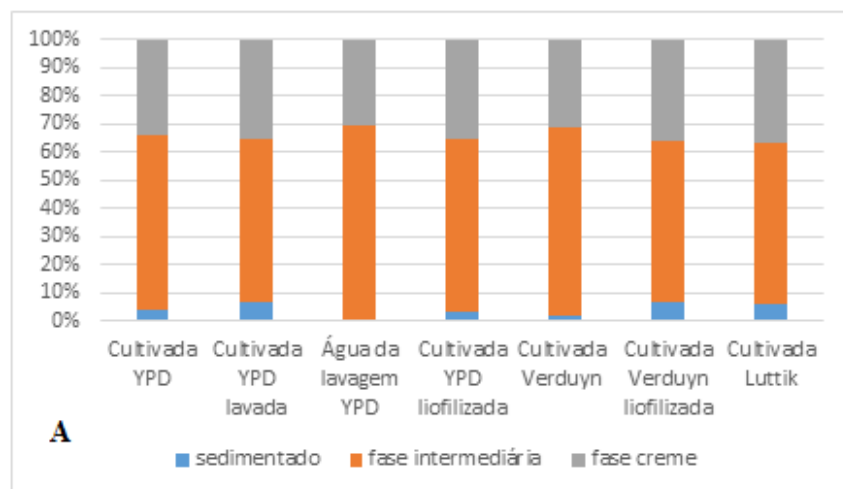
3									
6									

Figura 20. Aspecto visual de emulsões preparadas com hexadecano e levedura, em que são visíveis as 3 fases formadas: topo, intermediária e fundo. Branco (água e hexadecano), Células cultivas YPD (emulsão com levedura *S. cerevisiae* cultiva em meio complexo), Cultivas YPD lavadas (emulsão com levedura *S. cerevisiae* cultiva em meio complexo, após lavagem das células), Água lavagem YPD (emulsão com água de lavagem das células cultivadas em meio YPD e centrifugadas para retirada do sobrenadante), Cultivada YPD liofilizada (emulsão com levedura *S. cerevisiae* cultiva em meio complexo após liofilização), Células cultivas Verduyn (emulsão com levedura *S. cerevisiae* cultiva em meio sintético Verduyn), Cultivadas Verduyn liofilizada (emulsão com levedura *S. cerevisiae* cultiva em meio sintético Verduyn, após liofilização), Cultivadas Luttk (emulsão com levedura *S. cerevisiae* cultiva em meio sintético Luttk) São apresentadas imagens imediatamente após o preparo das emulsões e 1, 3 e 6 dias após o preparo, a temperatura ambiente. F.A Fase Aquosa, T: tempo



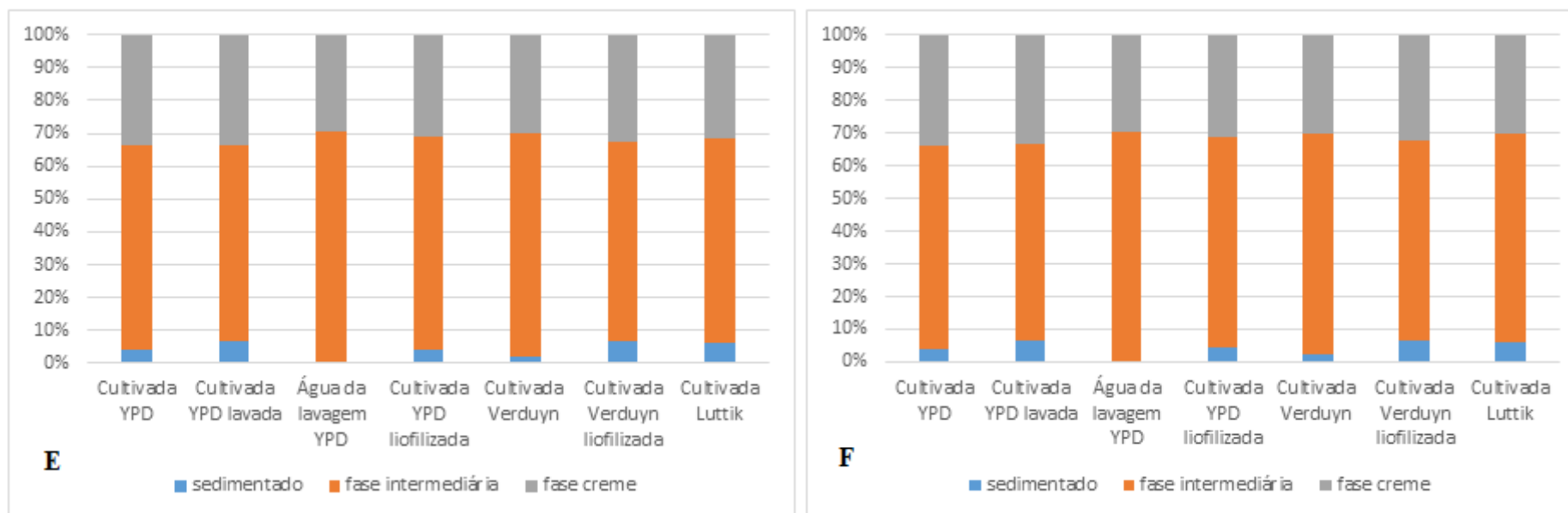


Figura 21. Fração volumétrica das fases superior (creme), intermediária e sedimentado das emulsões ao longo de seis dias de armazenamento. Primeiro dia (A), segunda dia (B), terceiro dia (C), quarto dia (D), quinto dia (E), sexto dia (F).

Aplicando-se a determinação do tamanho de partículas nas diferentes fases da emulsão, observou-se que, nas fases superior e intermediária, a distribuição do tamanho de partículas é bimodal, ou seja, há um grupo de partículas com diâmetro menor, em torno de 5 μm , correspondente às células de levedura e outro grupo de partículas com diâmetro maior, na faixa de 100 a 250 μm , correspondente às gotas de óleo (hexadecano) (Figuras 22, 23 e 24), conforme também observado por Furtado e colaboradores (2015).

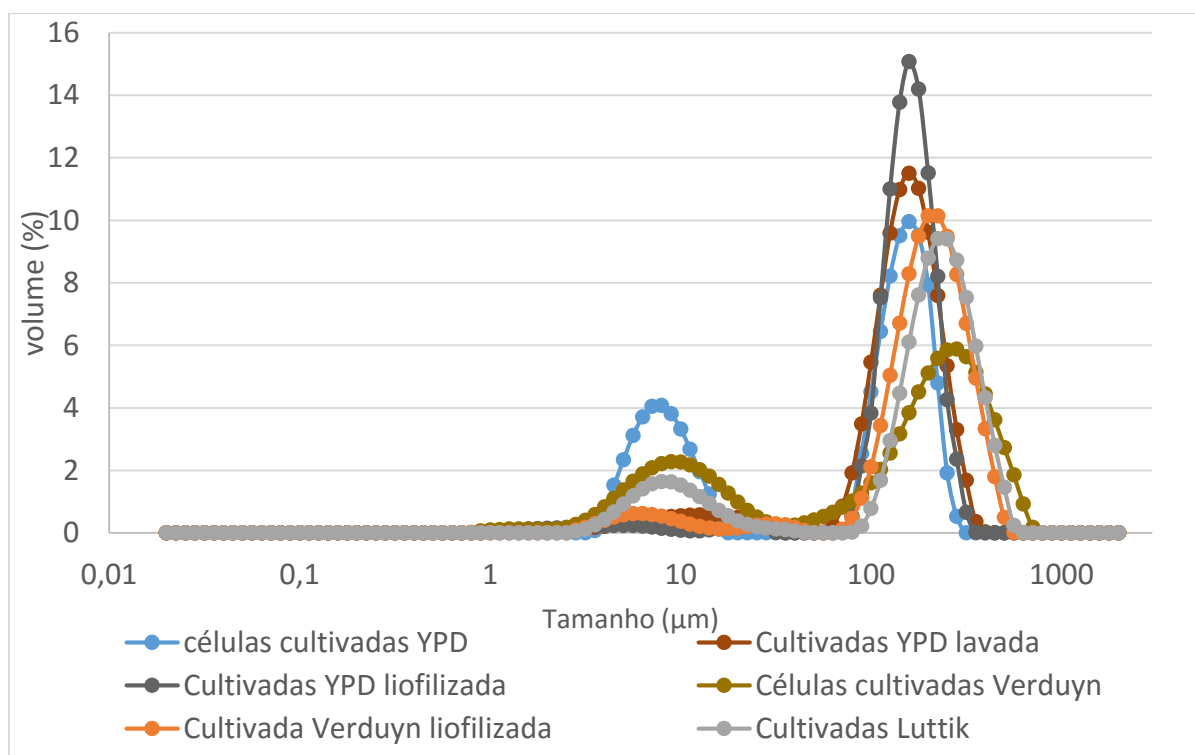


Figura 22. Distribuição do tamanho de partículas na fase superior (creme) das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

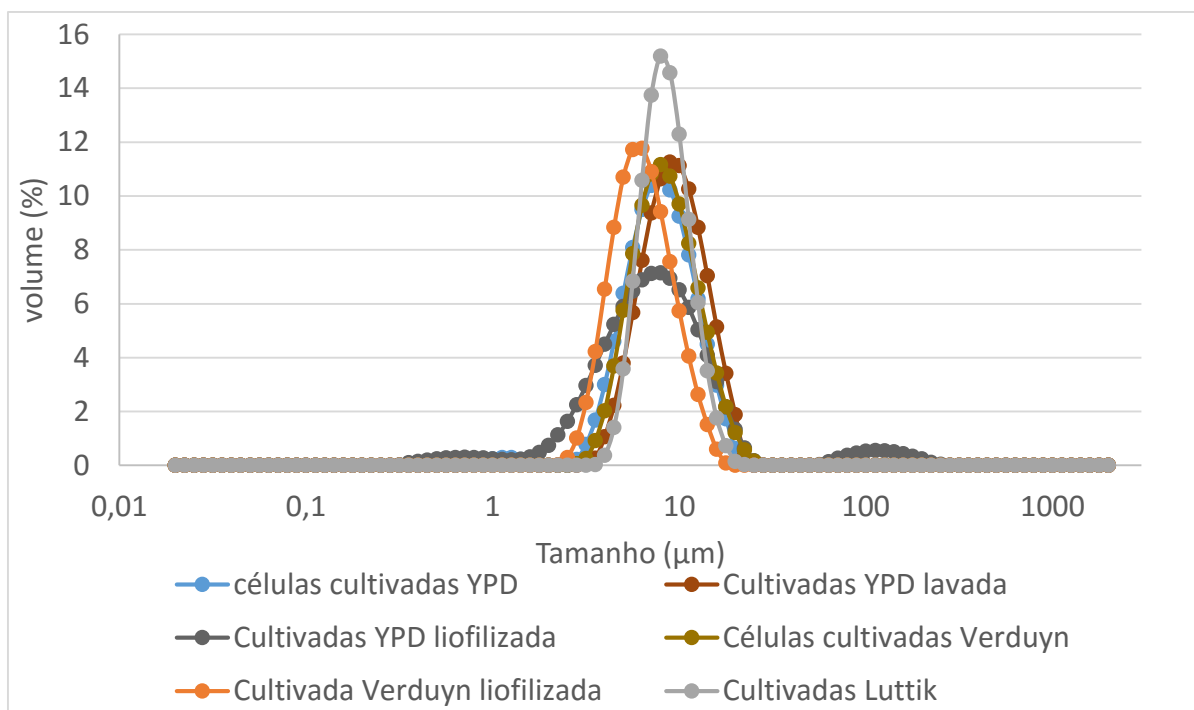


Figura 23. Distribuição do tamanho de partículas na fase intermediária das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

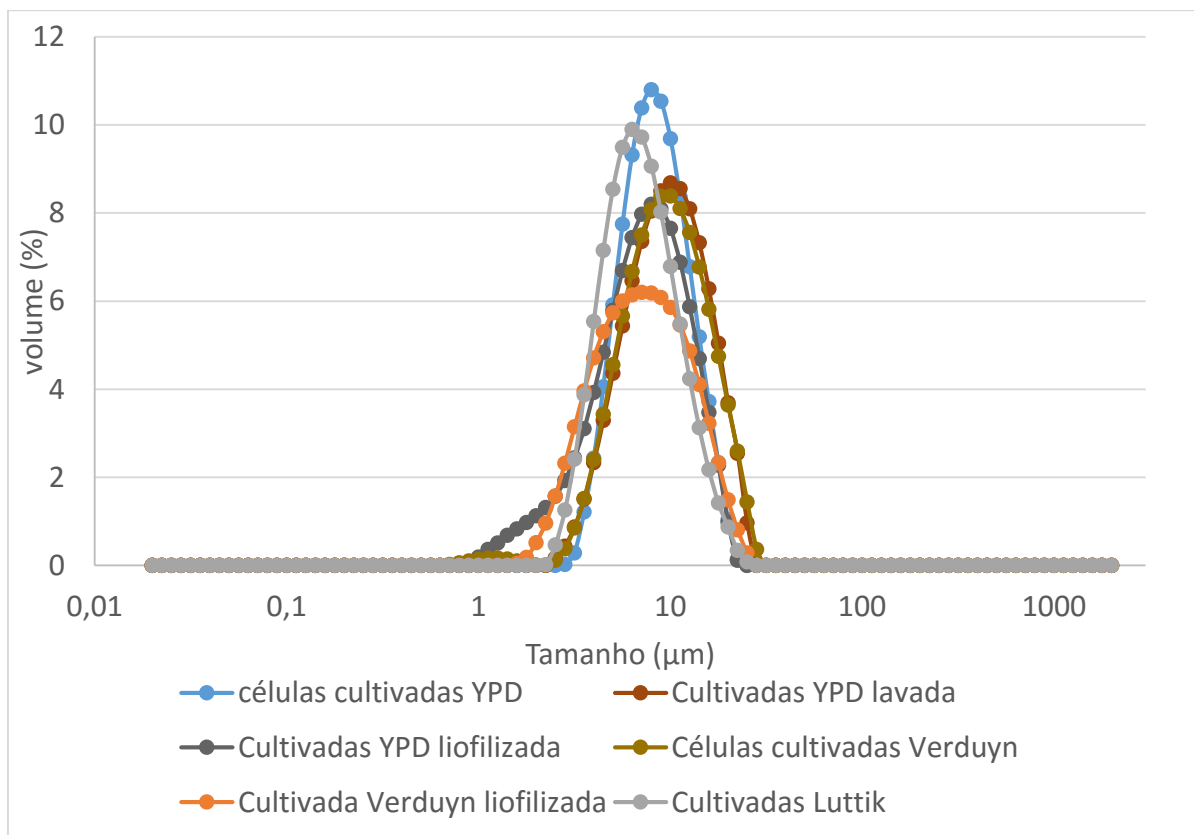


Figura 24. Distribuição do tamanho de partículas na fase sedimentada das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

A análise de distribuição de tamanho de partículas mostrou que as emulsões preparadas com a levedura cultivada em meios sintéticos são mais instáveis apresentando tamanhos de gotas maiores, moda entre 200 a 282 μm , do que as emulsões preparadas com a levedura cultivada em meio complexo, moda de 158 μm . Gotas de óleo maiores justificariam a coalescência mais rápida das mesmas e uma liberação de óleo também mais rápida, durante os 6 dias de repouso das emulsões. É possível observar que a distribuição do tamanho das células das leveduras varia de acordo com o meio em que estas foram cultivadas, variando entre 7,96-8,93 μm quando foi cultivada em meio complexo e variando entre 6,32-8,93 μm quando foi cultivada em meios sintéticos, tabela 10.

É interessante observar que a levedura de panificação, quando passou por um processo de cultivo em laboratório, apresentou tamanhos de célula maiores em meio complexo ou sintético, em relação à mesma levedura, porém utilizada diretamente do tablete adquirido no supermercado (experimentos do item 5.1). Além disso, os tamanhos das gotas de óleo nestas emulsões também são maiores, quando comparados com as gotas das emulsões preparadas com a levedura de panificação adquirida em supermercado e utilizada nos experimentos do item 5.1. O aumento no tamanho das gotas promove a coalescência das mesmas, causando a liberação da fase óleo em um menor intervalo de tempo (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; MCCLEMENS, 2005).

Tabela 10. Distribuição de tamanho das partículas das diferentes fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras em diferentes condições.

Condição da		0,02 -20 μm		20 -2000 μm	
Fases	Levedura	% Volume*	Moda (μm)	% Volume*	Moda (μm)
Superior	Cultivada YPD	33,25	7,09	66,75	158,87
	YPD lavada	8,34	8,93	91,66	158,86
	YPD liofilizada	4,09	5,02	95,91	158,87
	Cultivada Verduyn	31,90	8,93	68,10	282,51
	Verduyn liofilizada	6,45	6,32	93,55	200
	Cultivada Luttkik	17,47	7,96	82,53	251,79
Intermed iária	Cultivada YPD	100	7,96	0	0
	YPD lavada	100	8,93	0	0

	YPD liofilizada	93,67	7,96	6,33	141,59
	Cultivada Verduyn	100	7,96	0	0
	Verduyn liofilizada	100	5,63	0	0
	Cultivada Luttk	100	7,96	0	0
Inferior	Cultivada YPD	100	8,93	0	0
	YPD lavada	100	8,93	0	0
	YPD liofilizada	100	7,96	0	0
	Cultivada Verduyn	100	8,93	0	0
	Verduyn liofilizada	100	7,09	0	0
	Cultivada Luttk	100	6,32	0	0

* Representa o percentual de volume em cada fase para as partículas de levedura e as gotas de óleo

O potencial zeta é uma medida da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade da emulsão. Essa análise mostra como o emulsificante irá interagir quando estiver localizado na interface da emulsão. É possível saber se ocorrerá dispersão, agregação ou floculação. Na determinação da densidade de cargas quando um valor obtido é alto, as forças repulsivas predominam em relação às atrativas, indicando que as partículas se repeliram, ou seja, existe uma maior estabilidade da dispersão. Em casos de resultados com valores baixos, as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, representam instabilidade na dispersão, visto que as partículas se aproximaram umas das outras até se agregarem (FRANGE; GARCIA, 2009).

As densidades de carga das diferentes fases aquosas usadas no preparo das emulsões neste conjunto de experimentos estão apresentadas na Tabela 11. De acordo com Riddick (1968), valores de potencial zeta entre -41 e -60 mV indicam boa estabilidade das suspensões, valores entre -31 e -40 mV indicam estabilidade média, para uma faixa entre -16 e -30 mV é observada dispersão com baixa estabilidade e valores entre -10 e -15 mV apontam início de aglomeração. As suspensões de leveduras (fresca, fresca lavada, água da lavagem, fresca liofilizada) apresentaram características de uma dispersão com baixa estabilidade, tabela 10.

Tabela 11. Densidade de carga superficial em diferentes condições da levedura

	Potencial zeta (mV)	pH
Cultivada YPD	-30,35±1,37 ^a	5,82±0,02 ^a
YPD lavada	-29,2±1,01 ^a	5,91±0,01 ^b
YPD liofilizada	-24,38±0,68 ^{bc}	6,62±0,01 ^c
Cultivada Verduyn	-26,74±2,13 ^b	5,63±0,02 ^d
Verduyn liofilizada	-20,74±1,52 ^c	6,16±0,02 ^e
Cultivada Luttk	-26,99±1,61 ^b	6,54±0,01 ^f

Letras iguais na mesma coluna significam que não há diferença significativa entre as medidas ($p < 0,05$).

Nas figuras 25 e 26, encontram-se as microscopias das fases separadas das emulsões preparadas com as setes suspensões aquosas levedura (cultivada YPD, cultivada YPD lavada, água da lavagem do YPD, cultivada YPD liofilizada, cultivada Verduyn, cultivada Verduyn liofilizada, cultivada Luttk). As micrografias mostram novamente que a superfície externa da gota de óleo da fase superior (creme) está circundada por leveduras, as quais impedem/dificultam a coalescência das gotas, esse fato também foi observado por Furtado e colaboradores (2015) e Moreira (2015). Como pode ser observado pelas micrografias, as fases intermediárias são constituídas basicamente por água com algumas gotas dispersas e leveduras em suspensão; e as fases inferiores, por células, confirmando os resultados obtidos na análise de tamanho de partícula, sendo somente a fase superior da proveta uma emulsão óleo em água.

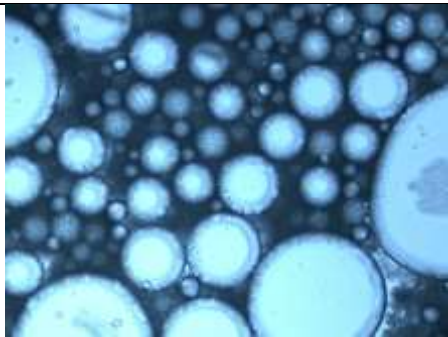
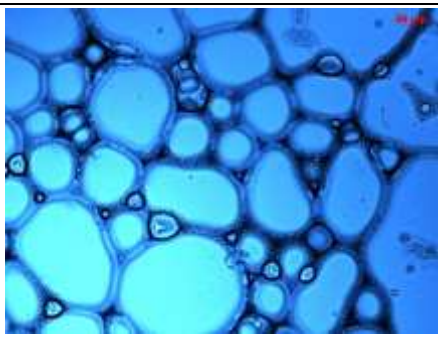
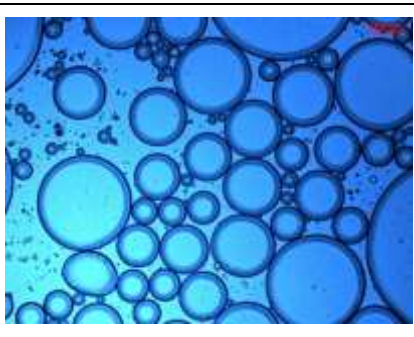
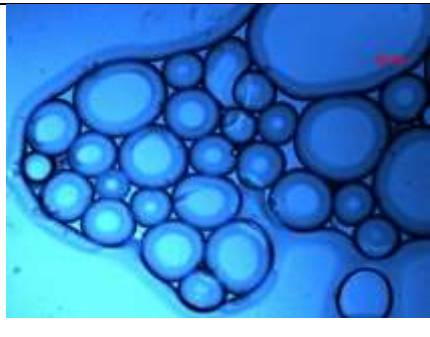
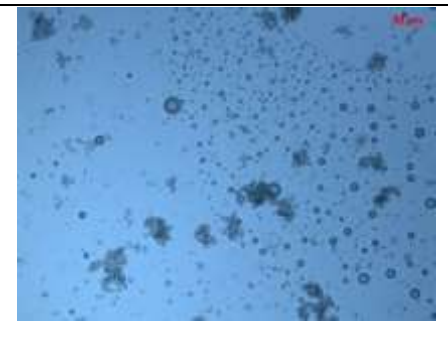
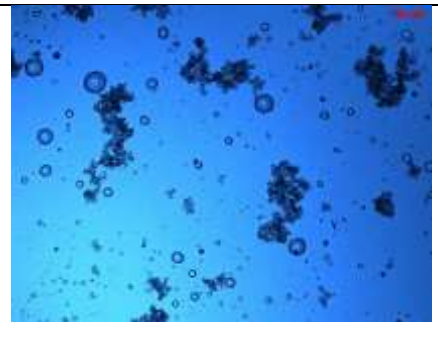
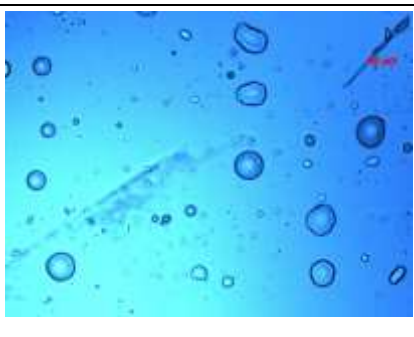
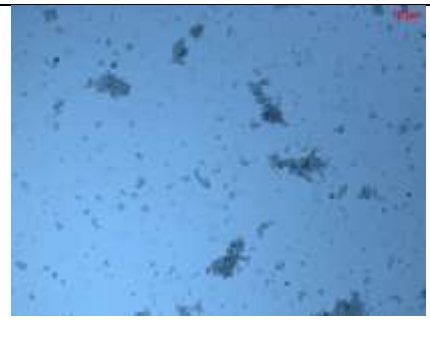
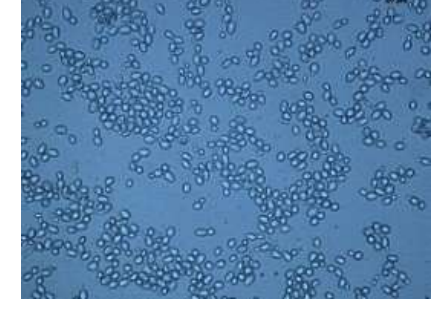
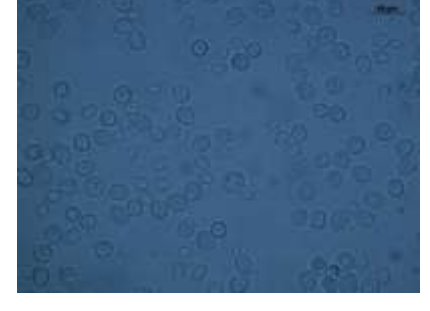
Fases	Levedura cultivada YPD	Levedura cultivada YPD lavada	Água de lavagem YPD	Levedura cultivada YPD liofilizada
Superior				
Intermediária				
Sedimentado				

Figura 25. Micrografias das fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras. Aumento de 400 vezes

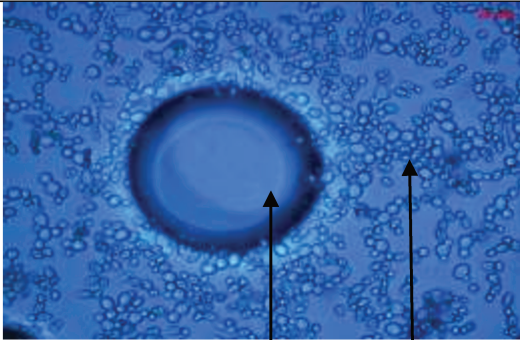
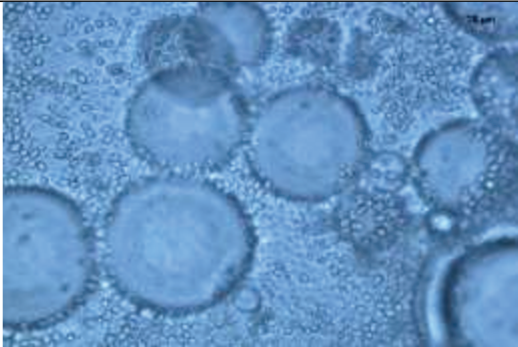
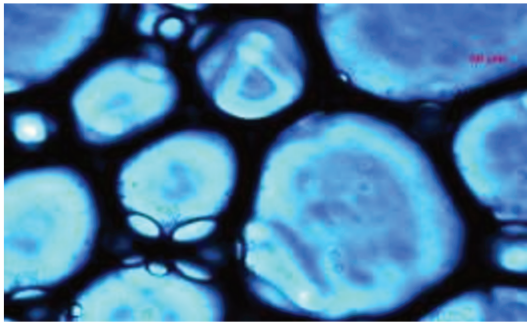
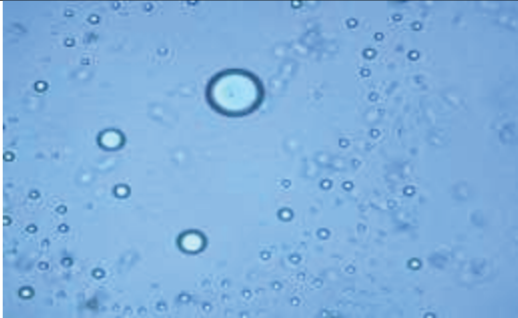
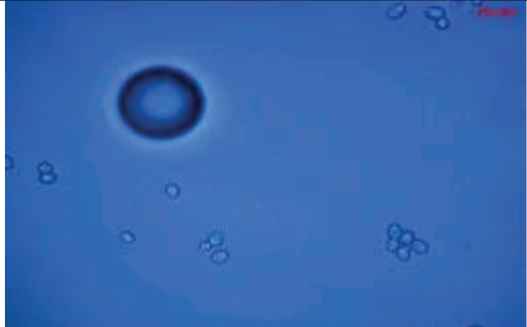
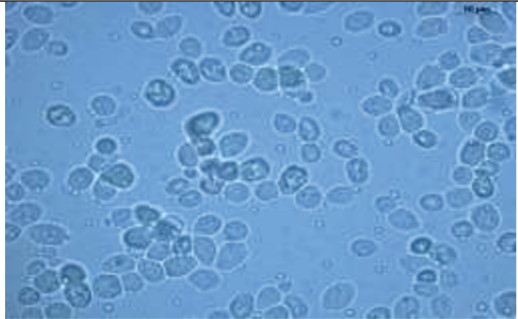
Fases	Levedura cultivada Verduyn	Levedura cultivada Verduyn liofilizada	Levedura cultivada Luttk
Superior			
Intermediária	<p>Gotícula de óleo</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>		
Sedimentado			

Figura 26. Micrografias das fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras. Aumento de 400 vezes

Através do aspecto visual das emulsões e da análise de tamanho de partículas foi possível concluir nessa terceira etapa de experimentos, que o cultivo das células de levedura, tanto em meio complexo, como em meio sintético, promove emulsões menos estáveis, quando comparado com emulsões preparadas com a mesma levedura, porém utilizada diretamente do tablete adquirido em supermercado, sem passar pela etapa de cultivo, item 5.1. Através da análise de tamanho de partículas, o uso de meios sintéticos no cultivo da linhagem de panificação promove a formação de emulsões menos estáveis, quando comparado com a situação em que meio complexo foi utilizado. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quando utilizada para a produção industrial do farneseno pela empresa Amyris, é cultivada em meios de cultivo à base de caldo de cana e melaço. Por isso, o meio de cultivo YPD, que é um meio complexo, foi escolhido para darmos continuidade ao trabalho experimental, já que este meio complexo é o mais próximo da composição do caldo de cana e melaço que são utilizados na produção do farneseno. (DELLA-BIANCA et al., 2014; PERALTA-YAHYA et al., 2012; RENNINGER; NEWMAN; REILING, 2010). Mais uma vez foi confirmada a importância da lavagem da massa celular pois ocorreu emulsão com água de lavagem das células cultivadas em meio YPD e centrifugadas. Esta lavagem ajuda na remoção de compostos presentes no meio de cultura que poderiam estar contribuindo para a formação de emulsões mais estáveis.

5.4 Influência da linhagem e do estado fisiológico da *S. cerevisiae* na estabilidade das emulsões

A partir do conhecimento da cinética de crescimento de diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae*, (item 5.2), os inóculos das linhagens de panificação e PE-2 foram incubados em *shaker*, em frascos de 1 L com deflectores, para aumentar a transferência de oxigênio, contendo 300 mL dos meios de cultura, a 200 rpm e 30 °C até que fosse atingida a fase estacionária pré-diáuxica ou pós-diáuxica, com o objetivo de se verificar se o estado fisiológico das células, no momento em que são recolhidas do cultivo para serem utilizadas no preparo das emulsões, teria alguma influência na estabilidade das mesmas. A massa celular gerada nos cultivos era sempre centrifugada e ressuspendida em H₂O destilada estéril.

As emulsões preparadas com as suspensões aquosas de levedura (10% m/m) (Panificação pré-diáuxica, Panificação pós-diáuxica, PE-2 pré-diáuxica, PE-2 pós-diáuxica), com hexadecano, após 24 h de repouso, formaram um sistema trifásico: superior (creme) emulsão óleo em água, intermediária leveduras e gotas de óleo em suspensão aquosa e inferior (sedimentado de leveduras), figura 27.

Após 1 dia de repouso, é possível visualizar que não ocorreu a formação de uma emulsão (creme) na fase superior da proveta com a linhagem PE-2 no estado fisiológico de pré-diáuxia, um estudo adicional será necessário para uma completa compreensão de não ter ocorrido emulsão para este caso. Após 3 dias de repouso, já é possível notar a liberação do óleo da fase creme em todas as emulsões. Após 6 dias de repouso, é possível visualizar uma maior liberação de óleo da fase creme nas células em estado fisiológico de pós-diáuxia para a linhagem de panificação.

As frações volumétricas para as seis condições propostas (Panificação pré-diáuxica, Panificação pós-diáuxica, PE-2 pré-diáuxica, PE-2 pós-diáuxica) permaneceram estáveis dentro do período de tempo avaliado, figura 21. Emulsões de 50 mL continham 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de levedura, na concentração de 10% (m/m). Para as seis emulsões propostas, a fase creme representou entre 32-39% do volume da proveta, a fase intermediária representou entre 57 – 62% do volume da proveta e o sedimentado representou entre 4 – 6,5% do volume da proveta ao longo do período avaliado para as seis emulsões, figura 28.
















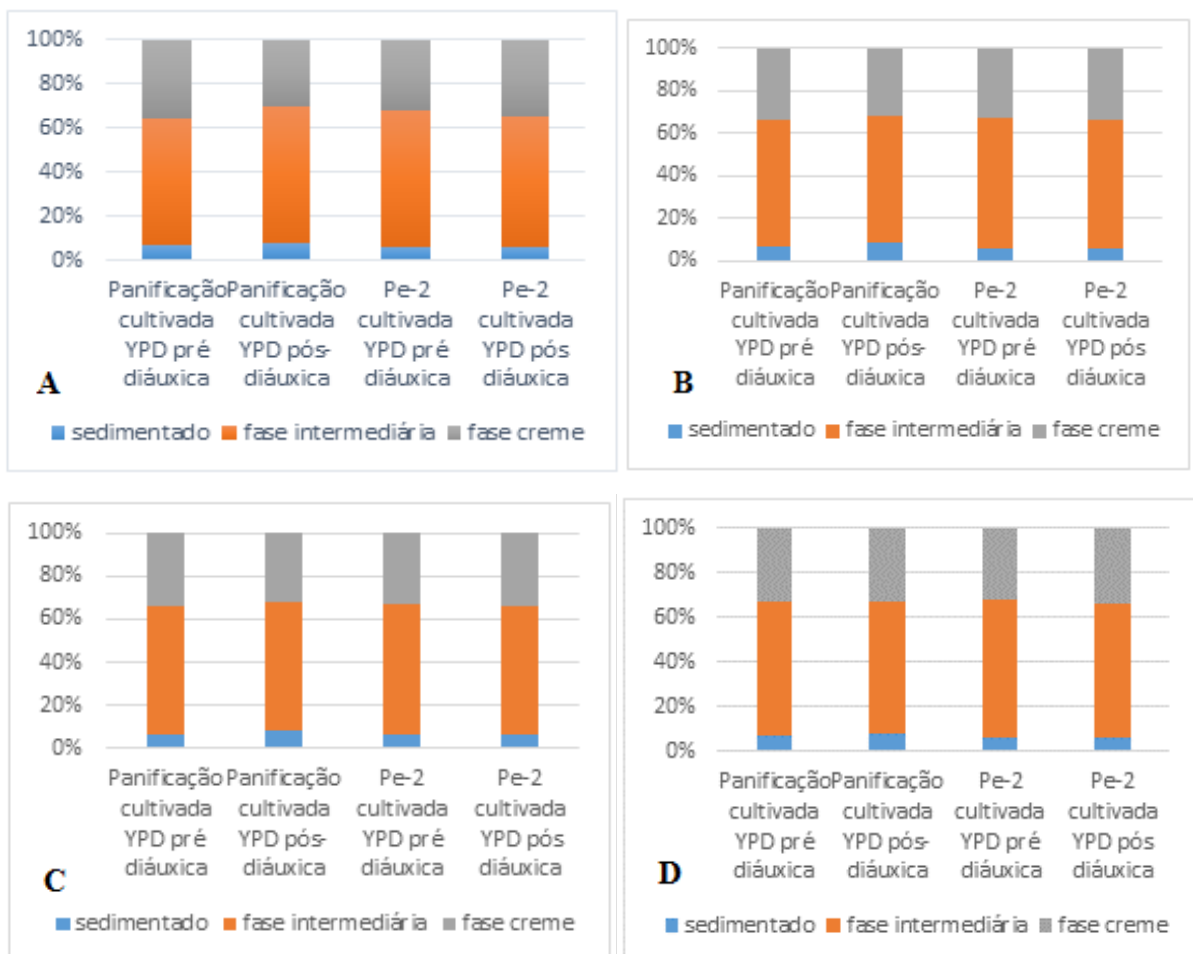
FA T (dias)	Branco	Panificação cultivada YPD pré diáuxica	Panificação cultivada YPD pós- diáuxica	PE-2 cultivada YPD pré diáuxica	PE-2 cultivada YPD pós diáuxica
0					
1					
3					



Figura 27 Aspecto visual de emulsões preparadas com hexadecano e levedura, em que são visíveis as 3 fases formadas: topo, intermediária e fundo. Branco (água e hexadecano), Panificação cultivada YPD pré diáuxica (emulsão com levedura de panificação cultiva em meio complexo em estado fisiológico de pré-diáuxica), Panificação cultivada YPD pós diáuxica (emulsão com levedura de panificação cultiva em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxica). PE-2 cultivada YPD pré diáuxica (emulsão com levedura PE-2 cultiva em meio complexo em estado fisiológico de pré-diáuxica), PE-2 cultivada YPD pós diáuxica (emulsão com levedura PE-2 cultiva em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxica). São apresentadas imagens imediatamente após o preparo das emulsões e 1, 3 e 6 dias após o preparo, a temperatura ambiente. FA: Fase aquosa, T: tempo.



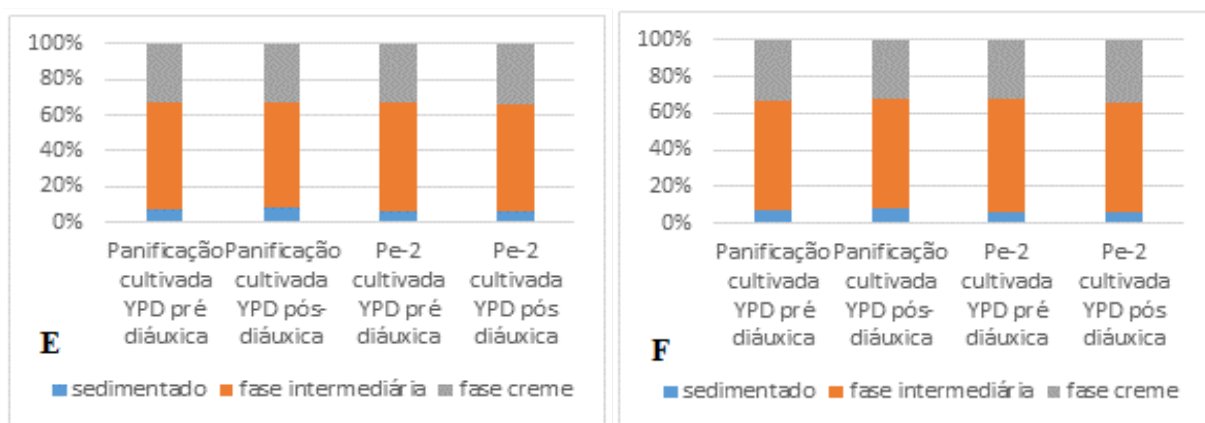


Figura 28. Fração volumétrica das fases superior (creme), intermediária e sedimentado das emulsões ao longo de seis dias de armazenamento. Primeiro dia (A), segunda dia (B), terceiro dia (C), quarto dia (D), quinto dia (E), sexto dia (F).

Aplicando-se a determinação do tamanho de partículas nas diferentes fases da emulsão, observou-se que, nas fases superior e intermediária, a distribuição do tamanho de partículas é bimodal, ou seja, há um grupo de partículas com diâmetro menor, em torno de 5 μm , correspondente às células de levedura e outro grupo de partículas com diâmetro maior, na faixa de 100 a 250 μm , correspondente às gotas de óleo (hexadecano) (Figuras 29, 30 e 31), conforme também observado por Furtado e colaboradores (2015).

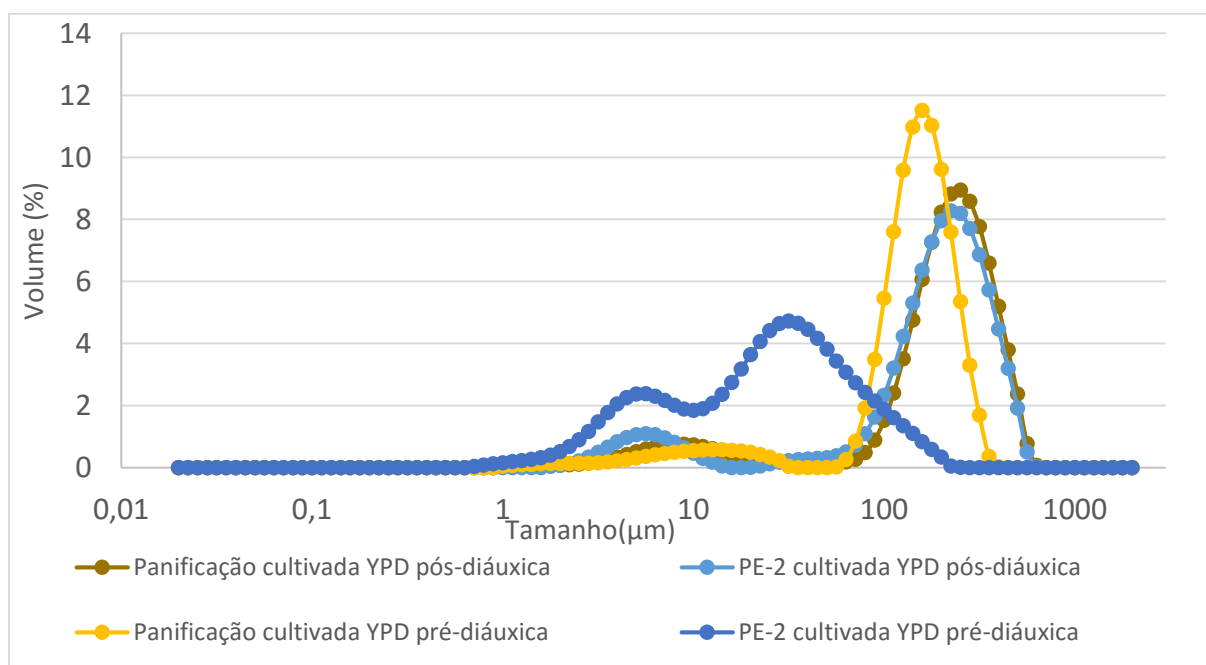


Figura 29. Distribuição do tamanho de partículas na fase superior (creme) das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras.

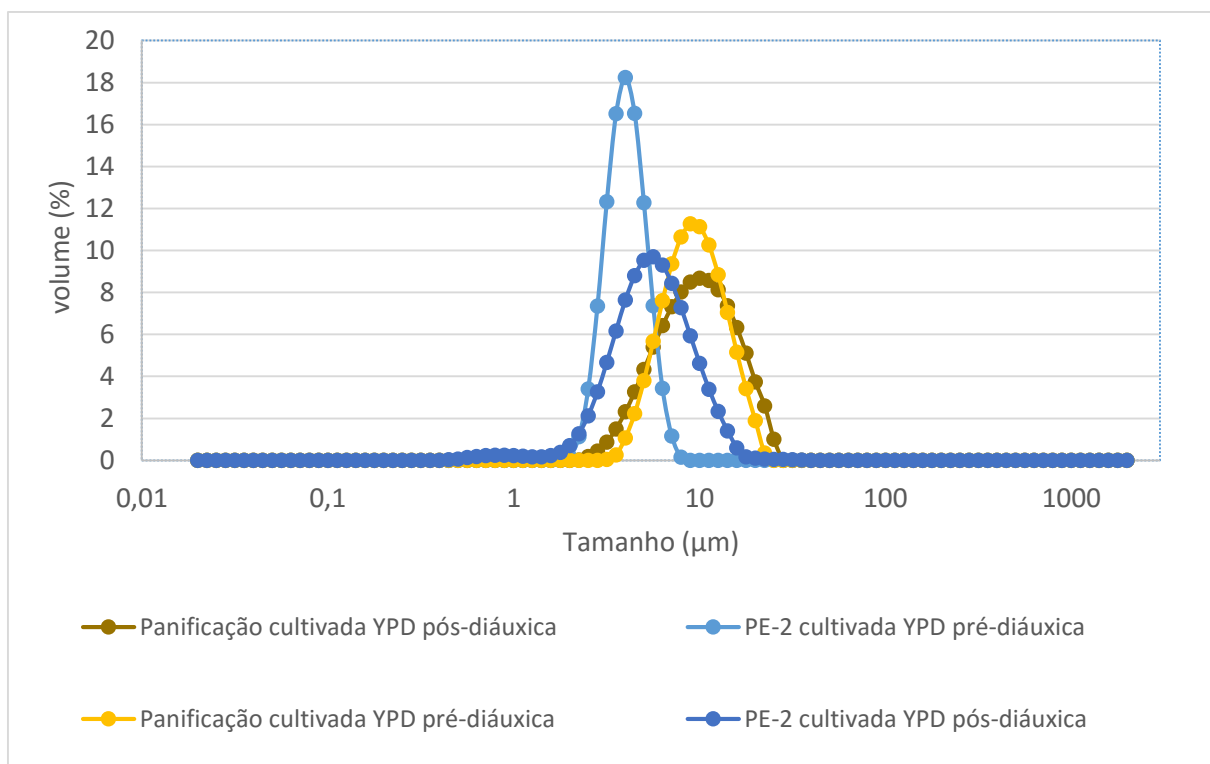


Figura 30. Distribuição do tamanho de partículas na fase intermediária das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

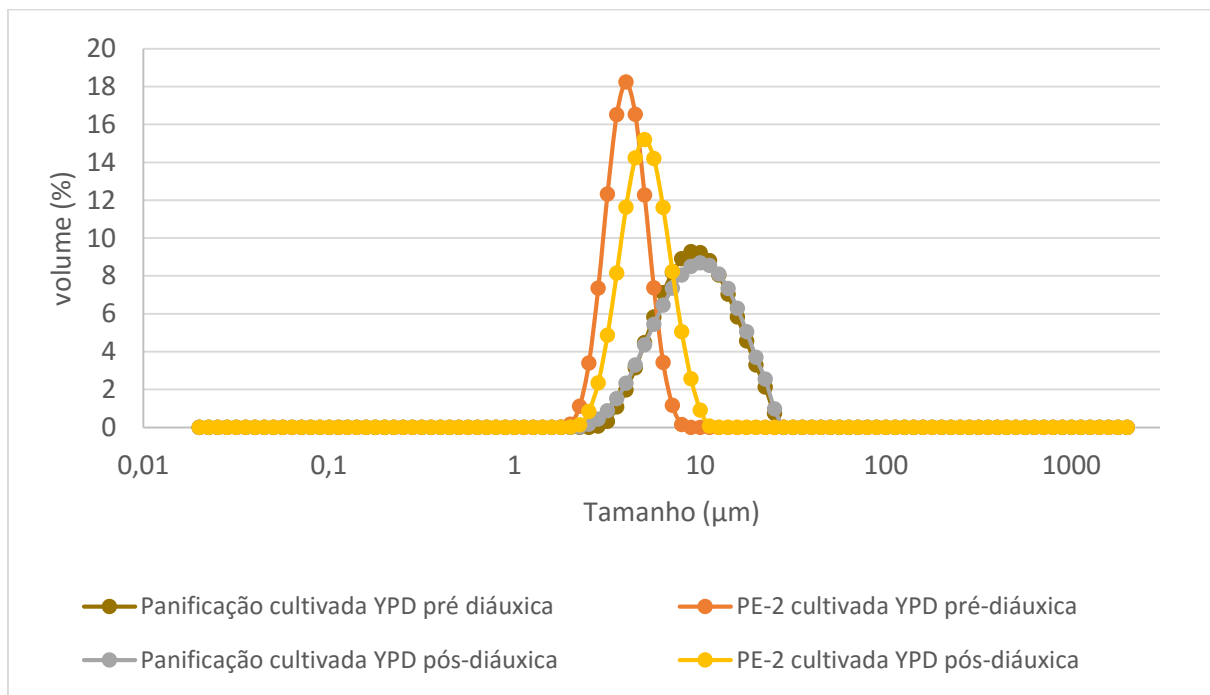


Figura 31. Distribuição do tamanho de partículas na fase sedimentada das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

A análise de distribuição de tamanho de gotas, mostra que as emulsões com a presença de células de levedura em estado fisiológico de pós-diáuxia apresentam tamanho de

gota maiores, tabela 12. Esse fato justifica a coalescência mais rápida das gotas de óleo e uma maior liberação de óleo após os 6 dias de repouso. No item 5.2.2, a tabela 9 mostra que o tamanho das células em estado pós diáuxico são maiores, logo a velocidade de sedimentação na proveta irá ser maior também de acordo com a lei de Stokes. As condições de cultivo (aeração, fonte de carbono e nitrogênio, temperatura, pH, etc.), estado fisiológico e o genótipo da linhagem da levedura interferem diretamente na morfologia e no tamanho das células (Barth e Gaillardin, 1997).

Tabela 12. Distribuição de tamanho das diferentes fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras em diferentes condições.

Condição da		0,02 -20 μm		20 -2000 μm	
Fases	Levedura	% Volume*	Moda (μm)	% Volume*	Moda (μm)
Superior	Panificação				
	cultivada YPD pré-diáuxica	8,34	7,96	91,66	158,86
	Panificação				
	cultivada YPD pós-diáuxica	9,58	8,93	90,42	251,79
Intermediária	PE-2 cultivada YPD	5,63		35,56	
	pré-diáuxica				
	PE-2 cultivada YPD	10,4	5,63	89,6	224,4
	pós-diáuxica				
Intermediária	Panificação				
	cultivada YPD pré-diáuxica	100	8,93	0	0
	Panificação				
	cultivada YPD pós-diáuxica	100	8,93	0	0
Intermediária	PE-2 cultivada YPD	100	5,63	0	0
	pré-diáuxica				
	PE-2 cultivada YPD	100	5,02	0	0
	pós-diáuxica				

Inferior	Panificação				
	cultivada YPD pré-diáuxica	100	8,93	0	0
	Panificação				
	cultivada YPD pós-diáuxica	100	10,02	0	0
	PE-2 cultivada YPD pré-diáuxica	100	5,63	0	0
	PE-2 cultivada YPD pós-diáuxica	100	5,63	0	0

* Representa o percentual de volume em cada fase para as partículas de levedura e as gotas de óleo

Através das análises reológicas em emulsões é possível visualizar de maneira direta a interação das forças que ocorrem no sistema. As instabilidades provenientes da variação no tamanho e no número de partículas e na orientação ou migração do emulsionante durante um período de tempo podem ser detectadas por meio de alterações na viscosidade, elasticidade e textura da emulsão (TADROS, 2011; MCCLEMENTS, 2005).

A figura 32 mostra o comportamento reológico das fases superiores das emulsões, independente da linhagem da levedura e do estado fisiológico, a fase superior obedeceu à Lei da Potência com comportamento de fluido pseudoplástico mostrando queda da viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação (MCCLEMENTS, 2005). Para as emulsões com extrato celulares, a fase superior obedeceu ao modelo de Herschel Bulkley, segundo o qual é necessária uma tensão inicial para começar o escoamento. Na Tabela 13 encontram-se relacionados os parâmetros reológicos dos ajustes aos modelos, e os coeficientes de determinação para cada modelo (R^2).

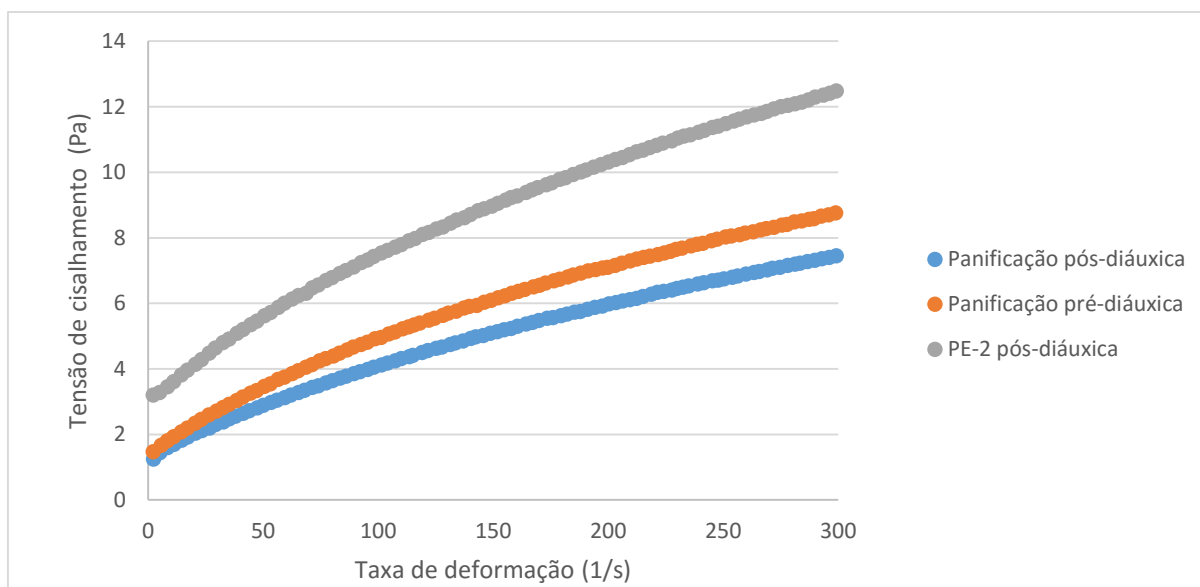


Figura 32. Curvas de escoamento da fase superior (creme) das emulsões preparadas com diferentes soluções aquosas

Tabela 13. Parâmetros reológicos dos ajustes das curvas de escoamentos experimentais aos modelos de Lei de Potência (LP)

Fase Aquosa	Fase	Fluido	Parâmetros			R ²
			k (Pa.s ⁿ)	n	ζ	
Panificação pré-diáuxica	FS	LP	0,439±0,04 ^a	0,512±0,005 ^e		0,995
Panificação pós-diáuxica	FS	LP	0,512±0,005 ^b	0,516±0,02 ^e		0,994
PE-2 pós-diáuxica	FS	LP	0,420±0,02 ^a	0,431±0,009 ^f		0,991

FS: Fase Superior, LP: Lei da Potência e HB: Herschel Bulkley. Letras diferentes na mesma coluna significa que há diferença significativa ($p < 0,05$)

Para a fase superior houve algumas diferenças significativas em relação aos parâmetros dependendo da composição da fase aquosa utilizada no preparo das emulsões, com índice de comportamento do fluido (n) variando de 0,43 a 0,88 e índice de consistência (k) de 0,51 a 0,153 Pa.s.

A fase creme da emulsão com a linhagem PE-2 pós –diáuxica, apresentou maior viscosidade comparando com as emulsões com a linhagem de panificação, o que pode ser atribuído à maior presença de leveduras na interface das gotas (10,4%). Furtado e colaboradores (2015) e Moreira (2015) perceberam que a maior presença de leveduras na fase creme da emulsão colabora para o aumento da viscosidade dessa emulsão. A linhagem PE-2 apresenta um tamanho de célula menor que a linhagem de panificação (tabela 9). Deste modo, as células

da PE-2 seriam capazes de formar uma camada com mais células na superfície externa das gotas de óleo, ocorrendo maior interação com a fase óleo

Na Figura 33 estão descritas as cinéticas de tensão interfacial entre o hexadecano e as diferentes suspensões aquosas, e tensões interfaciais obtidas no equilíbrio. Todas foram realizadas em uma hora e meia para o alcance do equilíbrio. A água Milli-Q foi utilizada como branco para as amostras. As tensões finais das amostras ficaram com valores próximos, mas sendo maiores que os valores obtidos quando as células de levedura não passam pelo cultivo, item 5.1.

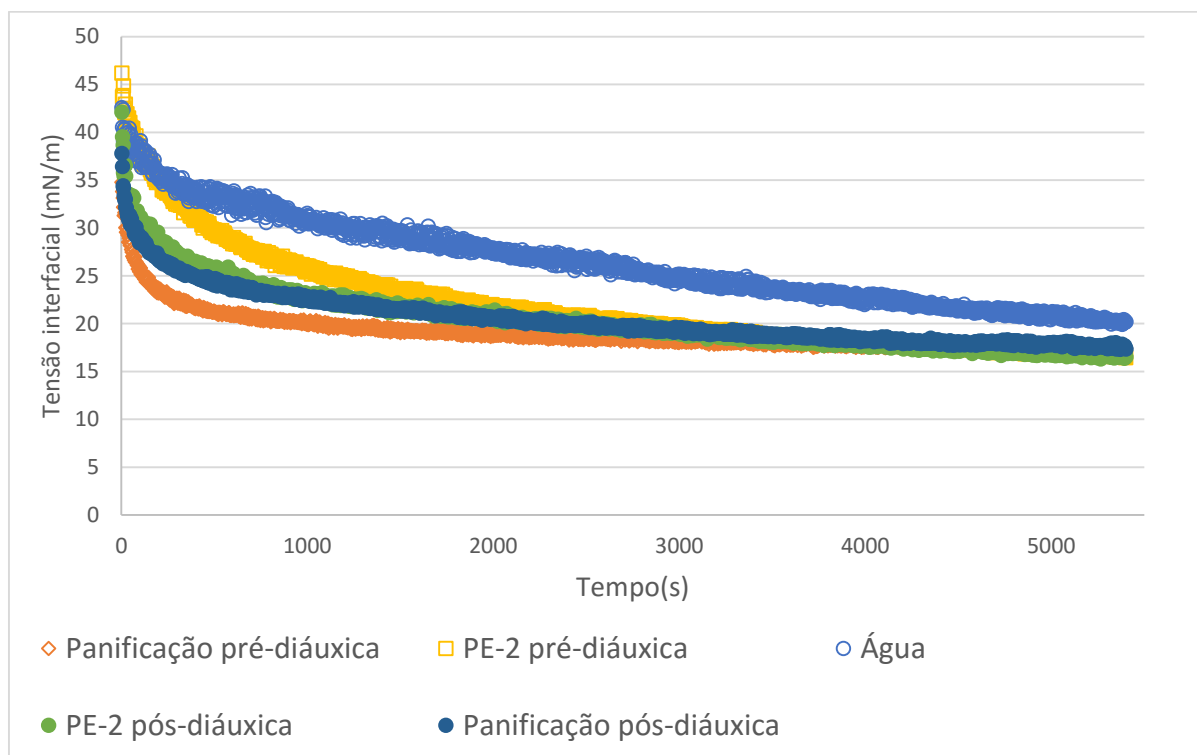


Figura 33. Cinética de tensão interfacial entre o hexadecano e diferentes suspensões aquosas

O potencial zeta é uma medida da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade da emulsão. Essa análise mostra como o emulsificante irá interagir quando estiver localizado na interface entre o óleo e água para formar a emulsão. É possível saber se ocorrerá dispersão, agregação ou floculação. Na determinação da densidade de cargas quando um valor obtido é alto, as forças repulsivas predominam em relação às atrativas, indicando que as partículas se repeliram, ou seja, existe uma maior estabilidade da dispersão. Em casos de resultados com valores baixos, as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, representam instabilidade na dispersão, visto que as partículas se aproximaram umas das outras até se agregarem (FRANGE; GARCIA, 2009).

As densidades de carga das diferentes fases aquosas usadas no preparo das emulsões neste conjunto de experimentos estão apresentadas na Tabela 13. De acordo com Riddick (1968) valores de potencial zeta entre -41 e -60 mV indicam boa estabilidade das suspensões, valores entre -31 e -40 mV indicam estabilidade média, para uma faixa entre -16 e -30 mV é observada dispersão com baixa estabilidade e valores entre -10 e -15 mV apontam início de aglomeração. Todas as suspensões de leveduras apresentaram características de uma dispersão com baixa estabilidade, exceto a suspensão de levedura com células PE-2 pré-diáuxica, apresentando um comportamento de início de aglomeração, isso pode ser uma justificativa para que não tenha ocorrido emulsão para esta condição, tabela 14.

Tabela 14. Densidade de carga superficial em diferentes condições da levedura

	Densidade de carga (mV)	pH
Células Panificação pré-diáuxica	-30,35±1,37 ^a	5,82±0,02 ^a
Células Panificação pós-diáuxica	-31,56±0,46 ^b	5,95±0,03 ^b
Células Pe-2 pré-diáuxica	-10,83±0,79 ^b	6,07±0,04 ^c
Células Pe-2 pós-diauxica	-18,44±1,56 ^c	6,32±0,01 ^d

Letras iguais na mesma coluna significam que não há diferença significativa entre as medidas ($p < 0,05$).

Na Figura 34, encontram-se as microscopias das fases separadas das emulsões preparadas com as seis suspensões aquosas levedura (Panificação pré-diáuxica, Panificação pós-diáuxica, PE-2 pré-diáuxica, PE-2 pós-diáuxica,). As micrografias mostram novamente que a interface da gota de óleo da fase superior (creme) está circundada por leveduras, impedindo a coalescência das gotas, esse fato também foi observado por Furtado e colaboradores (2015) e Moreira (2015). Como pode ser observado pelas micrografias, as fases intermediárias, são constituídas basicamente por água com algumas gotas dispersas e leveduras em suspensão; e as fases inferiores, por células ou material celular precipitado, confirmando os resultados obtidos na análise de tamanho de partícula.

Foi possível concluir nesta quarta etapa de experimentos, que o estado fisiológico da levedura e a linhagem utilizada influenciam na estabilidade das emulsões. Através do aspecto visual das emulsões e da análise de tamanho de partículas foi possível concluir que células de levedura em fase estacionária pós-diáuxica promovem a formação de emulsões menos estáveis do que células em fase estacionária pré-diáuxica. O ensaio de reologia mostrou que a linhagem PE-2 promoveu emulsões mais estáveis do que as emulsões com células de levedura de panificação, em razão de uma maior viscosidade da fase creme, devido à maior presença das células ao redor das gotas de óleo. A análise de tensiometria mostrou que as suspensões de levedura ficaram com valores próximos entre elas quando alcançaram o patamar de equilíbrio,

mas sendo maiores que os valores obtidos quando as células de levedura não passam pelo cultivo, maiores tensões interfaciais das suspensões de levedura indicam que as emulsões são menos estáveis. Desta maneira, as emulsões nesse conjunto de experimentos foram menos estáveis quando comparadas com as emulsões realizadas com as células de levedura que não passaram pelo cultivo, item 5.1. A análise de densidade de carga mostrou que a suspensão de levedura com células PE-2 pré-diáuxica, apresenta um comportamento de início de aglomeração, isso pode ser uma justificativa para que não tenha ocorrido emulsão para esta condição.

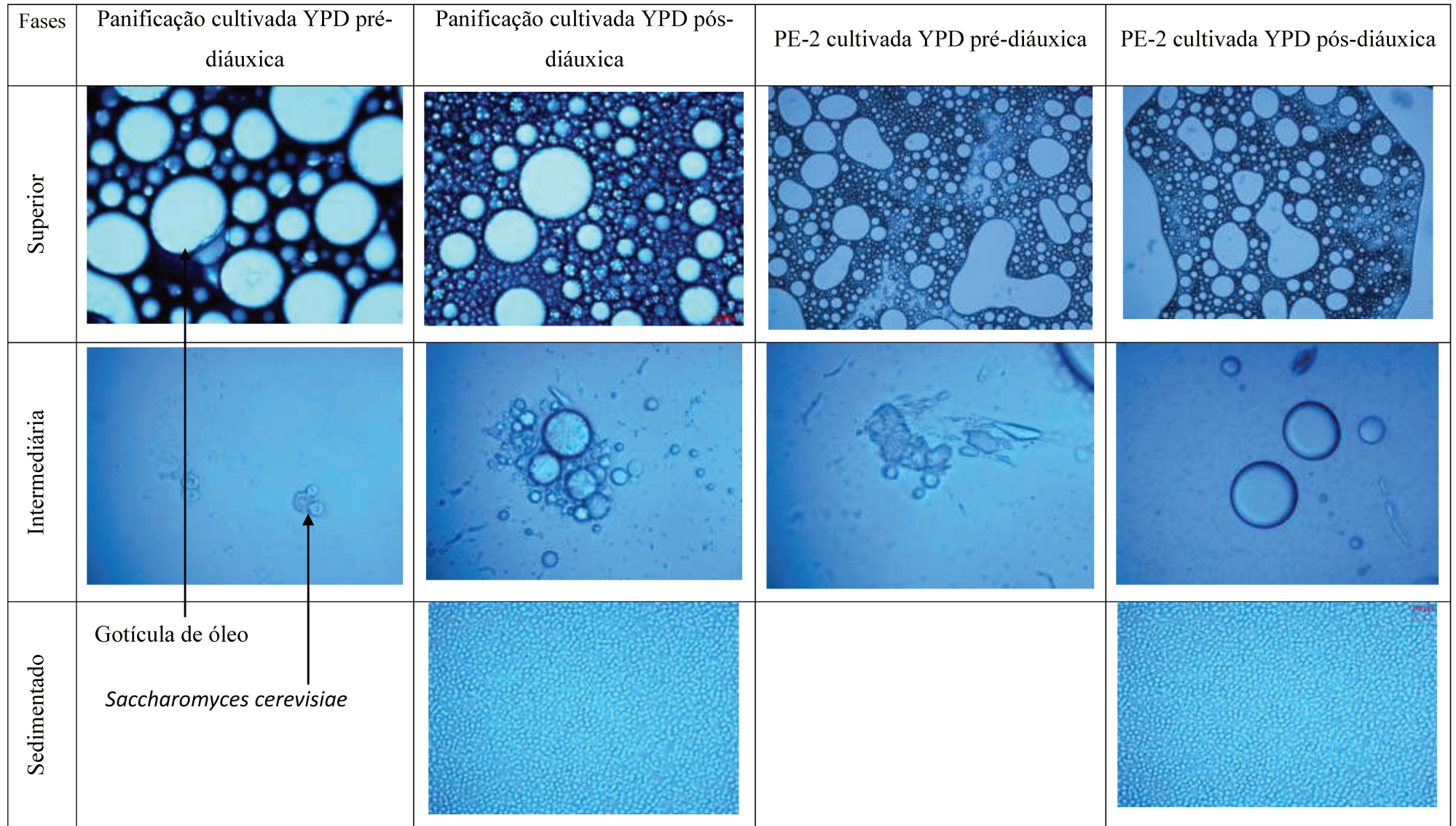


Figura 34. Micrografias das fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras. Aumento de 400 vezes

5.5 Influência do rompimento da parede celular da *S. cerevisiae* na estabilidade das emulsões

A partir do conhecimento da cinética de crescimento de diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae*, (item 5.2), os inóculos das linhagens de panificação e PE-2 foram incubados em *shaker*, em frascos de 1 L com defletores, para aumentar a transferência de oxigênio, contendo 300 mL dos meios de cultura, a 200 rpm e 30 °C até que fosse atingida a fase estacionária pós-diáuxica.

Com o objetivo de se estudar o comportamento de emulsões preparadas com células de levedura rompidas, células da linhagem de panificação e PE-2 foram cultivadas em meio complexo e, após alcançarem a fase estacionária pós-diáuxica, a biomassa obtida foi centrifugada, lavada e ressuspensa com água destilada estéril. As suspensões de levedura passaram então por um processo de rompimento celular por cisalhamento com pérolas de vidro (3,3 mm de diâmetro) e agitação em agitador tipo vórtex (5 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de repouso a 0 °C entre dois ciclos consecutivos) (BELLAYER et al., 2004).

As emulsões preparadas com as suspensões aquosas dos extratos de levedura (10% m/m) (Extrato celular panificação pós-diáuxica, Extrato celular PE-2 pós-diáuxica, com hexadecano, após 24 h de repouso, formaram um sistema trifásico: superior (creme) emulsão óleo em água, intermediária leveduras e gotas de óleo em suspensão aquosa e inferior (sedimentado de leveduras), figura 35.

Após 1 dia de repouso, as fases intermediárias das provetas com os extratos celulares das linhagens ainda apresentam uma cor próxima ao branco, provavelmente é o material celular da levedura, submetido ao processo de abrasão, que ainda está sedimentando, diferente das emulsões no qual a levedura não passou processo de abrasão com perolas de vidro. Após 3 dias de repouso, já é possível notar liberação do óleo da fase creme no topo da proveta nas duas emulsões com extrato celular. Após 6 dias de repouso, comparando as provetas com extratos celulares é possível visualizar uma maior liberação de óleo da fase creme na proveta com extrato celular da linhagem panificação.













<div>Fase Aquosa</div> <div>Tempo (dias)</div>	Panificação cultivada YPD pós- diáuxica	Extrato celular panificação YPD pós diáuxica	PE-2 cultivada YPD pós diáuxica	Extrato celular Pe2 YPD pós diáuxica
0				
1				
3				



Figura 35. Aspecto visual de emulsões preparadas com hexadecano e levedura, em que são visíveis as 3 fases formadas: topo, intermediária e fundo. Panificação cultivada YPD pós diáuxia (emulsão com levedura de panificação cultivada em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxia). Extrato celular panificação cultivada YPD pós diáuxia (emulsão com levedura de panificação cultivada em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxia, após o processo de abrasão com esferas de vidro), PE-2 cultivada YPD pós diáuxia (emulsão com levedura PE-2 cultivada em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxia). Extrato celular PE-2 cultivada YPD pós diáuxia (emulsão com levedura PE-2 cultivada em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxia, após o processo de abrasão com esferas de vidro) São apresentadas imagens imediatamente após o preparo das emulsões e 1, 3 e 6 dias após o preparo, a temperatura ambiente.

As frações volumétricas para as duas condições propostas (extrato celular panificação pós-diáuxia e extrato celular PE-2 pós-diáuxia) permaneceram estáveis dentro do período de tempo avaliado, figura 29. Emulsões de 50 mL continham 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa do extrato celular da levedura, na concentração de 10% (m/m). Para as duas emulsões propostas, a fase creme representou entre 34-39% do volume da proveta, a fase intermediária representou entre 57 – 62% do volume da proveta e o sedimentado representou entre 4 – 6,2% do volume da proveta ao longo do período avaliado para as seis emulsões, figura 36.

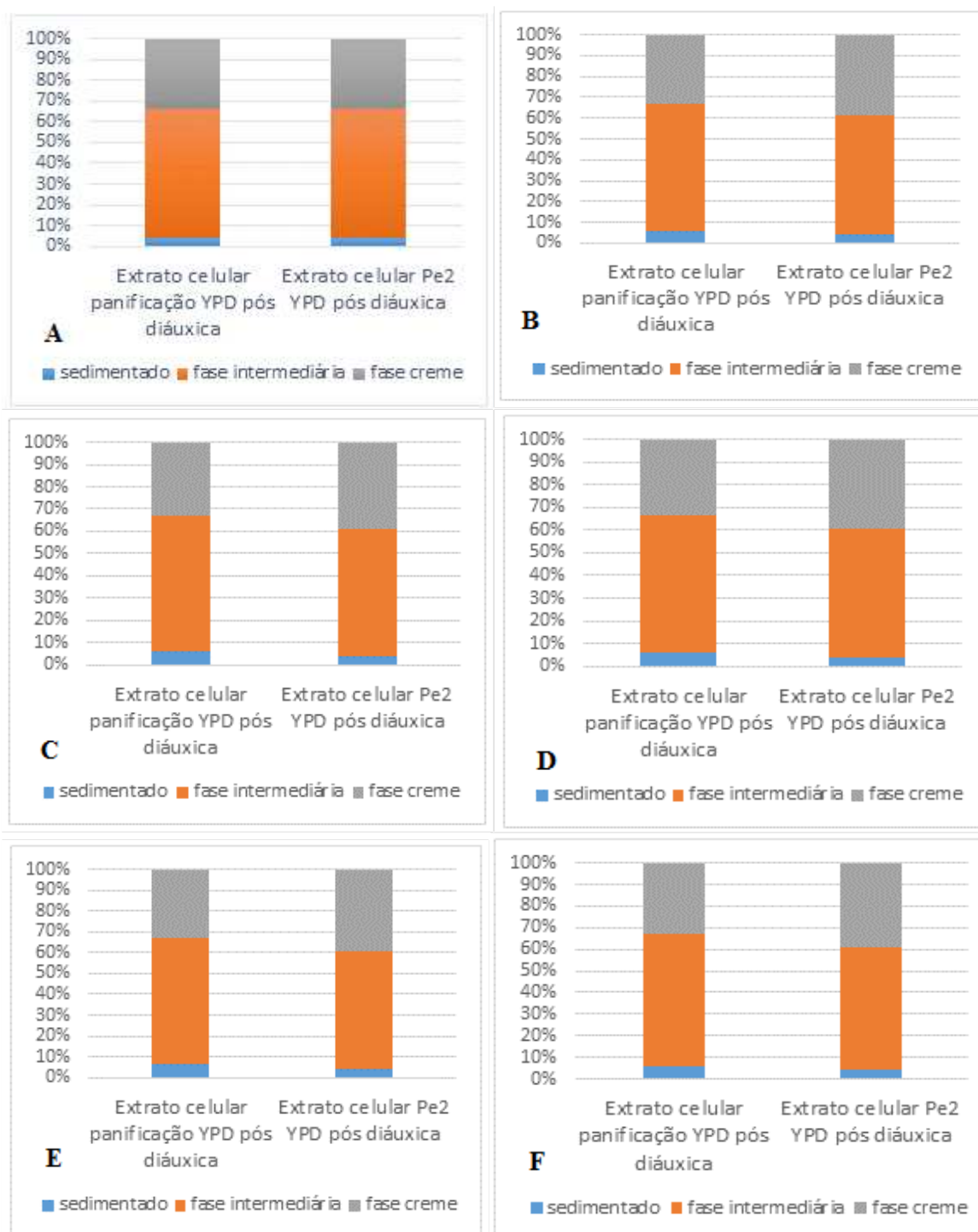


Figura 36. Fração volumétrica das fases superior (creme), intermediária e sedimentado das emulsões ao longo de seis dias de armazenamento. Primeiro dia (A), segunda dia (B), terceiro dia (C), quarto dia (D), quinto dia (E), sexto dia (F).

Aplicando-se a determinação do tamanho de partículas nas diferentes fases da emulsão, observou-se que, nas fases superior e intermediária, a distribuição do tamanho de partículas é bimodal, ou seja, há um grupo de partículas com diâmetro menor, em torno de 5 μm , correspondente às células de levedura e outro grupo de partículas com diâmetro maior, na

faixa de 100 a 250 μm , correspondente às gotas de óleo (hexadecano) (Figuras 37, 38 e 39), conforme também observado por Furtado e colaboradores (2015).

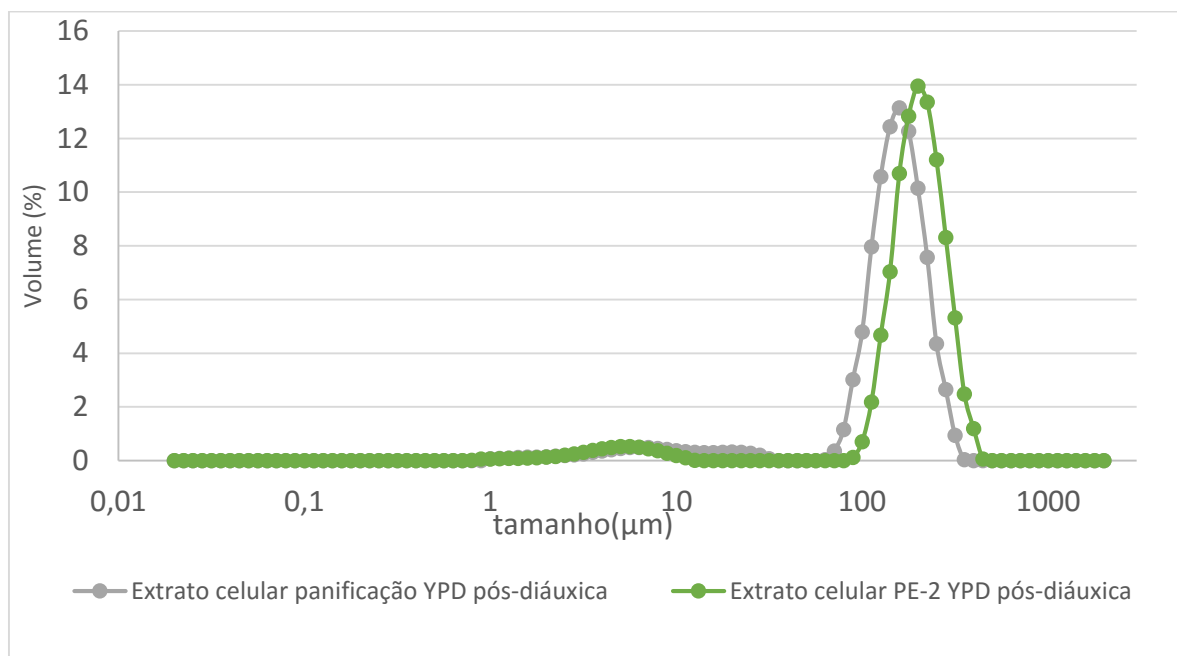


Figura 37. Distribuição do tamanho de partículas na fase superior (creme) das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

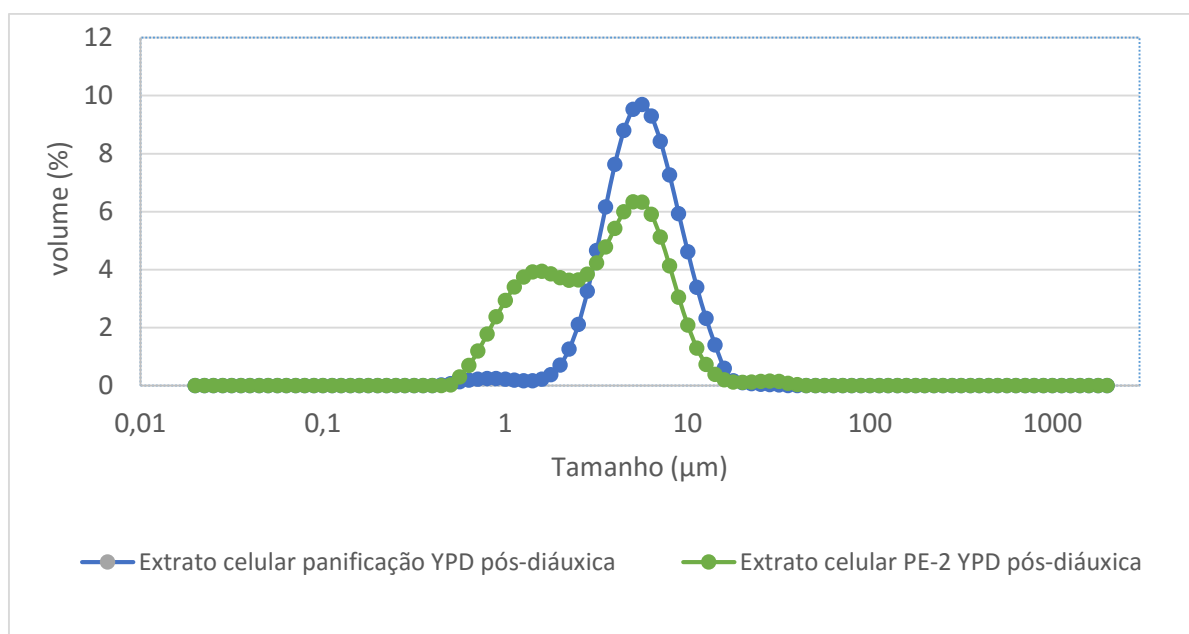


Figura 38. Distribuição do tamanho de partículas na fase intermediária das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

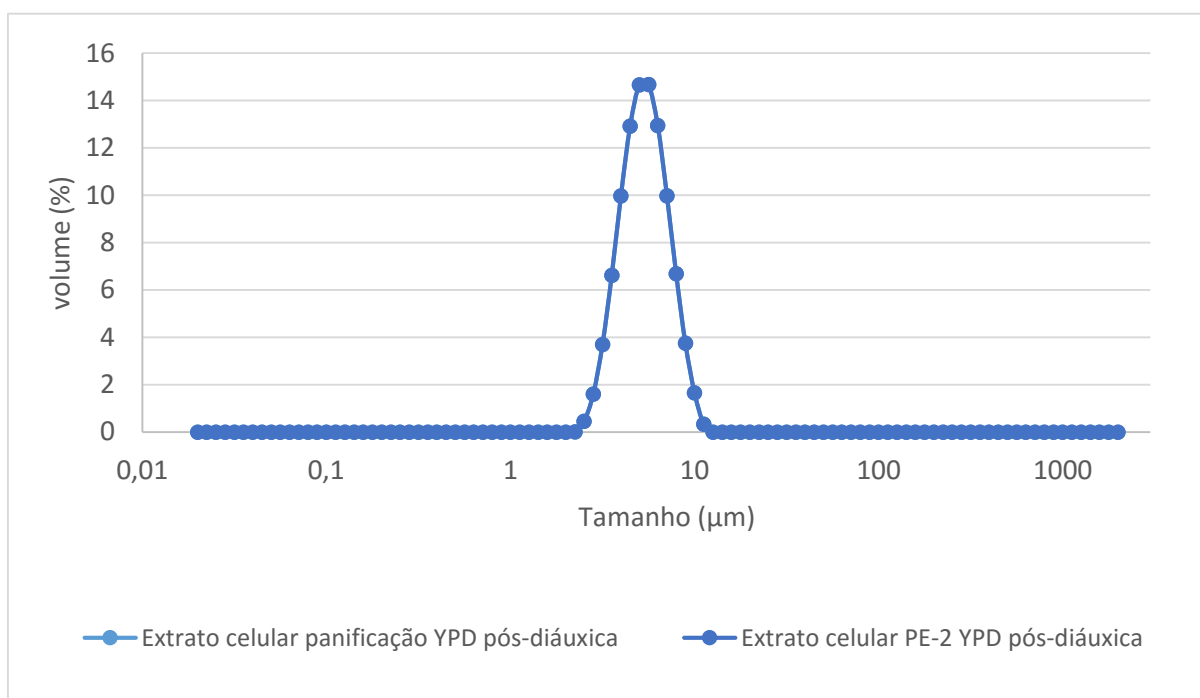


Figura 39. Distribuição do tamanho de partículas na fase sedimentada das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras

A análise de distribuição de tamanho de gotas, mostra que a emulsão com a presença do extrato celular da levedura PE-2 apresentou tamanho de gota maiores comparando com a emulsão com o extrato celular da levedura de panificação, tabela 15. Porém pelo aspecto visual das emulsões, uma maior liberação de óleo após os 6 dias de repouso ocorreu com a emulsão com extrato celular da levedura de panificação.

Tabela 15. Distribuição de tamanho das diferentes fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras em diferentes condições.

Fases	Condição da Fase	0,02 -20 μm		20 -2000 μm	
		% Volume	Moda (μm)	% Volume	Moda (μm)
Superior	Extrato celular				
	Panificação cultivada YPD pós-diáuxica	5,28	6,32	94,72	158,86

Intermediária	Extrato celular PE-2				
	cultivada YPD pós-diáuxica	8,42	5,63	91,58	224,4
	Extrato celular				
	Panificação cultivada YPD pós-diáuxica	100	6,32		
Inferior	Extrato celular PE-2				
	cultivada YPD pós-diáuxica	100	1,58/6,32		
	Extrato celular				
	Panificação cultivada YPD pós-diáuxica	100	5,63		
	Extrato celular PE-2				
	cultivada YPD pós-diáuxica	100	5,63		
	Extrato celular				
	Panificação cultivada YPD pós-diáuxica				

A figura 40 mostra o comportamento reológico das fases superiores das emulsões com extratos celulares. A fase superior obedeceu ao modelo de Herschel Bulkley, onde é necessária uma tensão inicial para começar o escoamento. Na Tabela 16 encontram-se relacionados os parâmetros reológicos dos ajustes aos modelos, e os coeficientes de determinação para cada modelo (R^2).

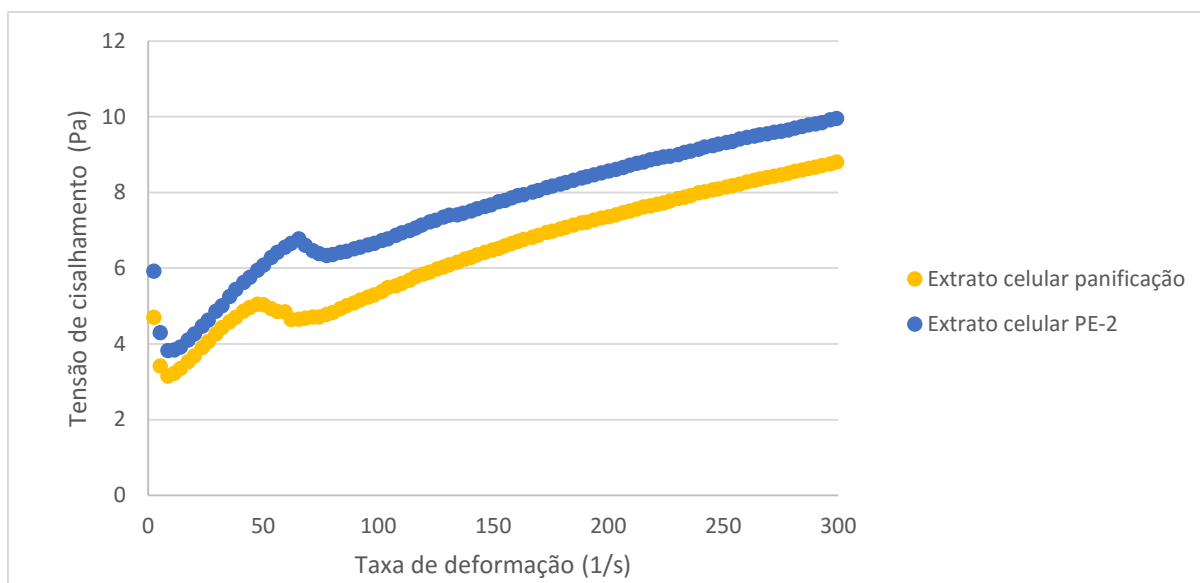


Figura 40. Curvas de escoamento da fase superior (creme) das emulsões preparadas com diferentes soluções aquosas

Tabela 16. Parâmetros reológicos dos ajustes das curvas de escoamentos experimentais aos modelos de Herschel Bulkley (HB)

Fase Aquosa	Fase	Fluido	Parâmetros			R ²
			k (Pa.s ⁿ)	n	ζ	
Extrato celular Panificação	FS	HB	0,357±0,14 ^a	0,883±0,04 ^c	3,435±0,12 ^e	0,985
Extrato celular PE-2	FS	HB	0,153±0,09 ^b	0,648±0,06 ^d	3,784±0,17 ^f	0,981

FS: Fase Superior, HB:Herschel Bulkley. Letras diferentes na mesma coluna significa que há diferença significativa ($p < 0,05$)

A presença de um pico nas curvas de escoamento da fase superior com extratos celulares pode ser devido à resistência inicial ao cisalhamento. Este resultado também foi reportado por Moreira (2015), que afirma que a presença de uma alta concentração de leveduras somada com a interação com a fase óleo aumenta a resistência inicial ao cisalhamento, levando a uma maior viscosidade da emulsão.

Para a fase superior houve algumas diferenças significativas em relação aos parâmetros dependendo da composição da fase aquosa utilizada no preparo das emulsões, com índice de comportamento do fluido (n) variando de 0,64 a 0,88 e índice de consistência (k) de

0,357 a 0,153 Pa.s. A fase creme da emulsão com o extrato célula da linhagem PE-2 apresentou maior viscosidade, o que pode ser atribuído mais uma vez à maior presença de leveduras na interface das gotas (8,42%), confirmando a hipótese para os resultados de reologia do item 5.5.

Na Figura 41 estão descritas as cinéticas de tensão interfacial entre o hexadecano e as diferentes suspensões aquosas, e tensões interfaciais obtidas no equilíbrio. Todas foram realizadas em uma hora e meia para o alcance do equilíbrio. A água Milli-Q foi utilizada como branco para as amostras. A amostra com extrato celular da linha PE-2 levou mais tempo para chegar no patamar de equilíbrio, porém ao final da cinética as duas amostras apresentaram valores próximos de tensão interfacial.

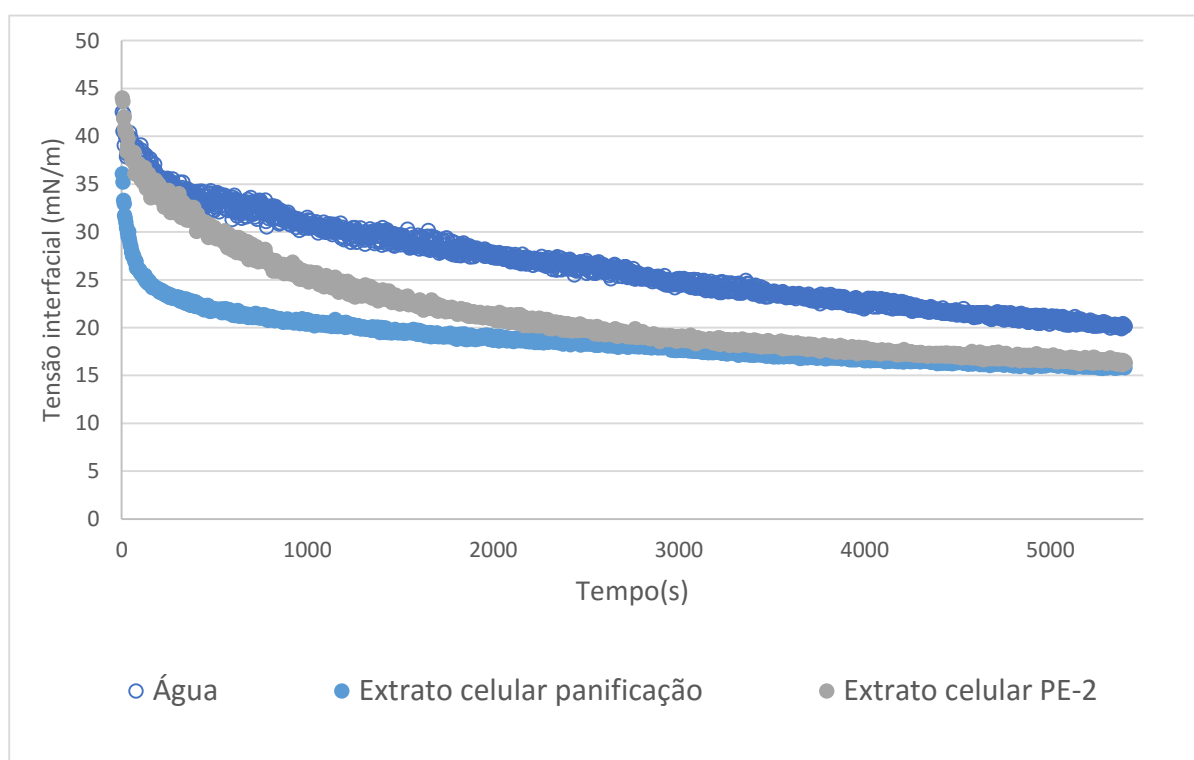


Figura 41. Cinética de tensão interfacial entre o hexadecano e diferentes suspensões aquosas

O potencial zeta é uma medida da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade da emulsão. Essa análise mostra como o emulsificante irá interagir quando estiver localizado na interface entre o óleo e água para formar a emulsão. É possível saber se ocorrerá dispersão, agregação ou floculação. Na determinação da densidade de cargas quando um valor obtido é alto, as forças repulsivas predominam em relação às atrativas, indicando que as partículas se repeliram, ou seja, existe uma maior estabilidade da dispersão. Em casos de resultados com valores baixos, as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, representam instabilidade na

dispersão, visto que as partículas se aproximaram umas das outras até se agregarem (FRANGE; GARCIA, 2009).

As densidades de carga das diferentes fases aquosas usadas no preparo das emulsões neste conjunto de experimentos estão apresentadas na Tabela 17. De acordo com Riddick (1968) valores de potencial zeta entre -41 e -60 mV indicam boa estabilidade das suspensões, valores entre -31 e -40 mV indicam estabilidade média, para uma faixa entre -16 e -30 mV é observada dispersão com baixa estabilidade e valores entre -10 e -15 mV apontam início de aglomeração. As duas suspensões de extrato de leveduras apresentaram características de uma dispersão com baixa estabilidade

Tabela 17. Densidade de carga superficial em diferentes condições da levedura

	Densidade de carga (mV)	pH
Extrato celular panificação	-28,62±0,39 ^a	5,90±0,02 ^c
Extrato celular Pe-2	-21,35±0,52 ^b	6,26±0,02 ^d

Letras iguais na mesma coluna significam que não há diferença significativa entre as medidas ($p < 0,05$).

Na Figura 42, encontra-se as microscopias das fases separadas das emulsões preparadas com as duas suspensões aquosas levedura (Extrato celular panificação pós-diáuxica, Extrato celular PE-2 pós-diáuxica,). As micrografias mostram novamente que a interface da gota de óleo da fase superior (creme) está circundada por leveduras, impedindo a coalescência das gotas, esse fato também foi observado por Furtado e colaboradores (2015) e Moreira (2015). Como pode ser observado pelas micrografias, as fases intermediárias, são constituídas basicamente por água com algumas gotas dispersas e leveduras em suspensão; e as fases inferiores, por células ou material celular precipitado, confirmando os resultados obtidos na análise de tamanho de partícula.

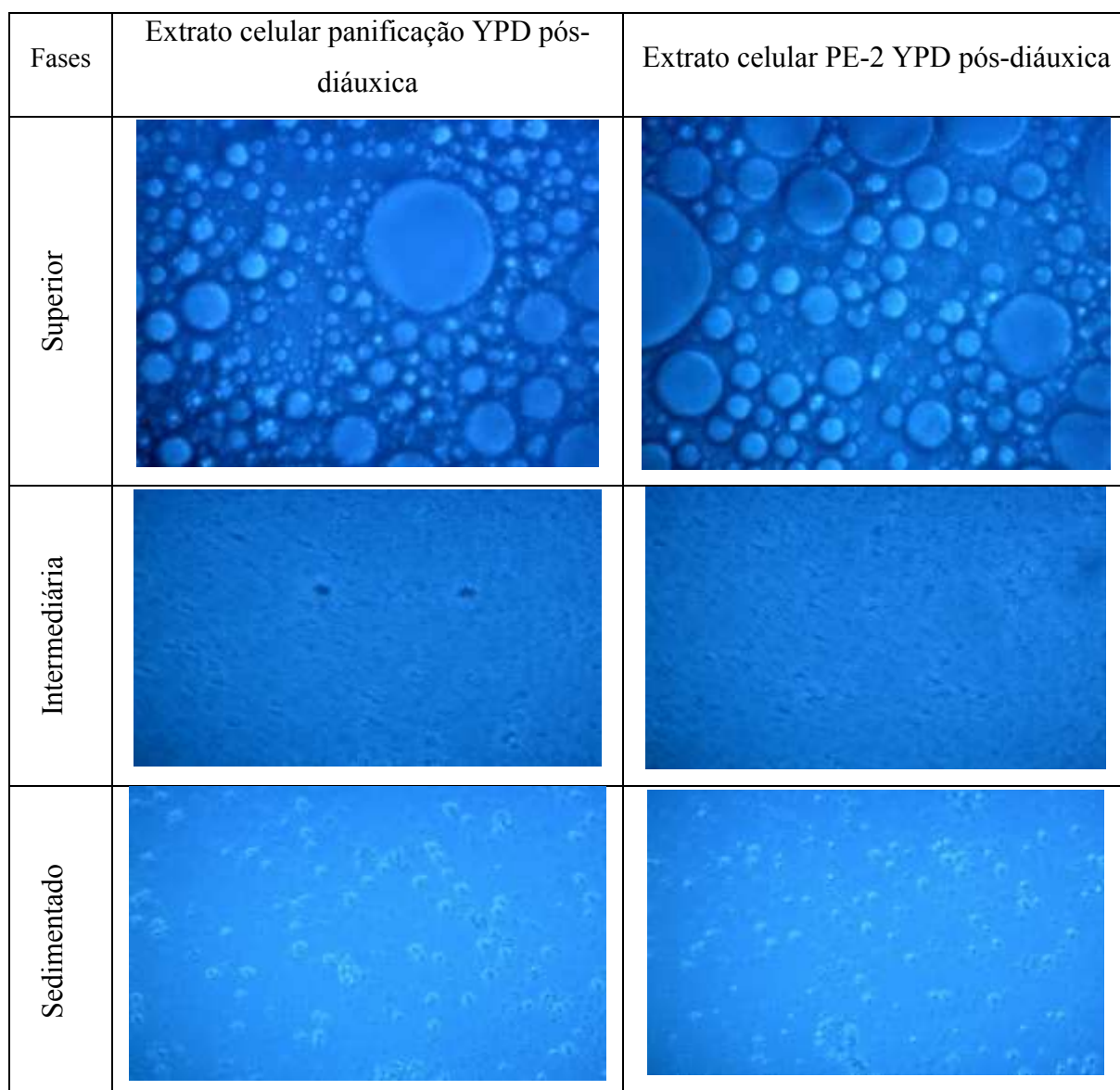


Figura 42. Micrografias das fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras mais bactérias. Aumento de 400 vezes

Foi possível concluir nesta quinta etapa de experimentos, que o rompimento da parede celular da levedura promove emulsões com características diferentes, quando comparado com as emulsões do item 5.4. Através do aspecto visual das emulsões, a emulsão com extrato celular da linhagem de panificação ao final dos 6 dias de repouso, foi a que formou o maior volume de óleo desprendido no topo da proveta, ou seja, foi a emulsão menos estável. A análise de tamanho de partículas mostrou que a emulsão com a presença do extrato celular da levedura PE-2 apresentou tamanho de gota maiores comparando com a emulsão com o extrato celular da levedura de panificação. O ensaio de reologia mostrou que a emulsão com a o extrato celular da linhagem PE-2 promoveu emulsões mais estáveis do que as emulsões com células de panificação, em razão de uma maior viscosidade da fase creme devido à maior presença das células ao redor das gotas de óleo.

5.6 Emulsões com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*













Diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* têm se adaptado muito bem às condições de estresses industriais para produção de biocombustíveis (FERREIRA et al., 2010; BASSO et al, 2008). No entanto, apesar dos procedimentos de assepsia empregados na indústria do etanol, contaminações bacterianas são frequentes, o que causa diminuição do rendimento e da produtividade do processo. A contaminação bacteriana é considerada como um dos principais inconvenientes durante a produção de etanol industrial. Ao mesmo tempo, as bactérias consomem os açúcares da matéria-prima que a levedura utilizaria para produção do etanol e algumas bactérias produzem metabólitos, ácido láctico e acético, que inibem a atividade da levedura durante a fermentação, causando baixos rendimentos de conversão de substrato a etanol, floculação celular e diminuição da viabilidade celular. A maioria das bactérias contaminantes na dorna de fermentação são bactérias ácido lácticas, provavelmente porque essas são mais adaptadas para suportar baixos valores de pH e de concentrações elevadas de etanol. O gênero *Lactobacillus* é o que está em maior presença nas usinas de etanol brasileiras (BASSO et al., 2011; DELLA-BIANCA et al., 2013).

Em nosso grupo de pesquisa, verificamos que a presença da levedura *S. cerevisiae* contribui para a estabilização das referidas emulsões, mas não sabemos ainda se a presença de contaminantes irá contribuir para um aumento ou uma diminuição desta estabilização. Desta maneira, o objetivo desse conjunto de experimentos foi verificar a influência da presença de contaminantes, *Lactobacillus fermentum*, do processo industrial de produção de etanol combustível, na estabilidade de emulsões formadas na indústria de biocombustíveis avançados.

Foram preparadas dois tipos de emulsões com 30% (v/v) de hexadecano e 70% (v/v) de suspensão aquosa de *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem de Panificação) e *Lactobacillus fermentum*, na outra emulsão a linhagem de panificação foi substituída pela linhagem PE-2. Estas foram retiradas no momento em que se alcançou a fase estacionária pós-diáuxica, na concentração de 5% de levedura + 5% de bactéria (m/m). Após 24 h de repouso, as emulsões formaram um sistema trifásico: superior (creme) emulsão óleo em água, intermediária leveduras e bactérias e gotas de óleo em suspensão aquosa e inferior (sedimentado de leveduras e bactérias).

Na figura 43 são apresentados os aspectos das emulsões logo depois do preparo e após 1, 3 e 6 dias de armazenamento. É possível notar neste conjunto de experimentos que a emulsão contendo *S. cerevisiae* PE-2 + *Lactobacillus fermentum* formou uma emulsão mais instável do que uma emulsão com a presença somente da levedura, sendo que após 24 h de

repouso já ocorreu praticamente todo o desprendimento de óleo da fase creme. A sedimentação da bactéria *Lactobacillus fermentum* ocorre de maneira mais lenta ao longo dos dias pois o diâmetro da célula chega a ser 5 vezes menor que a levedura (JAY, 1992), por isso a fase intermediária apresenta muitas partículas em suspensão até o terceiro dia de repouso. No sexto dia de repouso é possível visualizar praticamente uma fase óleo continua, com apenas uma emulsão residual entre as fases óleo e água na proveta.

<div>Fase Aquosa</div> <div>Tempo (dias)</div>	Panificação cultivada YPD pós-diauxica	Panificação + <i>Lactobacillus</i>	PE-2 cultivada YPD pós- diauxica	PE-2 + <i>Lactobacillus</i>
0				
1				
3				

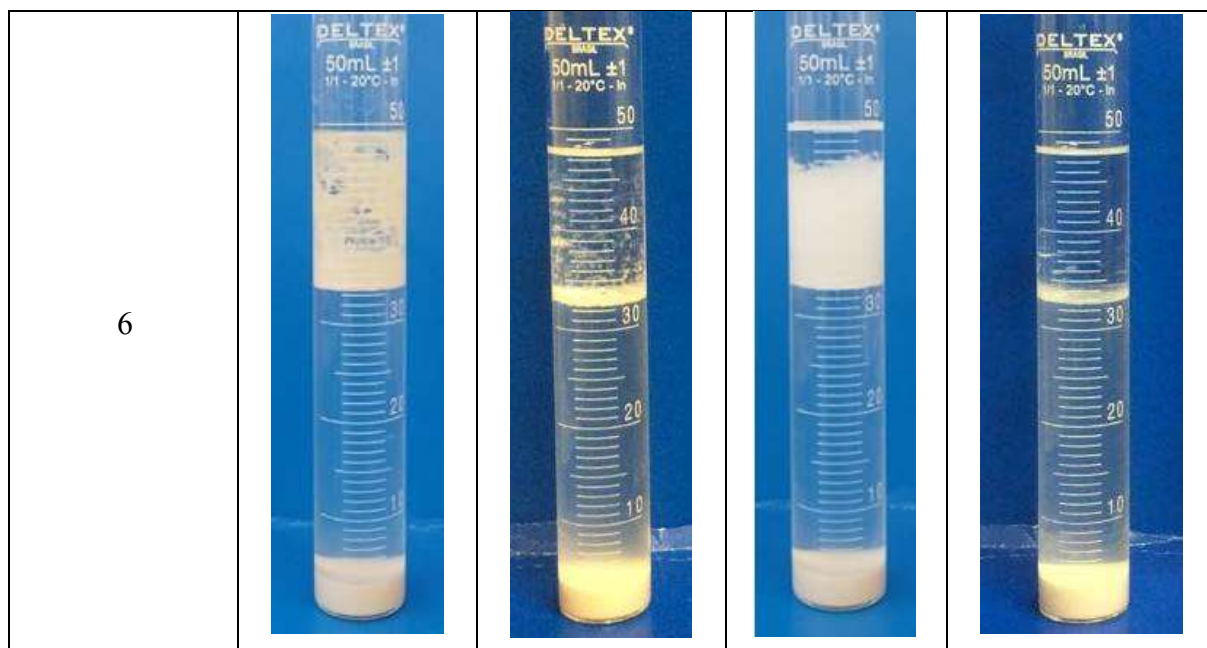


Figura 43. Aspecto visual de emulsões preparadas com hexadecano e levedura, em que são visíveis as 3 fases formadas: topo, intermediária e fundo. Panificação cultivada YPD pós diáuxica (emulsão com levedura de panificação cultiva em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxia). Panificação + *Lactobacillus* (emulsão com levedura de panificação cultiva em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxia mais a bactéria *Lactobacillus fermentum*). PE-2 cultivada YPD pós diáuxica (emulsão com levedura PE-2 cultiva em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxia). PE-2 + *Lactobacillus* (emulsão com levedura PE-2 cultiva em meio complexo em estado fisiológico de pós-diáuxia mais a bactéria *Lactobacillus fermentum*). São apresentadas imagens imediatamente após o preparo das emulsões e 1,3 e 6 dias após o preparo, a temperatura ambiente.

Aplicando-se a determinação do tamanho de partículas nas diferentes fases da emulsão, observou-se que, nas fases superior e intermediária, a distribuição do tamanho de partículas é trimodal, ou seja, há um grupo de partículas com diâmetro menor, em torno de 1 e 5 μm , correspondente às células de bactéria e levedura, respectivamente. E outro grupo de partículas com diâmetro maior, na faixa de 100 a 200 μm , correspondente às gotas de óleo (hexadecano) (Figuras 44, 45 e 46), conforme também observado por Furtado e colaboradores (2015).

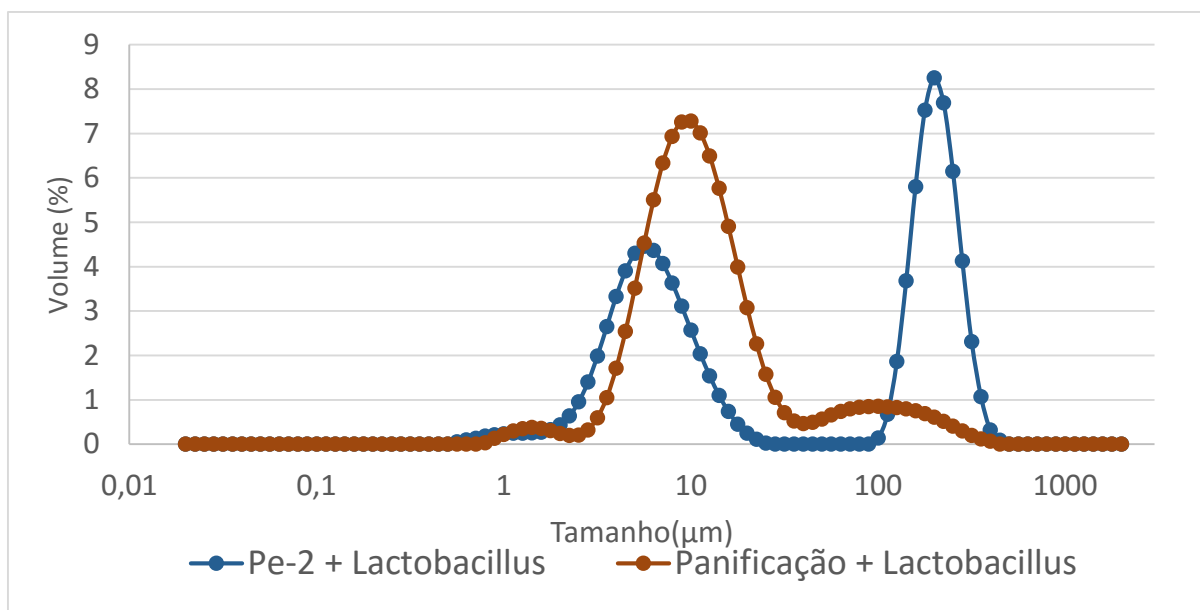


Figura 44. Distribuição do tamanho de partículas na fase superior (creme) das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras mais bactérias.

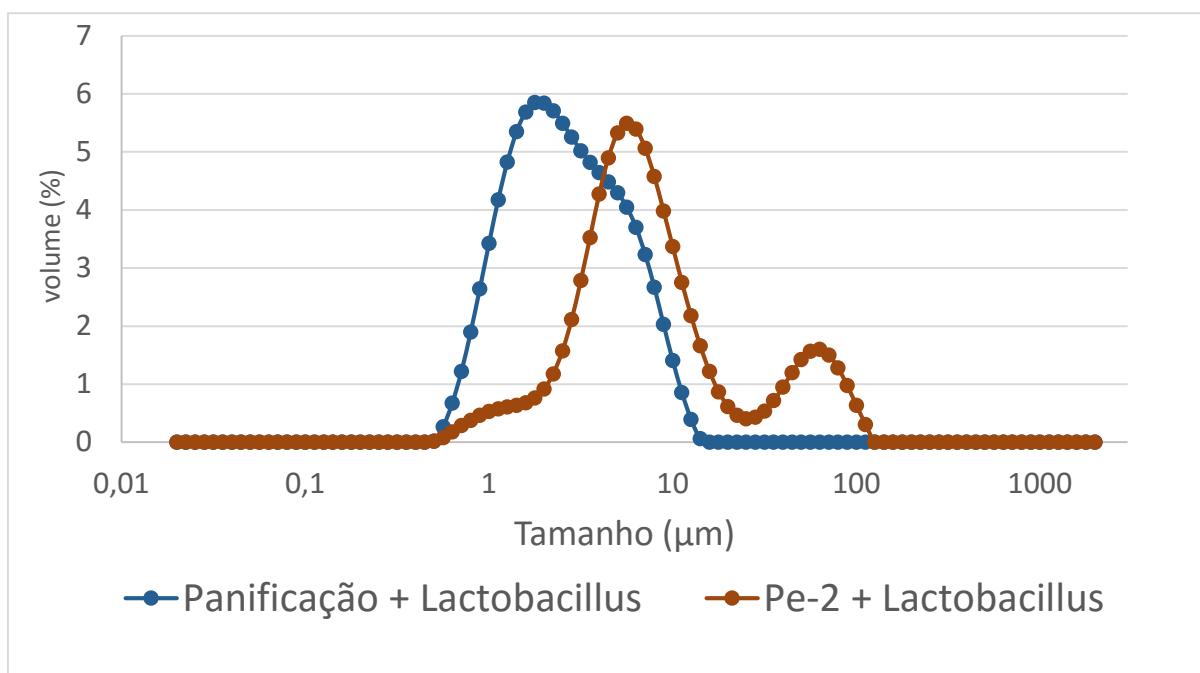


Figura 45. Distribuição do tamanho de partículas na fase intermediária das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras mais bactérias

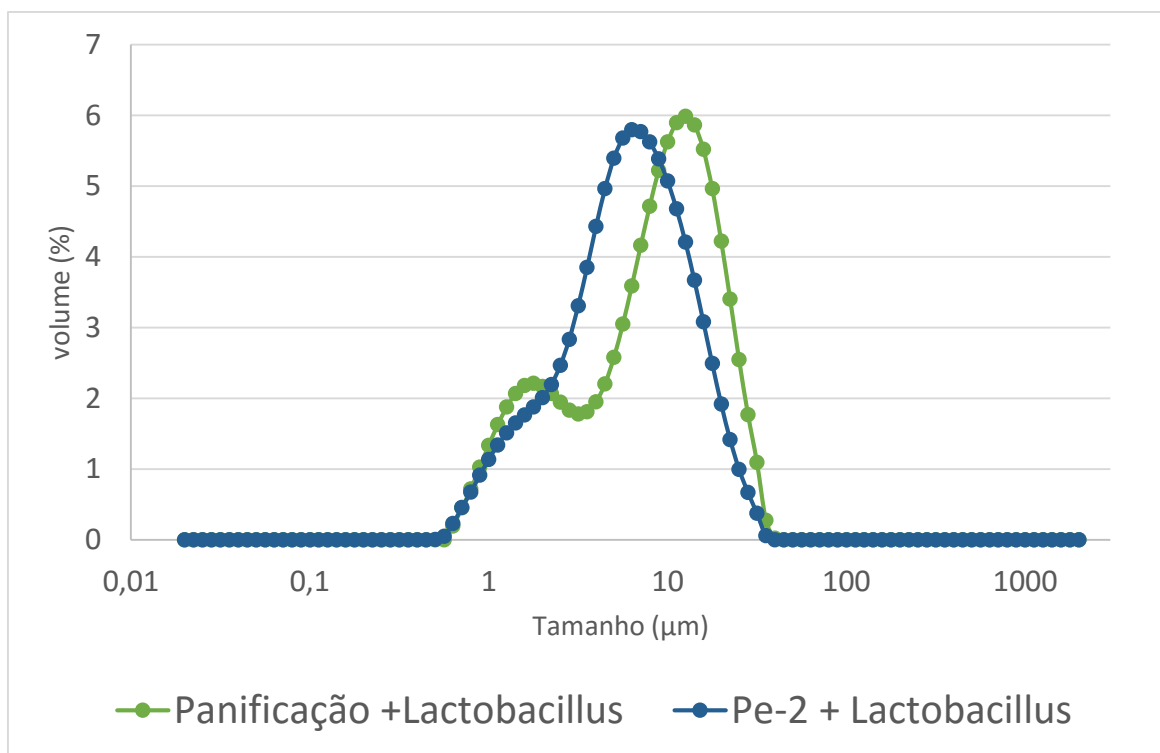


Figura 46. Distribuição do tamanho de partículas na fase sedimentada das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras mais bactérias

A análise de distribuição de tamanho de gotas, mostra que a emulsão com a presença da levedura PE-2 + *Lactobacillus* apresentou tamanho de gota maiores, tabela 18. Pelo aspecto visual das emulsões, uma maior liberação de óleo ocorre após os 6 dias de repouso para emulsão PE-2 + *Lactobacillus* em relação a emulsão Panificação + *Lactobacillus*, confirmando os resultados de análise de tamanho de partícula.

Tabela 18. Distribuição de tamanho das diferentes fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras em diferentes condições.

Fases	Condição da Fase	0,02 -20 μm		20 -2000 μm	
		% Volume	Moda (μm)	% Volume	Moda (μm)
Superior	Panificação +Lactobacillus	90,27	11,24	9,73	112,47
	PE-2 +Lactobacillus	21,68	5,63	78,32	200

Intermediária	Panificação +Lactobacillus	100	1,78		
	PE-2 +Lactobacillus	88,16	5,63	11,84	63,24
Inferior	Panificação +Lactobacillus	100	11,24		
	PE-2 +Lactobacillus	100	6,32		

Emulsões contendo células bacterianas, que são menores que as células de levedura, poderiam levar a um aumento da estabilidade das emulsões, pois, sendo menores, as células bacterianas seriam capazes de formar uma camada com mais células na superfície externa das gotas de óleo, evitando a agregação das gotículas de óleo. No entanto, o que se observou é que as emulsões ficaram menos estáveis. Alguns estudos relatam que resíduos de aminoácidos da superfície de *Lactobacillus fermentum* e resíduos de carboidratos das leveduras são os responsáveis pelo desenvolvimento do fenômeno da floculação durante a fermentação para a produção do etanol e outros biocombustíveis (LUDWIG et al 2001; OLIVA-NETO et al, 2014). Provavelmente as células de *Lactobacillus fermentum* estão interagindo de tal forma com as leveduras que a sedimentação das leveduras ocorreu mais rapidamente ao longo do tempo.

O potencial zeta é uma medida da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade da emulsão. Essa análise mostra como o emulsificante irá interagir quando estiver localizado na interface entre o óleo e água para formar a emulsão. É possível saber se ocorrerá dispersão, agregação ou floculação. Na determinação da densidade de cargas quando um valor obtido é alto, as forças repulsivas predominam em relação às atrativas, indicando que as partículas se repeliram, ou seja, existe uma maior estabilidade da dispersão. Em casos de resultados com valores baixos, as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, representam instabilidade na dispersão, visto que as partículas se aproximaram umas das outras até se agregarem (FRANGE; GARCIA, 2009).

As densidades de carga para as duas fases aquosas usadas no preparo das emulsões neste conjunto de experimentos estão apresentadas na Tabela 19. De acordo com Riddick (1968) valores de potencial zeta entre -41 e -60 mV indicam boa estabilidade das suspensões, valores entre -31 e -40 mV indicam estabilidade média, para uma faixa entre -16 e -30 mV é observada dispersão com baixa estabilidade e valores entre -10 e -15 mV apontam início de aglomeração. As suspensões de leveduras mais bactérias apresentaram um comportamento de

aglomeração, a interação entre a bactéria e a levedura favorece o fenômeno da floculação, logo a formação das emulsões usando estas suspensões são mais instáveis, devido a sedimentação mais rápida das células ao longo do tempo. (SANTOS; OLIVA-NETO, 1993).

Tabela 19. Densidade de carga superficial em diferentes condições da levedura

	Densidade de carga (mV)	pH
Panificação + <i>Lactobacillus fermentum</i>	-14,52±1,08 ^a	5,91±0,02 ^c
PE-2 + <i>Lactobacillus fermentum</i>	-17,35±0,83 ^b	6,07±0,02 ^d

Letras iguais na mesma coluna significam que não há diferença significativa entre as medidas (p<0,05)

Na Figura 47, encontram-se as microscopias das fases separadas das emulsões preparadas com as duas suspensões aquosas levedura (Panificação + *Lactobacillus fermentum*, PE-2 + *Lactobacillus fermentum*). As micrografias mostram gotas de óleo com pouca presença de leveduras na fase superior (creme). Como pode ser observado pelas micrografias, as fases intermediárias e sedimentadas, são constituídas basicamente por água com aglomerados de leveduras e bactérias, isso confirma os resultados de densidade de carga superficial.

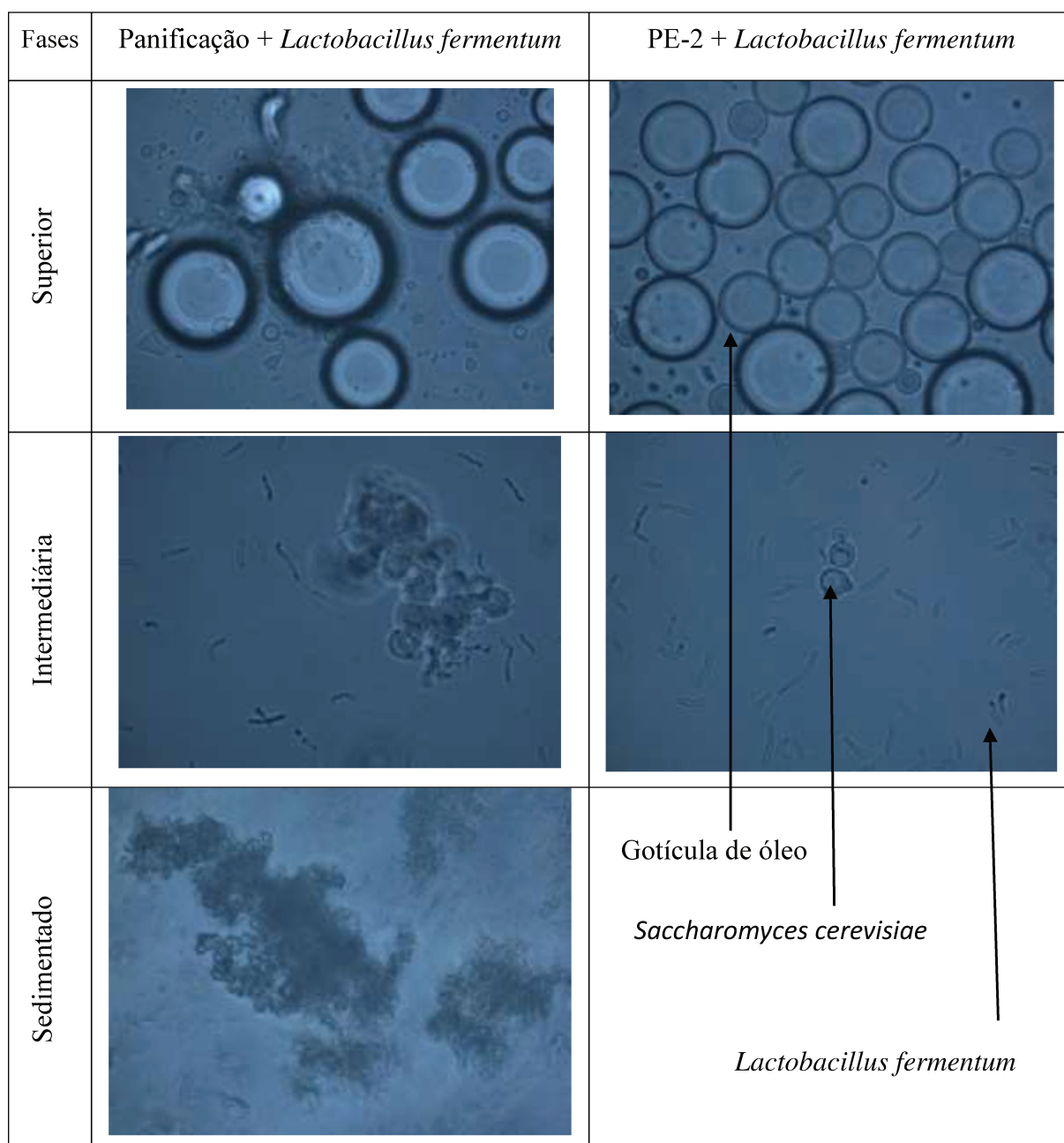


Figura 47. Micrografias das fases das emulsões preparadas com suspensões aquosas de leveduras mais bactérias . Aumento de 400 vezes

Foi possível concluir nesta sexta etapa de experimentos, que a presença da bactéria *Lactobacillus fermentum* influencia bastante na formação e na estabilidade das emulsões. Ao final de 6 dias de repouso, existe uma fase contínua de óleo para as duas emulsões, apenas uma emulsão residual na interface entre o óleo e água permanece. A análise de tamanho de partículas mostrou que a emulsão com a presença da levedura PE-2 + *Lactobacillus fermentum* apresentou tamanho de gota maiores, logo a separação da fase óleo foi mais rápida ao longo dos dias para esta amostra. A análise de densidade de carga mostrou que as suspensões de leveduras mais bactérias apresentaram um comportamento de aglomeração, a interação entre a bactéria e a

levedura favorece o fenômeno da floculação celular, logo as emulsões formadas usando estas suspensões são menos estáveis em relação as emulsões sem a presença da bactéria.

5.7 Ensaio de crescimento em placa com diluições seriadas

Este último conjunto de experimentos foi realizado para avaliar de forma qualitativa, quais os efeitos observáveis no desenvolvimento das colônias formadas quando diferentes fontes de carbono lipídicas eram adicionadas no meio de cultivo (oleato e hexadecano). Esse ensaio foi motivado para tentar descobrir se *Saccharomyces cerevisiae* consegue crescer e consumir o óleo (hexadecano) que foi utilizado nos experimentos de emulsificação.

O método aplicado nessa etapa foi adaptado do protocolo utilizado por Della-Bianca e Gombert (2013) e Lockshon e colaboradores (2007). O ensaio de diluição seriada permite isolar células que irão originar uma única colônia, quando são empregadas as suspensões mais diluídas (à direita na placa), permitindo uma melhor visualização e comparação dos resultados, figura 48.

S. cerevisiae cataboliza glicose, sacarose, maltose de maneira eficiente, gerando pouca quantidade de glicerol e quase nenhum ácido graxo, pois não utiliza de maneira eficiente ácidos graxos para gerar energia, devido a sua capacidade limitada de quebrar as moléculas de ácidos graxos no peroxissoma para gerar acetil-CoA (β -oxidação) (TEHLIVETS et al., 2007). Por não ser capaz de secretar lipases, *S. cerevisiae* tem dificuldades em utilizar triacilgliceróis e ácidos graxos como fonte de carbono (BACCIONI, 2015; DARVISHI, 2012).

Das fontes de carbono investigadas oleato e hexadecano, os resultados mostram que essas duas fontes de carbono são assimiláveis para as três linhagens. Esse fato já era esperado com o meio de cultura com oleato, pois esta molécula é necessária para a levedura realizar suas atividades metabólicas e tem importante papel na formação da parede celular (ISHTAR SNOEK; YDE STEENSMA, 2007). O objetivo de substituir o oleato pelo hexadecano era tentar descobrir se a *Saccharomyces cerevisiae* tem a capacidade de crescer e consumir este hidrocarboneto saturado. Foi possível visualizar que a levedura, independentemente da linhagem, consegue crescer na presença dessa molécula, mas não se pode afirmar apenas visualmente que a levedura pode consumir o hexadecano, pois ao redor da colônia formada o meio de cultura não ficou translúcido como ocorreu com a placa com oleato.

Pfammatter et al (1989) realizaram um estudo em que foram preparadas microemulsões, utilizando água, hexadecano e levedura de panificação comercial, para saber qual o comportamento da *S. cerevisiae* numa emulsão. Estes autores conseguiram mostrar que

a viabilidade celular diminuiu apenas 20% ao longo de 10 dias de repouso, mas não conseguiram afirmar que a levedura consome o hexadecano. Entretanto, a levedura consegue sobreviver em condições com menos de 1% de água na emulsão. Li et al (2009) usaram hexadecano para suplementar a presença de oxigênio no meio de cultura aumentando o metabolismo aeróbico da *S. cerevisiae*, eles mostraram que pode ser interessante a adição de hexadecano a culturas de *S. cerevisiae*. Com a adição de hexadecano no meio de cultivo, ocorre um aumento na produção de *S*-adenosilmetionina, molécula importante para o metabolismo dos seres vivos, o interessante é que a célula não consome energia a mais para produzir esse composto. Deng et al (2010) realizaram um estudo com o objetivo de estudar as propriedades da superfície celular de algumas linhagens de levedura. A habilidade de emulsificação do hexadecano pela *S. cerevisiae* foi considerada baixa quando comparada com outras linhagens de levedura (*Pichia anomala* e *Rhodotorula dairenensis*). Entre todas as linhagens estudadas, *S. cerevisiae* foi a levedura que apresentou a menor hidrofobicidade na superfície da célula, quando esteve presente com hexadecano.

Foi possível concluir nesta sétima etapa de experimentos, que a *S. cerevisiae* é capaz de consumir a molécula do oleato pois esta molécula é necessária para a levedura realizar suas atividades metabólicas e porque foi visível um halo translúcido ao redor das colônias de levedura observadas em placa. Com o ensaio de crescimento, foi possível notar que a *S. cerevisiae* consegue crescer em meio de cultura com a presença do hexadecano, porém seria necessário realizar mais experimentos para poder afirmar que a *S. cerevisiae* pode consumir a molécula do hexadecano, já que não se pôde observar um halo translúcido ao redor das colônias em placa. Se isso de fato ocorrer (consumo de hexadecano), a levedura pode estar secretando alguma lipase ou emulsificante para o consumo desse substrato lipídico.







	CEN.PK113-7D	Panificação	PE-2
Oleato			
Hexadecano			

Figura 48. Resultados dos ensaios em meio solidificado para avaliação da capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono (oleato e hexadecano), os resultados apresentados são referentes a 48 h de incubação.

6 CONCLUSÕES

Com a realização dos experimentos descritos nesta dissertação, podemos concluir que a mistura de hexadecano com uma fase aquosa contendo leveduras resultou, em todos os casos, num sistema trifásico, o qual, após 24 h de repouso, era constituído das seguintes fases: superior ou creme (emulsão óleo em água), intermediária (leveduras e gotas de óleo em suspensão aquosa) e inferior (sedimentado de leveduras).

Compostos presentes na água de lavagem da levedura fresca, comercial, ajudam no processo de emulsificação. Por isto, para permitir uma melhor comparação entre as diferentes linhagens de levedura que se pretendia estudar, passou-se a preparar emulsões a partir de leveduras estocadas em ultrafreezer a -80 °C.

Curvas de crescimento geradas com as diferentes linhagens de *S. cerevisiae* (linhagem de panificação e PE-2), permitiram a observação das fases: exponencial, estacionária pré-diauxica e estacionária pós-diauxica, nos seguintes intervalos de tempo, respectivamente: entre 8 e 16 h fase exponencial, entre 16 e 22 h de cultivo fase estacionária pré-diauxica, entre 38 e 48 h de cultivo fase estacionária pós-diauxica, para a linhagem de panificação. Entre 18 e 22 h de cultivo fase estacionária pré-diauxica, entre 34 e 48 h de cultivo fase estacionária pós-diauxica, para a linhagem PE-2

O cultivo das células de levedura, tanto em meio complexo, como em meio sintético, promove emulsões menos estáveis, quando comparadas com emulsões preparadas com a mesma linhagem de levedura, porém utilizada na forma fresca (comercial), sem passar pela etapa de cultivo.

O estado fisiológico da levedura e a linhagem utilizada influenciam na estabilidade das emulsões. Células de levedura em fase estacionária pós-diauxica promovem a formação de emulsões menos estáveis do que células em fase estacionária pré-diauxica. A linhagem PE-2 promoveu emulsões mais estáveis do que as emulsões com células de panificação, provavelmente em razão de uma maior viscosidade da fase creme. A suspensão de levedura com células PE-2 pré-diauxicas apresenta um comportamento de início de aglomeração, isso pode ser uma justificativa para que não tenha ocorrido emulsão para esta condição.

O rompimento da parede celular da levedura e o consequente uso de extratos celulares promove emulsões com características diferentes, quando comparadas com as emulsões com leveduras integras. A emulsão com extrato celular da linhagem de panificação, ao final dos 6 dias de repouso, foi a que formou o maior volume de óleo desprendido no topo

da proveta em relação a emulsão com extrato celular da linhagem PE-2, ou seja, foi a emulsão menos estável.

A presença de um contaminante típico do processo industrial de produção de etanol combustível (*Lactobacillus fermentum*) influencia bastante na formação e na estabilidade das emulsões. Ao final de 6 dias de repouso, é possível visualizar praticamente uma fase óleo contínua, com apenas uma emulsão residual entre as fases óleo e água na proveta. A interação entre a bactéria e a levedura favorece o fenômeno da floculação celular (aglomeração) da levedura, logo as emulsões usando estas suspensões são menos estáveis, quando comparadas com emulsões sem o contaminante.

Há crescimento de colônias de *S. cerevisiae* em placas de petri contendo meio de cultivo com hexadecano. No entanto, não é possível afirmar que o hexadecano é consumido pela levedura, pois não foram observados halos transparentes em torno das colônias, como ocorrer quando o oleato é usado em vez de hexadecano. O crescimento pode ter ocorrido às custas de reservas energéticas internas da levedura, por exemplo do glicogênio.

Com base nos resultados obtidos neste projeto de mestrado, o uso da linhagem de panificação em fase estacionária pós-diáuxica, sem a presença do *L. fermentum*, apresenta o potencial de formar emulsões menos estáveis. Essas condições poderiam ajudar a diminuir o tempo de processo e diminuir o custo de produção do farneseno.

De maneira geral, os resultados permitiram concluir que as leveduras têm uma grande importância tanto na formação, como na estabilidade de emulsões. Muitas variáveis influenciam na formação das emulsões, como por exemplo: a linhagem da levedura, o estado fisiológico das células, a composição do meio em que as leveduras foram cultivadas antes do preparo das emulsões, presença de outros microrganismos como bactérias e a integridade das células de levedura. Mais estudos são necessários para que a estabilidade destas emulsões possa ser melhor compreendida, em termos moleculares. Este entendimento poderá levar a estratégias mais eficientes e econômicas para aplicação em bioprocessos industriais de obtenção de biocombustíveis usando leveduras.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a viabilidade celular da população de leveduras na emulsão durante os dias de descanso da proveta;
- Estudar como outras linhagens, industriais e laboratoriais, da *Saccharomyces cerevisiae* podem contribuir para a estabilidade das emulsões;
- Estudar qual o comportamento de leveduras oleaginosas nas emulsões estudadas;
- Estudar o genoma da levedura e verificar se há genes que codificam proteínas que podem estar envolvidas no processo de emulsificação;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1591-1601, 2014.

ACCORSINI, F. R. et al. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 116-125, 2012.

AJANOVIC, A.; HAAS, R. On the future prospects and limits of biofuels in Brazil, the US and EU. **Applied Energy**, v. 135, p. 730-737, 2014.

ALCANTARA, V. A., PAJARES, I. G., SIMBAHAN, J. F., & RUBIO, M. L. D. Substrate Dependent Production and Isolation of an Extracellular Biosurfactant from *Saccharomyces cerevisiae* 2031. **Philippine Journal of Science**, v. 141, p. 13-24, 2012.

ALVES, D. M. G. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica**. 2010 Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

AMARAL, P. F. et al. Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application. In: SEN, R. (Ed.). **Biosurfactants**: Springer New York, v.672, 2010. cap. 18, p.236-249. (Advances in Experimental Medicine and Biology). ISBN 978-1-4419-5978-2.

AMPATZIDIS, C. D.; VARKA, E. M. A.; KARAPANTSIOS, T. D. Interfacial activity of amino acid-based glycerol ether surfactants and their performance in stabilizing O/W cosmetic emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 460, n. 0, p. 176-183, 10/20/ 2014.

ANDRIETTA, M. G. S. et al. Bioethanol - Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

ANTON, N.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.

ARONSSON, K.; RÖNNER, U. Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, n. 2, p. 105-112, 2001.

BACCIOTTI, F. **Fisiologia e formação de partículas lipídicas durante o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica*** IMUFRJ 50682. 2015. 120 (Mestrado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009.

BAMFORTH, C. W. Fermented Beverages. In: ALFEN, N. K. V. (Ed.). **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. Oxford: Academic Press, p.124-136, 2014.

- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists 1789–1850. **Yeast**, v. 14, n. 16, p. 1439-1451, 1998.
- BARNETT, J. A.; ROBINOW, C. F. A history of research on yeasts 4: cytology part II, 1950–1990. **Yeast**, v. 19, n. 9, p. 745-772, 2002.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research** v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO L.C; BASSO T.O; ROCHA S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: Bernardes MAS (ed) **Biofuel production—recent developments and prospects**. Intech, Rijeka, p. 85–100, 2011
- BARRIGA, J. A. T. et al. Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 1–2, p. 96-102, 1999.
- BELLAVER, L. H. et al. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, p. 691-698, 2004.
- BENITO, S. et al. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 15-23, 2011.
- BERMAN, P.; NIZRI, S.; WIESMAN, Z. Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2861-2866, 2011.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.
- BLANCH, H. W. Bioprocessing for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 390-395, 2012.
- BLEVE, G. et al. Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 982-989, 2011.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. 1. Oxford: Blackwell Science, 2001, 659 p.
- BULLIS, K. **Why Amyris is Focusing on Moisturizers, Not Fuel, for Now**. MIT Technology: Disponivel em <http://www.technologyreview.com/>. 2012. Acesso em 13/08/2015.
- CABIB, E.; ARROYO, J. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 648-655, 2013.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 422-427, 1999.

CHAE, H. J.; JOO, H.; IN, M.-J. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. **Bioresource Technology**, v. 76, n. 3, p. 253-258, 2001.

CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M.-A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, n. 0, p. 23-34, 2013.

CHUNG, C.; MCCLEMENTS, D. J. Structure–function relationships in food emulsions: Improving food quality and sensory perception. **Food Structure**, v. 1, n. 2, p. 106-126, 2014.

COSTA, A. G.; MAGNANI, M.; CASTRO-GOMEZ, J. H. Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2012.

COSSU, A. et al. Antifungal activity against *Candida albicans* of starch Pickering emulsion with thymol or amphotericin B in suspension and calcium alginate films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, n. 1–2, p. 233-242, 2015.

CUELLAR, M. C.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Recent advances in the microbial production and recovery of apolar molecules. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 39-45, 2015

DAVIS, R. et al. **Process design and economics for the conversion of lignocellulosic biomass to hydrocarbons: dilute-acid and enzymatic deconstruction of biomass to sugars and biological conversion of sugars to hydrocarbons**. Technical report: National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2013

DA CUNHA, M. E. et al. Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 4, p. 570-575, 2009.

DARVISHI, F. Expression of native and mutant extracellular lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb Biotechnol**, v. 5, n. 5, p. 634-41, 2012

DEAK, T. Ecology and Biodiversity of Yeasts with Potential Value in Biotechnology. In: SATYANARAYANA, G. K. (Ed.). **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Netherlands: Springer, 2009, 747 p.

DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 6, p. 1083-1095, 2013.

DELLA-BIANCA, B. E. et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979-991, 2013.

DELLA-BIANCA, B. E. et al. Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. **FEMS Yeast Research**, 2014.

DICKINSON, J. R. Life cycle and morphogenesis. In: Dickinson, J. R. Schweizer, M. (Ed.). **The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. London: CRC Press, 2004. cap. 1, 476 p.

DICKINSON, E. Hydrocolloids and emulsion stability. In: PHILLIPS, G. O. e WILLIAMS, P. A. (Ed.). **Handbook of Hydrocolloids (Second edition)**: Woodhead Publishing, 2009, p.23-49.

DICKINSON, E. Food emulsions and foams: Stabilization by particles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 40-49, 2010.

DIKIT, P.; MANEERAT, S.; H-KITTIKUN, A. Mannoprotein from spent yeast obtained from thai traditional liquor distillation: extraction and characterization. **Journal of Food Process Engineering**, v. 35, n. 1, p. 166-177, 2012.

DIKIT, P. et al. Characterization of an unexpected bioemulsifier from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 4, p. 465-470, 11/1/ 2010.

DOROBANTU, L. S. et al. Stabilization of Oil-Water Emulsions by Hydrophobic Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6333–6336, 2004.

DENG, Y. et al. Cell surface properties of five polycyclic aromatic compound-degrading yeast strains. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 86, n. 6, p. 1933-9, 2010

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 2, p. 77-84, 2010.

FLEET, G. H. Chapter 5 - Yeast Spoilage of Foods and Beverages. In: Kurtzman, C. P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. (Ed.). **The Yeasts (Fifth Edition)**. London: Elsevier, 2011. p.53-63.

FILHO, E. A. D. S. et al. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 481-486, 2005.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, p. 2091-2099, 2008.

FURTADO, G. F. **Quebra de emulsões modelo visando a produção de biocombustíveis**. 2014. 141 (Mestrado). Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas.

FURTADO, G. F. et al. Breaking oil-in-water emulsions stabilized by yeast. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, n. 0, p. 568-576, 2015.

FRANGE, R.C.C; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, p.263-271,30(3), 2009.

GERALD, R.; TILAK, W. N. **Yeast technology**. New York: AVI, 1991. 459.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546, 563-7, 1996

GOLDEMBERG, J. et al. Oil and natural gas prospects in South America: Can the petroleum industry pave the way for renewables in Brazil? **Energy Policy**, v. 64, n. 0, p. 58-70, 1// 2014.

GUTIÉRREZ, C. P. **Estudio, optimización y escalado de nanoemulsiones o/w preparadas por inversión de fases** 2008. 171 (Doctoral). Departament d'enginyeria química i metallúrgica, Universitat de Barcelona, Barcelona.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 128–130, n. 0, p. 227-248, 2006.

HEALY, M. G.; DEVINE, C. M.; MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 18, n. 1–4, p. 41-57, 1996.

HEERES, A. S. et al. Microbial advanced biofuels production: overcoming emulsification challenges for large-scale operation. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 221-229, 2014.

HOFER, M. Membranes. In: SPENCER, J. F. T. e SPENCER, D. M. (Ed.). **Yeast in Natural and Artificial Habitats**. 1. Berlin: Springer, 1997. cap. 7, p.95-132.

HOON, S. et al. Yeast chemical genomics and drug discovery: an update. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 10, p. 499-504, 2008.

HUNTER, R. J. **Foundations of Colloid Science**. Oxford University Press, 2001.

HUNTER, T. N. et al. The role of particles in stabilising foams and emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 137, n. 2, p. 57-81, 2008.

ISHTAR SNOEK, I. S.; YDE STEENSMA, H. Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2007.

IVANOV, I. B.; KRALCHEVSKY, P. A. Stability of emulsions under equilibrium and dynamic conditions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 128, n. 1–3, p. 155-175, 1997.

JAFARI, S. M. et al. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1191-1202, 2008.

JANG, Y.-S. et al. Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 989-1000, 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza, Espanha: 1992. 804p.

JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Chapter 3 - Yeast Biotechnology. In: BOEKHOUT, C. P. K. W. F. (Ed.). **The Yeasts (Fifth Edition)**. London: Elsevier, 2011. p.21-44.

KACZOREK, E. et al. Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4285-4291, 2008.

KANG, Z. et al. Hydrophobic bacteria at the hexadecane–water interface: Examination of micrometre-scale interfacial properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 67, n. 1, p. 59-66, 2008a.

KANG, Z. et al. Mechanical properties of hexadecane–water interfaces with adsorbed hydrophobic bacteria. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, n. 2, p. 273-279, 2008b.

KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1426, n. 2, p. 373-383, 1999.

KATEMAI, W. Biosurfactants from Yeasts. **Walailak Journal**, v. 1, p. 1-8, 2012.

KERSCHNER, C. et al. Economic vulnerability to Peak Oil. **Global Environmental Change**, v. 23, n. 6, p. 1424-1433, 2013.

KIM, J-W; PARK, T. J.; RYU, D.D.Y.; Kim, J-Y. High Cell Density Culture of *Yarrowia lipolytica* using a One-Step Feeding Process. **Biotechnology Progress**, v.16, p. 657–660,2000.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185-202, 2006.

KLIS, F. M. et al. Molecular organization and biogenesis of the cell wall. In: DICKINSON, J. R. e SCHWEIZER, M. (Ed.). **The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae**. 2. London: CRC Press, 2004. cap. 5, p.476.

KLIS, F. M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239-256, 2002.

KONINGS, W. N. Microbial transport: Adaptations to natural environments. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 325–342, 2006.

KRÖMER, J. O. et al. Production of aromatics in *Saccharomyces cerevisiae*—A feasibility study. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 184-193, 2013.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Chapter 1 - Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. In: BOEKHOUT, C. P. K. W. F. (Ed.). **The Yeasts (Fifth Edition)**. London: Elsevier, p.3-5, 2011..

LANE, J. Amyris says 132% increase in sales to \$100M is in the cards for 2015. Disponível em <http://www.biofuelsdigest.com/>, 2015. Acesso em 12/08/2015.

LEAL-CALDERON, F.; THIVILLIERS, F.; SCHMITT, V. Structured emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, n. 4–5, p. 206-212, 2007.

LEE, G. J. et al. Stabilization of pickering emulsions by generating complex colloidal layers at liquid–liquid interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 413, n. 0, p. 100-105, 2014.

LEE, S. K. et al. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 556-563, 2008.

LI, M. et al. Productivity enhancement of S-adenosylmethionine in *Saccharomyces cerevisiae* using n-hexadecane as oxygen vector. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 10, p. 1379-1384, 2012.

LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, 1980.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3735-3740, 1998.

LOCHER, G. et al. Automatic bioprocess control .4. a prototype batch of *saccharomyces-cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 29, n. 1-2, p. 57-74, 1993.

LOCKSHON, D. et al. The Sensitivity of Yeast Mutants to Oleic Acid Implicates the Peroxisome and Other Processes in Membrane Function. **Genetics**, v. 175, n. 1, p. 77-91, 2007.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 63-66, 2001

LUTTIK, M. A. H. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* *ICL2* gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n.24, p. 7007-7013, 2000

LY, M. H. et al. Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 26-34, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2004. 608p.

MAGGIO, G.; CACCIOLA, G. When will oil, natural gas, and coal peak? **Fuel**, v. 98, n. 0, p. 111-123, 2012.

MAGNELLI, P.; CIPOLLO, J. F.; ABEIJON, C. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-1,6-glucan fine structure. **Analytical Biochemistry**, v. 301, n. 1, p. 136-150, 2002.

MARKU, D. et al. Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 428, n. 1–2, p. 1-7, 2012.

MARTINEZ DE MARANON, I.; MARECHAL, P.-A.; GERVAIS, P. Passive Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shifts: Cell Volume Variations Depending on the Physiological State. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 227, n. 2, p. 519-523, 1996.

MARTÍNEZ, J. L. et al. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 965-971, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques**. 2°. Washington, D.C: CRC Press, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. In: DOYLE, M. P. e KLAENHAMMER, T. R. (Ed.). **Annual Review of Food Science and Technology, Vol 1**. Palo Alto: Annual Reviews, p.241-269, v.1, 2010.

MCCLEMENTS, D. J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 235-245, 2012.

MEEHL, M. A.; STADHEIM, T. A. Biopharmaceutical discovery and production in yeast. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, n. 0, p. 120-127, 2014.

MELESE, T.; HIETER, P. From genetics and genomics to drug discovery: yeast rises to the challenge. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 12, p. 544-547, 2002.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, p. 371-394, 1949

MOREIRA, T. C. P **Mecanismos de estabilização de emulsões contendo leveduras**. 2015. 142 (Mestrado). Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas.

MURRAY, B. S. et al. Stabilization of foams and emulsions by mixtures of surface active food-grade particles and proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 4, p. 627-638, 2011.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52-68, 2011

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 252-259, 2007.

NOVACANA. **Amyris vende Farneseno da cana com preço 148 vezes acima do custo de produção**. Disponível em <http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/amyris-amostra-farneseno-cana-internet-100414/> Acesso em: 18/09/2014.

OLIVA NETO, P. et al. Chemical inhibition of the contaminant *Lactobacillus fermentum* from distilleries producing fuel bioethanol. **Brazilian biology technology**, Curitiba, v. 57, n. 3, p. 441-447, 2014

ORO, L. et al. Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. **Postharvest Biology and Technology**, v. 96, n. 0, p. 64-68, 2014.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DŁUGOŃSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 287-294, 2002.

PAULILLO, S. C. D. L.; YOKOYA, F.; BASSO, L. C. Mobilization of endogenous glycogen and trehalose of industrial yeasts **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 249-254, 2003.

PERALTA-YAHYA, P. P. et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 320-328, 2012.

PETREZSELYOVA, S.; ZAHRADKA, J.; SYCHROVA, H. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. **Fungal Biology**, v. 114, n. 2-3, p. 144-50, 2010.

PEREIRA, F. et al. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 11, p. 1655-1661, 2010

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, n. 0, p. 1-37, 2013.

PFAMMATTER, N.; GUADALUPE, A. A.; LUISI, P. L. Solubilization and activity of yeast cells in water-in-oil microemulsion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 161, n. 3, p. 1244-1251, 1989

QI, D. H.; LEE, C. F. Influence of soybean biodiesel content on basic properties of biodiesel-diesel blends. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 2, p. 504-507, 3// 2014.

QUEROL, A.; BOND, U. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. v. 293, n. 1, p. 1-10, **FEMS Microbiology Letters** 2009.

QUIRÓS, M. et al. A new methodology to determine cell wall mannoprotein content and release in wine yeasts. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 760-766, 2011.

RAVERA, F.; LOGLIO, G.; KOVALCHUK, V. I. Interfacial dilational rheology by oscillating bubble/drop methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 4, p. 217-228, 2010.

RAYNER, M. et al. Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 458, n. 0, p. 48-62, 2014.

RENNINGER, N. S.; NEWMAN, J. D.; REILING, K. K. **Fuel components, fuel compositions and methods of making and using same**: Google Patents 2010.

RIDDICK, T.M. **Control of colloid stability through zeta potential**. New York: 1968.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, n. 1, p. 29-33, 1980.

RUDE, M. A.; SCHIRMER, A. New microbial fuels: a biotech perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 274-281, 2009.

RÜHS, P. A. et al. Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid–liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, n. 0, p. 174-184, 2014.

RUMLOVA, L.; DOLEZALOVA, J. A new biological test utilising the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the rapid detection of toxic substances in water. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 459-464, 2012.

SANFELD, A.; STEINCHEN, A. Emulsions stability, from dilute to dense emulsions — Role of drops deformation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 140, n. 1, p. 1-65, 2008.

SANTANA, R. C. et al. Evaluation of different reaction strategies for the improvement of cetane number in diesel fuels. **Fuel**, v. 85, n. 5–6, p. 643-656, 2006.

SANTANA, R. C.; PERRECHIL, F. A.; CUNHA, R. L. High- and Low-Energy Emulsifications for Food Applications: A Focus on Process Parameters. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 2, p. 107-122, 2013.

SANTOS, M. T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 151-154, 1993.

SAVAJI, K. V.; NIITSOO, O.; COUZIS, A. Influence of particle/solid surface zeta potential on particle adsorption kinetics. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 431, n. 0, p. 165-175, 2014.

SONG, X. et al. Particle-stabilizers modified from indica rice starches differing in amylose content. **Food Chemistry**, v. 153, n. 0, p. 74-80, 2014.

SCHISLER, D. A. et al. Chapter 4 - Agriculturally Important Yeasts: Biological Control of Field and Postharvest Diseases Using Yeast Antagonists, and Yeasts as Pathogens of Plants. In: Kurtzman, C. P.; Fell, J.W. Boekhout, T. (Ed.). **The Yeasts (Fifth Edition)**. London: Elsevier, 2011. p.45-52.

SCHUBERT, H.; ENGEL, R. Product and Formulation Engineering of Emulsions. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 82, n. 9, p. 1137-1143, 2004.

SHARMA, T. et al. Thermal stability of oil-in-water Pickering emulsion in the presence of nanoparticle, surfactant, and polymer. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, n. 0, 2014.

SHANK, J. L. Encapsulation process utilizing microorganisms and products produced thereby. United States Patent n° 4,001,480. US Patent & Trademark Office, 1977

SHEN, X. et al. Bacterial Imprinting at Pickering Emulsion Interfaces. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 40, p. 10687-10690, 2014.

STARMER, W. T.; LACHANCE, M.-A. Chapter 6 - Yeast Ecology. In Kurtzman, C. P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. **The Yeasts (Fifth Edition)**. London: Elsevier, 2011. p.65-83.

TABUR, P.; DORIN, G. **Methods for purifying bio-organic compounds**: Google Patents 2012.

TADROS, T. F. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. In: (Ed.). **Emulsion Formation and Stability**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.

TANG, X.; FENG, H.; CHEN, W. N. Metabolic engineering for enhanced fatty acids synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 16, n. 0, p. 95-102, 2013.

TEHLIVETS, O.; SCHEURINGER, K.; KOHLWEIN, S. D. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 3, p. 255-270, 2007

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S. A.; TEHRANI, H. A. Preparation and Characterisation of Bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its Application in Food Products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 29, n. 8, p. 734-737, 1996.

TIMILSINA, G. R.; SHRESTHA, A. How much hope should we have for biofuels? **Energy**, v. 36, n. 4, p. 2055-2069, 2011.

TIPPMANN, S.; NIELSEN, J.; KHOOMRUNG, S. Improved quantification of farnesene during microbial production from *Saccharomyces cerevisiae* in two-liquid-phase fermentations. **Talanta**, v. 146, p. 100-106, 2016.

TUFANO, C. et al. Transient interfacial tension of partially miscible polymers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 325, n. 1, p. 130-140, 2008.

VALDEZ-TAUBAS, J.; PELHAM, H. R. B. Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. **Current Biology**, v. 13, n. 18, p. 1636-1640, 2003.

VALLE-RODRÍGUEZ, J. O. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of fatty acid ethyl esters, an advanced biofuel, by eliminating non-essential fatty acid utilization pathways. **Applied Energy**, v. 115, n. 0, p. 226-232, 2014.

VAN DER GRAAF, S.; SCHROËN, C. G. P. H.; BOOM, R. M. Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review. **Journal of Membrane Science**, v. 251, n. 1–2, p. 7-15, 2005.

VAN DER KLEI, I. et al. Chapter 8 - Cytology, Cell Walls and Septa: A Summary of Yeast Cell Biology from a Phylogenetic Perspective. In: Kurtzman, C. P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. **The Yeasts (Fifth Edition)**. London: Elsevier, 2011. p.111-128.

VAN DER REST, M. E. et al. The plasma-membrane of *Saccharomyces-cerevisiae* - structure, function, and biogenesis. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 304-322, 1995.

VAN DINTHER, A. M. C.; SCHROËN, C. G. P. H.; BOOM, R. M. Separation process for very concentrated emulsions and suspensions in the food industry. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, n. 0, p. 177-182, 2013.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 241-252, 1991.

VERDUYN, C. P. E. S., W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, p. 501-517, 1992.

VOISSET, C. et al. Using yeast to model calcium-related diseases: Example of the Hailey–Hailey disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 10, p. 2315-2321, 2014.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. New York: Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 348p.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 427-451, 2006.

WEISS, R. L.; KUKORA, J. R.; ADAMS, J. The relationship between enzyme activity, cell geometry, and fitness in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 3, p. 794-8, 1975.

WERNER-WASHBURN, M. et al. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 383-401, 1993.

WERNER-WASHBURN, M. et al. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 1159-1166, 1996

WESTFALL P. J.; GARDNER, T. S. Industrial fermentation of renewable diesel fuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 344-350, 2011.

WILDE, P. J. Interfaces: their role in foam and emulsion behaviour. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, n. 3–4, p. 176-181, 2000.

WONGKONGKATEP, P. et al. Bacteria Interface Pickering Emulsions Stabilized by Self-assembled Bacteria–Chitosan Network. **Langmuir**, v. 28, n. 13, p. 5729-5736, 2012.

YUAN, D. et al. Fermentation of biomass sugars to ethanol using native industrial yeast strains. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3246-3253, 2011.










ZEEB, B. et al. Influence of interfacial properties on Ostwald ripening in crosslinked multilayered oil-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 387, n. 1, p. 65-73, 2012.

ZHANG, F.; RODRIGUEZ, S.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 775-783, 2011.

ZHENG, D.-Q. et al. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3020-3027, 2011.

ZHU, W. et al. Magnetic molecularly imprinted microspheres via yeast stabilized Pickering emulsion polymerization for selective recognition of λ -cyhalothrin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 453, n. 0, p. 27-36, 2014

9 APÊNDICE

F.A T (dias)	Branco	Levedura Fresca	Levedura fresca lavada	Água da lavagem	Levedura fresca liofilizada
0		 	 	 	 

1



3



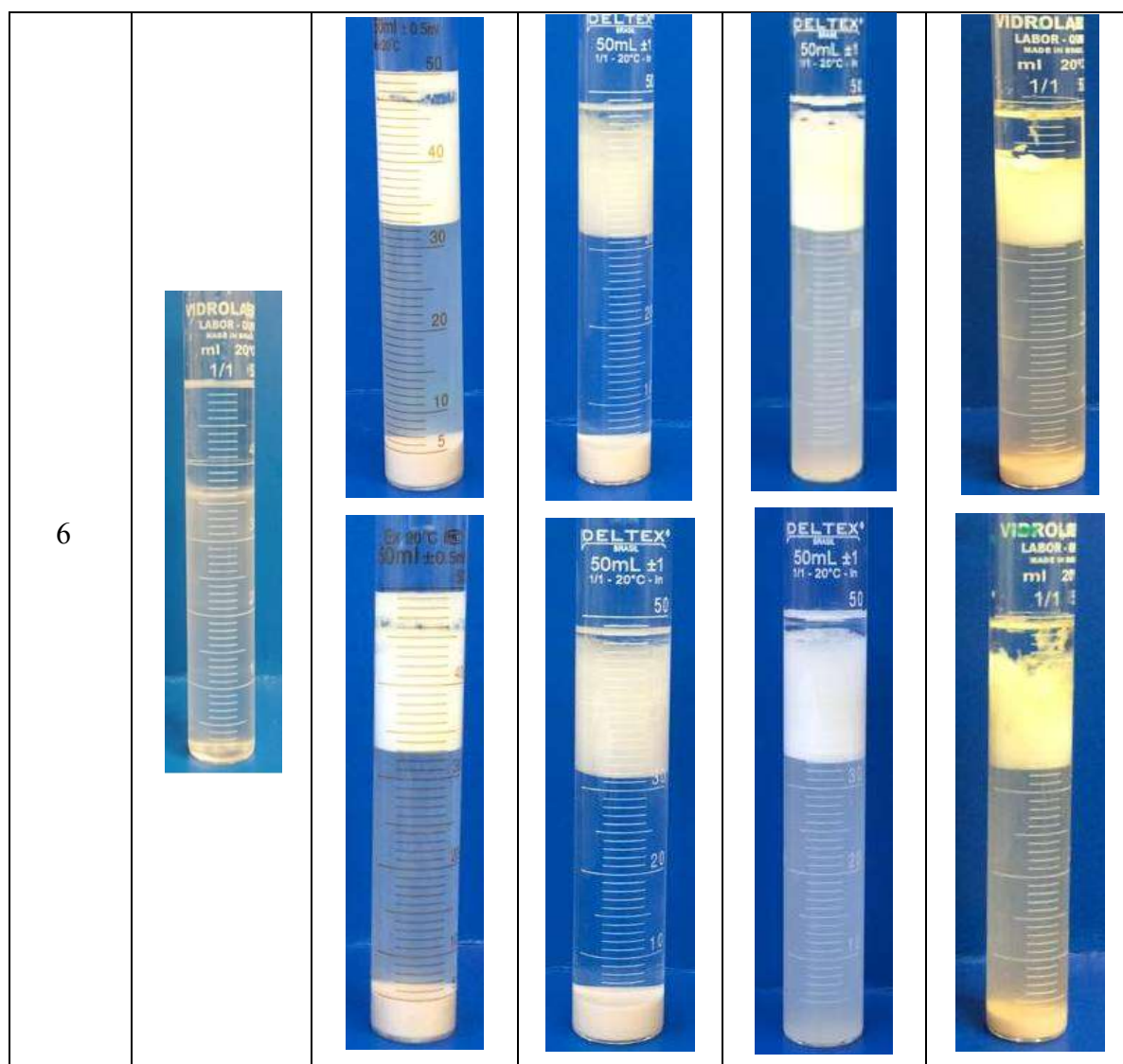


Figura 49. Aspecto visual de emulsões preparadas com hexadecano e levedura, em que são visíveis as 3 fases formadas: topo, intermediária e fundo. Branco (água e hexadecano), Levedura fresca (emulsão com levedura *S. cerevisiae* prensada fresca Itaquara), Levedura lavada (emulsão com levedura *S. cerevisiae* prensada fresca Itaquara, após lavagem com água destilada), Água de Lavagem (emulsão com água de lavagem da levedura), Levedura Liofilizada (emulsão com levedura *S. cerevisiae* Itaquara, após liofilização). São apresentadas imagens imediatamente após o preparo das emulsões e 1, 3 e 6 dias após o preparo, em duplicatas, a temperatura ambiente. F.A Fase Aquosa, T: tempo.

