



**GUILHERME DE FIGUEIREDO FURTADO**

**QUEBRA DE EMULSÕES MODELO VISANDO A  
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

**Campinas**

**2014**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

GUILHERME DE FIGUEIREDO FURTADO

# QUEBRA DE EMULSÕES MODELO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

*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, na Área de Engenharia de Alimentos.*

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosiane Lopes da Cunha**

**Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Carolina Siqueira Franco Picone**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO GUILHERME DE FIGUEIREDO FURTADO E ORIENTADO PELA PROF(A).DR(A). ROSIANE LOPES DA CUNHA.

---

Assinatura do Orientador

Campinas

2014

iii

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

F984q Furtado, Guilherme de Figueiredo, 1988-  
Quebra de emulsões modelo visando a produção de biocombustíveis /  
Guilherme de Figueiredo Furtado. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Rosiane Lopes da Cunha.  
Coorientador: Carolina Siqueira Franco Picone.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Engenharia de Alimentos.

1. Biocombustíveis. 2. Emulsões. 3. Estabilidade. I. Cunha, Rosiane Lopes da.  
II. Picone, Carolina Siqueira Franco. III. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Breaking of model emulsions aiming at biofuels production

**Palavras-chave em inglês:**

Biofuels

Emulsions

Stability

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Mestre em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Rosiane Lopes da Cunha [Orientador]

Ana Carla Kawazoe Sato

Fabiana Perrechil Bonsanto

**Data de defesa:** 09-04-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia de Alimentos

## BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosiane Lopes da Cunha - Orientadora**

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carla Kawazoe Sato – Membro Titular

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Perrechil Bonsanto - Membro Titular

Faculdade de Engenharia Química – UNIFESP/SP

---

Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert - Membro Suplente

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP/SP

---

Prof. Dr. Hosiberto Batista Sant'ana - Membro Suplente

Faculdade de Engenharia Química – UFC/CE



## RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo estudar a desestabilização de emulsões visando desenvolver processos tecnológicos para a produção fermentativa de biocombustíveis. Os sistemas foram compostos por água deionizada, hexadecano e levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. Para avaliar o efeito da levedura na estabilização das emulsões sua concentração foi variada de 0,75 a 22,11% (m/m). As leveduras foram caracterizadas quanto à composição química, hidrofobicidade superficial e densidade de carga. As emulsões obtidas foram submetidas a análises de estabilidade e composição química das fases, distribuição do tamanho das gotas, microscopia óptica, microscopia de fluorescência, densidade de carga, medidas reológicas e tensiometria. A separação do óleo foi realizada com diferentes processos físicos e químicos: centrifugação, alterações de temperatura e adição de diferentes agentes desmulsificantes. Como agentes desmulsificantes foram usados sais, polímeros catiônicos, alcoóis, ácidos, bases e nanopartículas magnéticas. Estes agentes foram adicionados em diferentes concentrações para averiguar sua influência na eficiência de separação do óleo, na distribuição de tamanho de gotas e potencial zeta das emulsões. As emulsões obtidas inicialmente, após um período de 24 horas de estabilização, apresentaram-se em três fases distintas: a fase superior ou creme, a fase intermediária e a fase de sedimentado. A fase creme das emulsões apresentou-se estável por um período de sete dias, indicando que os mecanismos responsáveis por sua estabilidade estavam associados à formação

de compostos pela levedura, ao aumento da viscosidade, causado pelo empacotamento das gotas, e uma possível repulsão eletrostática entre as gotas. O mecanismo de estabilização por *Pickering* também foi considerado como relevante no início do processo. A maior parte dos processos de desestabilização foi baseada na interação eletrostática entre os componentes presentes na interface, e os compostos desemulsificantes adicionados. O uso de forças centrífugas, por um período de 2 horas, não foi suficiente para causar a separação total dos componentes da emulsão e as temperaturas utilizadas não reduziram a viscosidade a ponto de ocorrer a separação total dos componentes. A utilização de um álcool (butanol) levou a um índice de separação de óleo de 96%. A separação do óleo foi mais eficiente quando as estratégias adotadas de se reduzir a viscosidade mediante o aumento da temperatura, solubilizar o óleo em alcoóis com maior afinidade química e a formação de complexos eletrostáticos foram combinadas com aplicação de elevada força mecânica. Neste caso, a desestabilização da fase creme das emulsões utilizando extração alcoólica foi de 100%. No entanto após o processo de desemulsificação seria necessária uma etapa adicional para a separação e recuperação do solvente de forma a se obter o óleo puro. A utilização de nanopartículas magnéticas levou a um índice de separação de óleo de 96%, sendo considerada uma alternativa viável para a desestabilização deste tipo de emulsão.

**Palavras-chave:** biocombustíveis, desemulsificantes, emulsão, estabilidade.

## ABSTRACT

This work aimed to study the destabilization of emulsions to develop technological processes for the fermentative production of biofuels. The systems were composed of deionized water, hexadecane and commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. To evaluate the stability of the emulsions the yeast concentration was varied from 0.75 to 22.11 % (w/w). The yeasts were characterized for chemical composition, surface hydrophobicity and charge density. The emulsions obtained were analyzed for stability and chemical composition of the phases, droplet size distribution, optical microscopy, fluorescence microscopy, charge density, rheological measurements and tensiometry. The oil separation was performed with different physical and chemical processes: centrifugation, changes in temperature and addition of demulsifiers agents. Salts, cationic polymers, alcohols, acids, bases, and magnetic nanoparticles were used as demulsifiers. These agents were added at different concentrations to determine their influence on the efficiency of oil separation, droplet size distribution and zeta potential of the emulsions. The emulsions obtained after 24 hour of stabilization presented three distinct phases: the upper or cream phase, the intermediate phase and the sedimented phase. The cream phase of the emulsion was stable for seven days, indicating that the mechanisms responsible for its stability were associated with the formation of compounds by the yeast, the increase in viscosity caused by the packing of the droplets, and a possible electrostatic repulsion between the drops. Initially the mechanism of

Pickering stabilization was also regarded as important in the process. Most destabilization processes was based on electrostatic interaction between the components present in the interface and the demulsifiers added. The use of centrifugal forces for 2 hours was insufficient to cause total separation of the components of the emulsion and the temperature used did not reduce the viscosity to the point of occurring total separation of the components. The use of an alcohol (butanol) led to an oil separation index of 96%. The oil separation was more effective when strategies adopted to reduce the viscosity by increasing the temperature, to solubilize the oil in alcohols with greater chemistry affinity and the formation of electrostatic complexes were combined with the application of high mechanical force. In this case, the destabilization of the cream phase of emulsions using alcohol extraction was 100%. However after the demulsification process would require an additional separation and recovery of the solvent to give the pure oil phase. The use of magnetic nanoparticles led to an oil separation index of 96 % and is considered a viable alternative to the destabilization of this type of emulsion.

**Keywords:** biofuels, demulsifiers, emulsion, stability.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	vii
ABSTRACT .....	ix
AGRADECIMENTOS .....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xvii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xxiii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
1.1 INTRODUÇÃO .....	3
1.2 OBJETIVOS .....	7
1.2.1 Objetivo Geral .....	7
1.2.2 Objetivos Específicos .....	7
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1 Biocombustíveis .....	11
2.2 Emulsões .....	16
2.2.1 Agentes Emulsificantes .....	18
2.2.2 Fatores que Afetam a Estabilidade de uma Emulsão .....	20
2.3 Desemulsificação .....	21
2.4 Avaliação da Estabilidade das Emulsões .....	23
CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1 Material .....	29

3.2 Métodos .....	29
3.2.1 Preparo e Caracterização das Suspensões de Levedura .....	30
3.2.2 Definição das Condições do Processo de Emulsificação.....	30
3.2.3 Elaboração dos Sistemas Modelo .....	31
3.2.4 Quebra das Emulsões.....	32
3.2.4.1 <i>Métodos Físicos</i> .....	33
3.2.4.1.1 <i>Centrifugação</i> .....	33
3.2.4.2 <i>Aquecimento</i> .....	33
3.2.4.3 <i>Métodos Físicos e Químicos</i> .....	34
3.2.4.3.1 <i>Adição de Álcool</i> .....	34
3.2.4.3.2 <i>Alteração do pH</i> .....	34
3.2.4.3.3 <i>Adição de Sais e Polímeros</i> .....	35
3.2.4.3.4 <i>Adição de Nanopartículas Magnéticas</i> .....	35
3.2.5 Estabilidade das Fases .....	36
3.2.6 Caracterização físico-química .....	36
3.2.7 Hidrofobicidade Superficial da Levedura.....	37
3.2.8 Distribuição do Tamanho das Gotas .....	37
3.2.9 Microscopia Óptica.....	38
3.2.10 Microscopia Confocal de Varredura a Laser .....	38
3.2.11 Densidade de Carga .....	39
3.2.12 Reologia em Estado Estacionário .....	39

3.2.13 Tensiometria .....	40
3.3 Análise Estatística.....	41
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Caracterização da Levedura .....	45
4.2 Definição das Condições do Processo de Emulsificação.....	48
4.3 Estabilidade das Emulsões: Entendimento do Mecanismo .....	53
4.3.1 Estabilidade das Fases .....	53
4.3.2 Caracterização físico-química das fases da emulsão .....	58
4.3.3 Distribuição do Tamanho das Gotas das Emulsões.....	61
4.3.4 Microscopia Óptica.....	64
4.3.5 Microscopia Confocal de Varredura a Laser .....	68
4.3.6 Reologia em Estado Estacionário .....	69
4.3.7 Tensiometria .....	72
4.3.8 Densidade de Carga das Emulsões.....	75
4.4 Quebra das Emulsões.....	76
4.4.1 Métodos Físicos .....	76
4.4.1.1 <i>Centrifugação</i> .....	76
4.4.1.2 <i>Aquecimento</i> .....	78
4.4.2 Métodos Físicos e Químicos.....	81
4.4.2.1 <i>Adição de Álcool</i> .....	81
4.4.2.2 <i>Alteração do pH</i> .....	86

4.4.2.3 <i>Adição de Sais e Polímeros</i> .....	89
4.4.2.4 <i>Adição de Nanopartículas Magnéticas</i> .....	97
4.4.3 <i>Comparação entre os Métodos de Desemulsificação</i> .....	101
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS.....	105
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e seus professores e funcionários pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado e à Fapesp pelo suporte financeiro.

À professora Rosiane Lopes da Cunha pela disponibilidade, orientação, incentivo e confiança.

À banca examinadora, pelas valiosas correções e sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

À minha mãe por sempre me apoiar e vibrar comigo em cada conquista.

Aos colegas da pós-graduação e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E finalmente, mas não menos importante, a Deus, tão infinitamente justo e bom que nos dá diariamente dois grandes presentes: oportunidades e livre arbítrio.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural dos biocombustíveis utilizados em motores a diesel.	13
Figura 2. Mecanismos de instabilidade em emulsões. ....	18
Figura 3. Esquematização da metodologia desenvolvida. ....	30
Figura 4. Valores de densidade da suspensão em função da concentração de levedura.....	46
Figura 5. Densidade de carga da levedura em função do pH. ....	47
Figura 6. Microfotografias da fase creme das emulsões contendo 22,11% de levedura m/m e 30% v/v de hexadecano obtidas a 700 rpm em diferentes tempos de agitação (a) 60, (b) 30 e (c) 10 minutos, após 24 horas do preparo.....	49
Figura 7. Distribuição de tamanho de gotas da fase creme das emulsões contendo 22,11% de levedura m/m e 30% v/v de hexadecano elaboradas em diferentes tempos de agitação com velocidade constante igual a 700 rpm, após 24 horas do preparo.....	49
Figura 9. Distribuição de tamanho de gotas da fase creme das emulsões contendo 22,11% de levedura m/m e 30% v/v de hexadecano elaboradas em diferentes velocidades de agitação, após 24 horas do preparo. ....	51
Figura 10. Distribuição de tamanho de gotas da fase creme das emulsões preparadas com 22,11% m/m de levedura avaliada em diferentes tempos de repouso após o preparo. ....	52

Figura 11. Aspecto visual das emulsões preparadas nas concentrações de (a) 0,75, (b) 3,75, (c) 7,47, (d) 14,83, (e) 22,11% m/m de levedura e 30% v/v de hexadecano após 24 horas de repouso. ....	54
Figura 12. Aspecto visual das emulsões preparadas nas concentrações de (a) 7,47, (b) 14,84 e (c) 22,11% m/m de levedura e 30% v/v de hexadecano após 7 dias de teste de proveta. ....	56
Figura 13. Aspecto visual das emulsões preparadas com (a) hexadecano recuperado e (b) água recuperada, bem como a microfotografia e a distribuição de tamanho por volume e número da fase superior. ....	58
Figura 14. Distribuição de tamanho por volume da fase de sedimentado das emulsões preparadas em diferentes concentrações de levedura. ....	62
Figura 15. Distribuição de tamanho por volume da fase intermediária das emulsões preparadas em diferentes concentrações de levedura. ....	63
Figura 16. Distribuição de tamanho por volume da fase superior das emulsões preparadas em diferentes concentrações de levedura. ....	63
Figura 17. Microfotografias das emulsões preparadas nas concentrações de (a) 0,75, (b) 3,75, (c) 7,47, (d) 14,84, (e) 22,11% m/m de levedura e 30% v/v de hexadecano, após 24 horas. Aumento de 100 vezes. ....	66
Figura 18. Microfotografias das emulsões preparadas nas concentrações de (a) 0,75, (b) 3,75, (c) 7,47, (d) 14,84, (e) 22,11% m/m de levedura e 30% v/v de hexadecano, após 24 horas. Aumento de 400 vezes. ....	67
Figura 19. Imagem confocal da fase superior (creme) das emulsões compostas por 7,47% m/m de levedura corada com DAPI e 30% de hexadecano v/v corado com Vermelho do Nilo. Aumento de 400 vezes. ....	68

Figura 20. Curvas de escoamento da fase inferior (sedimentado) das emulsões contendo 7,47, 14,84 e 22,11% m/m de levedura. ....	70
Figura 21. Curvas de escoamento da fase intermediária das emulsões contendo 7,47, 14,84 e 22,11% m/m de levedura.....	71
Figura 22. Curvas de escoamento da fase superior (creme) das emulsões contendo 7,47, 14,84 e 22,11% m/m de levedura. ....	71
Figura 23. Cinética da tensão interfacial entre água e hexadecano na presença de (a) diferentes concentrações de levedura e (b) em baixas concentrações de levedura, % (m/m). ....	73
Figura 24. Valores de tensão Interfacial para diferentes concentrações de levedura, % (m/m). ....	75
Figura 25. Densidade de carga da fase superior da emulsão contendo 7,47% m/m de levedura mediante diferentes faixas de pH. ....	76
Figura 26. Separação de óleo (%) das emulsões centrifugadas a 3000 e 10000 rpm. ....	77
Figura 27. Aspecto visual da emulsão centrifugada a 10000 rpm, bem como a microfotografia e a distribuição de tamanho por volume e número da emulsão residual. ....	78
Figura 28. Separação de óleo (%) das emulsões submetidas a diferentes temperaturas de desestabilização. ....	79
Figura 29. Fotografias das emulsões submetidas a diferentes temperaturas de desestabilização, (a) 40, (b) 50 e (c) 60°C. ....	80
Figura 30. Distribuição de tamanho por volume das emulsões submetidas a diferentes temperaturas de desestabilização. ....	80

Figura 31. Aspecto visual das emulsões contendo etanol nas concentrações de (a) 0%, (b) 1%, (c) 3% (d) 5% e (e) 10% (v/v) e butanol nas concentrações de (f) 0%, (g) 1%, (h) 3% (i) 5% e (j) 10% (v/v).....	82
Figura 32. Separação de óleo (%) das emulsões desestabilizadas utilizando diferentes concentrações de etanol e butanol. ....	83
Figura 33. Separação de óleo (%) das emulsões desestabilizadas utilizando diferentes concentrações de etanol e butanol seguida de centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. ....	84
Figura 34. Aspecto visual das emulsões contendo etanol nas concentrações de (a) 1%, (b) 3%, (c) 5% e (d) 10% (v/v) e butanol nas concentrações de (e) 1%, (f) 3%, (g) 5% e (h) 10% (v/v), após centrifugação a 10000rpm por 10 minutos. ....	85
Figura 35. Distribuição de tamanho por volume das emulsões contendo etanol em diferentes concentrações, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. ....	85
Figura 36. Aspecto visual das emulsões em diferentes valores de pH: (a) 9,0, (b) 2,2, (c) 2,0 e (d) 1,8.....	87
Figura 37. Separação de óleo (%) das emulsões submetidas a diferentes faixas de pH, após centrifugação. ....	88
Figura 38. Aspecto visual das emulsões em diferentes valores de pH, (a) 9,0, (b) 2,2, (c) 2,0 e (d) 1,8 após centrifugação a 10000rpm por 10 minutos.....	88
Figura 39. Aspecto visual das emulsões contendo sais e polímeros (%) m/v: (a) NaCl 1%, (b) NaCl 0,5%, (c) NaCl 0,1% (d) CaCl <sub>2</sub> 1% (e) CaCl <sub>2</sub> 0,5%, (f) CaCl <sub>2</sub> 0,1%, (g) KAL(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O 1% (h) KAL(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O 0,5% (i) KAL(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O 0,1%, (j) N9909 1%, (k) N9909 0,5% (l) N9909 0,1%.....	90

Figura 40. Distribuição de tamanho por volume das emulsões contendo diferentes concentrações de agentes desestabilizantes.....	92
Figura 41. Separação de óleo (%) das emulsões em diferentes concentrações de agentes desestabilizantes, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. ....	94
Figura 42. Distribuição de tamanho por volume das emulsões contendo diferentes concentrações de agentes desestabilizantes, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos.....	96
Figura 43. Aspecto visual das emulsões contendo nanopartículas magnéticas nas concentrações de (a) 10%, (b) 1%, (c) 0,1% e (d) 0,01% (m/v). ....	99
Figura 44. Separação de óleo (%) das emulsões desestabilizadas utilizando diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas.....	99
Figura 45. Percentual de separação de óleo das emulsões desestabilizadas utilizando diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas recuperadas. ....	100



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades dos biocombustíveis e do diesel de petróleo.....	15
Tabela 2. Composição química da levedura. ....	45
Tabela 3. Hidrofobicidade superficial da levedura em diferentes valores de pH. ...	48
Tabela 4. Faixas de tamanho da fase creme das emulsões obtidas em diferentes tempos de agitação. ....	50
Tabela 5. Faixas de tamanho da fase creme das emulsões obtidas em diferentes velocidades de agitação. ....	52
Tabela 6. Faixas de tamanho da fase creme das emulsões avaliadas em diferentes tempos de repouso após o preparo. ....	53
Tabela 7. Percentual de separação das fases das emulsões contendo diferentes concentrações de levedura, após 24 horas de teste de proveta a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ . ....	55
Tabela 8. Composição das fases das emulsões preparadas com diferentes concentrações de levedura. ....	60
Tabela 9. Valores de densidade das fases separadas das emulsões preparadas em diferentes concentrações de levedura. ....	61
Tabela 10. Faixas de tamanho obtidas para a levedura pura, para a fase creme e intermediária das emulsões em diferentes concentrações de levedura. ....	64
Tabela 11. Parâmetros reológicos dos modelos de Newton e Lei da Potência ajustados aos dados experimentais das curvas de escoamento de cada uma das fases das emulsões contendo 7,47, 14,84 e 22,11% m/m de levedura, respectivamente. ....	72

Tabela 12. Faixas de tamanho da fase creme das emulsões submetidas a diferentes temperaturas de desestabilização .....	81
Tabela 13. Faixas de tamanho das emulsões contendo etanol em diferentes concentrações, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. ....	86
Tabela 14. Valores de potencial zeta das emulsões usando diferentes concentrações de sais e polímeros catiônicos. ....	91
Tabela 15. Faixas de tamanho das emulsões contendo diferentes concentrações de agentes desestabilizantes. ....	93
Tabela 16. Faixas de tamanho das emulsões contendo diferentes concentrações de agentes desestabilizantes, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. .	97
Tabela 17. Valores de potencial zeta das emulsões contendo diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas na emulsão.....	100
Tabela 18. Valores de potencial zeta das emulsões contendo diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas recuperadas após uso para desestabilização.....	101
Tabela 19. Comparação da separação de óleo (%) entre os diferentes métodos de desemulsificação.....	103

## **CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**



## 1.1 INTRODUÇÃO

Dentre as muitas possibilidades de fontes de energia renováveis, os biocombustíveis tem apresentado um crescimento acentuado em virtude da preocupação com o meio ambiente, da alta demanda de energia, e com a conservação das fontes de energia não renováveis. Vários países como Brasil, Estados Unidos, Alemanha, Austrália, Itália e Áustria já estão usando biocombustíveis, como o bioetanol e o biodiesel (YUSUF *et al.*, 2011). Em 2012, a produção nacional de etanol anidro e hidratado atingiu volume aproximado de 23,5 mil m<sup>3</sup> e a produção de biodiesel foi de aproximadamente 2,7 milhões de m<sup>3</sup> (BRASIL, 2012).

Basicamente existem três rotas para se converter fontes renováveis de energia em biocombustíveis ou precursores dos mesmos, sendo elas: a produção direta por organismos fotossintéticos, como plantas e algas; a produção fermentativa ou não fermentativa por micro-organismos heterótrofos, como bactérias, leveduras ou fungos; e a conversão química de biomassa em combustível (RUDE e SCHIRMER, 2009). Estas novas tecnologias podem trazer problemas tecnológicos associados à eficiência de processo, principalmente em relação à separação e recuperação do produto. No entanto, o processo produtivo dos biocombustíveis deve ser eficiente devido ao seu baixo custo de comercialização (RUDE e SCHIRMER, 2009).

Dentre os biocombustíveis produzidos por fermentação, têm-se destacado o farnesano, o qual é produzido extracelularmente por leveduras (*Saccharomyces*

*cerevisiae*) geneticamente modificadas (RENNINGER *et al.*, 2010). Este biocombustível está entrando em fase de comercialização e apresenta grande potencial para se estabelecer no mercado (PERALTA-YAHYA *et al.*, 2012). No entanto, o processo industrial de separação do óleo é realizado por meio de forças centrífugas e/ou gravitacionais, podendo ser oneroso em virtude do elevado custo energético e do tempo de processo. A formação de emulsões na produção de biocombustíveis também é comum e a presença de células microbianas pode ser mais um fator a tornar o processo de separação das emulsões ainda mais complexo, uma vez que estas podem atuar como partículas estabilizantes ou emulsificantes (DOROBANTU *et al.*, 2004).

As emulsões podem ser encontradas em diversos estágios do processamento industrial e sua estabilidade pode ser desejável em algumas situações e indesejável em outras. Uma vez formadas, as emulsões são termodinamicamente instáveis, mas podem ser cineticamente estáveis. A separação das fases líquidas envolvidas (quebra da emulsão) é uma etapa fundamental para o processo de produção de petróleo (COUTINHO *et al.*, 2004) e de biodiesel (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Alguns dos fatores que contribuem para aumentar a estabilidade cinética são a presença e formação de emulsificantes naturais, partículas sólidas com propriedades anfifílicas, ou ainda a presença de componentes que aumentem a viscosidade do meio.

A desemulsificação consiste na quebra da emulsão, o que demanda conhecimentos sobre este sistema complexo. Separação dos componentes em fases requer floculação e coalescência, os quais podem ser alcançados por

métodos físico-químicos ou métodos eletromecânicos, ou ainda, por uma combinação de ambos (HUNTER, 2001).

Diante do exposto, a avaliação das propriedades físicas e físico-químicas das fases e da interface das emulsões podem propiciar informações que levem à máxima separação do óleo. Uma vez que a probabilidade de junção das gotas é função das forças de interação e da tensão interfacial, um estudo da coalescência e da dependência com a composição das diferentes misturas e condições de obtenção, são fatores significantes. Para isso o uso de sistemas modelo permite o entendimento dos mecanismos associados ao processo de modo a propor soluções ao problema de forma mais eficiente e menos empírica.



## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Propor estratégias de quebra de emulsão de misturas modelo visando aumentar a eficiência de separação de óleo.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Elaboração de emulsões em diferentes concentrações de levedura e condições de emulsificação, para entender o mecanismo de estabilização das emulsões obtidas;
- Propor estratégias de desestabilização que empreguem métodos químicos e físicos avaliando-os quanto à eficiência de separação de óleo.



## **CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 2.1 Biocombustíveis

Desde o início da revolução industrial no final do século 18 e início do século 19, a energia tornou-se um fator indispensável para a humanidade de forma a preservar o crescimento econômico e manter seu padrão de vida (LIN *et al.*, 2011). O consumo de energia em todo o mundo aumentou mais de 20 vezes no século passado e, com exceção da hidroeletricidade e energia de fusão nuclear, todas as atuais principais fontes de energia são finitas. Como a maior parte da necessidade energética humana é satisfeita através de fontes petroquímicas, carvão e gases naturais, o uso contínuo desses combustíveis fósseis tem refletido em prejuízos ambientais (MONYEM e VAN GERPEN, 2001).

Nos últimos anos grande atenção tem se voltado para fontes alternativas de energia, de forma a promover o crescimento econômico sustentável da sociedade humana (PEIDONG *et al.*, 2009). As fontes de energia para serem alternativas devem cumprir uma série de critérios que incluem a suficiente abundância de recursos para substituir combustíveis derivados do petróleo no longo prazo, emissão de carbono zero ou baixa, efeito prejudicial mínimo para o meio ambiente, ser aplicável aos veículos já existentes e economicamente viável (WEN *et al.*, 2009).

A utilização de biocombustíveis em motores a diesel surgiu com a demonstração do primeiro motor a diesel projetado por Rudolf Diesel, na Exposição Mundial de Paris em 1900, usando óleo de amendoim como combustível. No entanto, devido ao fornecimento abundante do diesel de petróleo, não se deu continuidade à pesquisa e ao desenvolvimento de óleos vegetais

combustíveis. Estes combustíveis receberam atenção apenas recentemente, quando se percebeu a diminuição dos combustíveis de petróleo (AGARWAL e DAS, 2001).

Os biocombustíveis, líquidos ou gasosos, produzidos a partir de óleos vegetais, açúcares, cereais, resíduos orgânicos e processamento de biomassa, são capazes de fornecer energia que seja sustentável e sem sérios impactos ambientais (DWIVEDI *et al.*, 2011). Há uma grande expectativa de crescimento na área de biocombustíveis nas próximas décadas, o que tem encorajado as indústrias verdes e a agricultura. Vários biocombustíveis, incluindo bioetanol, biometanol, biodiesel e biohidrogênio sinalizam serem opções atraentes para o futuro do setor dos transportes (WEN, JIANG e ZHANG, 2009).

A classificação dos biocombustíveis é dividida em combustíveis de primeira, segunda e terceira geração. Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos principalmente a partir de matérias-primas agrícolas, já os biocombustíveis de segunda geração podem ser produzidos a partir de biomassa residual. E os biocombustíveis de terceira geração são produzidos utilizando microrganismos geneticamente modificados (CHENG e TIMILSINA, 2011; FIORESE *et al.*, 2013). Basicamente existem três rotas para se converter fontes renováveis de energia em biocombustíveis ou precursores dos mesmos, sendo elas: a produção direta por organismos fotossintéticos, como plantas e algas; a produção fermentativa ou não fermentativa por micro-organismos heterótrofos, como bactérias, leveduras ou fungos; e a conversão química de biomassa em combustível (RUDE e SCHIRMER, 2009; CHENG e TIMILSINA, 2011; FIORESE *et al.*, 2013).

Dentre os biocombustíveis que podem ser utilizados em motores a diesel destacam-se: o biodiesel; as misturas de alcanos e olefinas; e o farnesano (Figura 1) (STEEN *et al.*, 2010). Estes dois últimos biocombustíveis são definidos como diesel renovável, não em virtude dos seus processos de obtenção, mas em função de suas estruturas moleculares (WESTFALL e GARDNER, 2011).

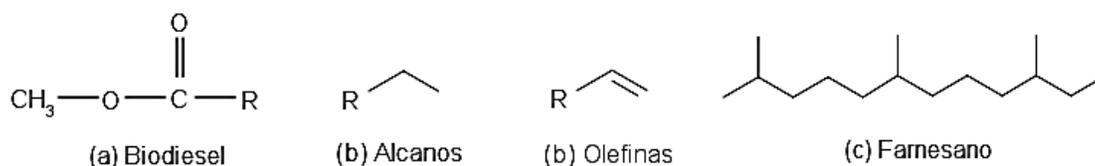


Figura 1. Fórmula estrutural dos biocombustíveis utilizados em motores a diesel.

De acordo com a Legislação Brasileira (Lei 11097/2005) o biodiesel é definido como um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil. Ainda pode ser definido como um composto de mono-álquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, obtido usualmente, a partir da reação de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcool, na presença ou não de catalisadores, que podem ser ácidos, básicos, ou ainda, enzimas (KNOTHE, 2005).

Diversas tecnologias de fermentação têm sido desenvolvidas para a produção de diesel renovável através de bactérias e leveduras geneticamente modificadas. Elas envolvem a fermentação de açúcares derivados de biomassa

resultando em compostos intermediários que são transformados em moléculas de diesel através de processos químicos. Dentre estas tecnologias está a produção de alcanos e olefinas, onde a biossíntese se dá a partir de cianobactérias; e a produção de farneseno que após o processo fermentativo passa por um processo de destilação e hidrogenação sendo transformado em farnesano (WESTFALL e GARDNER, 2011).

Os microrganismos hospedeiros para a produção de diesel renovável representam a escolha que determina o sucesso ou o fracasso da unidade de produção. *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* têm sido utilizadas nas indústrias de biocombustíveis por apresentarem características genéticas robustas e bem estudadas (RENNINGER, NEWMAN e REILING, 2010).

A produção extracelular elimina a necessidade de ruptura das células para a recuperação do produto simplificando os processos de *dowstream* e diminuindo os custos de produção. No entanto a fermentação gera uma mistura multifásica formada por microrganismos, meio fermentativo, biocombustível e gases de fermentação, o que dificulta a recuperação do produto (TABUR e DORIN, 2012).

Tanto a qualidade do diesel de petróleo quanto a dos biocombustíveis é avaliada por parâmetros como o número de cetanos (que representa a medida de qualidade de ignição), o ponto de névoa (menor temperatura em que se observa a formação de uma turvação, indicando o início da cristalização de parafinas e outros componentes que tendem a separar-se do diesel), densidade energética, viscosidade cinemática e estabilidade à oxidação. Tais parâmetros são influenciados pelo comprimento das cadeias de hidrocarbonetos dos compostos,

bem como pelo grau de ramificação ou saturação das mesmas (RUDE e SCHIRMER, 2009).

O farnesano é um isoprenóide composto por 15 átomos de carbono, enquanto que as misturas de alcanos/olefinas e o biodiesel são compostos por 8 a 22 átomos de carbono dispostos em longas cadeias lineares. Já o diesel de petróleo é composto por 10 a 19 átomos de carbono, tendo a predominância de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. De acordo com a Tabela 1 todos os três tipos de moléculas de diesel relatados acima tem propriedades parecidas com a do diesel de petróleo. No entanto, o biodiesel torna-se desvantajoso em virtude do elevado ponto de névoa (limitando seu uso a baixas temperaturas), da baixa densidade energética e da presença de oxigênio. Em termos de emissão de gases, com exceção do biodiesel que propicia elevados valores de emissão de NOx, todos os outros tipos de biocombustíveis propiciam uma menor emissão de gases como, NOx, SOx, e CO, quando comparados ao diesel de petróleo (WESTFALL e GARDNER, 2011).

Tabela 1. Propriedades dos biocombustíveis e do diesel de petróleo.

Produto	Processo	Número de Cetanos	Ponto de Névoa (°C)	Densidade Energética (MJ/kg)	% de Oxigênio
Farnesano	Fermentativo	58	-40	43	0
Alcano/Olefinas	Fermentativo	70-90	-20 a 20	44	0
Biodiesel	Fermentativo ou Químico	47-59	0	38	11
Alcanos e Compostos Aromáticos de Petróleo	Destilação	40	-5	43	0

Fonte: (WESTFALL e GARDNER, 2011)

## 2.2 Emulsões

As emulsões compreendem uma mistura de óleo e água, contendo gotas dispersas e uma fase contínua. O diâmetro das gotas é tipicamente da ordem de 0,1 a 100  $\mu\text{m}$ , no entanto, podem variar de poucos nanômetros a centenas de micrômetros. Os dois tipos mais comuns de emulsões são do tipo água em óleo A/O e óleo em água O/A, no entanto, podem existir emulsões múltiplas como água em óleo em água A/O/A, óleo em água em óleo O/A/O e sistemas ainda mais complexos (MIKULA, 1992).

Uma emulsão é formada a partir de três requisitos fundamentais, sendo eles: a existência de dois líquidos imiscíveis; agitação suficiente para que um dos líquidos esteja disperso na forma de gotas no outro líquido; e um emulsificante para estabilizar as gotas dispersas (ARNOLD e SMITH, 1992). Elas são caracterizadas como sistemas termodinamicamente instáveis em virtude da grande tensão interfacial existente entre a água e o óleo, acompanhada pela existência de grandes áreas interfaciais, implicando em uma elevada energia livre de Gibbs ( $\Delta G_f > 0$ ) (CASTELLAN, 1986). A energia livre de formação das gotas pode ser descrita a partir da Eq. 1, onde o termo de energia interfacial ( $\gamma\Delta A$ ) é elevado e muito maior que a entropia de formação das gotas ( $\Delta S_f$ ). Desta forma, a emulsão tende a se desequilibrar termodinamicamente com a diminuição da área interfacial entre as duas fases, promovendo a coalescência das gotas e favorecendo a separação das fases (ANTON *et al.*, 2008).

$$\Delta G_f = \gamma \Delta A - T \Delta S_f \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

$\Delta G_f$  é a energia livre de formação, [J/kg];

$\gamma$  é a tensão interfacial, [J/kg.m<sup>2</sup>];

A representa a área interfacial, [m<sup>2</sup>];

T a temperatura, [K];

$\Delta S_f$  a entropia de formação, [J/kg.K].

A partir da medida de separação das fases (volume de fases em função do tempo) é possível avaliar a estabilidade cinética da emulsão, que é sua propriedade mais importante. A estabilidade cinética está relacionada ao tempo em que esta permanece sem mostrar mudanças significativas na distribuição e tamanho das gotas, bem como no estado de agregação e arranjo espacial (ADAMSON e GAST, 1987). A modificação de tais fatores pode ocorrer devido aos seguintes processos: cremação, sedimentação, floculação e coalescência das gotas (Figura 2). A cremação ocorre se as gotas dispersas possuem densidade menor que a fase contínua, e estas migram para a parte superior da emulsão. No caso da densidade das gotas ser maior que a densidade da fase contínua o processo é definido por sedimentação. Já quando duas ou mais gotas se agregam mantendo sua integridade ocorre o processo de floculação. E na coalescência, duas ou mais gotas se fundem formando uma gota maior (MCCLEMENTS, 2005). Há ainda o mecanismo de *Ostwald ripening* onde o aumento no tamanho das gotas se dá pelo transporte de massa através da fase contínua (TAYLOR, 2003).

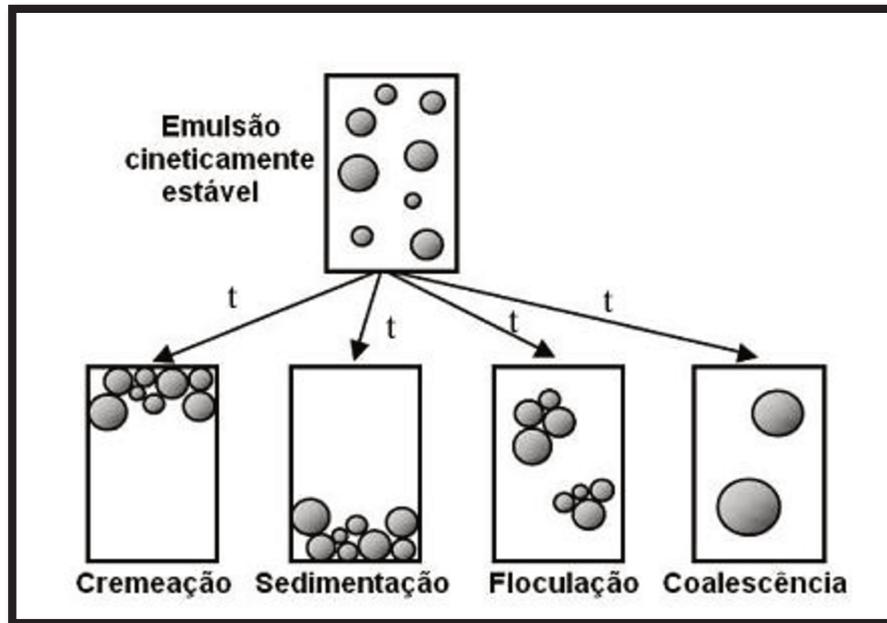


Figura 2. Mecanismos de instabilidade em emulsões. Fonte: (MCCLEMENTS, 2005)

### 2.2.1 Agentes Emulsificantes

A separação das fases de uma emulsão pode ser prevenida ou retardada pela adsorção das moléculas de um agente emulsificante na interface existente entre o óleo e a água, fornecendo uma camada protetora à floculação ou coalescência das gotas. Estas moléculas podem atuar na redução da tensão interfacial, na formação de um filme rígido na interface (barreira mecânica para a coalescência) ou ainda formando uma dupla camada elétrica (barreira contra a aproximação das gotas) (CAPEK, 2004). Pode haver ainda a presença de estabilizantes, que oferecem estabilidade a longo prazo atuando através da modificação da viscosidade ou gelificação da fase contínua aquosa (DICKINSON, 2003).

Os agentes emulsificantes são constituídos por uma parte hidrofílica e outra lipofílica, sendo denominados de anfifílicos. Na presença de água e óleo, a porção hidrofílica é atraída pela água, enquanto a lipofílica é atraída para o óleo (CAPEK, 2004). Os tipos mais utilizados são os surfactantes de baixa massa molecular, alguns emulsificantes de alta massa molecular como os biopolímeros anfifílicos, e materiais particulados tensoativos ou com atividade de superfície (MCCLEMENTS, 2005). Partículas sólidas que apresentam tamanho inferior às gotas da emulsão podem estar presentes na interface água-óleo, contribuindo também para a estabilização da emulsão. A estabilidade dependerá do tamanho, da molhabilidade e da interação entre estas partículas (LEVINE *et al.*, 1989).

Os compostos de baixa massa molecular que apresentam moléculas com uma parte hidrofóbica e outra parte hidrofílica atuam na redução da tensão interfacial dos meios aquosos. Já os compostos de alta massa molecular não apresentam necessariamente uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica e, conseqüentemente, podem não reduzir a tensão interfacial do meio (WILLUMSEN e KARLSON, 1997), mas podem agir como estabilizantes da fase contínua.

Os agentes tensoativos podem ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos em substratos hidrossolúveis (glicose, sacarose, etanol e glicerol) ou hidrofóbicos (hidrocarbonetos) (ROSENBERG e RON, 1999). Barriga *et al.* (1999) realizou estudos utilizando biomassa contendo *Saccharomyces cerevisiae*. Neste foram isolados bioemulsificantes contendo dois tipos de polímeros com diferentes composições químicas, sendo que um deles possuía propriedades emulsificantes, devido à presença de proteína. O outro polímero era composto por carboidratos e fósforo, o qual foi relacionado com a estabilização da emulsão.

### 2.2.2 Fatores que Afetam a Estabilidade de uma Emulsão

De acordo com a equação de Stokes (Eq. 2), a velocidade de sedimentação das gotas é diretamente proporcional ao tamanho das mesmas. No entanto, para uma maior estabilidade da emulsão é necessária uma redução do tamanho das gotas aliado à uniformidade de distribuição do tamanho das mesmas. Já os fatores diferença de densidade e viscosidade podem ser alterados pela adição de diluentes ou ajuste da temperatura (EOW *et al.*, 2001). O envelhecimento da emulsão e conseqüentemente uma maior adsorção dos agentes emulsificantes na interface água-óleo, e uma completa interação entre o emulsificante e a interface pode levar a uma maior resistência do filme interfacial, dificultando o processo de coalescência (MANNING e THOMPSON, 1995).

$$V = \frac{2r^2(\rho_2 - \rho_1)g}{9\eta} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:

V = velocidade de sedimentação das gotas, [m/s];

r = raio da gota, [m];

$\rho_1$  = densidade da fase dispersa, [kg/m<sup>3</sup>];

$\rho_2$  = densidade da fase contínua, [kg/m<sup>3</sup>];

g = aceleração da gravidade, [considerando igual a 9,8 m/s<sup>2</sup>];

$\eta$  = viscosidade da fase contínua, [Pa.s].

A temperatura afeta diretamente as propriedades físicas do óleo, da água, do filme interfacial e também a solubilidade dos emulsificantes. No filme interfacial, o aumento da temperatura ocasiona a redução da viscosidade, facilitando a coalescência das gotas (ARNOLD e SMITH, 1992).

Outro fator determinante na estabilidade das emulsões é a alteração do pH da fase aquosa, pela adição de ácidos e bases, provocando modificações nas propriedades físicas do filme interfacial, de modo a anular as cargas presentes nos surfactantes. A adição de eletrólitos multivalentes ou monovalentes também pode diminuir a energia da barreira interfacial a níveis críticos até neutralizar as interações repulsivas eletrostáticas existentes na interface (MCCLEMENTS, 2005).

### **2.3 Desemulsificação**

A desemulsificação é o processo de separação das fases aquosa e oleosa de uma emulsão. Este processo é obtido através da indução da coalescência até a completa separação das fases (MCCLEMENTS, 2005).

O processo de coalescência envolve a remoção do óleo mecanicamente disperso na água, sendo que gotas quimicamente emulsificadas são normalmente muito estáveis para serem unidas umas com as outras. Para que ocorra coalescência, as gotas têm que ser forçadas a ter contato físico, estimulando a aglomeração e reduzindo a carga superficial (RANGEL, 2008).

As técnicas de desemulsificação são classificadas em métodos físicos que geralmente dependem de consumo de energia; e métodos químicos que requerem

floculantes adequados que são selecionados de acordo com o tipo de emulsificante e a concentração utilizada.

Os métodos físicos aumentam a frequência de contato das gotas dispersas. Estes envolvem geralmente separação por gravidade, filtração em leito empacotado e granular, centrifugação, ultrafiltração, flotação por ar, congelamento e campo elétrico induzido. O método mais simples para se ter a cremeação das gotas é a separação por gravidade, a qual admite uma grande capacidade de processamento da fase contínua. No entanto são necessários grandes tanques de sedimentação para evitar variações bruscas de velocidade que possam cisalhar as gotas (SCHLIEPER *et al.*, 2004). Já pela aplicação de força centrífuga, pequenas gotas podem ser separadas, sendo esta uma técnica amplamente utilizada na indústria petrolífera. No entanto com altos custos de investimento e manutenção (GRACE, 1992). Como alternativa têm-se utilizado os hidrociclones, mas estes têm se mostrado ineficientes para altas concentrações de óleo (YOUNG *et al.*, 1994). A técnica de flotação, largamente utilizada no tratamento de águas residuais, emprega o uso de bolhas de ar para separação o óleo. As gotas têm afinidade pela fase apolar do gás e migram para a superfície vindo a colidir umas com as outras promovendo a coalescência (RUBIO *et al.*, 2002).

Os métodos químicos afetam as propriedades interfaciais na superfície das gotas de modo a aumentar a coalescência. Eles envolvem ajuste do pH, adição de cátions ou polímeros como flocculantes (LEE *et al.*, 1989). A combinação dos métodos físicos e químicos tem sido utilizada visando uma maior eficácia de desemulsificação. Estudos recentes mostraram que a utilização de nanopartículas magnéticas recobertas com material anfifílico tem se mostrado eficiente na

estabilização e desestabilização de emulsões. Estas partículas atuam como agentes emulsificantes estabilizando a interface, porém na presença de um campo magnético migram rapidamente em direção ao campo aplicado, desestabilizando a interface e conseqüentemente induzindo à coalescência das gotas (SOUZA *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2012). A utilização de propriedades magnéticas tem se mostrado interessante em virtude da rápida e fácil separação de sistemas multifásicos complexos (PENG *et al.*, 2011).

A escolha da técnica apropriada de desemulsificação depende do emulsificante e dos outros componentes presentes na emulsão (MCCLEMENTS, 2005). Além disso, mais de uma estratégia pode ser necessária para a separação do óleo em um sistema complexo, como é o caso de um meio fermentativo. Os processos de *downstream* utilizados para a separação de misturas fermentativas emulsionadas tem se baseado nos processos originados da indústria petrolífera, onde é comum a utilização de coalescedores de material fibroso (SAREEN *et al.*, 1966), membranas de filtração (HLAVACEK, 1995) e eletrocoalescedores (EOW *et al.*, 2001).

#### **2.4 Avaliação da Estabilidade das Emulsões**

A avaliação da estabilidade das emulsões pode ser realizada monitorando o processo de separação das fases e, com o auxílio de técnicas complementares, é possível identificar a distribuição do tamanho das gotas e determinar as cargas, as propriedades reológicas e interfaciais.

O teste de proveta (conhecido como *bottle test*) é utilizado para determinar a estabilidade das emulsões em função da adição de agentes desmulsificantes, permitindo definir as condições ótimas dos tratamentos através da constatação visual do volume das fases separadas após um determinado período de tempo (MIKULA, 1992). Um método mais sofisticado para monitorar a estabilidade das emulsões é o da turbidimetria, que se baseia no espalhamento da luz, indicando o percentual de luz transmitida através de uma emulsão. A partir deste método podem ser feitas correlações para se determinar a variação na concentração das gotas (MCCLEMENTS, 2005).

A distribuição do tamanho das gotas do sistema pode ser determinada por microscopia, difração a laser, contagem de pulsos elétricos ou métodos ultrasônicos (MCCLEMENTS, 2005). A técnica da difração a laser baseia-se na emissão de um feixe de luz gerado por um laser que atravessa a emulsão gerando um padrão de espalhamento ou difração da luz. A intensidade de luz espalhada é medida em função do ângulo de espalhamento e é relacionada com a distribuição do tamanho das gotas com base em modelos matemáticos (ALLEN, 1997). Os resultados obtidos na técnica da difração a laser podem ser confrontados com a microscopia ótica, que representa uma medida direta envolvendo o uso de luz transmitida e refletida. Através dela têm-se informações relativas ao tamanho e a forma das partículas (KING, 1984).

Já a microscopia confocal de varredura a laser combinada com o uso de corantes fluorescentes de alta seletividade fornece informações valiosas sobre a microestrutura das emulsões, permitindo a geração de imagens em três dimensões com boa resolução e sensibilidade (HAUGLAND e LARISON, 1992).

As gotas da emulsão podem ser avaliadas quanto a sua carga, onde ao serem submetidas a um campo elétrico entre dois eletrodos, indicam seu sinal se movendo na direção do eletrodo de carga oposta (HUNTER, 2001).

As propriedades reológicas das emulsões podem ser determinadas a partir da reometria rotacional permitindo a obtenção de dados de viscosidade e simulação do comportamento das mesmas quando submetidas a processos de cisalhamento (DERKACH, 2009). Através da tensiometria podem ser determinadas as variações na tensão interfacial das gotas da emulsão. Estes parâmetros podem ser obtidos através da tensiometria do perfil das gotas, a qual representa uma técnica bem estabelecida para a determinação das propriedades mecânicas das interfaces líquido-gás e líquido-líquido (RAVERA *et al.*, 2010).



## **CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS**



### **3.1 Material**

Foram utilizados no preparo das emulsões água Milli-Q, levedura fresca *Saccharomyces cerevisiae* (Itaiquara, Brasil) adquirida em comércio local e hexadecano adquirido da Sigma Aldrich Co. (St Louis, USA). Os demais reagentes utilizados nas análises e nos testes de desemulsificação eram todos de grau analítico.

### **3.2 Métodos**

A metodologia desenvolvida neste trabalho foi dividida duas etapas: a elaboração dos sistemas modelo e a quebra das emulsões, sendo que cada uma destas etapas foram devidamente caracterizadas, conforme esquematizado na Figura 3.

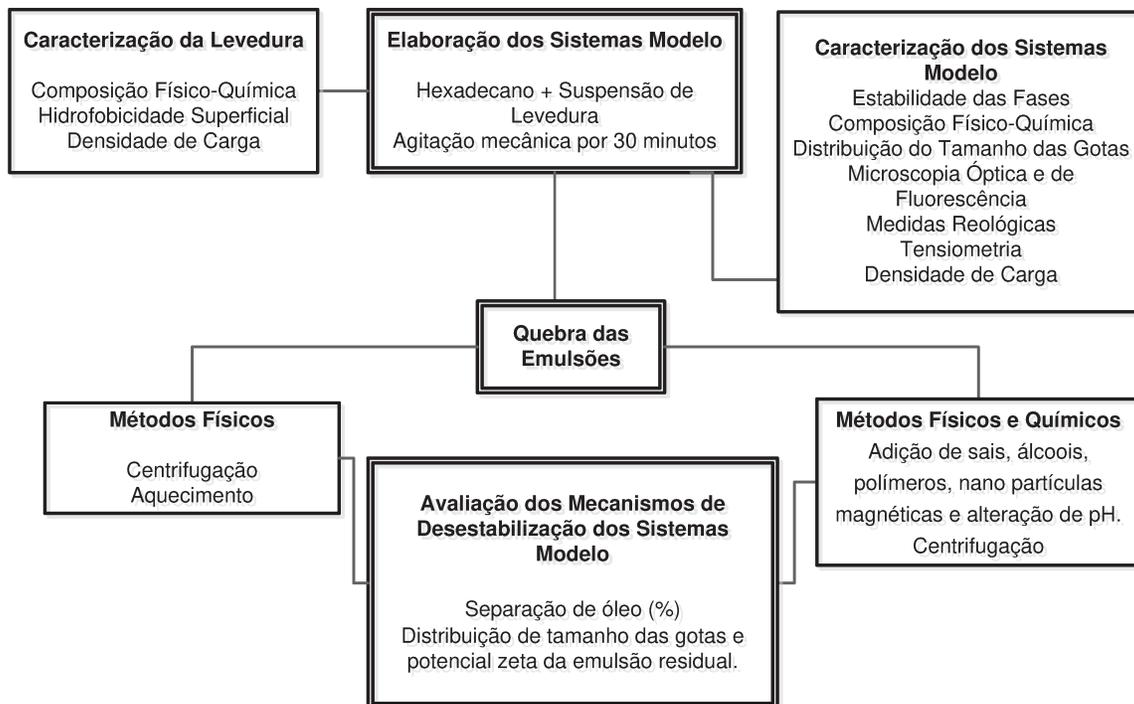


Figura 3. Esquematização da metodologia desenvolvida.

### 3.2.1 Preparo e Caracterização das Suspensões de Levedura

As leveduras foram suspensas em água MilliQ nas concentrações de 1 a 50% (m/m) sob agitação em magnética por 15 minutos. Estas suspensões foram utilizadas imediatamente após seu preparo. A levedura foi caracterizada quanto à sua composição físico-química (item 3.2.6), hidrofobicidade superficial (item 3.2.7) e densidade de cargas (item 3.2.11).

### 3.2.2 Definição das Condições do Processo de Emulsificação

Inicialmente as emulsões foram preparadas pela mistura de 30% de hexadecano (v/v) com 70% (v/v) de suspensão aquosa de leveduras na

concentração de 30% m/m. As emulsões foram preparadas utilizando-se agitador mecânico com impulsor tipo hélice RW20 (IKA, St Augustin, Alemanha) a 700 rpm e variando o tempo de agitação em 10, 30 e 60 minutos. A escolha do tempo de agitação foi feita com base nos menores tamanhos de gotas das emulsões observados a partir da análise dos resultados de microscopia ótica (item 3.2.9) e distribuição de tamanho de gotas (item 3.2.8). O hexadecano foi escolhido como óleo modelo por apresentar valor de densidade semelhante ao farneseno.

Posteriormente, as emulsões foram preparadas fixando-se o tempo e variando-se a velocidade de agitação em 500, 700 e 900 rpm. A escolha da velocidade de agitação também baseou-se nos menores tamanhos de gotas das emulsões observados a partir da análise dos resultados de microscopia ótica e distribuição de tamanho. A faixa de velocidades estudada foi baseada nos valores experimentais utilizados por Renninger *et al.* (2010) na produção de farnesano.

A estabilidade das emulsões foi determinada com base na análise da distribuição de tamanho das gotas em diferentes intervalos de tempo de 12, 24, 36 e 48 horas.

### 3.2.3 Elaboração dos Sistemas Modelo

As emulsões foram preparadas pela mistura de 30% de hexadecano (v/v) com 70% (v/v) de suspensão aquosa de leveduras nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 30% (m/m). As emulsões foram preparadas utilizando-se agitador mecânico a 900 rpm por 30 minutos. As condições de velocidade e tempo de agitação foram fixadas com base em testes preliminares, conforme descritos no item 3.2.2. Após

o preparo, as concentrações de levedura nas emulsões passaram a ser 0,75, 3,75, 7,47, 14,84 e 22,11% (m/m). Todas as emulsões foram obtidas em triplicata.

As emulsões, após entrarem em equilíbrio, tiveram suas fases devidamente caracterizadas com relação à estabilidade à cremação (item 3.2.5), composição físico-química (item 3.2.6), distribuição do tamanho das gotas (item 3.2.8), microscopia óptica (item 3.2.9), microscopia de confocal (item 3.2.10), densidade de carga (item 3.2.11), medidas reológicas (item 3.2.12) e tensiometria (item 3.2.13). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Após as fases das emulsões entrarem em equilíbrio, estas foram centrifugadas a 10000 rpm (15317 g) até se obter total separação dos componentes adicionados. A fim de se averiguar a influência da levedura na estabilidade das emulsões, foram elaborados dois tipos de emulsões. No primeiro tipo foi utilizado o hexadecano recuperado pela centrifugação e 30% (v/v) do mesmo foi misturado com 70% (v/v) de água Milli-Q em agitador mecânico a 900 rpm por 30 minutos. No segundo tipo foi utilizada a água recuperada da centrifugação e 70% (v/v) da mesma foi misturada com 30% (v/v) de hexadecano puro em agitador mecânico a 900 rpm por 30 minutos. Para os sistemas em que foi possível obter uma fase creme, as gotas foram observadas por microscopia óptica (item 3.2.9) e distribuição de tamanho de gotas (3.2.8).

#### 3.2.4 Quebra das Emulsões

As estratégias adotadas na quebra das emulsões empregaram métodos físicos e a combinação de métodos físicos e químicos, conforme descritos nos

itens 3.2.4.1 e 3.2.4.2. O desempenho da desemulsificação foi avaliado pelo percentual de separação de óleo (Eq. 3), e pela distribuição do tamanho de gotas (item 3.2.8) e potencial zeta (item 3.2.11) da emulsão residual.

$$\text{Separação de óleo (\%)} = 100 * \frac{\text{volume de óleo separado (ml)}}{\text{volume de óleo inicial (ml)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

#### 3.2.4.1 Métodos Físicos

##### 3.2.4.1.1 Centrifugação

As emulsões foram dispostas em tubos *falcon* graduados de 13 ml, em um volume de 10 ml, e centrifugadas em centrífuga Allegra 25R (Beckman Coulter, USA) a 3000 e 10000 rpm (1378 e 15317 g) e o volume das fases foi registrado em determinados intervalos de tempo até se completar o período máximo de duas horas.

##### 3.2.4.2 Aquecimento

As emulsões dispostas em provetas de 10 ml foram submetidas a aumento de temperatura (40, 50 e 60±1°C) permanecendo em banho de aquecimento com temperatura controlada e o volume das fases foi registrado em determinados intervalos de tempo até se completar o período máximo de três horas.

### 3.2.4.3 Métodos Físicos e Químicos

O uso de métodos químicos foi baseado na adição de 1 ml de soluções de diferentes agentes desemulsificantes em uma proveta graduada contendo 9 ml das emulsões. A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos (NADARAJAH *et al.*, 2002). Os agentes desemulsificantes foram preparados em suas respectivas concentrações e quando foram adicionados nas emulsões sua concentração foi diluída em 10 partes. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e o volume das fases foi registrado em determinados intervalos de tempo (efeito gravitacional) até se completar o período máximo de três horas. Em paralelo à etapa de decantação, as amostras também foram centrifugadas a 10000 rpm (15317 g) por 10 minutos. Os testes foram realizados em triplicatas e diferentes estratégias, descritas nos itens posteriores, foram estudadas com o intuito de aprimorar a eficiência da desemulsificação.

#### 3.2.4.3.1 Adição de Álcool

Foram adicionados 1 ml de solução de etanol e butanol nas concentrações de 10, 30, 50 e 100% (v/v), conforme metodologia descrita no item 3.2.4.3.

#### 3.2.4.3.2 Alteração do pH

O pH do meio foi alterado para 1,8, 2,0 e 2,2 mediante a adição de solução de HCl (0,1M) utilizando medidor de pH Metrohm pHLab 827 (Metrohm, Suíça).

Estes valores de pH são próximos ao ponto em que a densidade de carga das emulsões era aproximadamente zero (item 3.2.11). O pH do meio também foi alterado para valores de pH básico (9,0) mediante a adição de solução de NaOH (0,1M).

#### 3.2.4.3.3 *Adição de Sais e Polímeros*

Sais mono, divalentes e duplos como NaCl, CaCl<sub>2</sub> e KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O foram adicionados nas concentrações de 1, 5 e 10% (m/v) conforme metodologia descrita no item 3.2.4.3. Também foi adicionado um polímero flocculante catiônico de hidroxietilcelulose de alta massa molecular, intitulado por N9909 (Nalco Industries, USA) nas concentrações de 1, 0,1 e 0,01% (m/v) conforme metodologia descrita no item 3.2.4.3.

#### 3.2.4.3.4 *Adição de Nanopartículas Magnéticas*

Foram adicionados 1 ml de suspensão aquosa de nanopartículas de ferrofluido (diâmetro nominal de 10 nm) recobertas por surfactantes de caráter catiônico, intitulada por EMG 607 (Ferrotec Corporation, USA) nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1% (m/v), conforme metodologia descrita anteriormente. O processo de desestabilização foi induzido mediante a aplicação de um campo magnético de intensidade de aproximadamente 200 mT utilizando um ímã de neodímio (modelo N35) de 1 mm de espessura e 1 mm<sup>2</sup> de área.

### 3.2.5 Estabilidade das Fases

As emulsões obtidas foram transferidas para provetas graduadas de 50 ml com 21 mm de diâmetro interno e 144 mm de altura, e armazenadas a uma temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas, sendo o volume de cada fase quantificado pelo percentual das fases (PF) obtido pela Eq. 4.

$$PF\% = 100 * \frac{H}{H_0} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde:

H representa o volume das fases (superior, intermediária e inferior) após 24 horas, [ml];

$H_0$  representa o volume inicial da emulsão, [ml].

### 3.2.6 Caracterização físico-química

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl com fator de correção proteína-nitrogênio de 6,25 (AOAC, 1992). A umidade foi determinada gravimetricamente a  $105^\circ\text{C}$  (AOAC, 1992), a quantificação do teor de óleo foi determinada pelo método de Bligh & Dyer (BLIGH e DYER, 1959) enquanto que o percentual de massa seca foi obtido por diferença, a partir da concentração de umidade. A densidade foi medida utilizando um densímetro DMA 4500 (Anton Paar, Áustria) à temperatura ambiente de  $25\pm 0,1^\circ\text{C}$ .

### 3.2.7 Hidrofobicidade Superficial da Levedura

A hidrofobicidade da levedura foi determinada por técnica espectrofotométrica utilizando o método de adesão de células microbianas aos hidrocarbonetos (como hexadecano) proposto por Rosenberg *et al.* (1980). As células foram suspensas em tampão fosfato (0,1M). Em seguida adicionou-se três mililitros dessa suspensão celular em tubo de vidro contendo 1 ml de hexadecano, sendo o tubo agitado por 25 segundos em vórtex. Após 30 minutos, mediu-se a absorvância da fase aquosa. A leitura da absorvância das amostras foi realizada utilizando espectrofotômetro Spectro Quest 2800 (UNICO, USA) em um comprimento de onda de 600 nm. A leitura das amostras foi realizada em condições de pH natural do meio e também em um valor de pH próximo ao ponto em que a densidade de carga da levedura era aproximadamente zero. Os resultados foram expressos em percentual de células aderidas ao hexadecano segundo a Equação 5, sendo  $A_0$ , absorvância antes da mistura e  $A$ , absorvância depois da mistura com o hexadecano.

$$\% \text{ Hidrofobicidade} = 100 * \left( 1 - \left( \frac{A}{A_0} \right) \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

### 3.2.8 Distribuição do Tamanho das Gotas

A distribuição do tamanho das gotas das emulsões foi determinada utilizando um equipamento, baseado no espalhamento de luz estático, o Multi-

Angle Static Light-Scattering Mastersizer (Malvern Instruments, Malvern, UK). Essas medidas foram realizadas a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  após 24 horas do preparo das amostras. A moda dos valores obtidos na distribuição de tamanho foi utilizada como forma de comparação entre os resultados.

### 3.2.9 Microscopia Óptica

A microscopia foi realizada em microscópio Carl Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss, Alemanha). As amostras, após 24 horas do preparo, foram colocadas em lâminas, cobertas com lamínulas e visualizadas com aumento de 400 e 100 vezes, sendo obtidas aproximadamente 10 imagens de cada lâmina. As imagens obtidas foram avaliadas no software Image J 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### 3.2.10 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

O hexadecano foi corado com Vermelho do Nilo ( $0,032 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) e as leveduras foram coradas com DAPI ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ , solução de estoque:  $5\text{mg}/\text{ml}$  em água destilada) durante 15 min a  $27\pm 1^\circ \text{C}$  sob agitação, seguindo o método descrito por Ly *et al.* (2006). O óleo e as células foram corados separadamente e, em seguida, a suspensão aquosa contendo as células foi adicionada ao óleo, sob agitação de 900 rpm por 30 minutos. As amostras foram analisadas usando o confocal Zeiss LSM 780 NLO em um microscópio Axio Examiner D1 (Carl Zeiss AG, Alemanha), utilizando um aumento de 400 vezes. As imagens foram coletadas em um comprimento de onda do laser de 514 e 405 nm para excitação

dos fluorófilos Vermelho do Nilo e DAPI. As imagens obtidas foram avaliadas no software Image J 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### 3.2.11 Densidade de Carga

A partir da diluição da fase creme das emulsões em uma concentração de 0,005% m/v em água Milli-Q, foi determinada a carga elétrica superficial (potencial  $\zeta$ ) das gotas utilizando o equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Utilizando esta mesma técnica foram realizadas curvas de titulação da suspensão de levedura pura e da fase creme das emulsões para determinação da variação da densidade de cargas em relação ao pH (1 a 9).

### 3.2.12 Reologia em Estado Estacionário

Para a determinação das propriedades reológicas das emulsões foi utilizado reômetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Áustria). As medidas foram feitas em triplicata a uma temperatura de  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Para a determinação das curvas de escoamento das emulsões foi utilizada a geometria de cone placa. Já para a determinação das propriedades reológicas do hexadecano foi utilizado o reômetro AR1500ex (TA Instruments, Elstree, UK), onde foi utilizada a geometria de cilindros concêntricos com *double gap*.

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  $300 \text{ s}^{-1}$ , em três rampas com ciclo crescente, decrescente e

crecente, para a eliminação da tixotropia. Os dados obtidos foram ajustados aos modelos reológicos de Newton (Eq. 6) e Lei da Potência (Eq. 7). Para o ajuste dos modelos foram realizadas análises de regressão linear e não linear, pelo método de Quasi-Newton, utilizando o programa STATISTICA®5.0. O grau de ajuste de cada modelo considerou a magnitude do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

$$\sigma = \eta * \dot{\gamma} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\sigma = k * \dot{\gamma}^n \quad (\text{Eq. 7})$$

onde:

$\sigma$  corresponde ao valor de tensão de cisalhamento (Pa),  $\dot{\gamma}$  à taxa de deformação ( $s^{-1}$ ),  $\eta$  a viscosidade (Pa.s),  $n$  ao índice de comportamento do fluido e  $k$  ao índice de consistência (Pa.s<sup>n</sup>).

### 3.2.13 Tensiometria

A tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa nas mesmas composições das emulsões estudadas foi medida usando um tensiômetro Tracker-S (Teclis, França), pelo método da gota pendente. O método da gota pendente baseia-se na deformação do perfil da gota em função da tensão interfacial. Os ensaios foram realizados a  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  com a formação de uma gota da fase aquosa na fase oleosa.

Na realização destes testes inicialmente foi necessária a entrada dos valores de densidade do hexadecano e da fase aquosa (suspensões de levedura),

o volume e a área inicial da gota gerada no tensiômetro. As densidades dos líquidos foram medidas conforme descrito no item 3.2.6..

### **3.3 Análise Estatística**

Foram realizadas análises estatísticas, utilizando a comparação de médias entre os resultados por meio do teste de Tukey, através da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, com o programa STATISTICA®5.0 (StatSoft, USA).



## **CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



#### 4.1 Caracterização da Levedura

A composição química da levedura está apresentada na Tabela 2 onde pode ser observado que aproximadamente 67% do total era composto de água, estando abaixo do limite máximo permitido pela legislação (75% m/m) (BRASIL, 1977). Já o teor de lipídeos foi quantificado em 0,94% e o teor de proteínas em 15,66%.

A massa seca representou 32,87% do total, estando de acordo com os resultados encontrados por Klis (1994) que relata que a parede celular da levedura pode ser responsável por até 30% da massa seca da célula. A parede é constituída em sua maioria por duas classes de biopolímeros: (a) as manoproteínas que são polímeros de manose ligadas covalentemente aos peptídeos e (b) as glucanas que são polímeros de glicose. As glucanas e as manoproteínas são encontradas na parede em quantidades aproximadamente iguais (CABIB *et al.*, 1982).

Tabela 2. Composição química da levedura.

Componentes	% (m/m)
Umidade	67,13±0,15
Lipídeos	0,94±0,00
Proteína	15,66±0,06
Massa Seca	32,87±0,15

Os valores de densidade das suspensões de levedura estão apresentados na Figura 4. Foi observada uma relação diretamente proporcional entre a densidade e a concentração de levedura na suspensão, sendo comprovada pelo bom ajuste do modelo linear que apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superior a 0,99.

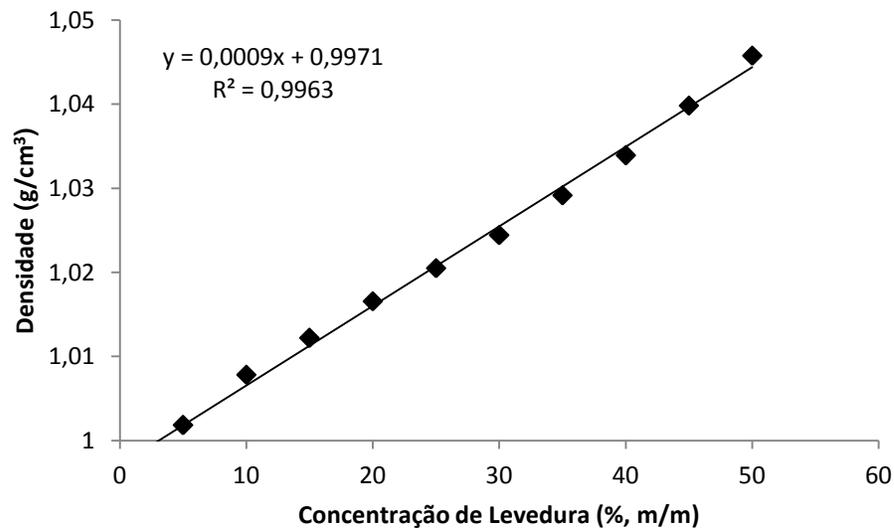


Figura 4. Valores de densidade da suspensão em função da concentração de levedura.

Os valores de potencial zeta obtidos na varredura de pH das suspensões de levedura são apresentados na Figura 5. A levedura apresentou valores de carga nula próximo de pH 2,0, sendo este denominado de ponto isoelétrico. Resultado semelhante foi obtido por Dengis e Rouxhet (1997) que determinaram o potencial zeta de leveduras de fermentação e verificaram que o ponto isoelétrico ficou abaixo do valor de pH 2.

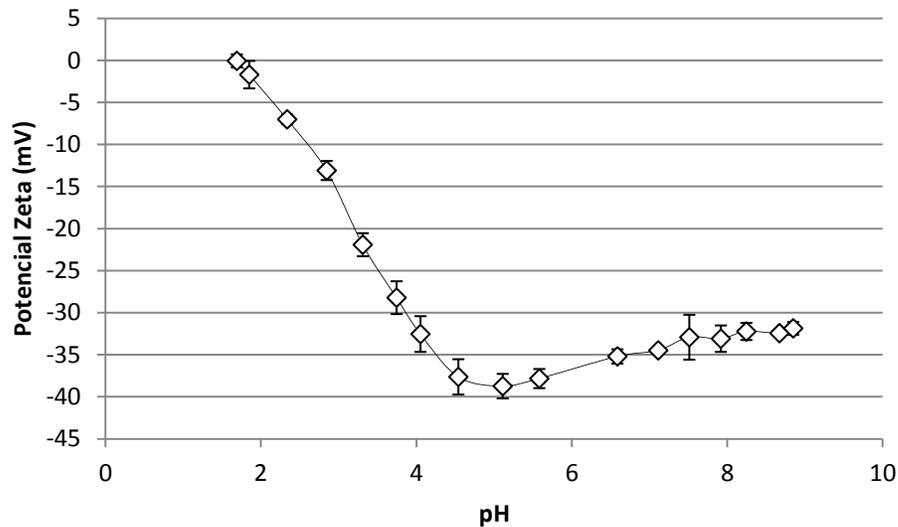


Figura 5. Densidade de carga da levedura em função do pH.

A hidrofobicidade superficial da levedura em função dos valores de pH é apresentada na Tabela 3, onde pode ser observado que houve um decréscimo no percentual de hidrofobicidade em um valor de pH próximo ao valor em que a densidade de cargas da levedura é nula. DeSousa et al. (2006) obtiveram o mesmo comportamento de redução da hidrofobicidade da levedura com a redução do pH, porém seus valores de hidrofobicidade foram dez vezes maiores quando comparados aos valores deste trabalho, pois a fase orgânica era composta de hexano ao invés de hexadecano.

Alguns autores (BOS *et al.*, 1999; HERMANSSON, 1999) relatam que a medida da hidrofobicidade superficial obtida em uma faixa próxima do ponto isoelétrico representa o valor real da adesividade das células, pois nesta faixa elas não interagem eletrostaticamente e suas propriedades superficiais são ressaltadas. A afinidade das células pela fase orgânica é resultado de uma combinação de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (GEERTSEMA-

DOORNBUSCH *et al.*, 1993). No entanto a superfície hidrofóbica do microrganismo pode depender de outros fatores como a quantidade de grupos químicos presentes na parede celular, a viscosidade e a densidade da fase contínua (STUMM *et al.*, 1992; ROUXHET *et al.*, 1994).

Tabela 3. Hidrofobicidade superficial da levedura em diferentes valores de pH.

pH	% Hidrofobicidade
4,65	23,16±1,18
2	7,22±0,38

#### 4.2 Definição das Condições do Processo de Emulsificação

A mistura dos componentes resultou em emulsões que após 24 horas estabilizaram-se em três fases: superior ou creme, intermediária e inferior. A velocidade de 700 rpm e os diferentes tempos de agitação possibilitaram a obtenção de uma fase creme onde as gotas de hexadecano apresentaram-se recobertas pelas células de levedura (Figura 6). Pode ser observada na Figura 7 uma distribuição de tamanho do tipo bimodal, onde o primeiro pico (da esquerda) representa em sua maioria as células de levedura e o segundo pico (da direita) representa as gotas de hexadecano. Conforme observado na distribuição de tamanho de gotas da fase creme das emulsões (Figura 7), para menores tempos de agitação foi obtido um maior volume de gotas com diâmetros maiores que 90  $\mu\text{m}$ . Já para tempos maiores os valores de tamanho foram semelhantes, conforme observado na Tabela 4. Portanto, como o tempo apresentou pouca influência no

tamanho das gotas acima de 30 minutos, fixou-se este tempo de agitação para o preparo das emulsões.

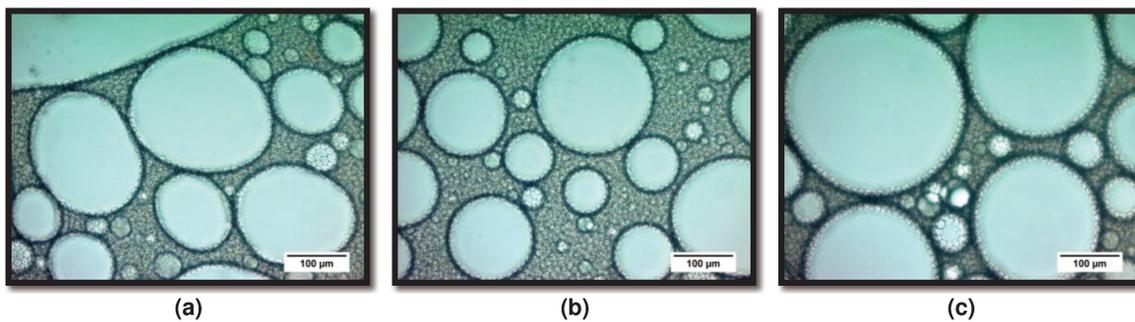


Figura 6. Microfotografias da fase creme das emulsões contendo 22,11% de levedura m/m e 30% v/v de hexadecano obtidas a 700 rpm em diferentes tempos de agitação (a) 60, (b) 30 e (c) 10 minutos, após 24 horas do preparo.

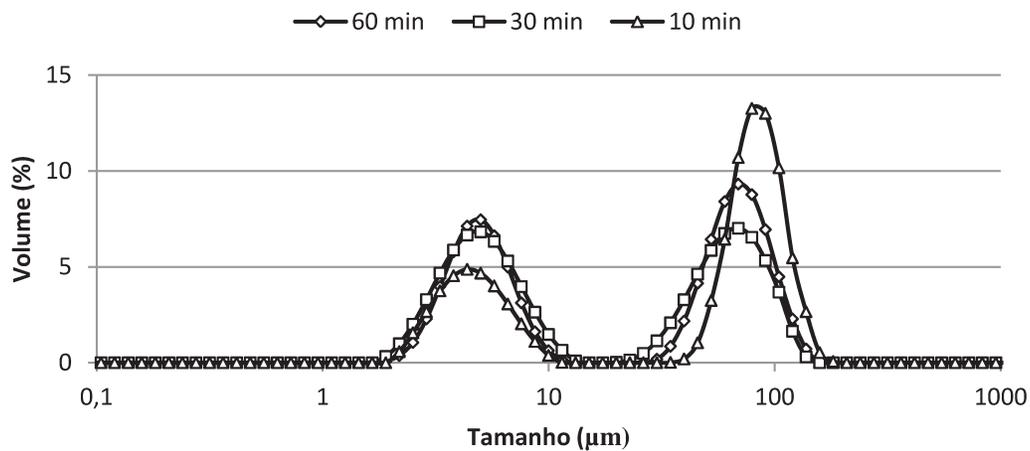


Figura 7. Distribuição de tamanho de gotas da fase creme das emulsões contendo 22,11% de levedura m/m e 30% v/v de hexadecano elaboradas em diferentes tempos de agitação com velocidade constante igual a 700 rpm, após 24 horas do preparo.

Tabela 4. Faixas de tamanho da fase creme das emulsões obtidas em diferentes tempos de agitação.

Tempo (min)	0,1 - 20 $\mu\text{m}$		20 – 1000 $\mu\text{m}$	
	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )
10	33,22	5,01	66,78	91,20
30	51,11	5,75	48,89	79,43
60	45,24	5,75	54,76	79,43

Após esta etapa preliminar, os componentes foram agitados por 30 minutos em diferentes velocidades de agitação. Pode ser observado na Figura 8 que a velocidade de agitação de 900 rpm forneceu gotas de hexadecano menores, o que pode ser confirmado pela distribuição de tamanho de gotas apresentada na Figura 9 e pelo valor da moda dos picos das gotas apresentado na Tabela 5. Portanto, baseado nas condições que forneceram o menor tamanho de gotas, para a elaboração dos sistemas modelo foram fixados o tempo de agitação em 30 minutos e a velocidade de agitação em 900 rpm.

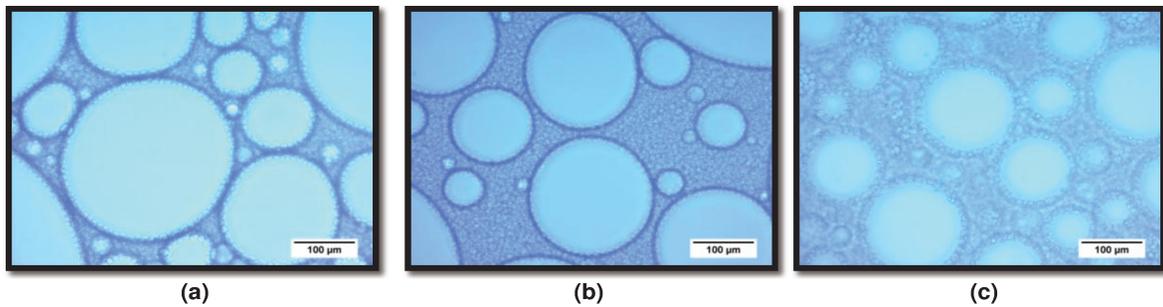


Figura 8. Microfotografias da fase creme das emulsões contendo 22,11% de levedura m/m e 30% v/v de hexadecano elaboradas em diferentes velocidades de agitação (a) 500, (b) 700 e (c) 900 rpm, após 24 horas do preparo.

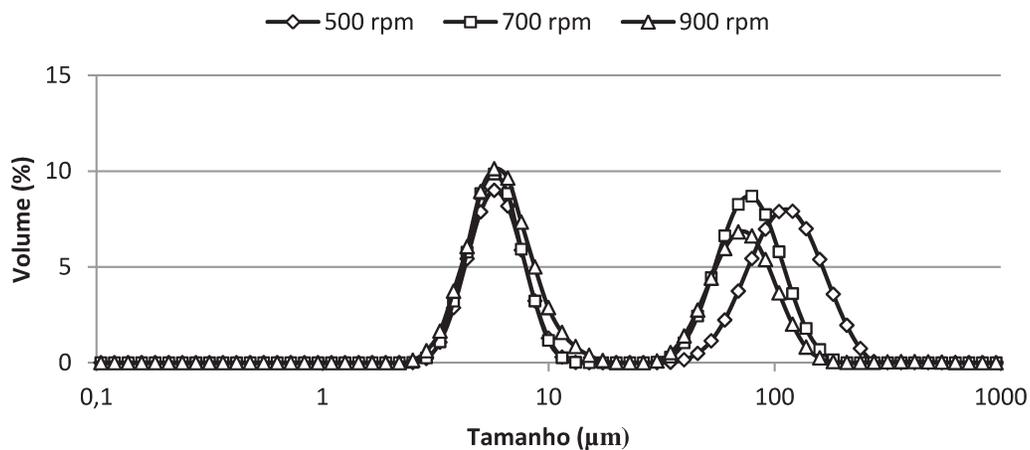


Figura 9. Distribuição de tamanho de gotas da fase creme das emulsões contendo 22,11% de levedura m/m e 30% v/v de hexadecano elaboradas em diferentes velocidades de agitação, após 24 horas do preparo.

Tabela 5. Faixas de tamanho da fase creme das emulsões obtidas em diferentes velocidades de agitação.

Velocidade de Agitação (rpm)	0,1 - 20 $\mu\text{m}$		20 – 1000 $\mu\text{m}$	
	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )
500	45,32	5,75	54,68	120,23
700	48,43	5,75	51,57	79,43
900	59,01	5,75	40,99	69,18

A definição do tempo de análise das emulsões foi determinada com base na distribuição de tamanho das gotas da fase creme em diferentes intervalos de tempo (Figura 10) após o preparo. Na Tabela 6 pode ser observado que a partir de 36 horas as gotas começavam a ter tamanhos maiores e assim, todas as caracterizações dos sistemas foram realizadas no tempo de 24 horas após o preparo das emulsões.

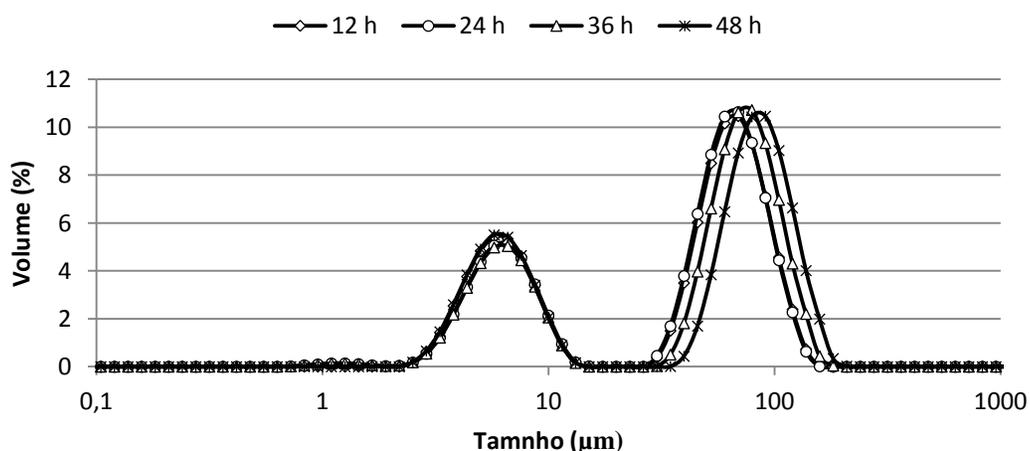


Figura 10. Distribuição de tamanho de gotas da fase creme das emulsões preparadas com 22,11% m/m de levedura avaliada em diferentes tempos de repouso após o preparo.

Tabela 6. Faixas de tamanho da fase creme das emulsões avaliadas em diferentes tempos de repouso após o preparo.

Tempo (horas)	0,1 - 20 $\mu\text{m}$		20 – 1000 $\mu\text{m}$	
	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )
12	35,33	5,75	64,67	69,18
24	33,97	5,75	66,03	69,18
36	33,51	5,75	66,49	79,43
48	35,71	5,75	64,29	91,20

### 4.3 Estabilidade das Emulsões: Entendimento do Mecanismo

#### 4.3.1 Estabilidade das Fases

Uma vez fixados o tempo e a velocidade de agitação, as emulsões modelo foram avaliadas quanto à variação da concentração de levedura. Após o período de 24 horas, todos os sistemas elaborados estabilizaram-se em três fases: superior ou creme, intermediária e inferior. Na Figura 11 pode ser observado que quanto maior a concentração de levedura, mais turvas se tornaram as fases superior e intermediária.

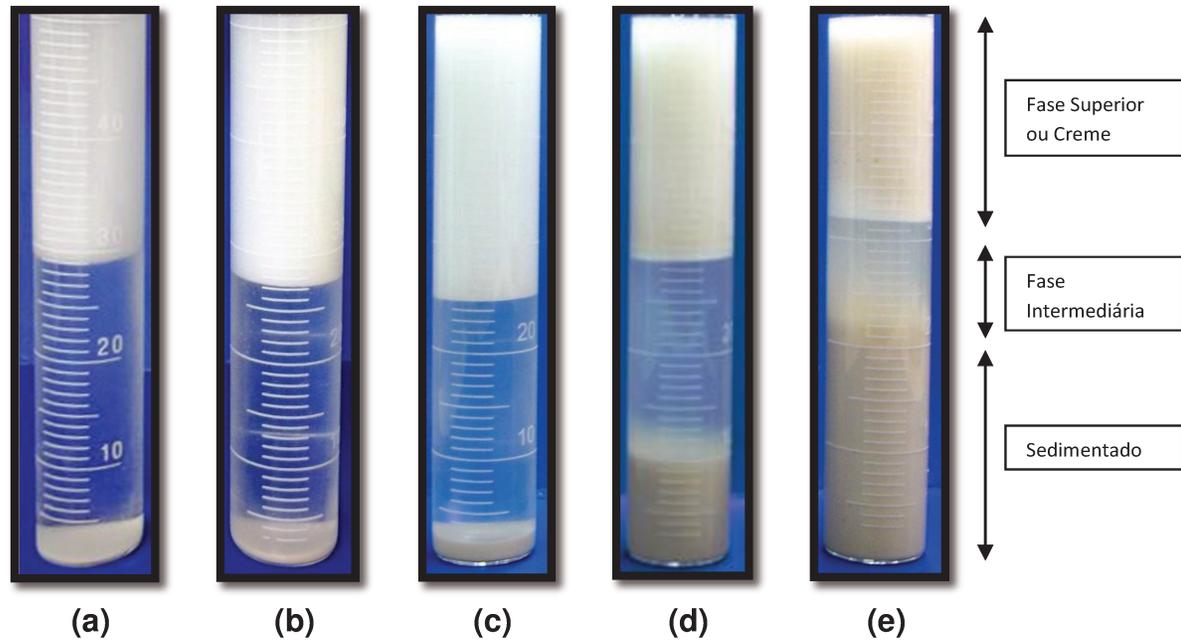


Figura 11. Aspecto visual das emulsões preparadas nas concentrações de (a) 0,75, (b) 3,75, (c) 7,47, (d) 14,83, (e) 22,11% m/m de levedura e 30% v/v de hexadecano após 24 horas de repouso.

Os valores de percentuais das fases mostraram que não houve diferença significativa do volume da fase creme independente da concentração de levedura (Tabela 7), indicando que todo ou quase todo o óleo estava nesta fase. Por outro lado, os volumes das fases intermediária e inferior (sedimentado) reduziram e aumentaram com o incremento da concentração de levedura, respectivamente.

Tabela 7. Percentual de separação das fases das emulsões contendo diferentes concentrações de levedura, após 24 horas de teste de proveta a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

Concentração de Levedura na Emulsão [% m/m]	Percentual das Fases (%)		
	FS	FI	S
0,75	35,30 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>	63,7 $\pm$ 1,31 <sup>b</sup>	1,0 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
3,75	41,3 $\pm$ 3,99 <sup>a</sup>	56,7 $\pm$ 4,00 <sup>ab</sup>	2,0 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
7,47	42,4 $\pm$ 3,72 <sup>a</sup>	49,1 $\pm$ 2,64 <sup>a</sup>	8,5 $\pm$ 1,98 <sup>b</sup>
14,84	40,4 $\pm$ 2,12 <sup>a</sup>	38,8 $\pm$ 1,41 <sup>d</sup>	20,8 $\pm$ 3,15 <sup>c</sup>
22,11	37,2 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	22,5 $\pm$ 1,25 <sup>c</sup>	40,3 $\pm$ 1,24 <sup>d</sup>

FS: Fase Superior; FI: Fase Intermediária; S: Sedimentado

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A fim de se determinar a estabilidade da fase creme obtida, os sistemas foram deixados sob as condições de armazenamento iniciais ( $25^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ ) e foram avaliados com o tempo (Figura 12). Durante um período de sete dias, o volume das fases não se alterou e só ao final do período começou a aparecer uma fase contínua de hexadecano. O empacotamento das gotas pode ter induzido ao estreitamento e drenagem do filme interfacial com a consequente ruptura do filme e junção das gotas até a formação de uma fase contínua (MCCLEMENTS, 2005).

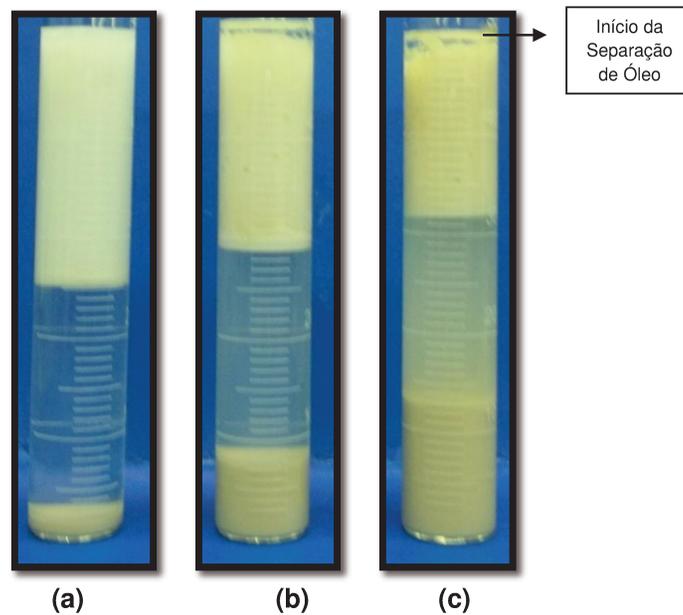


Figura 12. Aspecto visual das emulsões preparadas nas concentrações de (a) 7,47, (b) 14,84 e (c) 22,11% m/m de levedura e 30% v/v de hexadecano após 7 dias de teste de proveta.

A emulsão preparada na concentração de 7,47% m/m foi centrifugada a 10000 rpm até a completa separação dos componentes. A partir do hexadecano e da fase aquosa recuperados após centrifugação foram preparadas novas emulsões. No entanto, o hexadecano recuperado não resultou na formação de uma emulsão, indicando assim que os compostos responsáveis pela estabilidade dos sistemas não eram apolares. Por outro lado, a fração aquosa recuperada permitiu a elaboração de uma emulsão que separou em duas fases, uma inferior aquosa e uma superior emulsionada composta por gotas de hexadecano com tamanho similar ao obtido na emulsão inicial, conforme observado na Figura 13.

Ainda na Figura 13 pode ser observado que a distribuição de gotas por número mostrou que há um maior número de gotas com tamanho na faixa de 1

$\mu\text{m}$  e na microfotografia pode ser observado que não ocorreu a presença de leveduras na interface entre as gotas. Isto indica que além da levedura, componentes hidrofílicos presentes no sistema e provenientes da levedura também são responsáveis pela estabilidade da fase creme que se forma após a separação de fases da emulsão.

A formação de uma emulsão pode ter ocorrido devido à presença de manoproteínas na fase aquosa (CAMERON *et al.*, 1988; BARRIGA *et al.*, 1999). Zlotnik *et al.* (1984) relatam que as manoproteínas são consideradas como um material de preenchimento, ligadas na rede estrutural das glucanas. No entanto, as manoproteínas podem ser extraídas da parede celular sem causar grandes alterações na forma das células. As manoproteínas se encontram nas superfícies mais externas às células e determinam a maioria de suas propriedades de superfície (SCHREUDER *et al.*, 1996).

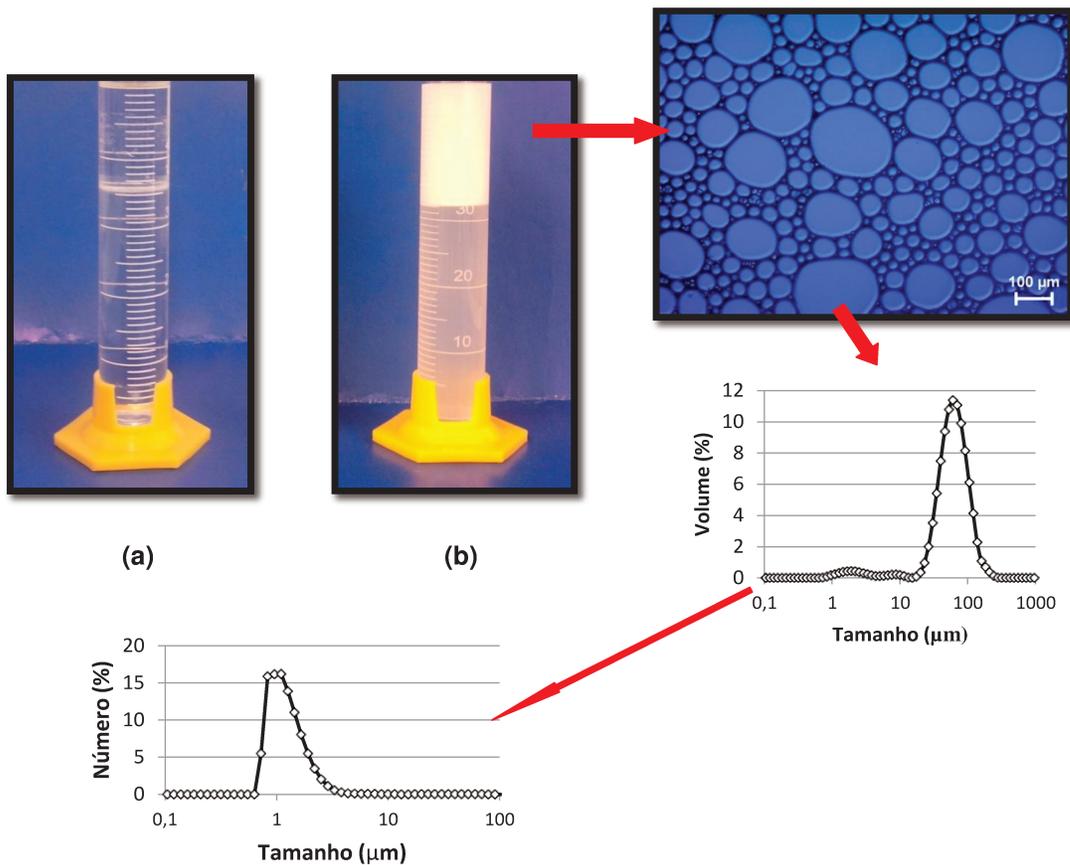


Figura 13. Aspecto visual das emulsões preparadas com (a) hexadecano recuperado e (b) água recuperada, bem como a microfotografia e a distribuição de tamanho por volume e número da fase superior.

#### 4.3.2 Caracterização físico-química das fases da emulsão

Na Tabela 8 são apresentados os teores de óleo, água, proteína e massa seca quantificados em cada uma das fases. Pode ser observado que o conteúdo de óleo permaneceu aproximadamente constante na fase creme e tendeu a reduzir nas demais fases com o decréscimo da concentração de levedura. Este

decréscimo pode estar diretamente relacionado com a concentração de levedura. Por outro lado o conteúdo de água diminuiu e o teor de massa seca aumentou à medida que a concentração de levedura aumentou. Ainda na Tabela 8 pode ser observado que a fase superior ou creme das emulsões era constituída de aproximadamente 60% de óleo e 40% de água e a fase intermediária continha praticamente 100% de água. A fase de sedimentado continha aproximadamente 85% de água e grande parte das células de levedura adicionadas apresentava-se nesta fase.

O líquido com maior volume não é necessariamente aquele que forma o meio contínuo, pois isso depende das características do emulsificante. Peker *et al.* (2001) demonstraram ser possível preparar emulsões (A/O) estáveis com concentrações da fase dispersa chegando a 95% v/v.

O aumento no teor de proteínas em cada uma das fases (Tabela 8) está diretamente relacionado com o aumento da massa seca, o que também refletiu em um aumento da densidade das fases (Tabela 9). Cameron *et al.* (1988) relatam que as manoproteínas atuam como excelentes bioemulsificantes, pois baixas concentrações (0,04% m/v) são capazes de fornecer índices de cremeação superiores a 60%, utilizando diferentes tipos de óleos.

Tabela 8. Composição das fases das emulsões preparadas com diferentes concentrações de levedura.

(*)	Água [%, m/m]			Óleo [%, m/m]			Proteína [%, m/m]			Massa Seca [%, m/m]		
	FS	FI	S	FS	FI	S	FS	FI	S	FS	FI	S
7,47	39,8±0,40 <sup>b</sup>	99,6±0,07 <sup>c</sup>	85,7±0,04 <sup>c</sup>	60,1±0,41 <sup>a</sup>	0,3±0,07 <sup>c</sup>	0,4±0,04 <sup>b</sup>	0,34±0,02 <sup>b</sup>	0,03±0,01 <sup>a</sup>	5,87±0,08 <sup>b</sup>	0,6±0,00 <sup>c</sup>	0,1±0,02 <sup>c</sup>	13,9±0,01 <sup>c</sup>
14,84	39,1±0,49 <sup>ab</sup>	99,0±0,08 <sup>b</sup>	84,7±0,05 <sup>b</sup>	60,5±0,48 <sup>a</sup>	0,7±0,08 <sup>b</sup>	0,5±0,05 <sup>b</sup>	0,70±0,07 <sup>a</sup>	0,05±0,02 <sup>a</sup>	7,48±0,04 <sup>a</sup>	1,0±0,03 <sup>b</sup>	0,3±0,03 <sup>b</sup>	14,9±0,00 <sup>b</sup>
22,11	37,6±0,50 <sup>a</sup>	98,5±0,02 <sup>a</sup>	83,1±0,14 <sup>a</sup>	61,0±0,53 <sup>a</sup>	1,0±0,08 <sup>a</sup>	0,8±0,12 <sup>a</sup>	0,79±0,01 <sup>a</sup>	0,11±0,05 <sup>a</sup>	7,97±0,02 <sup>a</sup>	2,0±0,03 <sup>a</sup>	0,5±0,06 <sup>a</sup>	16,1±0,02 <sup>a</sup>

(\*) Concentração de Levedura (%, m/m); FS: Fase Superior; FI: Fase Intermediária; S: Sedimentado

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabela 9. Valores de densidade das fases separadas das emulsões preparadas em diferentes concentrações de levedura.

Concentração de Levedura na Emulsão [% , m/m]	Densidade [kg/m <sup>3</sup> ]		
	FS	FI	S
7,47	807,85±0,17 <sup>a</sup>	997,63±0,01 <sup>a</sup>	1060,39±0,02 <sup>a</sup>
14,84	811,43±0,06 <sup>b</sup>	998,32±0,01 <sup>b</sup>	1064,63±0,02 <sup>b</sup>
22,11	824,23±0,41 <sup>c</sup>	998,79±0,01 <sup>c</sup>	1077,67±0,02 <sup>c</sup>

FS: Fase Superior; FI: Fase Intermediária; S: Sedimentado

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3 Distribuição do Tamanho das Gotas das Emulsões

Nas Figuras 14, 15 e 16 são apresentadas as distribuições de tamanho por volume de cada uma das fases das emulsões.

Na Figura 14 há a presença de um único pico, sendo este caracterizado como sendo das leveduras, considerando que na fase de sedimentado contém basicamente células de levedura e água. Este pico também foi observado nas Figuras 15 e 16 referentes às fases intermediária e superior (ou creme), no entanto, com diferentes frações volumétricas, que dependeram da concentração de levedura.

Na Figura 16 pode ser observada a presença de distribuições de tamanho bimodais, onde o primeiro pico representa em sua maioria as células de levedura e o segundo pico representa as gotas de hexadecano. Para maiores concentrações de levedura (acima de 7,47%, m/m) foi possível obter gotas

menores. Na Tabela 10 pode-se confirmar que as células de levedura apresentaram tamanho médio na faixa dos 5  $\mu\text{m}$  e as gotas obtidas utilizando maiores concentrações de levedura apresentaram moda ao redor de 60  $\mu\text{m}$ , enquanto que aquelas obtidas utilizando menores concentrações de levedura apresentaram tamanho superior a 100  $\mu\text{m}$ . Já a fase intermediária (Figura 15) apresentou gotas relativamente menores quando comparadas a fase superior.

A distribuição de tamanho desempenha um papel importante na estabilidade de emulsões óleo em água, uma vez que um aumento no tamanho das gotas promove a coalescência das mesmas, causando a desestabilização da emulsão (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008).

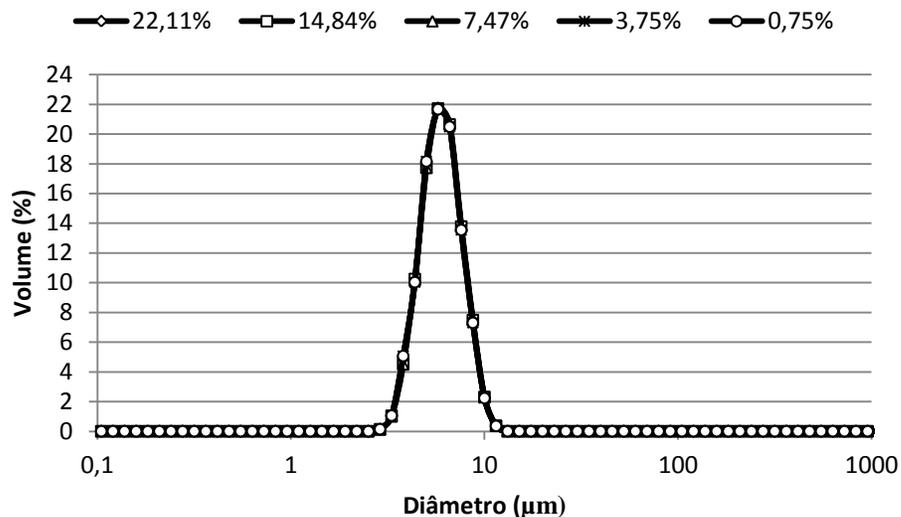


Figura 14. Distribuição de tamanho por volume da fase de sedimentado das emulsões preparadas em diferentes concentrações de levedura.

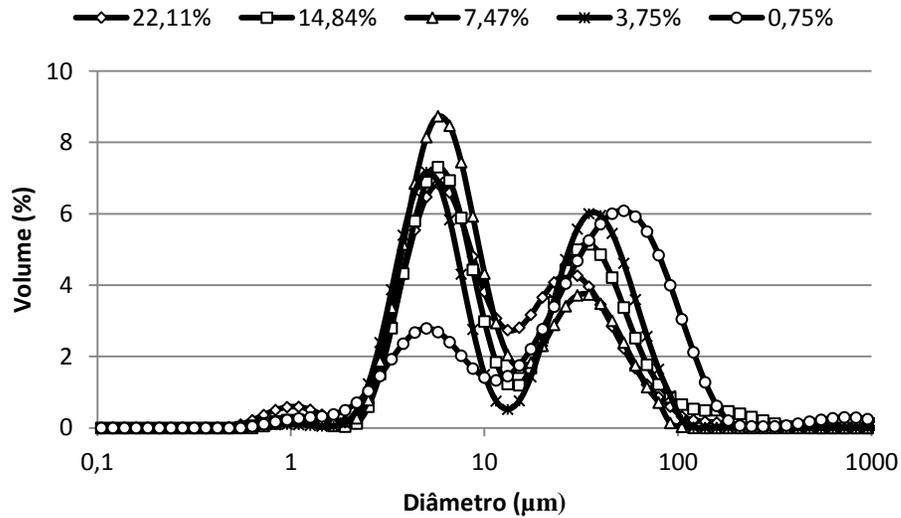


Figura 15. Distribuição de tamanho por volume da fase intermediária das emulsões preparadas em diferentes concentrações de levedura.

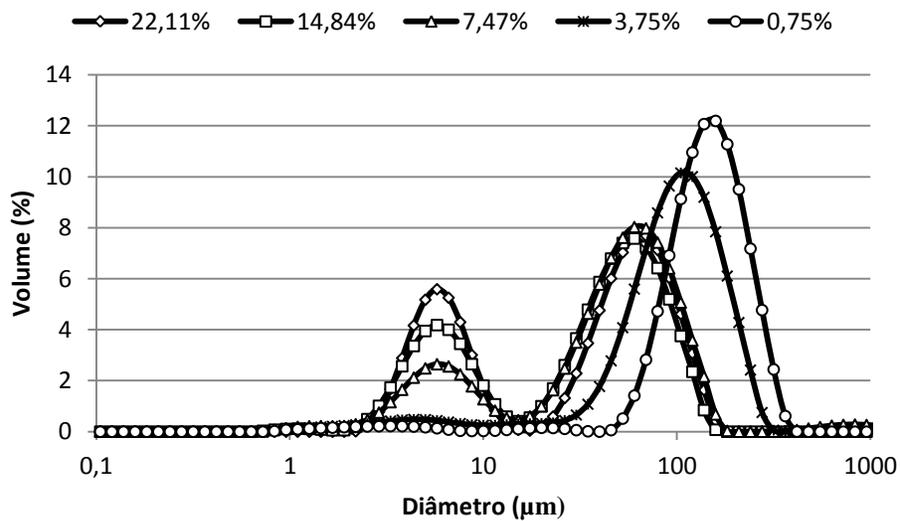


Figura 16. Distribuição de tamanho por volume da fase superior das emulsões preparadas em diferentes concentrações de levedura.

Tabela 10. Faixas de tamanho obtidas para a levedura pura, para a fase creme e intermediária das emulsões em diferentes concentrações de levedura.

(*)	Fase Superior				Fase Intermediária			
	0,1 - 20 $\mu\text{m}$		20 – 1000 $\mu\text{m}$		0,1 - 20 $\mu\text{m}$		20 – 1000 $\mu\text{m}$	
	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )
100	100	5,01	-	-	-	-	-	-
0,75	2,75	3,31	97,25	158,49	30	5,01	70	52,48
3,75	6,36	4,36	93,64	104,71	51,19	5,01	48,81	34,67
7,47	22,52	5,75	77,48	60,26	69,44	5,01	30,56	34,67
14,84	32,14	5,75	67,86	60,26	55,13	5,75	44,87	30,20
22,11	36,06	5,75	63,94	69,18	62,49	5,75	37,51	26,30

(\*) Concentração de Levedura (% , m/m)

#### 4.3.4 Microscopia Óptica

Foram obtidas imagens de microscopia para todas as fases dos sistemas modelo nas diferentes concentrações de levedura, conforme mostrado nas Figuras 17 e 18. Pode ser observado que o sedimentado continha apenas as células de levedura, porém a fase intermediária continha o microrganismo e algumas gotas de hexadecano. Para a fase superior (creme) foi possível observar as gotas de hexadecano e sua interface, que em alguns casos estava completamente recoberta pelas células de levedura. O aumento da concentração de levedura associado ao tamanho relativamente pequeno das gotas parece ter induzido que a fase creme fosse mais empacotada. Além dos compostos hidrofílicos

responsáveis pela estabilidade da emulsão, identificados anteriormente, mediante a análise da microscopia pode-se dizer que as células de levedura se comportam como partículas estabilizantes.

A estabilização das gotas de uma emulsão por micro ou nanopartículas é outra abordagem que tem recebido atenção crescente. As emulsões estabilizadas por estas partículas são denominadas de emulsões tipo *Pickering*. (PICKERING, 1907) e alguns microrganismos podem se alocar na interface criando a estabilização por *Pickering* (DICKINSON, 2012). Neste tipo de emulsão o tamanho das gotas é normalmente uma ordem de magnitude maior do que as partículas estabilizantes. Assim, conhecendo-se o tamanho dos microrganismos seria possível estimar o tamanho da menor gota da emulsão, porém se a concentração for insuficiente para recobrir a interface serão formadas gotas muito maiores (CHEVALIER e BOLZINGER, 2013). Portanto, pode-se dizer que a fase creme das emulsões tem o aspecto de emulsões do tipo *Pickering*.

Baseado na distribuição de tamanho de gotas da fase creme das emulsões (Figura 16) e microfotografias (Figura 18) foi escolhido o sistema modelo que continha 7,47% (m/m) de levedura para ser utilizado na etapa posterior de quebra das emulsões, uma vez que a partir desta concentração as gotas obtidas apresentaram tamanho reduzido.

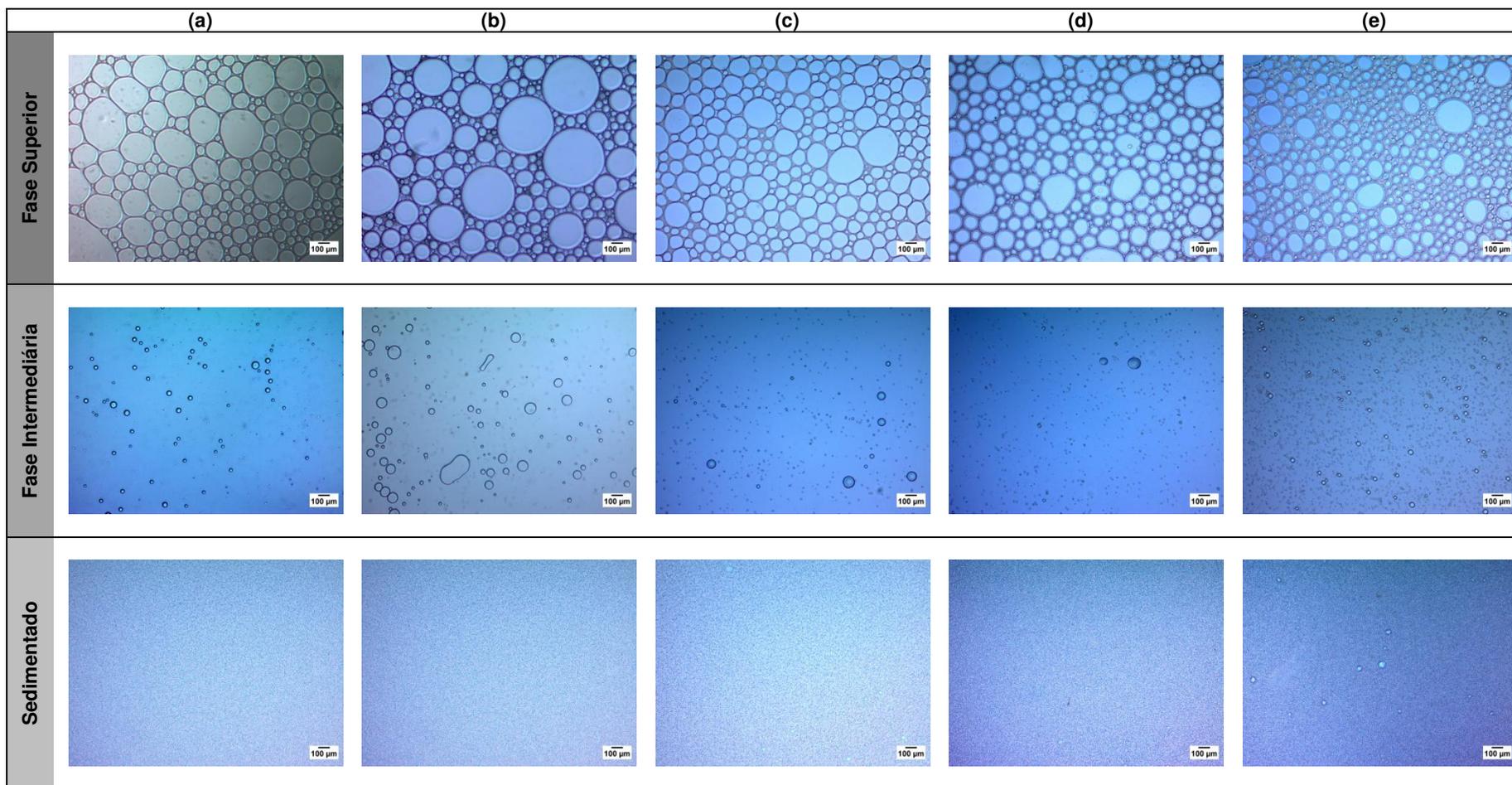


Figura 17. Microfotografias das emulsões preparadas nas concentrações de (a) 0,75, (b) 3,75, (c) 7,47, (d) 14,84, (e) 22,11% m/m de levedura e 30% v/v de hexadecano, após 24 horas. Aumento de 100 vezes.

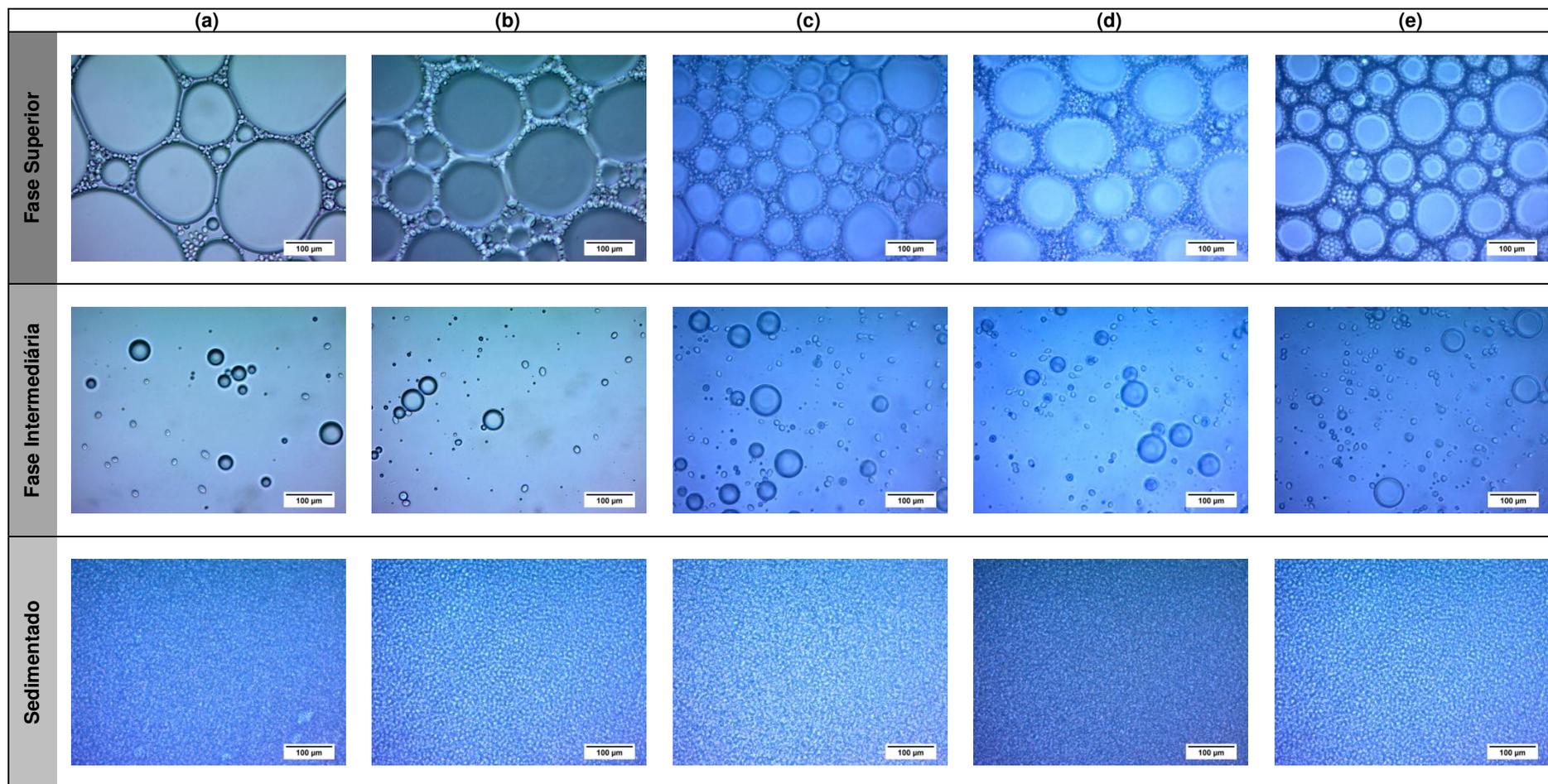


Figura 18. Microfotografias das emulsões preparadas nas concentrações de (a) 0,75, (b) 3,75, (c) 7,47, (d) 14,84, (e) 22,11% m/m de levedura e 30% v/v de hexadecano, após 24 horas. Aumento de 400 vezes.

## 4.3.5 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Através da microscopia confocal de varredura a laser pode-se confirmar a presença das células de levedura (em azul) na fase superior, onde as mesmas encontravam-se na interface entre as gotas de hexadecano (em vermelho) e a água (Figura 19). Mais uma vez pode-se indicar o mecanismo de estabilização por *Pickering* e comportamento semelhante foi obtido por Ly *et al.* (2006) no recobrimento de gotas de hexadecano por bactérias *Lactococcus lactis*. Ainda na Figura 19 pode-se confirmar que a fase creme era um sistema emulsionado do tipo óleo em água (O/A).

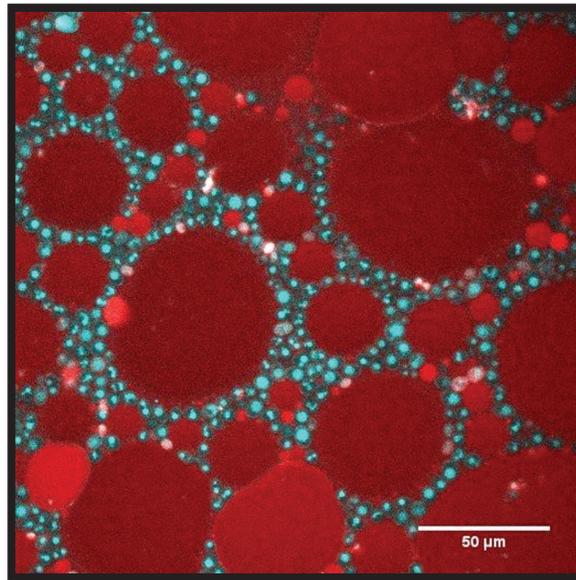


Figura 19. Imagem confocal da fase superior (creme) das emulsões compostas por 7,47% m/m de levedura corada com DAPI e 30% de hexadecano v/v corado com Vermelho do Nilo. Aumento de 400 vezes.

A adesão de microrganismos em diferentes tipos de interface tem sido explicada pela teoria clássica da estabilidade coloidal, a teoria Derjagin-Landau-Vernwey-Overbeek (DLVO), onde a adesão é governada por interações de longo alcance entre as partículas e a superfície do líquido envolvendo interações hidrofóbicas, ácido-base e interações eletrostáticas (HERMANSSON, 1999).

#### 4.3.6 Reologia em Estado Estacionário

As fases inferior e intermediária apresentaram comportamento reológico característico de fluidos newtonianos que é a relação linear entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação, conforme pode ser observado nas Figuras 20 e 21. Os parâmetros reológicos calculados são apresentados na Tabela 11, onde pode-se confirmar o bom ajuste dos modelos em virtude dos elevados valores do coeficiente de determinação. Os valores de viscosidade calculados são apresentados na Tabela 11, onde pode ser observado que não houve alteração da viscosidade da fase intermediária, que era similar a da água, com a concentração de levedura. No entanto, a viscosidade da fase inferior foi mais elevada e seu valor foi diretamente proporcional à concentração de levedura.

Já a fase superior que mostrou características de uma emulsão concentrada (Figura 18) apresentou comportamento pseudoplástico (Figura 22). Os valores de índice de consistência ( $k$ ), de comportamento ( $n$ ) e a viscosidade do fluido aumentaram com o aumento da concentração de levedura.

A emulsão apresentou comportamento de fluido não newtoniano apesar da água e do hexadecano (viscosidade igual a 0,0032 Pa.s) serem fluidos newtonianos. O comportamento pseudoplástico pode ocorrer por uma série de fatores como, por exemplo, a alteração da distribuição espacial devido à aplicação de cisalhamento, alinhamento de gotas não esféricas, remoção de moléculas de solventes ligados às gotas, ou deformação e rompimento de flocos (MACOSKO, 1994). As interações coloidais com as gotas da emulsão são os principais fatores que determinam seu comportamento reológico (MCCLEMENTS, 2005). De acordo com Quemada e Berli (2002) um dos principais fatores que influenciam nas propriedades reológicas dos sistemas coloidais é o empacotamento das partículas no sistema. O aumento na viscosidade também pode ser atribuído à presença de carboidratos, o que pode ter contribuído para a redução da coalescência (MCCLEMENTS, 2005).

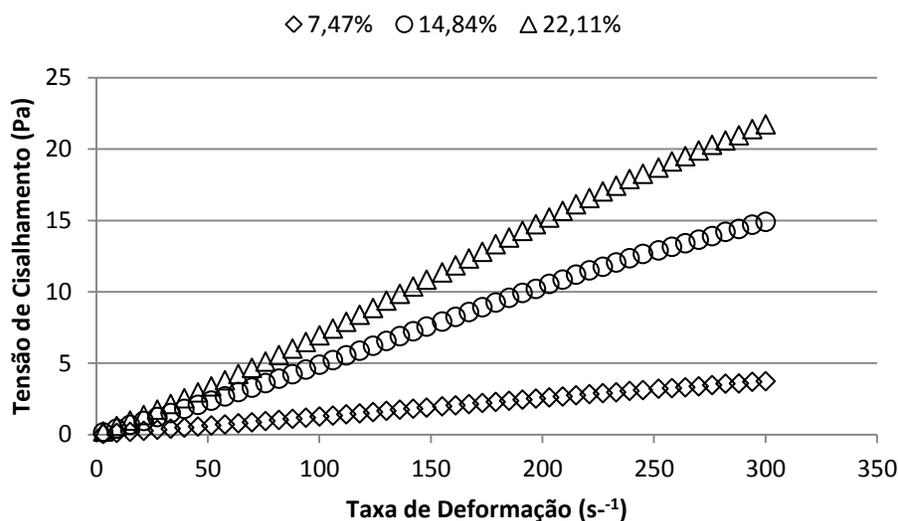


Figura 20. Curvas de escoamento da fase inferior (sedimentado) das emulsões contendo 7,47, 14,84 e 22,11% m/m de levedura.

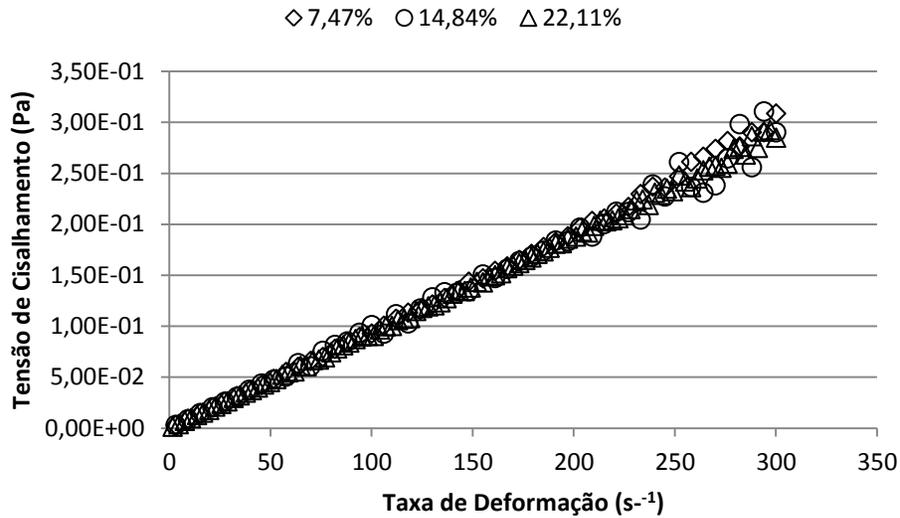


Figura 21. Curvas de escoamento da fase intermediária das emulsões contendo 7,47, 14,84 e 22,11% m/m de levedura.

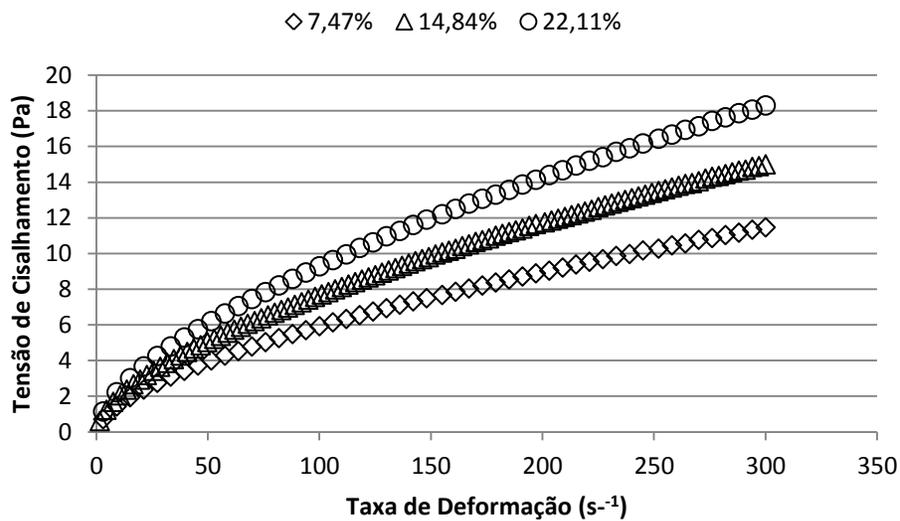


Figura 22. Curvas de escoamento da fase superior (creme) das emulsões contendo 7,47, 14,84 e 22,11% m/m de levedura.

Tabela 11. Parâmetros reológicos dos modelos de Newton e Lei da Potência ajustados aos dados experimentais das curvas de escoamento de cada uma das fases das emulsões contendo 7,47, 14,84 e 22,11% m/m de levedura, respectivamente.

(*)	Parâmetros				Viscosidade (Pa.s)		R <sup>2</sup>
			k (Pa.s <sup>n</sup> )	n	$\eta_{3s}^{-1}$	$\eta_{100s}^{-1}$	
7,47	FS	LP	0,377	0,598	38,58	0,059	0,999
	FI	N	-	-	0,001	0,001	0,998
	S	N	-	-	0,013	0,013	0,999
14,84	FS	LP	0,468	0,608	42,68	0,077	0,999
	FI	N	-	-	0,001	0,001	0,994
	S	N	-	-	0,051	0,051	0,999
22,11	FS	LP	0,553	0,613	47,61	0,093	0,999
	FI	N	-	-	0,001	0,001	0,999
	S	N	-	-	0,074	0,074	0,999

(\*) Concentração de Levedura; FS: Fase Superior; FI: Fase Intermediária; S: Sedimentado; LP: Lei da Potência; N: Newtoniano

#### 4.3.7 Tensiometria

Na Figura 23a são apresentados os valores de tensão interfacial entre a suspensão de células de levedura e o hexadecano em função do tempo, onde se observa que, para a maioria das amostras, o equilíbrio foi alcançado em até 1 hora. No entanto, para as menores concentrações de levedura (0, 5 e 10% m/m)

(Figura 23b) foi necessário um maior tempo de estabilização. Assim, quanto maior a concentração de levedura na suspensão mais rápido ocorreu o equilíbrio da tensão interfacial. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a interface entre o hexadecano e a água é recoberta pelas células e que quanto maior o número de células disponíveis, menor será o tempo de recobrimento, implicando em uma mais rápida estabilização da tensão interfacial.

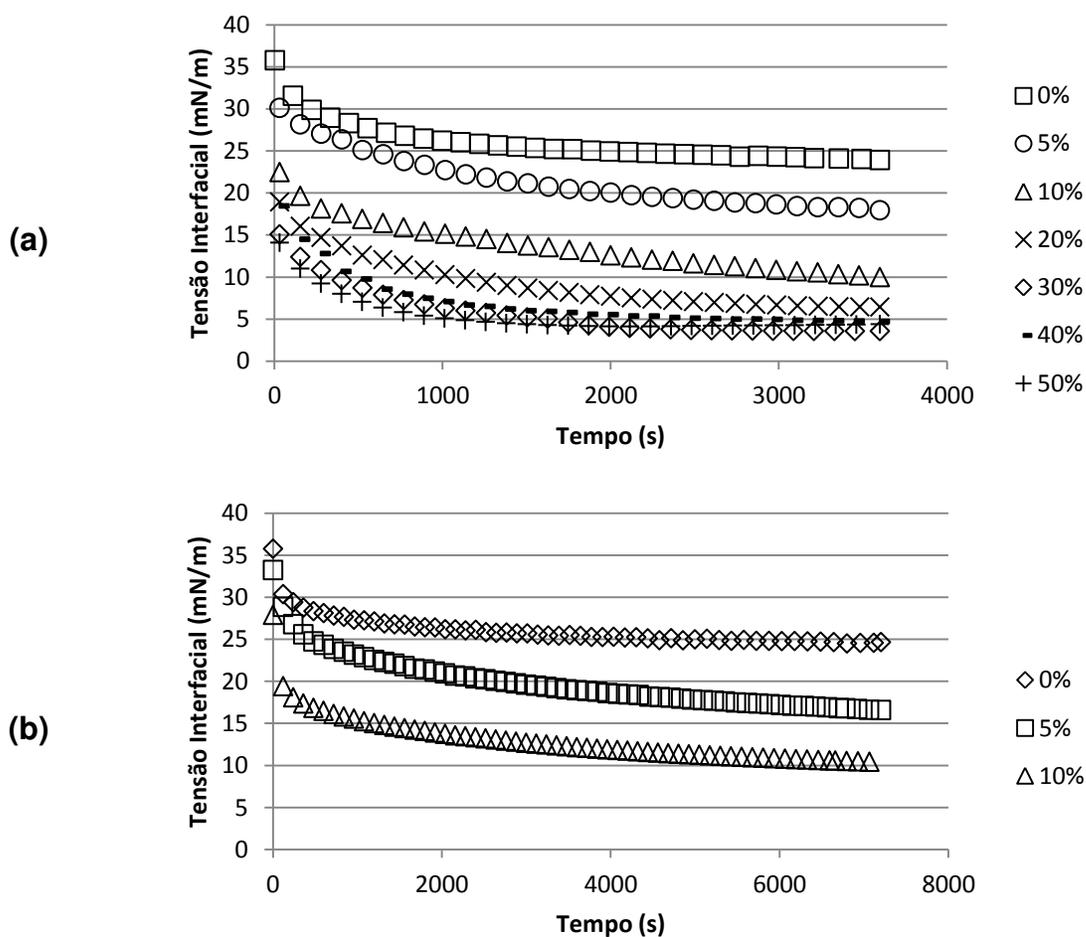


Figura 23. Cinética da tensão interfacial entre água e hexadecano na presença de (a) diferentes concentrações de levedura e (b) em baixas concentrações de levedura, % (m/m).

Os valores de tensão interfacial no equilíbrio (Figura 24) mostram que com o aumento da concentração da levedura os valores de tensão interfacial tenderam a ser aproximadamente constantes em torno de 4 mN/m. Isto indica que a partir de 30% (m/m) de levedura, a interface estava saturada de células, pois o aumento da concentração não influenciou nos valores de tensão interfacial no equilíbrio.

A presença de um componente com atividade de superfície reduz a tensão interfacial, pois tais compostos podem minimizar os contatos termodinamicamente desfavoráveis entre os diferentes tipos de moléculas na interface (MCCLEMENTS, 2005). Além disso, a diminuição da tensão interfacial é obtida à medida que ocorre a difusão e adsorção das moléculas com atividade de superfície na interface das gotas (GÜLSEREN e CORREDIG, 2013).

Alguns autores relataram que a estabilização por Pickering não afeta a tensão interfacial entre as fases (DOROBANTU *et al.*, 2004; MOHEBALI *et al.*, 2007). No entanto alguns trabalhos identificaram uma redução considerável da tensão interfacial pela adesão das células, mesmo sem a produção de bioemulsificantes (HUANG *et al.*, 2013; VILKOVA e NUSHTAEVA, 2013).

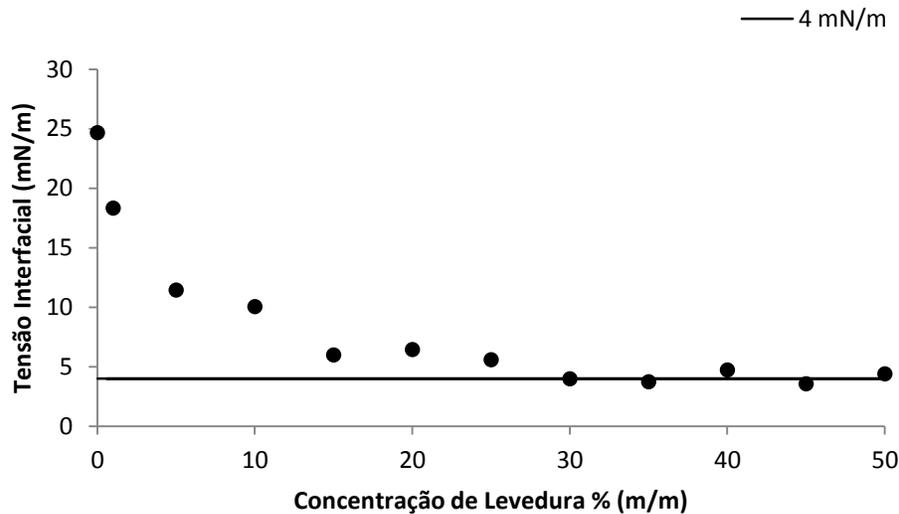


Figura 24. Valores de tensão Interfacial para diferentes concentrações de levedura, % (m/m).

#### 4.3.8 Densidade de Carga das Emulsões

O potencial zeta da emulsão em seu valor de pH natural (4,17) foi de aproximadamente -31 mV. Os valores de potencial zeta obtidos na varredura de pH da fase creme da emulsão são apresentados na Figura 25, onde pode-se observar que a densidade de cargas foi bem semelhante a da levedura (Figura 5) pois houve a predominância de suas características após a elaboração dos sistemas. Em pH básico os valores de potencial zeta foram aproximadamente constantes, já em pH ácido os valores de potencial zeta aumentaram até atingir o valor de carga nula.

A composição do meio pode influenciar na estabilidade das gotas, onde a adição de sais e a correção do pH levam à neutralização das cargas das gotas, diminuindo as forças eletrostáticas repulsivas. Normalmente a interface entre óleo

e água apresenta-se carregada negativamente e baixos valores de pH são mais propensos a induzir a coalescência das gotas (MARINOVA *et al.*, 1996).

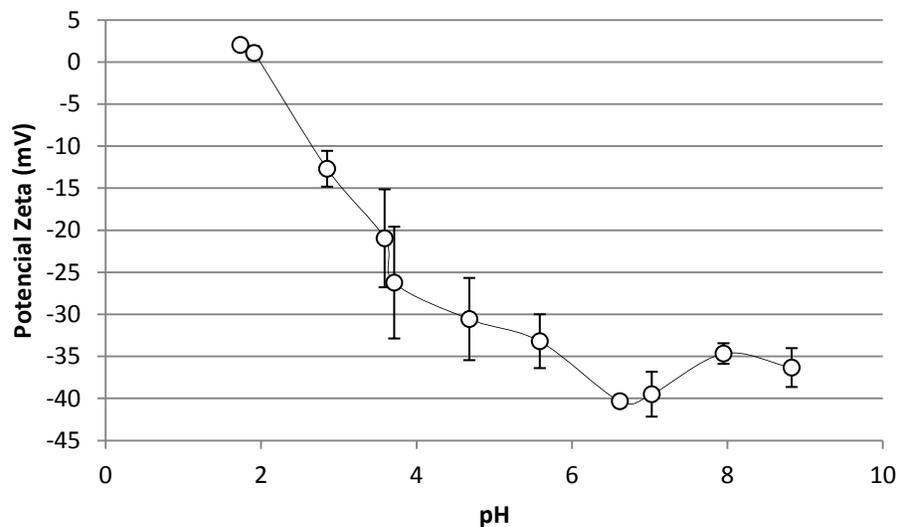


Figura 25. Densidade de carga da fase superior da emulsão contendo 7,47% m/m de levedura mediante diferentes faixas de pH.

## 4.4 Quebra das Emulsões

### 4.4.1 Métodos Físicos

#### 4.4.1.1 Centrifugação

Na Figura 26 são apresentados os valores de percentual de separação de óleo para os ensaios conduzidos nas velocidades de 3000 e 10000 rpm em função do tempo de centrifugação. Após a etapa de centrifugação foi possível observar a separação parcial do hexadecano, das células de levedura e de uma fase aquosa, porém, ainda restou a presença de uma emulsão residual, a qual apresentou

gotas pequenas com tamanho similar ao da emulsão inicial, no entanto com um menor volume de células de leveduras, conforme observado na microscopia e na distribuição de tamanho apresentada na Figura 27. A distribuição de gotas por número mostrou que há um maior número de gotas com tamanho na faixa de 1  $\mu\text{m}$ .

Na Figura 26 pode ser observado que o aumento na velocidade de centrifugação aumentou consideravelmente o percentual de separação de óleo. E por um período de 120 minutos de centrifugação não foi possível obter mais do que 70% de separação do óleo livre da emulsão, utilizando velocidade de 10000 rpm.

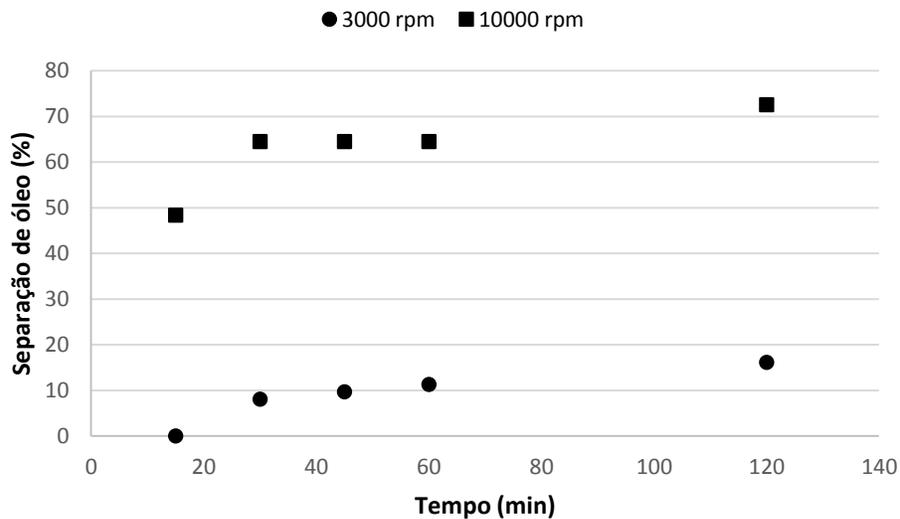


Figura 26. Separação de óleo (%) das emulsões centrifugadas a 3000 e 10000 rpm.

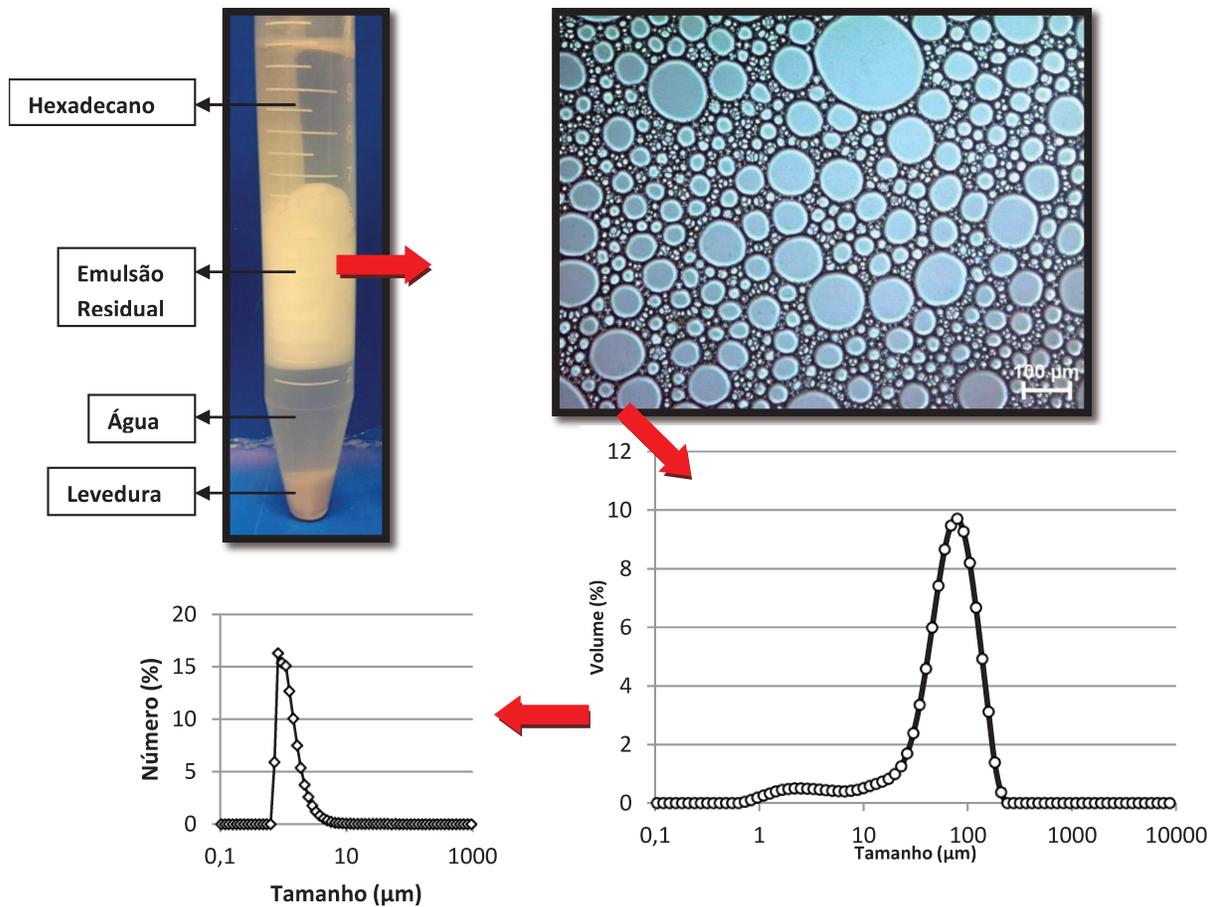


Figura 27. Aspecto visual da emulsão centrifugada a 10000 rpm, bem como a microfotografia e a distribuição de tamanho por volume e número da emulsão residual.

#### 4.4.1.2 Aquecimento

Altas temperaturas reduzem a estabilidade da emulsão e o processo de desemulsificação é consequência de alterações na tensão interfacial e redução da viscosidade (CHEN e TAO, 2005). No entanto, as emulsões submetidas a

variações de temperatura não apresentaram rendimento considerável quanto à separação de óleo no intervalo de tempo utilizado. Somente na emulsão submetida a 60°C foi possível ter uma separação de óleo próxima de 20% (Figura 28) após 120 minutos. Para este caso o hexadecano separado apresentou-se com aspecto límpido (Figura 29). Para as outras temperaturas avaliadas, a separação de óleo foi inferior a 5%.

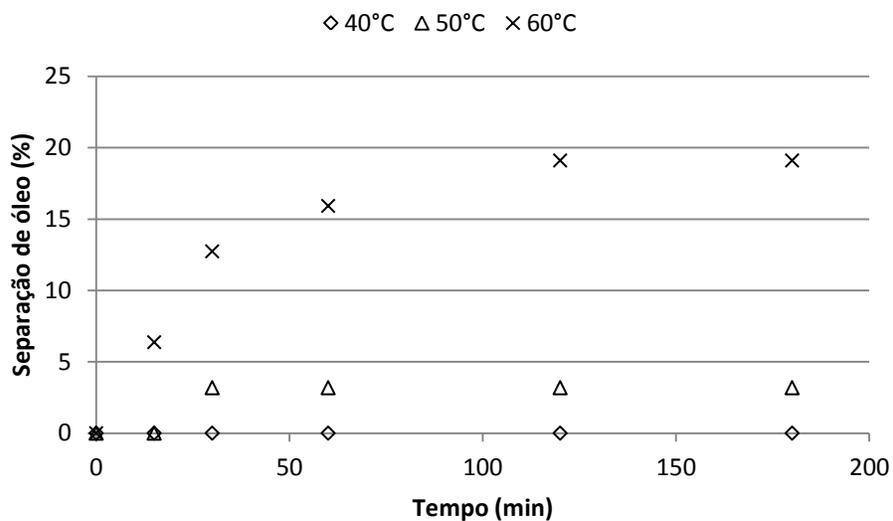


Figura 28. Separação de óleo (%) das emulsões submetidas a diferentes temperaturas de desestabilização.

O aumento da temperatura pode ter acarretado na diminuição da viscosidade da fase contínua induzindo a aproximação e aumento do tamanho das gotas (Figura 30), porém não foi suficiente para a separação total do óleo. Na Tabela 12 pode ser observado que a redução no % de volume dos picos na faixa de 0,1 a 20  $\mu\text{m}$  pode ter ocorrido em virtude da sedimentação da levedura causada pela diminuição da viscosidade da fase contínua, e o uso da temperatura

de 60°C forneceu gotas de tamanho de uma ordem de magnitude maior àquelas obtidas na emulsão controle.

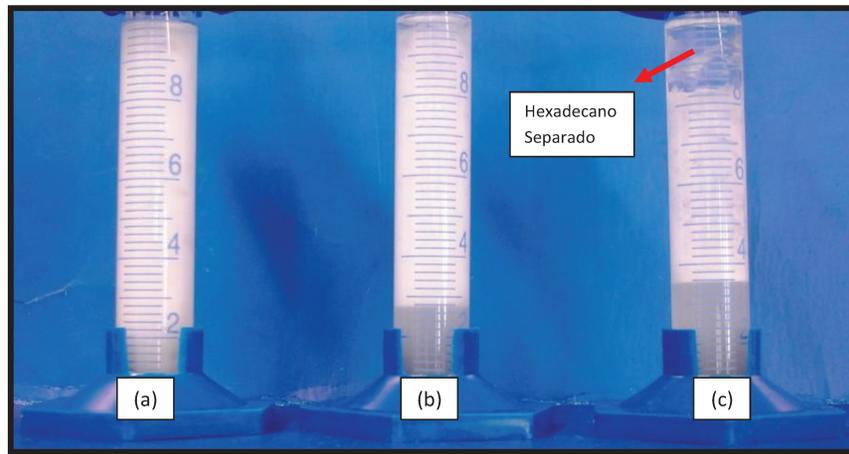


Figura 29. Fotografias das emulsões submetidas a diferentes temperaturas de desestabilização, (a) 40, (b) 50 e (c) 60°C.

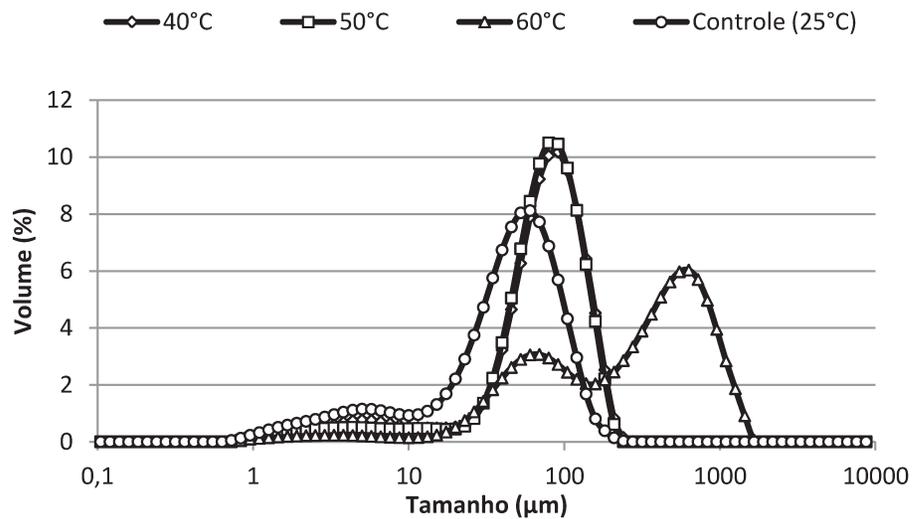


Figura 30. Distribuição de tamanho por volume das emulsões submetidas a diferentes temperaturas de desestabilização.

Tabela 12. Faixas de tamanho da fase creme das emulsões submetidas a diferentes temperaturas de desestabilização

Ensaio	0,1 - 20 $\mu\text{m}$		20 – 1000 $\mu\text{m}$	
	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )	% Volume	Moda ( $\mu\text{m}$ )
Controle	22,07	5,75	77,93	69,18
40°C	10,44	5,01	89,56	91,2
50°C	8,68	4,36	91,32	91,2
60°C	3,82	3,31	96,18	630,96

#### 4.4.2 Métodos Físicos e Químicos

##### 4.4.2.1 Adição de Álcool

Pode ser observado na Figura 31 que as emulsões misturadas com etanol não apresentaram qualquer sinal de desestabilização, enquanto que as emulsões que foram misturadas com butanol mostraram separação de fases. No entanto a fase superior não apresentou um aspecto completamente límpido.

A adição de alcoóis aumenta a probabilidade de coalescência das gotas devido à presença de compostos polares e apolares na estrutura destes componentes. Assim, as moléculas de álcool são capazes de desestabilizar as emulsões através do deslocamento dos surfactantes da interface ou ainda se ligando às cadeias dos mesmos, e quanto maior o número de carbonos maior a sua afinidade com a fase apolar (MCCLEMENTS, 2005).

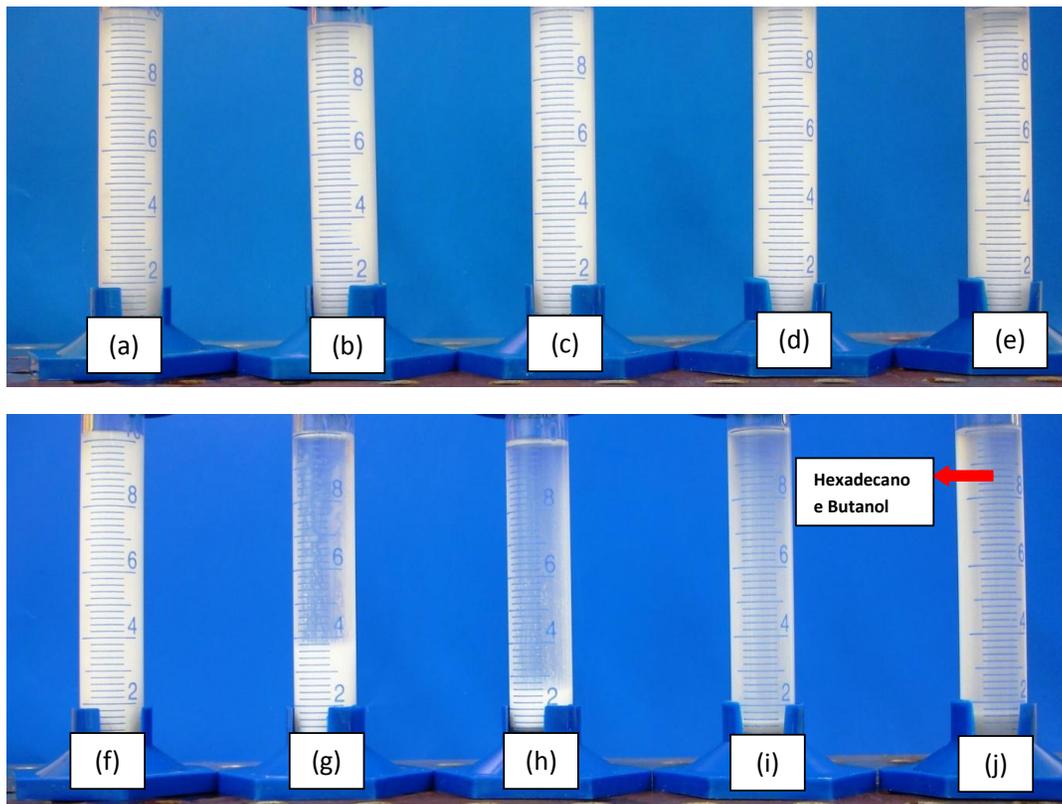


Figura 31. Aspecto visual das emulsões contendo etanol nas concentrações de (a) 0%, (b) 1%, (c) 3% (d) 5% e (e) 10% (v/v) e butanol nas concentrações de (f) 0%, (g) 1%, (h) 3% (i) 5% e (j) 10% (v/v).

Na Figura 32 são apresentados os valores de percentual de separação de óleo para os ensaios de separação utilizando etanol e butanol em diferentes concentrações. Pode ser observado que foi possível obter 96% de separação do óleo quando foi utilizado butanol na concentração de 10% v/v. No entanto, quando etanol foi utilizado na mesma concentração não foi possível obter mais do que 10% de separação do óleo. O butanol tem a capacidade de alterar o equilíbrio cinético das emulsões levando à separação das fases instantaneamente. Sua

solubilidade em água é baixa, no entanto é bastante solúvel na fase orgânica, sendo necessária uma etapa posterior de destilação para sua completa recuperação (LARSON *et al.*, 1994). Assim, vale ressaltar que apesar de se ter obtido um bom índice de separação do óleo, como o butanol é solúvel em hexadecano seria necessária a utilização de uma etapa posterior de extração líquido-líquido ou destilação para a obtenção do óleo puro.

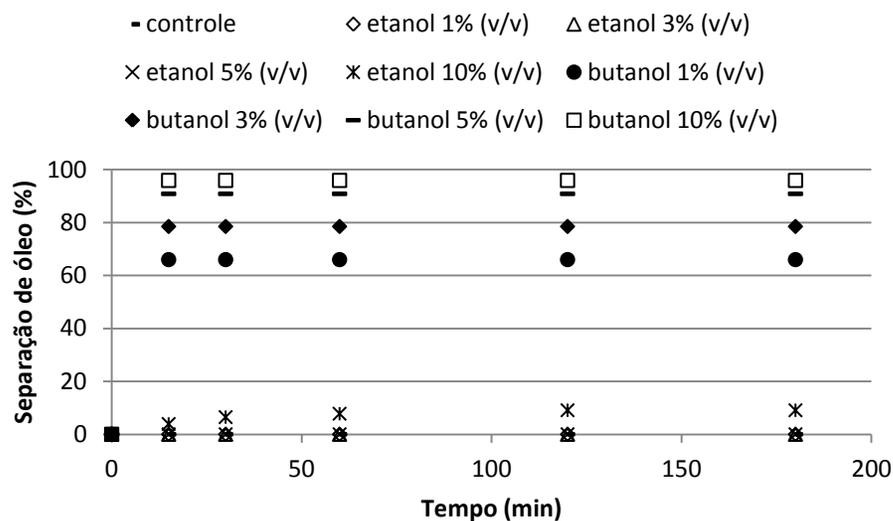


Figura 32. Separação de óleo (%) das emulsões desestabilizadas utilizando diferentes concentrações de etanol e butanol.

Estas emulsões, quando foram centrifugadas, mostraram uma separação de óleo de aproximadamente 84% utilizando etanol na concentração de 10% v/v. No entanto, a separação total do óleo foi obtida utilizando butanol nas concentrações de 5 e 10% v/v, após centrifugação, conforme observado na Figura 33. Porém ainda faz-se necessária a utilização de uma etapa posterior de extração líquido-líquido ou destilação para a obtenção do óleo puro nos dois casos.

Na Figura 34 pode-se observar que para todas as concentrações de etanol e butanol utilizadas foi possível obter uma fase de hexadecano com aspecto límpido após centrifugação, no entanto, a completa separação da emulsão só foi possível nas maiores concentrações de butanol.

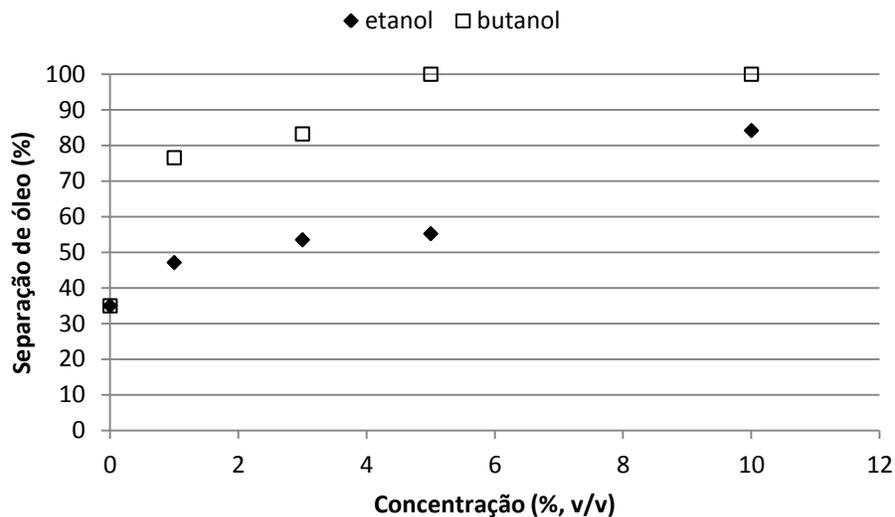


Figura 33. Separação de óleo (%) das emulsões desestabilizadas utilizando diferentes concentrações de etanol e butanol seguida de centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos.

A fase emulsionada residual foi avaliada quanto à distribuição de tamanho e pode ser observado (Figura 35) que o processo de centrifugação em conjunto com a ação do etanol não promoveu a completa separação do hexadecano e conseqüentemente não foi capaz de desestabilizar as gotas de tamanho reduzido (Tabela 13).

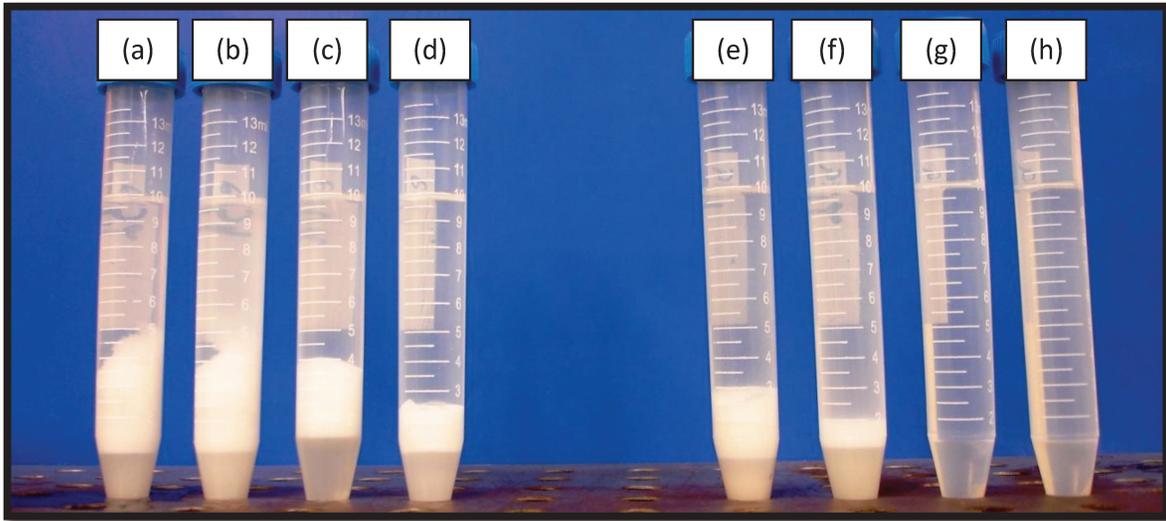


Figura 34. Aspecto visual das emulsões contendo etanol nas concentrações de (a) 1%, (b) 3%, (c) 5% e (d) 10% (v/v) e butanol nas concentrações de (e) 1%, (f) 3%, (g) 5% e (h) 10% (v/v), após centrifugação a 10000rpm por 10 minutos.

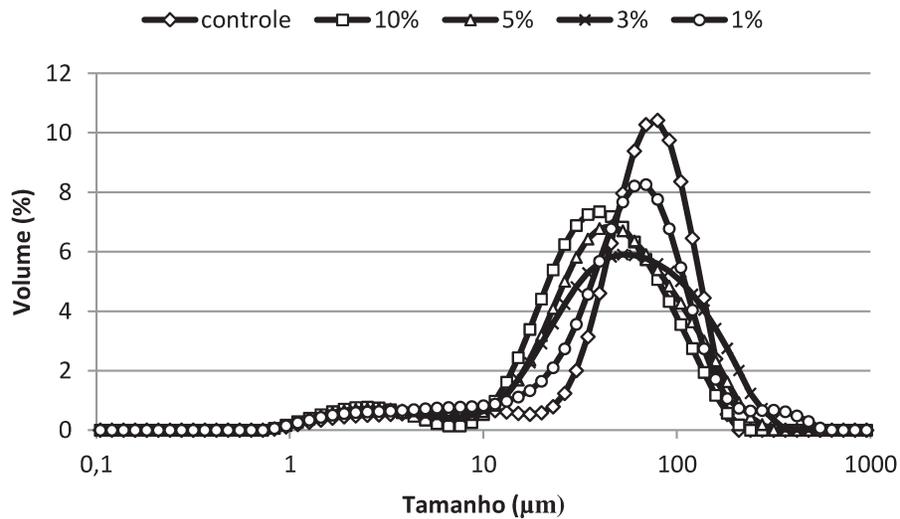


Figura 35. Distribuição de tamanho por volume das emulsões contendo etanol em diferentes concentrações, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos.

Tabela 13. Faixas de tamanho das emulsões contendo etanol em diferentes concentrações, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos.

Concentração %, v/v	0,1 - 20 $\mu\text{m}$		20 – 1000 $\mu\text{m}$	
	% Volume	Moda	% Volume	Moda
Controle	10,82	8,71	89,18	79,43
1	13,44	2,51	86,56	39,81
3	13,82	2,88	86,18	45,71
5	12,8	2,51	87,20	69,18
10	-	-	100	69,18

#### 4.4.2.2 Alteração do pH

As emulsões tiveram os valores de pH ajustados para valores próximos ao ponto em que as leveduras apresentam carga neutra (Figura 5), e também para um valor de pH básico (9,0). Após um período de 24 horas de decantação foi observado uma separação de óleo máxima de apenas 3%. A fina camada de hexadecano separada pode ser observada na parte superior das provetas (Figura 36).

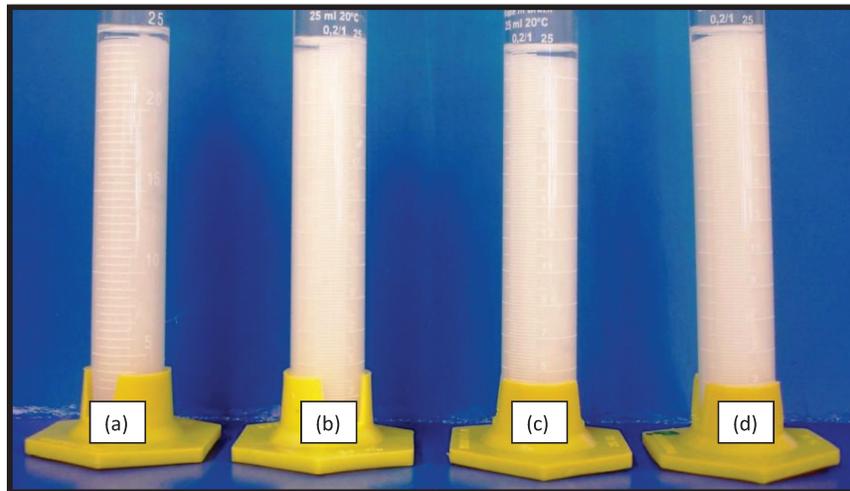


Figura 36. Aspecto visual das emulsões em diferentes valores de pH: (a) 9,0, (b) 2,2, (c) 2,0 e (d) 1,8.

Após a centrifugação dessas emulsões, foi possível obter um percentual de separação de óleo de aproximadamente 96% para todos os valores de pH ácido e 83% para o valor de pH básico (Figura 37). Para a centrifugação das emulsões sem ajuste de pH (pH natural da emulsão igual a 4,17) (Figura 37) não foi possível obter uma separação de óleo maior que 50% para o mesmo tempo de análise. Portanto ficou evidente que a alteração do pH provocou interações eletrostáticas influenciando na desestabilização das emulsões. Assim como nos ensaios utilizando alcoóis, o hexadecano separado apresentou-se com aspecto límpido (Figura 38).

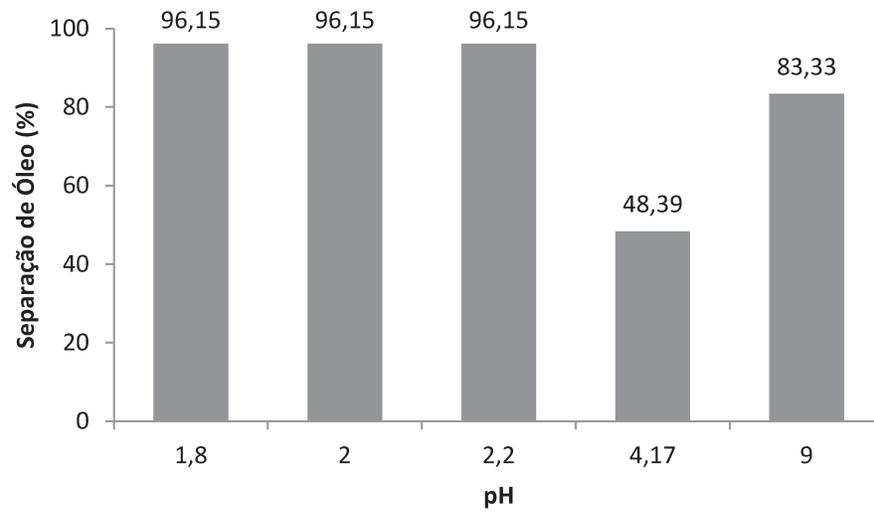


Figura 37. Separação de óleo (%) das emulsões submetidas a diferentes faixas de pH, após centrifugação.

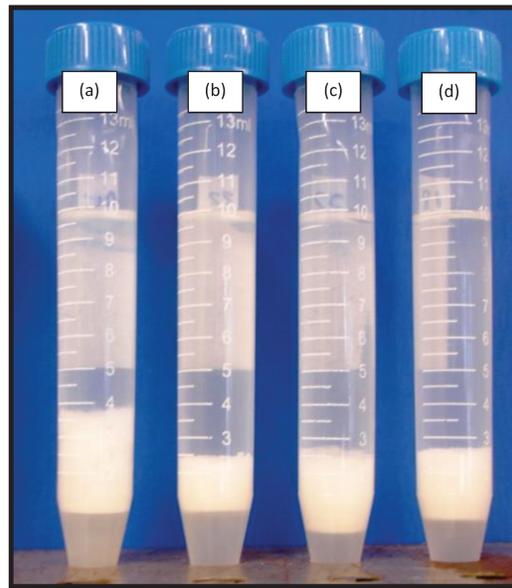


Figura 38. Aspecto visual das emulsões em diferentes valores de pH, (a) 9,0, (b) 2,2, (c) 2,0 e (d) 1,8 após centrifugação a 10000rpm por 10 minutos.

#### 4.4.2.3 Adição de Sais e Polímeros

Para as emulsões misturadas com sais e polímeros catiônicos não houve separação de óleo por decantação, apenas uma camada de água foi separada durante um período de 24 horas, conforme pode ser observado na Figura 39.

Os valores de potencial zeta (Tabela 14) mostram que a adição de sais e polímeros catiônicos causou uma mudança na carga superficial das gotas quando comparadas à emulsão controle, porém somente na maior concentração de polímero catiônico a alteração do potencial zeta foi significativa. No entanto, somente a ação dos eletrólitos não foi suficiente para promover a decantação e induzir ao processo de coalescência das gotas.

Ao observar a distribuição do tamanho das gotas das emulsões adicionadas dos diferentes agentes desemulsificantes (Figura 40) e a moda dos picos (Tabela 15) nota-se que o polímero catiônico promoveu um maior aumento no tamanho das gotas, pois foi o que apresentou maior quantidade de íons disponíveis para a interação eletrostática. Já para a adição de sais não houve alteração na moda dos picos na faixa de 20 a 1000  $\mu\text{m}$ , no entanto estes valores foram maiores com relação ao controle.

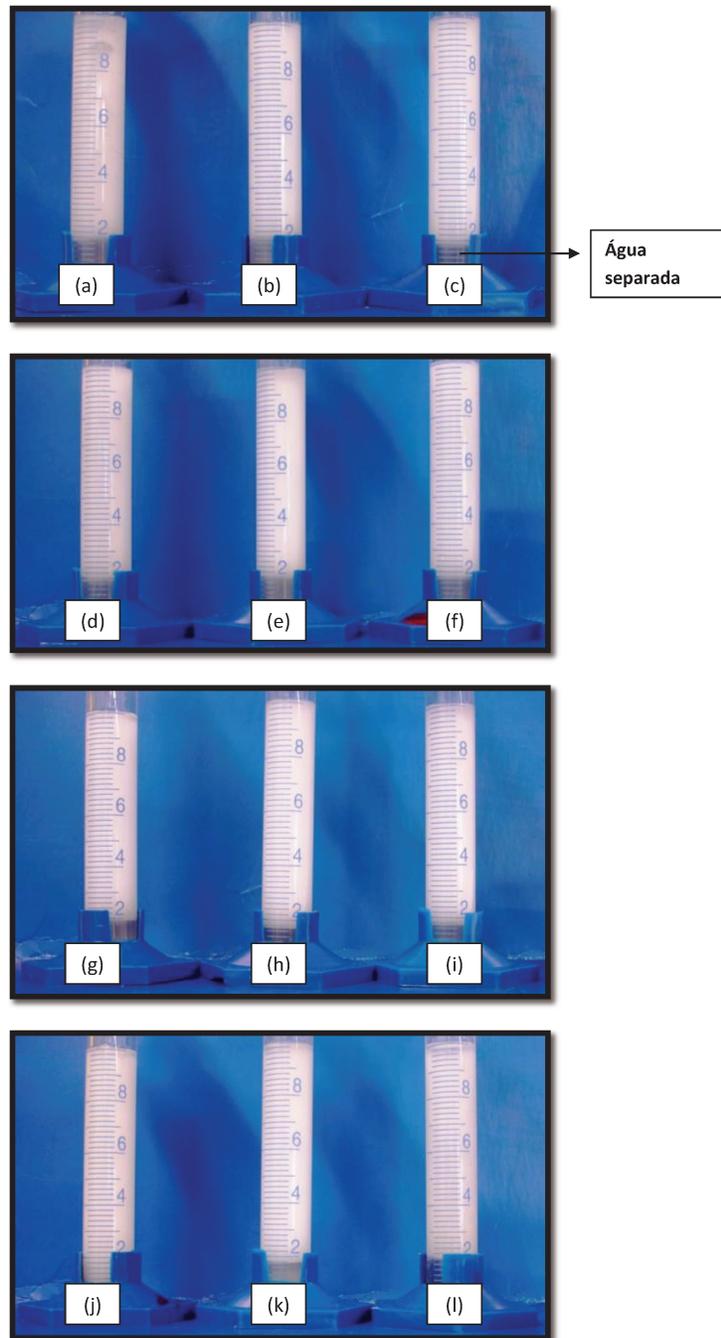


Figura 39. Aspecto visual das emulsões contendo sais e polímeros (% m/v): (a) NaCl 1%, (b) NaCl 0,5%, (c) NaCl 0,1% (d) CaCl<sub>2</sub> 1% (e) CaCl<sub>2</sub> 0,5%, (f) CaCl<sub>2</sub> 0,1%, (g) KAL(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O 1% (h) KAL(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,5% (i) KAL(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O 0,1%, (j) N9909 1%, (k) N9909 0,5% (l) N9909 0,1%.

Tabela 14. Valores de potencial zeta das emulsões usando diferentes concentrações de sais e polímeros catiônicos.

Desestabilizantes	Concentração (% m/v)	Potencial Zeta (mV)
NaCl	0 (controle)	-31,87±0,31 <sup>ab</sup>
	0,1	-34,90±0,53 <sup>b</sup>
	0,5	-28,13±0,82 <sup>a</sup>
	1	-27,60±2,87 <sup>a</sup>
CaCl <sub>2</sub>	0 (controle)	-31,87±0,31 <sup>a</sup>
	0,1	-29,53±2,24 <sup>ab</sup>
	0,5	-25,17±2,58 <sup>ab</sup>
	1	-22,77±2,31 <sup>b</sup>
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	0 (controle)	-31,87±0,31 <sup>ab</sup>
	0,1	-34,57±0,64 <sup>a</sup>
	0,5	-29,53±0,44 <sup>bc</sup>
	1	-25,50±2,60 <sup>c</sup>
Polímero Catiônico (N9909)	0 (controle)	-31,87±0,31 <sup>ab</sup>
	0,001	-36,90±3,53 <sup>a</sup>
	0,01	-24,10±2,60 <sup>b</sup>
	0,1	18,30±3,33 <sup>c</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

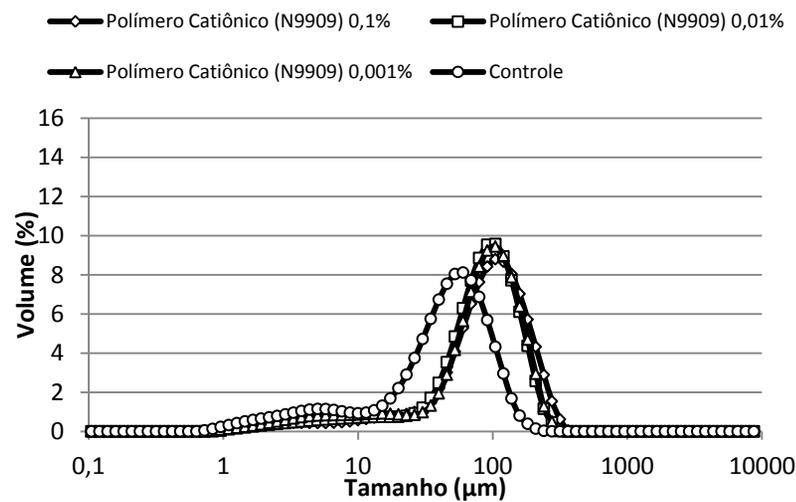
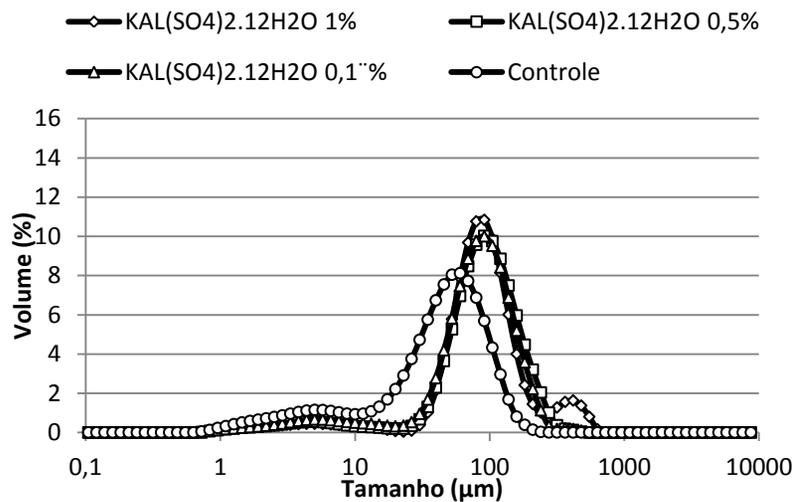
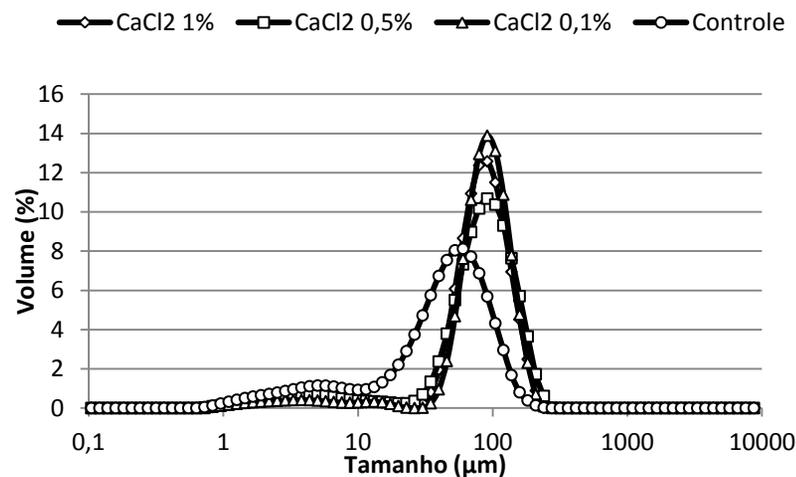
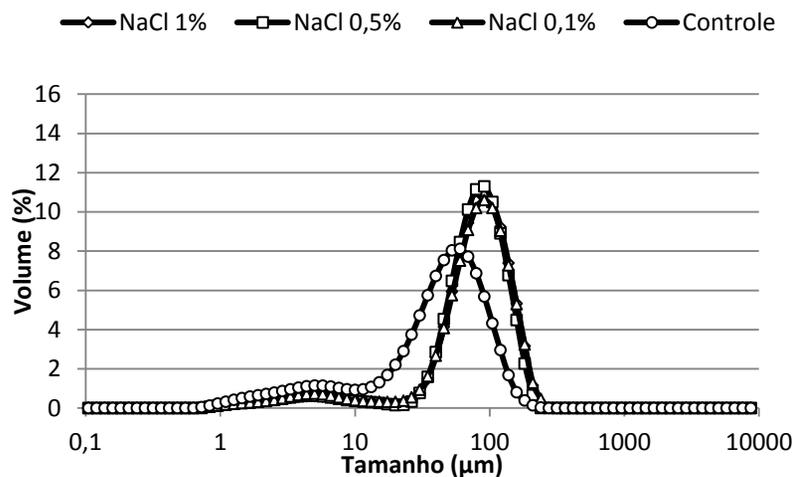


Figura 40. Distribuição de tamanho por volume das emulsões contendo diferentes concentrações de agentes desestabilizantes.

Tabela 15. Faixas de tamanho das emulsões contendo diferentes concentrações de agentes desestabilizantes.

Desestabilizantes	Concentração (% m/v)	0,1 - 20 $\mu\text{m}$		20 - 1000 $\mu\text{m}$	
		%	Moda	%	Moda
		Volume	( $\mu\text{m}$ )	Volume	( $\mu\text{m}$ )
Controle	-	19,65	5,01	80,35	60,25
	0,1	9,5	5,01	90,5	91,2
NaCl	0,5	8,51	5,01	91,49	91,2
	1	8,57	5,01	91,43	91,2
CaCl <sub>2</sub>	0,1	6,84	5,01	93,16	91,2
	0,5	9,3	3,8	90,7	91,2
	1	6,61	5,01	93,39	91,2
	0,1	9,46	5,01	90,54	91,2
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,5	7,64	5,01	92,36	91,2
	1	6,9	5,01	93,1	91,2
Polímero Catiônico (N9909)	0,001	-	-	100	104,7
	0,01	-	-	100	104,7
	0,1	-	-	100	104,7

Após a centrifugação, as emulsões com adição de cloreto de sódio resultaram em um maior percentual de separação de óleo, de aproximadamente 84%, e para os outros agentes obteve-se uma separação de pouco mais que 60% (Figura 41). As fases creme apresentaram faixas de tamanho similares, exceto as provenientes de emulsões misturadas com polímero catiônico que apresentaram

faixas de tamanho menores (Figura 42), indicando que o tempo de centrifugação não foi suficiente para quebrar as gotas de tamanho reduzido.

Comparando-se as modas dos picos apresentadas nas Tabelas 15 e 16 nota-se que após a centrifugação ocorreu a diminuição do valor da moda dos picos quando comparado aos ensaios sem centrifugação. O desaparecimento dos picos na faixa de 0,1 a 20  $\mu\text{m}$  pode estar relacionado com a sedimentação das células de levedura em virtude da aplicação de elevada força mecânica.

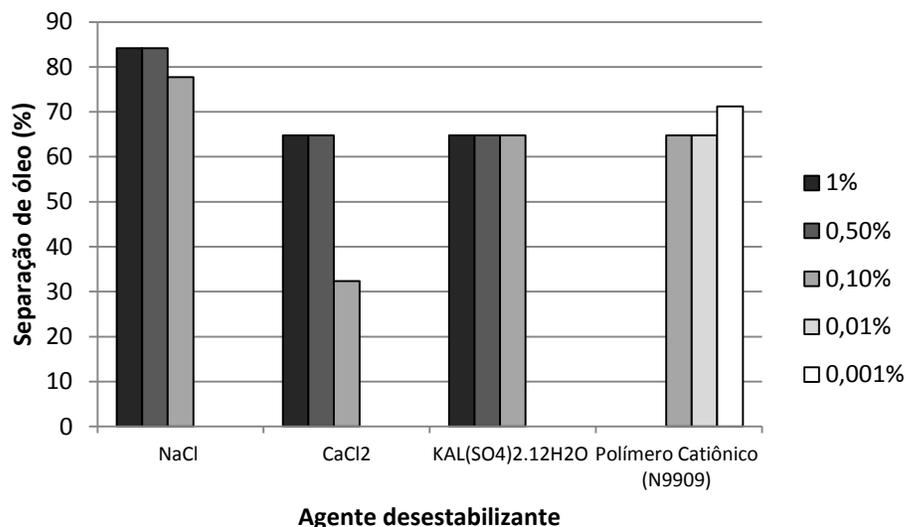


Figura 41. Separação de óleo (%) das emulsões em diferentes concentrações de agentes desestabilizantes, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos.

Ríos *et al.* (1998) trabalhando com cloreto de alumínio e cloreto de cálcio para a desestabilização de emulsões residuais de indústrias metalúrgicas, obtiveram bons resultados em termos de separação e diminuição de turbidez e conseguiram aumentar em aproximadamente dez vezes o tamanho das gotas óleo das emulsões, porém com o incremento simultâneo da temperatura.

Pinotti e Zaritzky (2001) ao trabalharem com emulsões de óleo de girassol em água estabilizadas por dodecil sulfato de sódio obtiveram a separação de óleo e baixos valores de turbidez ao trabalharem com valores de densidade de carga próximos de zero utilizando uma concentração ótima de poliacrilamida catiônica de alta massa molecular. No entanto, o aumento da concentração deste polímero levou a emulsões novamente estáveis.

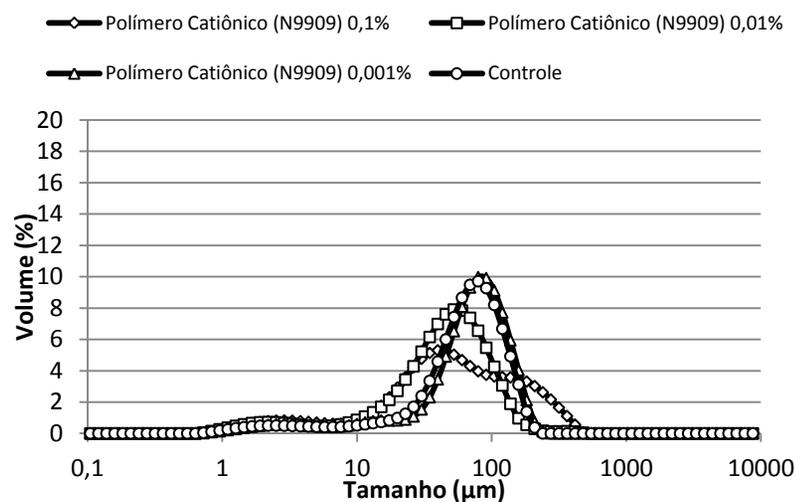
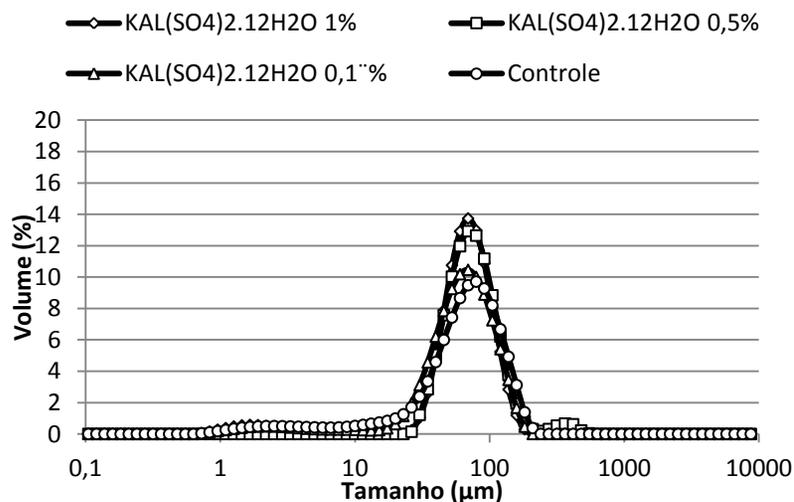
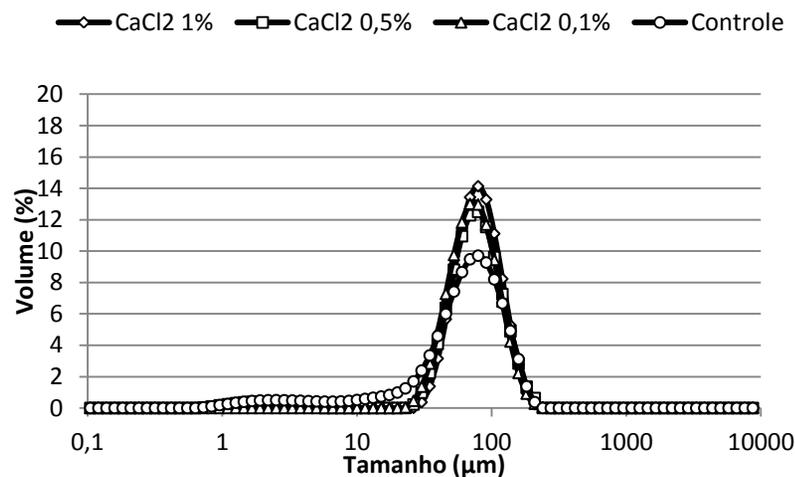
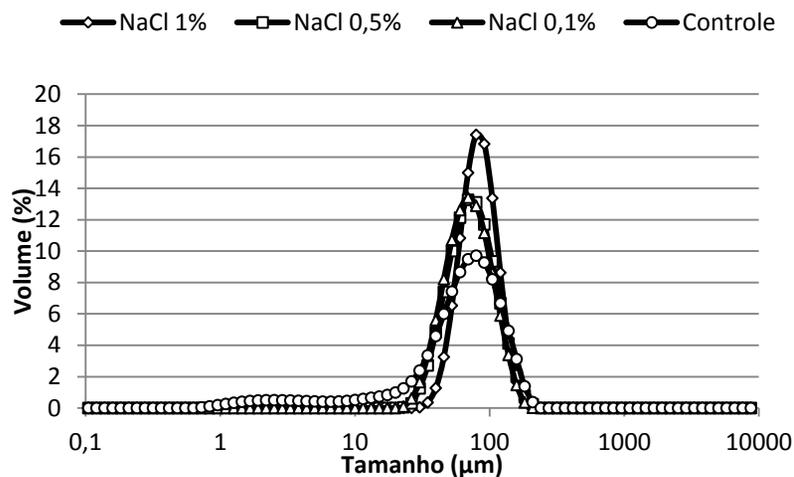


Figura 42. Distribuição de tamanho por volume das emulsões contendo diferentes concentrações de agentes desestabilizantes, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos.

Tabela 16. Faixas de tamanho das emulsões contendo diferentes concentrações de agentes desestabilizantes, após centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos.

Desestabilizantes	Concentração (% m/v)	0,1 - 20 $\mu\text{m}$		20 - 1000 $\mu\text{m}$	
		%	Moda	%	Moda
		Volume	( $\mu\text{m}$ )	Volume	( $\mu\text{m}$ )
Controle	-	8,97	2,51	91,03	79,43
	0,1	-	-	100	69,18
NaCl	0,5	-	-	100	69,18
	1	-	-	100	79,43
CaCl <sub>2</sub>	0,1	-	-	100	69,18
	0,5	3,4	1,9	96,6	79,43
	1	-	-	100	79,43
	0,1	-	-	100	69,18
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,5	-	-	100	69,18
	1	4,37	1,65	95,63	69,18
Polímero Catiônico (N9909)	0,001	12,21	2,88	87,79	79,43
	0,01	19,48	2,19	80,52	52,48
	0,1	21,23	2,88	78,77	39,81

#### 4.4.2.4 Adição de Nanopartículas Magnéticas

A Figura 43 apresenta o aspecto visual das emulsões contendo nanopartículas magnéticas em diferentes concentrações, onde pode ser observado que o hexadecano separado apresentou aspecto límpido para todas as concentrações.

A adição da suspensão de nanopartículas magnéticas (com carga igual a  $39,65 \pm 0,52$  mV) às emulsões permitiu a separação de aproximadamente 96% do óleo utilizando uma concentração de 1% m/v, enquanto que para a concentração de 10% m/v obteve-se uma separação de 88% (Figura 44). Este resultado pode ser explicado mediante a análise dos valores de potencial zeta das fases creme (Tabela 17). Na concentração de 10% (m/v) o potencial zeta apresentou valor em torno de 20 mV proporcionando estabilidade eletrostática às gotas. Já para a concentração de 1% (m/v) o valor de potencial zeta ficou muito próximo à zero, evidenciando assim uma melhor condição de separação pela redução da repulsão eletrostática entre as gotas.

Oliveira *et al.* (2010) produziram partículas magnéticas com propriedades anfífilas a partir da magnetização de nanotubos de carbono, e, ao adicioná-las (0,05% m/v) em emulsões de biodiesel em água, obtiveram uma boa difusão das mesmas na interface. Quando as emulsões foram expostas a um campo magnético obteve-se a separação completa do biodiesel e da água, e as partículas puderam ser recuperadas e reutilizadas por pelo menos 5 vezes.

Assim, as nanopartículas magnéticas foram recuperadas, lavadas e novamente suspensas em água Milli-Q na concentração de 2% (m/v), assim como informado pelo fabricante, e a partir de então foram misturadas com novas emulsões nas concentrações utilizadas anteriormente. Pode ser observado na Figura 45 que apenas na concentração de 10% (m/v) foi possível obter uma separação de óleo de aproximadamente 80%, enquanto que nas demais concentrações não houve qualquer indício de desestabilização. Pela análise dos valores de potencial zeta da Tabela 18 pode ser observado que a suspensão de

nanopartículas não apresentou caráter catiônico suficiente para interagir eletrostaticamente, e por isso não foi possível desestabilizar as emulsões. Porém, na maior concentração alguma interação eletrostática deve ter prevalecido, contribuindo para a desestabilização da emulsão.

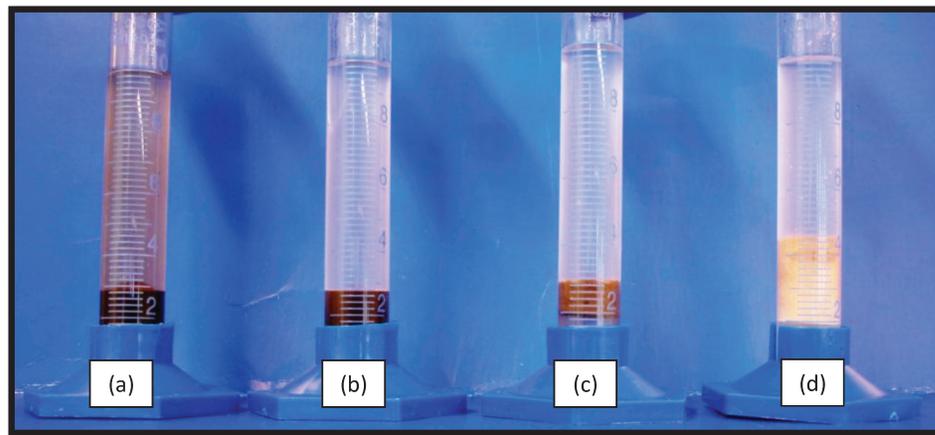


Figura 43. Aspecto visual das emulsões contendo nanopartículas magnéticas nas concentrações de (a) 10%, (b) 1%, (c) 0,1% e (d) 0,01% (m/v).

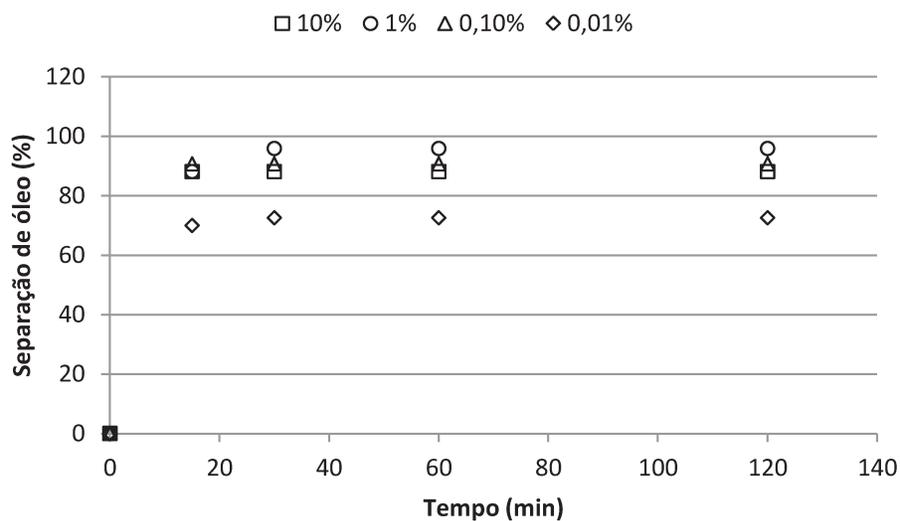


Figura 44. Separação de óleo (%) das emulsões desestabilizadas utilizando diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas.

Tabela 17. Valores de potencial zeta das emulsões contendo diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas na emulsão.

Concentração (% m/v)	Potencial Zeta (mV)
0 (controle)	-31,87 ±0,1 <sup>a</sup>
0,01	-34,03 ±0,71 <sup>b</sup>
0,1	-25,43 ±0,62 <sup>c</sup>
1	-3,12 ±0,46 <sup>d</sup>
10	26,17 ±0,49 <sup>e</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

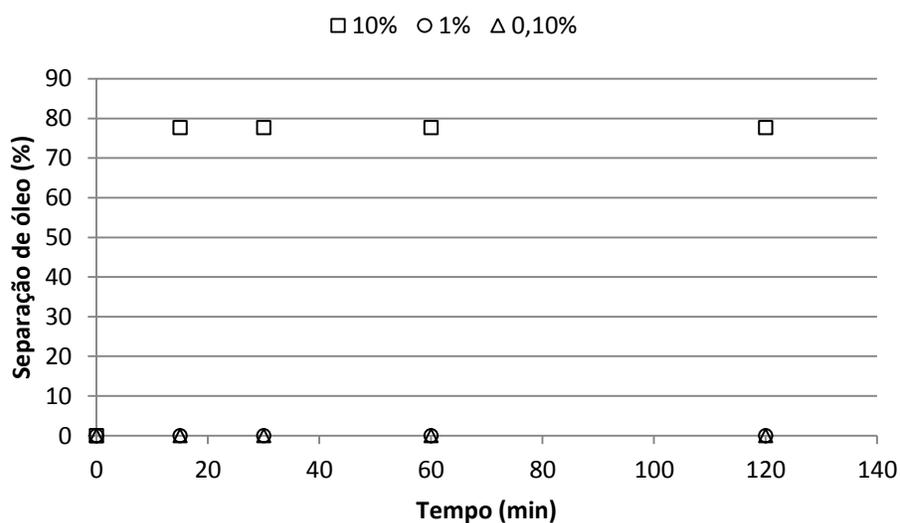


Figura 45. Percentual de separação de óleo das emulsões desestabilizadas utilizando diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas recuperadas.

Tabela 18. Valores de potencial zeta das emulsões contendo diferentes concentrações de nanopartículas magnéticas recuperadas após uso para desestabilização.

Concentração (% m/v)	Potencial Zeta (mV)
0 (controle)	-31,87±0,1 <sup>a</sup>
0,1	-30,57±1,76 <sup>ab</sup>
1	-29,20±0,60 <sup>ab</sup>
10	-28,33±0,31 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.3 Comparação entre os Métodos de Desemulsificação

Um resumo geral dos melhores resultados, em termos da separação de óleo (%), obtidos para cada um dos métodos adotados é apresentado na Tabela 19. Em termos de maior separação de óleo fica evidente que o uso de butanol seguido de centrifugação foi o único método que propiciou a total separação das emulsões, porém a escolha desta estratégia pode não ser a ideal, pois, como relatado anteriormente é necessária uma etapa posterior de separação do solvente aumentando os custos dos processos de *downstream*.

Para conseguir a total separação do óleo utilizando o processo convencional de centrifugação seria necessário utilizar tempos maiores e velocidade de rotação superior a 10000 rpm (15317 g), o que seria inviável em virtude dos elevados custos, como relatado anteriormente.

A utilização de sais, polímeros, ácidos e bases não foi eficiente em desestabilizar as emulsões somente pela ação da força gravitacional. Porém utilizando-se uma posterior etapa de centrifugação, maiores percentuais de separação de óleo foram alcançados quando comparados à centrifugação convencional.

Já as nanopartículas magnéticas mostraram ser eficientes em interagir eletrostaticamente com as células de levedura e com os compostos anfífilos responsáveis pela estabilidade das emulsões. Ao aplicar um campo magnético os complexos formados foram rapidamente removidos da interface migrando em direção ao campo aplicado e facilitando a coalescência das gotas e a consequente formação da fase contínua de óleo. Este método propiciou 95,85% de separação de óleo e pode-se dizer que é vantajoso por não serem necessárias etapas adicionais de separação e também por eliminar custos variáveis com energia elétrica e manutenção de equipamentos.

Vale ressaltar que o uso das nanopartículas magnéticas seria possível após um estudo da viabilidade econômica do método, comparando-o com o método convencional de centrifugação.

Tabela 19. Comparação da separação de óleo (%) entre os diferentes métodos de desemulsificação.

<b>Métodos Físicos</b>			
Agente Desemulsificante	Processo Envolvido	Parâmetros	Separação de Óleo (%)
Centrifugação	Centrifugação	10000 rpm / 2horas	72,58
Aquecimento	Temperatura	60°C / 3horas	19,11
<b>Métodos Físicos e Químicos</b>			
Agente Desemulsificante	Processo Envolvido	Parâmetros	Separação de Óleo (%)
Álcool (Butanol 10% v/v)	decantação	15 minutos	95,85
Álcool (Butanol 5% v/v)	centrifugação	10000 rpm / 10 minutos	100
pH ácido (1,8-2,2)	decantação	1440 minutos	3
pH ácido (1,8-2,2)	centrifugação	10000 rpm / 10 minutos	96,15
pH básico (9,0)	decantação	1440 minutos	3
pH básico (9,0)	centrifugação	10000 rpm / 10 minutos	83,33
Sais (NaCl 1% m/v)	centrifugação	10000 rpm / 10 minutos	84,2
Polímero Catiônico N9909 (0,001% m/v)	centrifugação	10000 rpm / 10 minutos	71,24
Nanopartículas Magnéticas (1% m/v)	imã (campo magnético)	30 minutos	95,85



## **CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS**



Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram avaliar as propriedades emulsificantes das células de levedura, esclarecendo alguns mecanismos de interação destas células e os fatores que interferem na estabilidade, microestrutura e reologia das emulsões.

A estabilidade cinética das emulsões compostas por hexadecano, água e levedura foi viabilizada por mecanismos de estabilização ocorrendo simultaneamente ou sequencialmente como o aumento na viscosidade da fase creme, a repulsão eletrostática entre as gotas e estabilização por Pickering causada pelas células de levedura. Estes dois últimos estão associados à diminuição dos valores de tensão interfacial e à hidrofobicidade parcial causada pelas leveduras.

As estratégias adotadas no processo de desemulsificação foram baseadas na aplicação de forças mecânicas, alteração da densidade de carga das emulsões e redução da viscosidade da fase dispersa.

A força centrífuga não foi suficiente para causar a separação total dos componentes da emulsão. Da mesma forma, o aumento da temperatura em até 60°C não provocou redução suficiente da viscosidade a ponto de se ter a separação total dos componentes.

A utilização de alcoóis pode ter acarretado em uma redução na viscosidade das fases, pela maior afinidade da parte hidrofóbica, em que os mesmos eram solúveis levando a maiores índices de separação. No entanto após o processo de desemulsificação seria necessária uma etapa adicional para a recuperação do solvente. A utilização de sais, polímeros, ácidos e bases não foi eficiente em desestabilizar as emulsões somente pela ação da força gravitacional. A

combinação das estratégias adotadas com uma posterior centrifugação acarretou em uma separação mais eficiente.

De maneira geral, a produção de emulsões estabilizadas por células de levedura e a desestabilização das mesmas, quase em sua totalidade, foi possível através da utilização de nanopartículas magnéticas mediante a aplicação de um campo magnético. Este processo é interessante por não serem necessárias etapas adicionais de separação, podendo as nanopartículas serem reutilizadas e também por eliminar custos variáveis com energia elétrica e manutenção de equipamentos.

Assim sendo, foi possível entender e avaliar o mecanismo de estabilidade das emulsões modelo, permitindo estudar e avaliar diferentes estratégias de desemulsificação buscando uma maior separação de óleo.

**CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical chemistry of surfaces**. 6 ed. 1987.
- AGARWAL, A. K.; DAS, L. M. Biodiesel Development and Characterization for Use as a Fuel in Compression Ignition Engines. **Journal of Engineering for Gas Turbines and Power**, v. 123, n. 2, p. 440-447, 2001.
- ALLEN, T. **Particle size Measurement**. 5<sup>a</sup> ed. Londres: Chapman e Hall, 1997.
- 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.
- AOAC, A. O. O. A. C. **Official Method os Analysis of AOAC Intenational**. 12 ed. 1992.
- ARNOLD, K. E.; SMITH, H. V. Crude Oil Emulsions. In: BRADLEY (Ed.). **Petroleum Engineering Handbook**. 3rd. Richardson-Texas-USA: Society of Petroleum Engineer, 1992. p.19.
- BARRIGA, J. A. T.; COOPER, D. G.; IDZIAK, E. S.; CAMERON, D. R. Components of the bioemulsifier from *S-cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 1-2, p. 96-102, 1999.
- 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.
- BOS, R.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 179-230, 1999.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA **Resolução - CNNPA n. 38, de 1977**, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, p. Aprova como coadjuvantes da tecnologia de fabricação as substâncias constantes dos anexos I, II, III e IV, destinadas ao fabrico de produtos forneados, tais como: pão, broa, biscoito, bolacha, bolo, torta e demais produtos afins de confeitaria, 1977. Disponível em: <  
[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8d1eb580474594e29c74dc3fbc4c6735/RESOLUCAO\\_CNNPA\\_38\\_1977.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8d1eb580474594e29c74dc3fbc4c6735/RESOLUCAO_CNNPA_38_1977.pdf?MOD=AJPERES) >. Acesso em: 15/11/2013.
- BRASIL. **Lei Federal Número 11.097** 2005.
- BRASIL. Anuário estatístico Brasileiro de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Agência Nacional do Petróleo - ANP**, 2012. Disponível em: <  
<<http://www.anp.gov.br/?pg=60983>> >. Acesso em: 30 nov.

CABIB, E.; ROBERTS, R.; BOWERS, B. Synthesis of the Yeast Cell Wall and its Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 763-793, 1982.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. THE MANNOPROTEIN OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE IS AN EFFECTIVE BIOEMULSIFIER. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2-3, p. 125-155, 2004.

CASTELLAN, G. **Fundamentos de Físico-Química**. . 1ª ed. Rio de Janeiro - RJ: 1986.

CHEN, G.; TAO, D. An experimental study of stability of oil–water emulsion. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 5, p. 499-508, 2005.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3541-3549, 2011.

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.

COUTINHO, R. C. C. et al. **Avaliação da aplicação da tecnologia de micro-ondas no aquecimento de diferentes emulsões água/petróleo**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás, 2004.

DENGIS, P. B.; ROUXHET, P. G. Surface Properties of Top- and Bottom-Fermenting Yeast. **Yeast**, v. 13, n. 10, p. 931-943, 1997.

DERKACH, S. R. Rheology of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 151, n. 1-2, p. 1-23, 2009.

DESOUSA, S. R.; LALUCE, C.; JAFELICCI JR, M. Effects of organic and inorganic additives on flotation recovery of washed cells of *Saccharomyces cerevisiae* resuspended in water. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 48, n. 1, p. 77-83, 2006.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25-39, 2003.

DICKINSON, E. Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n. 1, p. 4-12, 2012.

DOROBANTU, L. S.; YEUNG, A. K.; FOGHT, J. M.; GRAY, M. R. Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 10, p. 6333-6336, 2004.

DWIVEDI, G.; JAIN, S.; SHARMA, M. P. Impact analysis of biodiesel on engine performance—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4633-4641, 2011.

EOW, J. S.; GHADIRI, M.; SHARIF, A. O.; WILLIAMS, T. J. Electrostatic enhancement of coalescence of water droplets in oil: a review of the current understanding. **Chemical Engineering Journal**, v. 84, n. 3, p. 173-192, 2001.

FIORESE, G.; CATENACCI, M.; VERDOLINI, E.; BOSETTI, V. Advanced biofuels: Future perspectives from an expert elicitation survey. **Energy Policy**, v. 56, n. 0, p. 293-311, 2013.

GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G. I.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Microbial cell surface hydrophobicity The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). **Journal of Microbiological Methods**, v. 18, n. 1, p. 61-68, 1993.

GRACE, R. Commercial Emulsion Breaking. In: (Ed.). **Emulsions**: American Chemical Society, v.231, 1992. cap. 9, p.313-339. (Advances in Chemistry).

GÜLSEREN, İ.; CORREDIG, M. Interactions of chitin nanocrystals with  $\beta$ -lactoglobulin at the oil–water interface, studied by drop shape tensiometry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, n. 0, p. 672-679, 2013.

GUTIÉRREZ, G. et al. Influence of Coagulant Salt Addition on the Treatment of Oil-in-Water Emulsions by Centrifugation, Ultrafiltration, and Vacuum Evaporation. **Separation Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1884-1895, 2008.

HAUGLAND, R. P.; LARISON, K. D. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. Molecular Probes, 1992.

HERMANSSON, M. The DLVO theory in microbial adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 14, n. 1–4, p. 105-119, 1999.

HLAVACEK, M. Break-up of oil-in-water emulsions induced by permeation through a microfiltration membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 102, n. 0, p. 1-7, 1995.

HUANG, X.; PENG, K.; FENG, Y.; LIU, J.; LU, L. Separation and characterization of effective demulsifying substances from surface of *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in water-in-kerosene emulsion. **Bioresource Technology**, v. 139, n. 0, p. 257-264, 2013.

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

KING, R. P. Measurement of particle size distribution by image analyser. **Powder Technology**, v. 39, n. 2, p. 279-289, 1984.

KLIS, F. M. Review: Cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 7, p. 851-869, 1994.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1059-1070, 2005.

LARSON, K.; RAGHURAMAN, B.; WIENCEK, J. Electrical and chemical demulsification techniques for microemulsion liquid membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 91, n. 3, p. 231-248, 1994.

LEE, S. S.; NAKAMURA, M.; TAKEUCHI, Y. Demulsification of o/w emulsion and subsequent water-treatment using powder adsorbent. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 81-87, 1989.

LEVINE, S.; BOWEN, B. D.; PARTRIDGE, S. J. Stabilization of emulsions by fine particles I. Partitioning of particles between continuous phase and oil/water interface. **Colloids and Surfaces**, v. 38, n. 2, p. 325-343, 1989.

LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, v. 88, n. 4, p. 1020-1031, 2011.

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.

MACOSKO, C. W. **Rheology: Principles, Measurements and Applications**. New York: VCH Publishers, 1994. 578.

MANNING, F. S.; THOMPSON, R. E. **Oilfield Processing**. University of Tulsa. Tulsa Penn Well Publishing Company, 1995.

MARINOVA, K. G. et al. Charging of Oil-Water Interfaces Due to Spontaneous Adsorption of Hydroxyl Ions. **Langmuir**, v. 12, n. 8, p. 2045-2051, 1996.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practice, and techniques**. Washington: CRC Press, 2005.

MIKULA, J. R. Emulsion Characterization. In: (Ed.). **Emulsions**: American Chemical Society, v.231, 1992. cap. 3, p.79-129. (Advances in Chemistry).

MOHEBALI, G.; BALL, A.; KAYTASH, A.; RASEKH, B. Stabilization of water/gas oil emulsions by desulfurizing cells of *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. **Microbiology**, v. 153, n. 5, p. 1573-1581, 2007.

MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. H. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. **Biomass and Bioenergy**, v. 20, n. 4, p. 317-325, 2001.

NADARAJAH, N.; SINGH, A.; WARD, O. P. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1135-1141, 2002.

OLIVEIRA, A. A. S. et al. Magnetic amphiphilic composites based on carbon nanotubes and nanofibers grown on an inorganic matrix: effect on water-oil interfaces. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 2184-2188, 2010.

PEIDONG, Z. et al. Opportunities and challenges for renewable energy policy in China. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 2, p. 439-449, 2009.

PEKER, S.; BORA, K.; OVER, Y. Effect of interfacial properties on the drop size distribution of high internal phase ratio emulsions. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 182, n. 1-3, p. 43-56, 2001.

PENG, J.; LIU, Q.; XU, Z.; MASLIYAH, J. Novel Magnetic Demulsifier for Water Removal from Diluted Bitumen Emulsion. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 5, p. 2705-2710, 2011.

PERALTA-YAHYA, P. P.; ZHANG, F.; DEL CARDAYRE, S. B.; KEASLING, J. D. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 320-328, 2012.

PICKERING, S. U. CXCVI.-Emulsions. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 91, n. 0, p. 2001-2021, 1907.

PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. Effect of aluminum sulfate and cationic polyelectrolytes on the destabilization of emulsified wastes. **Waste Management**, v. 21, n. 6, p. 535-542, 2001.

QUEMADA, D.; BERLI, C. Energy of interaction in colloids and its implications in rheological modeling. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 98, n. 1, p. 51-85, 2002.

RANGEL, R. M. **Modelamento da eletrocoagulação aplicada ao tratamento de águas oleosas provenientes das indústrias extrativas**. 2008. 221p (Tese de Doutorado). Departamento de Ciência dos Materiais Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

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.

RENNINGER, N. S. O. C. A.; NEWMAN, J. D. B. C. A.; REILING, K. K. O. C. A. **Fuel components, fuel compositions and methods of making and using same.** US. 11753586 2010.

RÍOS, G.; PAZOS, C.; COCA, J. Destabilization of cutting oil emulsions using inorganic salts as coagulants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 138, n. 2–3, p. 383-389, 1998.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

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.

ROUXHET, P. G. et al. Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2, n. 1–3, p. 347-369, 1994.

RUBIO, J.; SOUZA, M. L.; SMITH, R. W. Overview of flotation as a wastewater treatment technique. **Minerals Engineering**, v. 15, n. 3, p. 139-155, 2002.

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

SAREEN, S. S.; ROSE, P. M.; GUDESEN, R. C.; KINTNER, R. C. Coalescence in fibrous beds. **AIChE Journal**, v. 12, n. 6, p. 1045-1050, 1966.

SCHLIEPER, L.; CHATTERJEE, M.; HENSCHKE, M.; PFENNIG, A. Liquid–liquid phase separation in gravity settler with inclined plates. **AIChE Journal**, v. 50, n. 4, p. 802-811, 2004.

SCHREUDER, M. P.; MOOREN, A. T. A.; TOSCHKA, H. Y.; THEO VERRIPS, C.; KLIS, F. M. Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 115-120, 1996.

SOUZA, W. F.; PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, L. C. Amphiphilic catalysts based on onion-like carbon over magnetic iron oxide for petrochemical industry use. **Fuel**, v. 96, n. 0, p. 604-607, 2012.

STEEN, E. J. et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 559-563, 2010.

STUMM, W.; SIGG, L.; SULZBERGER, B. **Chemistry of the Solid-Water Interface: Processes at the Mineral-Water and Particle-Water Interface in Natural Systems.** Wiley, 1992.

TABUR, P.; DORIN, G. **Purifying bio-organic compounds comprises raising the temperature above the phase inversion temperature of the composition comprising a surfactant, host cells, an aqueous medium and a bio-organic compound**: Amyris Inc 2012.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions: estimation of solution thermodynamics of the disperse phase. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 106, n. 1–3, p. 261-285, 2003.

TEIXEIRA, A. P. C. et al. Amphiphilic magnetic composites based on layered vermiculite and fibrous chrysotile with carbon nanostructures: Application in catalysis. **Catalysis Today**, v. 190, n. 1, p. 133-143, 2012.

VILKOVA, N. G.; NUSHTAEVA, A. V. Influence of Hydrophobized Solid Particles on the Reduction of Interfacial Tension. **Mendeleev Communications**, v. 23, n. 3, p. 155-156, 2013.

WEN, D.; JIANG, H.; ZHANG, K. Supercritical fluids technology for clean biofuel production. **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 3, p. 273-284, 2009.

WESTFALL, P. J.; GARDNER, T. S. Industrial fermentation of renewable diesel fuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 344-350, 2011.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415-423, 1997.

YOUNG, G. A. B.; WAKLEY, W. D.; TAGGART, D. L.; ANDREWS, S. L.; WORRELL, J. R. Oil-water separation using hydrocyclones: An experimental search for optimum dimensions. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 11, n. 1, p. 37-50, 1994.

YUSUF, N. N. A. N.; KAMARUDIN, S. K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 7, p. 2741-2751, 2011.

ZLOTNIK, H.; FERNANDEZ, M. P.; BOWERS, B.; CABIB, E. Saccharomyces cerevisiae mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. **Journal of Bacteriology**, v. 159, n. 3, p. 1018-1026, 1984.