



# UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

MESTRADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

LUIZA MOURA FONTES

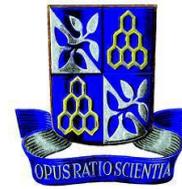
BIODEGRADAÇÃO DE EMULSÃO DE ÓLEO RESIDUAL PESADO  
EM CULTIVO DE *Desmodesmus sp.*



**SALVADOR**  
**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL**

**LUIZA MOURA FONTES**

**BIODEGRADAÇÃO DE EMULSÃO DE ÓLEO RESIDUAL PESADO  
EM CULTIVO DE *Desmodesmus sp.***

SALVADOR, BA

2017

**LUIZA MOURA FONTES**

**BIODEGRADAÇÃO DE EMULSÃO DE ÓLEO RESIDUAL PESADO  
EM CULTIVO DE *Desmodesmus sp.***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia–UFBA, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia Industrial

Orientador: Prof. Dr. Emerson Andrade Sales

SALVADOR, BA

2017

SIBI/UFBA/ Escola Politécnica

Moura Fontes, Luiza

Biodegradação de Emulsão de Óleo Residual Pesado em Cultivo de Desmodesmus sp. / Luiza Moura Fontes. -- Salvador, Bahia, Brasil, 2017.  
91 f.

Orientador: Emerson Andrade Sales. Dissertação (Mestrado - Engenharia Industrial) -- Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica, 2017.

1. Biodegradação. 2. Emulsão. 3. Óleo BPF. 4. Desmodesmus sp. 5. Microalga. I. Andrade Sales, Emerson. II. Título

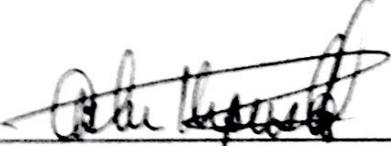
**"BIODEGRADAÇÃO DE EMULSÃO DE ÓLEO RESIDUAL PESADO EM CULTIVO  
DE *Desmodemus sp.*".**

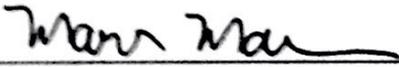
**LUIZA MOURA FONTES**

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Industrial.

Examinada por:

Prof. Dra. Elaine Cabral Albuquerque   
Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas,  
UNICAMP, Brasil, 2005.

Prof. Dr. Asher Kiperstok   
Doutor em Engenharia Química/Tecnologias Ambientais (MPhil e PhD) pela  
University of Manchester Institute of Science and Technology, Inglaterra, 1996.

Prof. Dr. Marcos Malta   
Doutor em Ciências (área de concentração Físico-Química) pela Universidade de  
São Paulo, USP, Brasil, 2004.

Salvador, BA - BRASIL  
Setembro/2017

## AGRADECIMENTOS

Ao longo de nossas vidas, muitas são as pessoas que passam, algumas nos acompanham de perto a vida toda, outras por alguns momentos, mas todas fazem parte de nossa evolução, do que somos e produzimos, então primeiramente gostaria de agradecer a todos que de alguma forma cruzaram o meu caminho e contribuíram com ele.

Agradeço a minha família por ter me ensinado desde muito pequena que o conhecimento é o bem mais precioso que podemos ter. A minha mãe pelo estímulo ao aprendizado e por ter me ensinado a ser forte.

Às minhas irmãs pelo grande companheirismo, a minha irmã Alessandra por ter despertado a minha curiosidade científica me contando que as estrelas fabricavam elementos químicos, por ter me mostrado a beleza da química e sua imensidão. Por todo apoio e inspiração. A minha irmã Daniela por todo carinho, risadas e paciência.

À André meu grande amor, obrigada pela ajuda em questões gráficas, pelo apoio, carinho, amor, companheirismo, mas em especial por fazer de mim um ser humano realizado e muito feliz.

A todos os mestres de faculdade, que tanto contribuíram para minha formação, em especial a minha adorada professora Maria de Lourdes.

Ao meu professor e orientador Emerson Sales pelo conhecimento, oportunidade, e pela tranquilidade em me ensinar a vencer as adversidades ao longo do caminho.

Agradeço a toda equipe do LABEC!

Aos meus amigos queridos pelo companheirismo, em especial aqueles que muito de perto contribuíram para este trabalho, Sonia, Mariana, Isabel, Vivi, Gea, Nicke Kamayurá. Soninha não há palavras para expressar meus agradecimentos a você.

Ao Professor Marcus Vinicius Santos e ao LAMUME por todo apoio que recebi.

Ao CNPq agradeço o suporte financeiro.

Enfim OBRIGADA!!!!

*“Não há nada bom nem mau a não ser estas duas coisas: a sabedoria que é um bem e a ignorância que é um mal.”*

*Platão*

FONTES, Moura Luiza. Biodegradação de emulsão de óleo residual pesado em cultivo de *Desmodesmus sp.* 91 f. il. 2017. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

## RESUMO

Os impactos ambientais provenientes do refino do petróleo são inúmeros e entre estes está a geração de grande quantidade de resíduos pesados contendo uma variedade de compostos orgânicos policíclicos, aromáticos e tóxicos ao homem e ao meio ambiente. É sabido que as microalgas utilizam compostos de carbono como o CO<sub>2</sub> como fonte de nutrientes para produção de carboidratos, proteínas, lipídeos e pigmentos. Neste trabalho foi realizado um estudo sobre a capacidade das microalgas da espécie *Desmodesmus sp.* de biodegradar emulsões de óleo residual pesado de petróleo (BPF) em água. Com esta finalidade foram preparadas emulsões com tensoativos aniônicos e não iônicos biodegradáveis permitindo o acesso das microalgas em cultivo aquoso ao óleo residual e a seus componentes tóxicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). O preparo das emulsões priorizou ativos biodegradáveis provenientes de fontes de carbono renováveis. Com o objetivo de preparar uma solução emulsionante utilizando quantidades mínimas de tensoativos para foi realizado um planejamento estatístico dos experimentos. Inicialmente foi cultivado o inóculo mãe; uma vez alcançada a fase estacionária, o cultivo foi reiniciado com 30%(v/v) do inóculo mãe e 1%(v/v) das emulsões contendo o óleo BPF em condição restrita de nutrientes, forçando assim a utilização da emulsão como fonte carbônica de nutrientes. Ao longo de cada experimento foi avaliado o crescimento celular das microalgas e acompanhados os teores de carotenoides dos cultivos através de espectroscopia Raman. Ao final, foi avaliada a presença de HPAs no meio de cultivo através de técnica cromatográfica gasosa. A espécie *Desmodesmus sp.* apresentou curva de crescimento atípica na presença do óleo BPF emulsionado, bem como alterações no metabolismo de produção de β-caroteno. Conclui-se que as microalgas da espécie *Desmodesmus sp.* foram capazes de biodegradar em 90 dias, nas condições utilizadas nos experimentos, os componentes orgânicos presentes no óleo BPF, incluindo a maior parte dos HPAs presentes.

Palavras Chaves: óleo BPF, microalga, *Desmodesmus sp.*, HPAs, biodegradação.

## ABSTRACT

The environmental impacts from the refining of petroleum are numerous and among these is the generation of large quantities of heavy residues containing a variety of polycyclic organic compounds, aromatic and toxic to humans and the environment. It is known that microalgae use carbon compounds such as CO<sub>2</sub> as a source of nutrients for the production of carbohydrates, proteins, lipids and pigments. In this work a study on the ability of the microalgae of the species *Desmodesmus sp.* to biodegrade heavy oil residual oil (BPF) emulsions in water was carried out. For this purpose, emulsions containing biodegradable anionic and nonionic surfactants were prepared, allowing the microalgae in aqueous culture to reach the residual oil and its toxic components, aromatic polycyclic hydrocarbons (PAHs). The preparation of the emulsions prioritized biodegradable assets from renewable carbon sources. In order to use minimum amounts of surfactants, a statistical design of experiments was carried out to prepare the ideal emulsifier solution. Initially the mother inoculum was cultivated; The culture was restarted with 30% (v / v) of the mother inoculum and 1% (v / v) of the emulsions containing the BPF oil in a nutrient restricted condition, thus forcing the emulsion to be source of nutrients. Throughout each experiment the cell growth of the microalgae was evaluated and the carotenoid contents of the cultures were monitored through Raman spectroscopy. At the end, the presence of PAHs in the culture medium was evaluated by gas chromatographic technique. The species *Desmodesmus sp.* presented an atypical growth curve in the presence of emulsified BPF oil, as well as changes in the metabolism of  $\beta$ -carotene production. It is concluded that the microalgae of the species *Desmodesmus sp.* were able to biodegrade in 90 days, under the conditions used in the experiments, the organic components present in the BPF oil, including most of the HPAs present.

Keywords: BPF oil, microalgae, *Desmodesmus sp.*, HPAs, biodegradation

## LISTA DE ABREVIACES

A	Antraceno
Ac	Acenafteno
Ace	Acenaftileno
AMIDA 80	Dietanolamida de ácido graxo de coco 80%
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ANOVA	Analise de variância
BaA	Benzo[a]antraceno
BaP	Benzo[a]pireno
BbFluo	Benzo[b]fluoranteno
CG/MS	Cromatografia Gasosa/espectrômetro de massas
BgP	Benzo[g,h,i]perileno
BkFluo	Benzo[k]fluoranteno
BPF	�leo residual pesado
CMC	Concentra�o micelar critica
Cri	Criseno
DBO	Demanda Bioquímica de Oxig�nio
DiBahA	Dibenzo[a,h]antraceno
DQO	Demanda Química de Oxig�nio
EO	Número médio de mols de oxido de etileno
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
Fe	Fenantreno
Fl	Fluoreno
Fluo	Fluoranteno
GD	grau médio de desacetila�o
HLB	Balanço hidrofílico-lipofílico
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IndP	Indeno[1,2,3-c,d]pireno
LESS	Lauril �ter sulfato de sódio 27%
N	Naftaleno
Pi	Pireno
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
TWEEN 20	Monolaurato de sorbitan etoxilado 20EO

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da destilação fracionada do petróleo. Adaptado de MARQUES, 2012.....	20
Figura 2: Mecanismo pirolítico para formação de HPAs. Fonte: LOPES E ANDRADE, 1996.....	25
Figura 3: Estrutura química dos HPAs indicados pela EPA para monitoramento. Fonte: COSTA,2001. ....	27
Figura 4: Curva teórica de crescimento de cultivo estacionário. Adaptado de GRESSLER, 2011. ....	31
Figura 5: Classificação dos tensoativos. Fonte: Adaptado de SILVA, 2008.....	36
Figura 6:Variação da tensão superficial x Concentração de tensoativo. Adaptado de MESTRE, 2011.....	38
Figura 7: Representações das estruturas primárias de quitina e quitosana onde n é o grau de polimerização. Fonte: BATTISTI e CAMPANA-FILHO, 2008. ....	43
Figura 8: Mecanismo de interação da Luz. Fonte: Adaptado de GUIMARÃES, 2011. ....	45
Figura 9: Mecanismo de espalhamento Rayleigh e Raman. Fonte: Adaptado de FARIA, 2011. ....	46
Figura 10: Regiões espectrais de alguns grupos funcionais característicos. Fonte: Adaptada de PETER,2011.....	47
Figura 11: Esquema de CG/MS. Fonte: Adaptado de MOURA, 2009.....	50
Figura 12: Estrutura da molécula de Dietanolamida de ácido graxo de coco, onde R representa a cadeia carbônica do ácido graxo de origem. ....	53
Figura 13: Estrutura da molécula de Monolaurato de sorbitan etoxilado, onde R = grupo alquila e $X + Y + Z + W = n^{\circ}$ médio de moles de oxido de etileno (E0), neste caso a soma de X, Y, Z e W é 20. Fonte: Adaptado do boletim técnico Alkest, OXITENO.....	54
Figura 14: Cultivo mãe de Desmodesmus sp. em prateleira.....	58
Figura 15: Cultivos Experimentais com óleo BPF não emulsionado em diferentes concentrações. ....	59
Figura 16: Gráfico de Pareto para variável resposta estabilidade da emulsão. ....	65
Figura 17: Gráfico de Pareto para variável resposta limpeza.....	65

Figura 18: Gráfico de Pareto para variável resposta qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão. ....	65
Figura 19: Gráfico de efeitos principais para a estabilidade da emulsão. ....	66
Figura 20: Gráfico de efeitos principais para a limpeza.....	66
Figura 21: Gráfico de efeitos principais para a qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão. ....	66
Figuras 22a, 22b e 22c: Curvas de nível: Figura 22a Curva de nível para a estabilidade da emulsão. Figura 22b Curva de nível para limpeza. Figura 22c Curva de nível para a qualidade da água após a quebra da emulsão. ....	67
Figura 23: Superfície de resposta para a estabilidade da emulsão. ....	68
Figura 24: Superfície de resposta para a limpeza. ....	68
Figura 25: Superfície de resposta para a qualidade da água após a quebra da emulsão. ....	69
Figura 26: Curva de crescimento do cultivo mãe. ....	72
Figura 27: Curvas de crescimento dos cultivos com óleo BPF não emulsionado. ....	73
Figura 28: 69º dia do experimento. ....	73
Figura 29: Curvas de crescimento dos experimentos com óleo de BPF emulsionado. As condições dos cultivos 1, 2, 3, R3, R4 e 4 estão descritas na Tabela 11. ....	74
Figura 30: Espectro Raman para amostra de <i>Desmodesmus</i> sp. Sinal a: tensão C-C e sinal b: tensão C=C, ambas da molécula de $\beta$ -caroteno. ....	76
Figura 31: Espectro Raman para amostra de <i>Desmodesmus</i> sp. Sinal a: tensão C-C e sinal b: tensão C=C, ambas da molécula de $\beta$ -caroteno. ....	77
Figura 32: Cromatograma do óleo BPF, ampliado com identificação dos HPAs encontrados. Nos tempos de retenção: 5,921 N (naftaleno); 7,808 Ac (acenaftileno); 10,002 A e Fe (antraceno e fenantreno); 13,021 Pi (Pireno); 15962 BaA (benzo antraceno); 18,954 Cri (criseno); 31,453 DiBahA (dibenzo antraceno) e 34,217 BgP (perileno benzeno). ....	78
Figura 33: Cromatograma do extrato do meio de cultivo 3, ampliado com identificação do HPAs encontrado. No tempo de retenção 34,062 BgP (perileno benzeno).....	79
Figura 34: Curva de titulação potenciométrica para o HCL 0,1M. ....	90
Figura 35: Curva da primeira derivada da titulação potenciométrica para o HCL 0,1M. ....	90

Figura 36: Curva da segunda derivada da titulação potenciométrica para o HCL 0,1M.....	91
Figura 37: Curva de titulação potenciométrica para a quitosana em solução de HCL 0,1M.....	91
Figura 38: Curva da primeira derivada da titulação potenciométrica para a quitosana em solução de HCL 0,1M. ....	91
Figura 39: Curva da segunda derivada da titulação potenciométrica para a quitosana em solução de HCL 0,1M. ....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomes e abreviaturas dos HPAs indicados pela EPA. A numeração dos compostos corresponde à Figura 4. ....	28
Tabela 2: Valores de HLB e suas aplicações. Fonte: Adaptado de MESTRE,2011. ....	40
Tabela 3: Sinais Raman do $\beta$ -caroteno e lipídeos considerados por Pilat e colaboradores (2012). ....	48
Tabela 4: Sinais Raman do $\beta$ -caroteno e lipídeos considerados por Villamizar (2013). ....	48
Tabela 5: Planejamento estatístico com variáveis independentes HLB e concentração total de tensoativos para o preparo da solução emulsionante. ....	55
Tabela 6: Concentração de nutrientes nos cultivos em meio BBM. Fonte: Adaptado de LOURENÇO, 2006. ....	57
Tabela 7: Cultivos experimentais com óleo BPF não emulsionado. ....	59
Tabela 8: Experimento com emulsão de óleo BPF.....	60
Tabela 9: Resultado do planejamento estatístico com variáveis independentes HLB e concentração total de tensoativos para o preparo da solução emulsionante. ....	64
Tabela 10: Composição da solução emulsionante utilizada. ....	70
Tabela 11: Experimentos com replicatas para emulsão de óleo BPF .....	74

## SUMÁRIO

<b>1 -INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1- Objetivo Geral.....	17
2.2- Objetivos específicos .....	17
<b>3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1- A indústria do petróleo e seus resíduos.....	18
3.2- HPAs .....	25
3.3- Microalgas .....	29
3.4- Emulsões .....	35
3.5-Métodos analíticos utilizados .....	44
3.5.1- ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	44
3.5.2- CROMATOGRAFIA GASOSA .....	49
<b>4- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
4.1- Preparo das emulsões.....	52
4.2 Cultivos de <i>Desmodesmus sp</i> .....	57
4.2.1 CULTIVO MÃE.....	58
4.2.2 CULTIVO COM BPF NÃO EMULSIONADO .....	58
4.2.3 CULTIVO COM BPF EMULSIONADO .....	59
4.3 Contagem celular .....	61
4.4 Análises de Espectroscopia Raman .....	62
4.5 Análises de CG-MS .....	63
<b>5- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
5.1- Emulsões .....	64
5.2 Crescimento doscultivos de <i>Desmodesmus sp</i> .....	72
5.2.1 CULTIVO MÃE.....	72
5.2.2 CULTIVO COM ÓLEO BPF NÃO EMULSIONADO .....	72
5.2.3 CULTIVO COM ÓLEO BPF EMULSIONADO .....	73
5.3 Espectroscopia Raman.....	76
5.4- Cromatografia.....	78
<b>6- CONCLUSÕES</b> .....	<b>81</b>
<b>7- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>84</b>
<b>APENDICE A</b> .....	<b>90</b>

## 1 -INTRODUÇÃO

São do conhecimento da população tanto a sua dependência aos derivados de petróleo, quanto os grandes impactos ambientais que acompanham a indústria petroquímica.

O ideal para a nossa sociedade seria reduzirmos as nossas necessidades em relação aos derivados de petróleo, até que o óleo cru fosse substituído por outra fonte de matéria prima. Este ideal implica em uma grande mudança de hábitos e está atrelado à descoberta de matérias primas que possam substituir de modo eficiente o petróleo sem promover tantos danos ao meio ambiente.

Neste contexto, além do investimento em novas tecnologias limpas para substituição do petróleo, também se faz necessário o investimento em pesquisas que tornem o processo petroquímico mais limpo, minimizando os resíduos gerados e recuperando ambientes contaminados.

O processo petroquímico gera resíduos desde a extração do óleo até o lixo gerado por produtos finais. Durante o refino do óleo cru são geradas grandes quantidades de óleos residuais, geralmente ricos em hidrocarbonetos pesados e aromáticos.

Dentre estes resíduos, também presentes em derramamentos de petróleo, estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Estes compostos apresentam longa persistência no meio ambiente, baixa solubilidade em água e alta toxidez. Muitos destes compostos aromáticos são cancerígenos ou mutagênicos.

Devido sua baixa solubilidade em água, estes tendem a se acumular nos solos por muitos anos, sendo transferidos para a água de forma paulatina.

São conhecidas espécies de microrganismos hábeis na decomposição dos HPAs, em especial diversas espécies de bactérias, mas também fungos e algas podem desempenhar este papel. Geralmente uma determinada espécie é mais hábil para um determinado HPA específico, motivo que geralmente faz com que processos de biodegradação ocorram em meio a um consórcio de microrganismos (CERNIGLA,1993).

Uma das grandes dificuldades nos processos de biodegradação está em promover o contato entre a espécie escolhida e o efluente orgânico. Em meio aquoso esta dificuldade é ampliada para hidrocarbonetos pesados, incluindo os HPAs, devido sua baixíssima solubilidade no meio.

A fim de resolver esta dificuldade alguns autores utilizam suportes para imobilização do microrganismo e/ou do componente tóxico (DÖNMEZ, 2008).

Neste trabalho fez-se o uso de emulsões com a finalidade em manter o óleo misturado ao meio de cultivo, e disponibilizá-lo para a biodegradação.

Emulsões são termodinamicamente instáveis e o meio de cultivo de microalgas é rico em sais, o que aumenta a força iônica do meio; assim, a solubilização de óleos e a estabilização de emulsão do tipo óleo em água tornam-se um desafio ainda maior quando envolve um meio de cultivo de microorganismos. No presente estudo foi necessário um planejamento estatístico de experimentos, na busca de uma emulsão de óleo BPF em água com posterior adição desta emulsão a um meio de cultivo da espécie escolhida, *Desmodesmus sp.*; vale ressaltar que esta emulsão de óleo BPF foi a única fonte de carbono orgânico fornecida às microalgas.

As microalgas da espécie *Desmodesmus sp.* possuem boa tolerância térmica e a cepa de origem utilizada para o cultivo neste trabalho foi coletada e isolada do Dique do Tororó, em Salvador-Bahia, o que conferiu à esta espécie melhor resistência às condições utilizadas nos experimentos, incluindo a presença de poluentes.

Para o acompanhamento periódico do cultivo foram escolhidos métodos que não necessitassem de grandes quantidades de amostra, nem de complexos procedimentos para o preparo da mesma. Foram então escolhidos a avaliação do crescimento celular e análises de espectroscopia Raman dos sinais referentes ao pigmento  $\beta$ -caroteno.

Ao final dos experimentos foi verificada a presença de compostos orgânicos provenientes do óleo BPF no cultivo através de técnica cromatográfica, CG/MS.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo Geral

Biodegradar um resíduo petroquímico rico em compostos policíclicos aromáticos (HPAs) em sistema fechado de cultivo de microalgas da espécie *Desmodesmus sp.*

### 2.2- Objetivos específicos

- Produzir uma emulsão estável e biodegradável para resíduos pesados de petróleo;
- Melhorar a fluidez do resíduo pesado de petróleo ao longo do sistema de escoamento industrial;
- Emulsionar um resíduo de óleo BPF em meio de cultivo aquoso;
- Avaliar o crescimento e produção de pigmentos ao longo do cultivo;
- Verificar a capacidade da espécie *Desmodesmus sp.* de utilizar os compostos emulsionados como fonte de carbono, e assim biodegradar este resíduo;

### 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1- A indústria do petróleo e seus resíduos

A indústria petroquímica possui alto poder germinativo e grande relação com os demais setores econômicos mundiais. Através do refino do petróleo além da produção de combustíveis, são produzidos insumos para fertilizantes, plásticos, fibras químicas, tintas, corantes, elastômeros, adesivos, solventes, tensoativos, gases industriais, detergentes, inseticidas, fungicidas, herbicidas, bernicidas, pesticidas, explosivos, produtos farmacêuticos, e outros. Seus produtos substituem com vantagem a madeira, as fibras naturais, o aço, o papel, a borracha natural, entre outras (TORRES, 1997; BIGNETTI, 2008).

No entanto, a volatilidade recente dos preços do petróleo e previsões de esgotamento de recursos fósseis, além das apreensões com o aquecimento global, fizeram renascer a preocupação energética e com a oferta de matérias-primas, dando lugar a um novo ciclo de inovações em uma indústria que parecia ter alcançado sua maturidade tecnológica. A insuficiência mundial de matérias primas petroquímicas imprimiu, assim, mudanças no cenário global e deu novo ímpeto à inovação, com foco principal na flexibilidade de matérias-primas (GLASS,2007).

A indústria do petróleo brasileira vem passando por reformas, que visam um maior aproveitamento dos insumos, menor consumo de energia e de água e produtos finais mais limpos, como a redução do teor de enxofre no óleo diesel comercial (FAHIM *et. al.*, 2012).

Processos petroquímicos trazem grande impacto ambiental, no entanto o mundo possui infraestrutura ainda dependente dos derivados de petróleo, o que devido a muitos fatores e interesses comerciais, econômicos e políticos, ainda deve durar algumas décadas, com a substituição dos petroquímicos lentamente por novas tecnologias. Mas enquanto a indústria petroquímica estiver em atividade faz-se necessário o investimento em tecnologias de produção mais limpas (GLASS,2007).

A indústria de extração de petróleo e gás realiza diversas etapas desde a prospecção nos campos até o início do processo de refino e em cada uma destas etapas são gerados efluentes e resíduos sólidos a serem tratados e descartados. Entre os principais resíduos gerados estão a água produzida, que inevitavelmente contém quantidades de óleo cru, os resíduos de perfuração (cascalhos e fluidos), e

uma série de outros resíduos comumente denominados resíduos associados (BRAGA *et. al.*, 2002).

Ainda hoje nos processos de exploração, refino, transporte e armazenamento de petróleo e seus derivados podem ocorrer derramamentos, provocando a contaminação de solos e águas. Os freqüentes derramamentos de petróleo e derivados no Brasil e no mundo, vêm motivando e incentivando a realização de pesquisas e desenvolvimento de tecnologias para remediação de áreas contaminadas (ANDRADE *et. al.*, 2010).

O óleo cru é uma mistura de hidrocarbonetos, contendo ainda pequenas porções de nitrogênio, oxigênio, enxofre e metais nas formas orgânicas. A composição do óleo, bem como a variação de suas propriedades físico-químicas dependem diretamente de sua fonte (FAHIM *et. al.*, 2012).

As frações do petróleo podem ser classificadas como leves ou pesadas de acordo com sua composição e respectivas faixas de ebulição (FAHIM *et. al.*, 2012).

O processo de refino do petróleo é realizado através de destilações fracionadas, além de outros processos complementares como craqueamento catalítico, hidrocrackeamento, craqueamento térmico, reforma catalítica, pirólise, entre outros que tem por finalidade a produção ou purificação de compostos específicos a partir das frações obtidas na destilação fracionada. A Figura 1 ilustra de maneira simplificada a destilação fracionada do petróleo e as principais frações obtidas (MARQUES, 2012).

Os óleos pesados, geralmente são ricos em asfaltenos e resinas. Os asfaltenos são sólidos de coloração marrom escura, formados por camadas de compostos aromáticos polinucleares condensadas unidas por ligações saturadas que são dobradas criando uma estrutura sólida micelar. A solubilidade dos asfaltenos no petróleo líquido pode ser atribuída à presença das resinas (FAHIM *et. al.*, 2012).

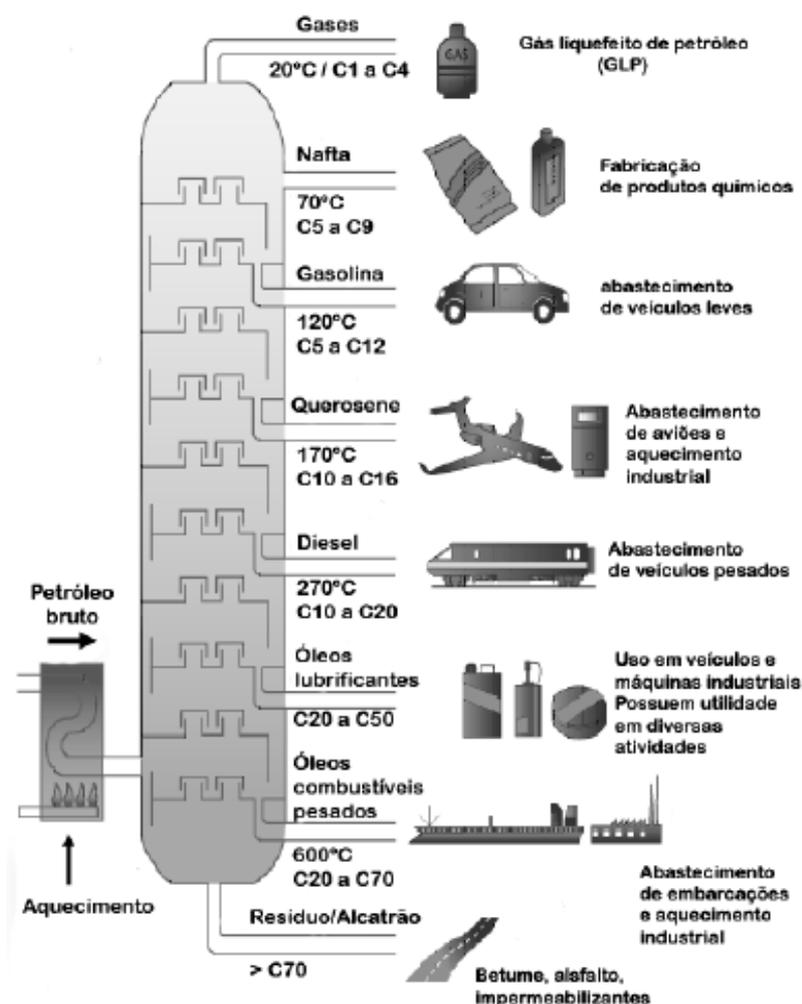


Figura 1: Ilustração da destilação fracionada do petróleo. Adaptado de MARQUES, 2012.

A presença de asfaltenos no óleo cru traz inúmeros problemas ao refino, com elevação de seu custo, formação de coque, deposição de metal na superfície do catalisador, com consequente inativação deste. Além das dificuldades trazidas ao refino, a presença de asfaltenos potencializa os riscos na contaminação ambiental, uma vez que estes são ricos em compostos aromáticos polinucleares, com alta toxidez e grande persistência no meio ambiente (FAHIM *et. al.*, 2012; ANDRADE *et. al.*, 2010).

A tendência mundial para o fornecimento de óleo cru indica um aumento contínuo na produção de óleo pesado. Em contrapartida a demanda por produtos de petróleo de alto valor, como destilados médios e gasolina também é crescente, trazendo à tona a necessidade de converter o “fundo do barril” em produtos líquidos mais valiosos e limpos. No entanto o resíduo representa uma parte significativa do petróleo e seu tratamento ainda deixa muito a desejar (FAHIM *et. al.*, 2012).

Entre os resíduos da exploração e refino do petróleo destacam-se pela alta toxidez e persistência ambiental as misturas de hidrocarbonetos, com alto teor de compostos aromáticos e enxofre (FAHIM *et. al.*, 2012).

Os resíduos compostos por solo (argilas, areias e cascalhos) e óleo, gerados durante as etapas de produção, processamento, transporte e refino de petróleo constituem um passivo ambiental significativo, uma vez que são gerados em grandes quantidades e não há uma definição de tecnologias de tratamento e disposição final economicamente sustentável (FRANCISCO e FRANÇA, 2007).

Os equipamentos industriais necessitam periodicamente de paradas preventivas para manutenção, durante este processo é necessário a completa remoção de resíduos de modo que seja possível a entrada de pessoal nos equipamentos e linhas, sem que haja risco de intoxicação, para tanto estes devem estar isentos de compostos aromáticos, ácido sulfídrico, gases explosivos, e ainda devem possuir atmosfera com teores de oxigênio próximos à 21%. Nas paradas torna-se necessário, em um pequeno intervalo de tempo, a destinação de grande quantidade de resíduos em especial de resíduos de óleos pesados (BIGNETTI, 2008).

O destino e tratamento final de resíduos oriundos da indústria de petróleo e seus derivados, geram altos riscos em relação ao meio ambiente devido principalmente às características de cada resíduo, mas também devido às atuais tecnologias utilizadas. Dentre as principais técnicas de destino e tratamento final, é possível citar a incineração, *landfarming*, compostagem, aterros, reatores biológicos, incorporação em indústrias de cerâmicas (FRANCISCO e FRANÇA, 2007).

A incineração ocorre sob alta temperatura (entre 1000 e 1300°C) em condições controladas. As principais vantagens da utilização do processo de incineração são a alta velocidade de destruição do resíduo, a possibilidade de aproveitamento do resíduo como combustível auxiliar e a ausência da necessidade de transportar o resíduo para outro local. No entanto para alguns resíduos os custos de incineração são altos e podem apresentar dificuldades no controle da operação para evitar combustões incompletas com consequente emissão de poluentes atmosféricos (FRANCISCO e FRANÇA, 2007).

O sistema *landfarming*, o aterro e a compostagem constituem formas distintas de depositar os resíduos oleosos no solo para posterior biodegradação. Ambos os processos são lentos e possuem como restrição a impossibilidade de utilizar resíduos com componentes tóxicos ou compostos não biodegradáveis. Já os reatores

biológicos consistem em misturar o solo contaminado ou o resíduo com água e introduzir a mistura em um reator previamente preenchido com carvão, plástico, esferas de vidro ou terra diatomácea que permitem a obtenção de grande área superficial e a rápida formação do biofilme responsável pela biodegradação. O inóculo pode vir da própria população presente no ambiente contaminado; de lodos ativados ou de cultura pura de microrganismo apropriado (FRANCISCO e FRANÇA, 2007).

A incorporação dos resíduos em indústrias de cerâmicas promove uma redução na quantidade de resíduos a serem dispostos e ainda podem ser uma fonte alternativa de matéria-prima de baixo custo para a indústria cerâmica. No entanto a adição de resíduos oleosos na indústria cerâmica pode levar a incrementos de emissão de poluentes nas fases de secagem e queima (OLIVEIRA, 2003).

A incineração acarreta a geração de grandes quantidades de poluentes atmosféricos e possui custo elevado; os aterros oferecem riscos para corpos hídricos e para a saúde pública. Uma alternativa na minimização destes impactos é considerar a biodegradação destes resíduos (FRANCISCO e FRANÇA, 2007).

Os resíduos oleosos são classificados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), segundo a norma para resíduos sólidos NBR 10.004:2004, que define resíduos sólidos:

“Resíduos nos estados sólido e semi-sólido, que resultam de atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou corpos de água, ou exijam para isso soluções técnicas e economicamente inviáveis em face à melhor tecnologia disponível (ABNT NBR 10.004:2004).”

A norma tem como objetivo classificar os resíduos sólidos quanto aos seus potenciais ao meio ambiente e à saúde pública, para que possam ser gerenciados adequadamente. Os resíduos são classificados em classe I, perigosos, e classe II, não perigosos (ABNT NBR 10.004:2004).

Conforme a NBR 10.004 são definidos como resíduos perigosos aqueles que possam apresentar risco à saúde pública, provocando ou acentuando, de forma significativa, um aumento de mortalidade ou incidência de doenças; riscos ao meio

ambiente, quando o resíduo é manuseado ou destinado de forma inadequada (ABNT NBR 10.004:2004).

A NBR 10.004 classifica como perigosos, os resíduos que possuam ao menos uma das características: corrosividade, inflamabilidade, patogenicidade, reatividade etoxicidade (FRANCISCO e FRANÇA, 2007).

A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) foi instituída e é regulada pela Lei 12305/2010. Conforme esta Lei:

“Art. 1º Esta Lei institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos, dispondo sobre seus princípios, objetivos e instrumentos, bem como sobre as diretrizes relativas à gestão integrada e ao gerenciamento de resíduos sólidos, incluídos os perigosos, às responsabilidades dos geradores e do poder público e aos instrumentos econômicos aplicáveis (Lei 12305, 2010).”

O plano de gerenciamento de resíduos sólidos é parte integrante do processo de licenciamento ambiental da atividade produtiva, conforme a PNRS. No entanto esta política não especifica de que forma o plano de gerenciamento deve ser realizado e não dispõe nada acerca de um possível enquadramento das atividades geradoras de resíduos. Outra falha legal reside na falta de referência à apresentação de um plano de gerenciamento de resíduos para os empreendimentos em operação, com a licença ambiental anterior a PNRS em 2010. Na indústria do petróleo a validade de operação da licença pode chegar a 10 anos, acarretando um risco de até uma década de omissão legislativa (MACHADO *et al.*, 2015).

Segundo Machado e colaboradores (2015) para a política pública nacional de resíduos sólidos a responsabilidade em apresentar um plano de gerenciamento de resíduos sólidos é do gerador destes resíduos, sendo ainda obrigações do gerador (MACHADO *et al.*, 2015):

- Manter o registro atualizado e facilmente acessível sobre os procedimentos do plano,
- Informar manualmente quantidade, natureza e destinação temporária ou final dos resíduos,
- Informar sobre a ocorrência de acidentes ou outros sinistros e
- Adotar medidas para reduzir o volume e a periculosidade dos resíduos.

Embora a implementação da Lei 12305/2010 e do PNRS represente um avanço na legislação ambiental brasileira, ainda falta um longo caminho no tratamento e

disposição dos resíduos sólidos provenientes da indústria do petróleo, o texto traz incoerências como a redução da periculosidade dos resíduos perigosos, ao invés de medidas para redução do risco de exposição aos resíduos perigosos. Além de críticas ao texto da Lei, a fiscalização em relação ao despejo de resíduos industriais no Brasil ainda deixa muito a desejar (MACHADO *et al.*, 2015).

Com o objetivo de minimizar os impactos ambientais causados pela operação e expansão da indústria petrolífera são necessários o investimento em novas tecnologias e uma atuação integrada da administração pública, especialmente dos órgãos das áreas de energia, petróleo e meio ambiente, para a revisão dos instrumentos de fiscalização e controle das normas de regulamentação dessa atividade. Em especial os resíduos sólidos perigosos, onde são encontrados em sua composição hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), compostos mutagênicos e carcinogênicos aos humanos e aos animais, que são introduzidos no ambiente em grandes quantidades provenientes das atividades relacionadas à extração, ao transporte, ao refino, à transformação e à utilização do petróleo e de seus derivados (MACHADO *et al.*, 2015).

Dentre os resíduos com altos teores de compostos policíclicos aromáticos pode-se citar o resíduo aromático de pirólise e o óleo pesado residual (BPF). O resíduo aromático de pirólise, também conhecido como óleo de *quench*, é gerado em grande quantidade na produção de gasolina de pirólise. Trata-se de um óleo pesado de coloração avermelhada que contém altos teores de estirenos e aromáticos. Pode ser utilizado como matéria prima para a produção de negro de fumo. O óleo pesado residual, BPF, possui coloração escura e alta viscosidade e é composto por diversos hidrocarbonetos com uma ampla faixa de pesos moleculares, números de carbonos (C7 a C50) e pontos de ebulição (121 a 600°C) (BRASKEN; OKUTAN *et. al.*, 1994; PETROBRAS).

O BPF é proveniente do fundo das torres de destilação fracionada e dos processos de craqueamento durante o refino do petróleo. Este óleo residual pesado é utilizado na fabricação de asfalto e como combustível em fornos e caldeiras. Conforme a ficha de segurança de produtos químicos, fornecida pela Petrobras Distribuidora S.A. Em combustão o óleo libera hidrocarbonetos poliaromáticos na forma de partículas e vapores. Quando aquecido pode liberar sulfeto de hidrogênio (BRASKEN; OKUTAN *et. al.*, 1994; PETROBRAS).

### 3.2- HPAs

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem um grupo com mais de cem compostos orgânicos, constituídos de carbono e hidrogênio, contendo dois ou mais anéis aromáticos condensados. A estrutura química destes compostos confere a eles um alto caráter lipofílico (CARUSO e ALABURDA, 2008).

Os estudos sobre a origem dos HPAs mostram que estes compostos podem ser provenientes de várias fontes antropogênicas como combustão incompleta ou pirólise da matéria orgânica, queima de carvão, escapamentos de veículos, óleos lubrificantes, fumaça de cigarro, entre outros processos de combustão, bem como de fontes ambientais como erupções vulcânicas e queimadas espontâneas. No entanto as fontes naturais contribuem com pequenas quantidades de HPAs, enquanto que as fontes antropogênicas representam o principal processo de emissão destes compostos (CARUSO e ALABURDA, 2008).

As principais fontes de HPAs são a combustão incompleta e a pirólise da matéria orgânica. A formação pirolítica de HPAs é bastante complexa e variável, dependendo das condições reacionais, como o tipo da matéria orgânica presente, a quantidade de oxigênio disponível, a pressão e a temperatura. Estudos apontam um aumento linear na concentração de HPAs na faixa de temperatura de 400 a 1000°C (CARUSO e ALABURDA, 2008).

O mecanismo aceito para formação de HPAs a partir da pirólise envolve a polimerização via radicais livres, em várias etapas, até a formação de núcleos aromáticos condensados, conforme ilustrado na Figura 2 (LOPES e ANDRADE, 1996).

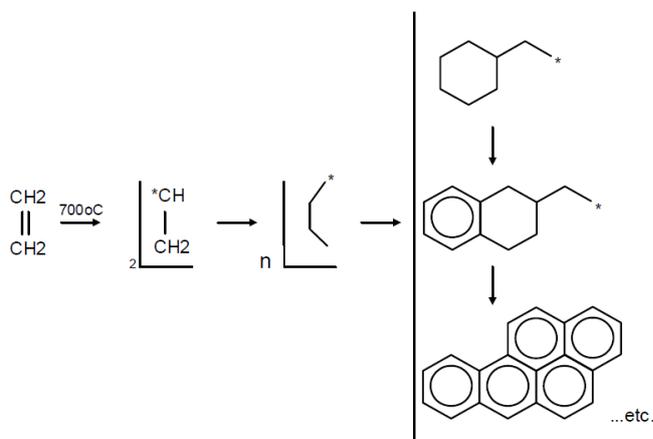


Figura 2: Mecanismo pirolítico para formação de HPAs. Fonte: LOPES E ANDRADE, 1996.

Os HPAs são poluentes orgânicos de grande persistência ambiental, e muitos são potencialmente carcinogênicos e/ou mutagênicos. Os sistemas de ligações duplas conjugadas dos HPAs determinam a maior parte de suas propriedades, que variam com o número de anéis e conseqüentemente com suas massas moleculares (COSTA, 2001). Eles possuem alta capacidade de distribuição no meio ambiente, atmosfera, água e solo, são encontrados em matrizes complexas, com diversos isômeros e amplas faixas de concentração. São considerados indicadores de contaminação de combustíveis por praticamente não se degradarem no ambiente (COTTA, 2008).

A biodegradabilidade dos HPAs torna-se mais difícil com o aumento da massa molecular destes compostos, uma vez que compostos mais leves podem ser parcialmente dissolvidos em ambiente aquoso, estando assim mais disponíveis para biodegradação ou ainda serem volatilizados estando susceptíveis à degradação atmosférica (COTTA, 2008).

O principal processo de degradação dos HPAs é por ação microbiana. A degradação destes compostos depende das condições ambientais, da quantidade e tipo de microrganismos, do pH, temperatura, oxigênio e grau de aclimação, além da estrutura química dos HPAs presentes. Diversas bactérias podem transformar os HPAs em metabólitos menos complexos, incluindo gás carbônico e água em processos aeróbicos e metano para processos anaeróbicos. Dentre as espécies bacterianas com atividade para biodegradar os HPAs estão *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas Fluorescentes*, *Mycobacterium spp.*, *Haemophilus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Paenibacillus spp.* Além destas os fungos *Lignolytice* algumas espécies de algas têm também a propriedade da degradação de HPAS (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

Geralmente a degradação de HPAs é mais eficiente utilizando um consórcio de microrganismos, seja este de bactérias, algas ou fungos ou de bactérias e algas. Algas marinhas fotoautotróficas (cianobactérias, algas verdes e diatomáceas) são conhecidas por metabolizar o naftaleno em uma série de metabólitos (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

Pinhati e colaboradores (2014) avaliaram a eficiência de degradação de HPAs por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo, verificaram que as taxas de degradação máximas foram obtidas quando um consórcio microbiano foi utilizado. Obtendo, 56% e 80% de biodegradação de antraceno em 15

e 30 dias, respectivamente e 96% e 99,6% de biodegradação de fenantreno em 15 e 30 dias, respectivamente (PINHATI *et. al.*, 2014)

Os HPAs são poluentes ambientais que apresentam atividade cancerígena e mutagênica. A exposição humana e de outros animais aos HPAs pode ocorrer por diferentes vias, como inalação, absorção cutânea ou por ingestão. Após a contaminação estes compostos podem se acumular no tecido adiposo e/ou ativar um processo metabólico visando à formação de compostos hidrossolúveis para facilitar sua excreção. O mecanismo de eliminação envolve a formação de epóxidos, seguidos de compostos polihidroxilados, os quais são mais solúveis em água, viabilizando a sua eliminação pela via urinária. Os intermediários metabólicos podem acarretar processos de tumoração (CARUSO e ALABURDA, 2008).

A *United States Environmental Protection Agency* (EPA) inclui 16 HPAs com alta carcinogenicidade, mutagenicidade e persistência em sua lista de poluentes prioritários, para monitoramento (COSTA, 2001) (COTTA, 2008). Os principais HPAs recomendados pela EPA para o monitoramento biológico são mostrados na Figura 3 e seus respectivos nomes e abreviaturas estão listados na Tabela 1.

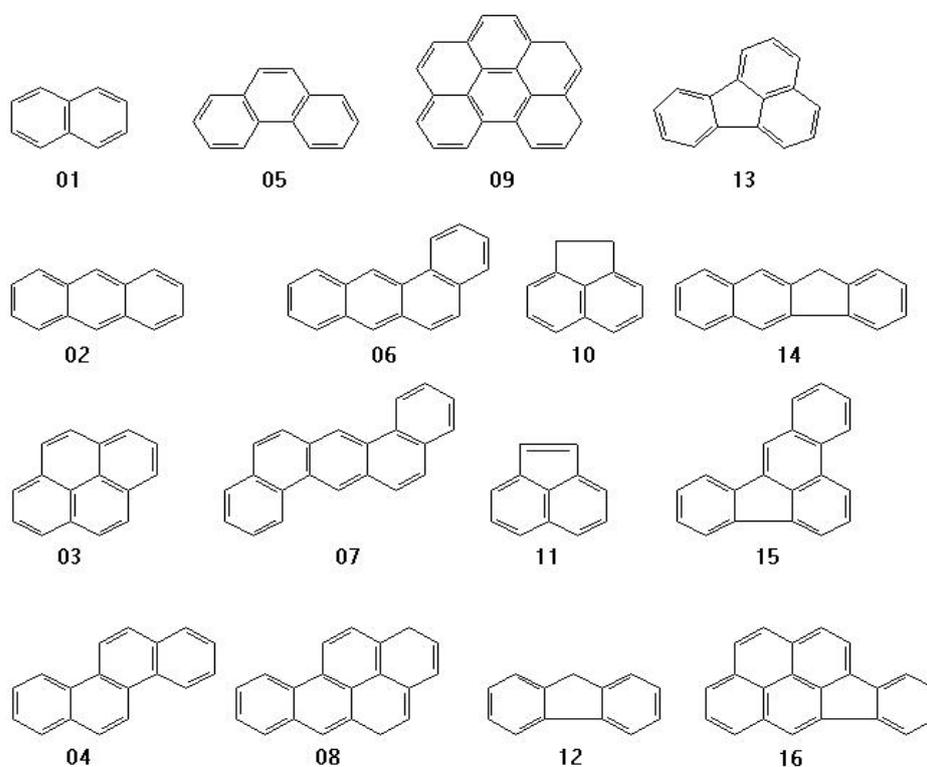


Figura 3: Estrutura química dos HPAs indicados pela EPA para monitoramento. Fonte: COSTA,2001.

Tabela 1: Nomes e abreviaturas dos HPAs indicados pela EPA. A numeração dos compostos corresponde à Figura3.

Número	Nome	Abreviatura
1	Naftaleno	N
2	Antraceno	A
3	Pireno	Pi
4	Criseno	Cri
5	Fenantreno	Fe
6	Benzo[a]antraceno	BaA
7	Dibenzo[a,h]antraceno	DiBahA
8	Benzo[a]pireno	BaP
9	Benzo[g,h,i]perileno	BgP
10	Acenafteno	Ac
11	Acenaftileno	Ace
12	Fluoreno	Fl
13	Fluoranteno	Fluo
14	Benzo[k]fluoranteno	BkFluo
15	Benzo[b]fluoranteno	BbFluo
16	Indeno[1,2,3-c,d]pireno	IndP

O Brasil ainda não possui legislação para monitoramento e limites de HPAs no meio ambiente (COTTA,2008).

### 3.3- Microalgas

As microalgas fazem parte de um grupo muito heterogêneo de organismos. Quase sempre são aquáticas, microscópicas e unicelulares, podendo formar colônias, e apresentar pouca ou nenhuma diferenciação celular. Sua coloração é variada e caracterizada pela produção de pigmentos através de metabolismo foto autotrófico (SCHMITZ,2012).

Microalgas são microrganismos fotossintéticos com necessidades nutricionais relativamente simples. Sua biomassa pode ser empregada para obtenção de biocompostos, como suplemento alimentar humano, alimento animal ou fonte de biocombustíveis (ANDRADE e COSTA, 2008).

As microalgas, juntamente com outros microrganismos fotossintéticos formam o *plankton* e são responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta a partir da fotossíntese (GRESSLER, 2011).

As microalgas fazem parte da cadeia alimentar como produtores primários. Trata-se de um grupo diversificado com organismos altamente especializados e capazes de sobreviver em uma variedade de condições extremas como: temperatura, luminosidade, salinidade, agentes contaminantes industriais e domésticos, entre outros (HARUM *et.al*, 2010).

As microalgas possuem em sua composição: ácidos graxos, carboidratos, pigmentos, proteínas e vitaminas, o que as torna, além de bons produtores primários da cadeia alimentar, uma fonte variada e importante de bioprodutos utilizados nas indústrias: alimentar humana e animal, farmacêutica, cosmética e de biocombustíveis (SATYANARAYANA *et. al.*, 2011).

Além da geração de bioprodutos, as microalgas possuem aplicações ambientais que incluem a fixação de CO<sub>2</sub>, remoção de matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, produção de biocombustíveis como biodiesel e bioetanol e na produção de moléculas de origem lipídica com capacidade surfactante entre outros (SCHMITZ,2012).

Estes microrganismos podem ser cultivados em espaços fechados como fotobiorreatores ou em sistemas abertos como lagoas abertas. Possuem alta taxa de crescimento quando comparadas a espécies vegetais (VILLAMIZAR, 2013).

O crescimento de uma população microalgal depende dos parâmetros biológicos, característicos de cada espécie e de parâmetros físico-químicos, principalmente

iluminação, temperatura e pH, regime hidrodinâmico e disponibilidade de nutrientes (GRESSLER, 2011).

As microalgas captam a radiação proveniente da energia solar através de pigmentos fotossintéticos, onde a energia luminosa é transferida para os centros de reação e é utilizada para as reações fotoquímicas. Através da fotossíntese as microalgas fixam o carbono necessário à produção de biomassa, portanto esse processo há uma relação do crescimento de um cultivo com o efeito da intensidade da luz (irradiância ou iluminação) nos mesmos (GRESSLER, 2011).

Cada espécie de microalga possui uma faixa de temperatura ótima fisiológica, variações nesta faixa acarretam alterações na composição e volume celular, modificando o crescimento celular e a produtividade de bioprodutos (GRESSLER, 2011).

A agitação é um fator importante para os cultivos, pois promove a mistura da suspensão microalgal possibilitando o acesso das células à luz, auxiliando troca de gases, mantendo a temperatura e a distribuição de nutrientes homogênea no cultivo (SOARES, 2010).

Uma série de nutrientes é necessária para o crescimento ótimo das espécies de microalgas. As necessidades nutricionais variam de acordo com a espécie, o meio e as condições de cultivo. Dentre os macronutrientes necessários destacam-se o carbono, nitrogênio e fósforo, bem como cálcio, magnésio, enxofre e potássio. Ainda podem ser necessários ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto, além de pequenas dosagens de vitaminas (GRESSLER, 2011).

A avaliação do crescimento de um cultivo de microalgas, geralmente é realizada através de curvas de crescimento que expressam a relação entre o incremento da biomassa ou o número de organismos num determinado volume (densidade celular) pelo tempo (GRESSLER, 2011). A Figura 4 ilustra uma curva teórica de crescimento em um cultivo do tipo estacionário.

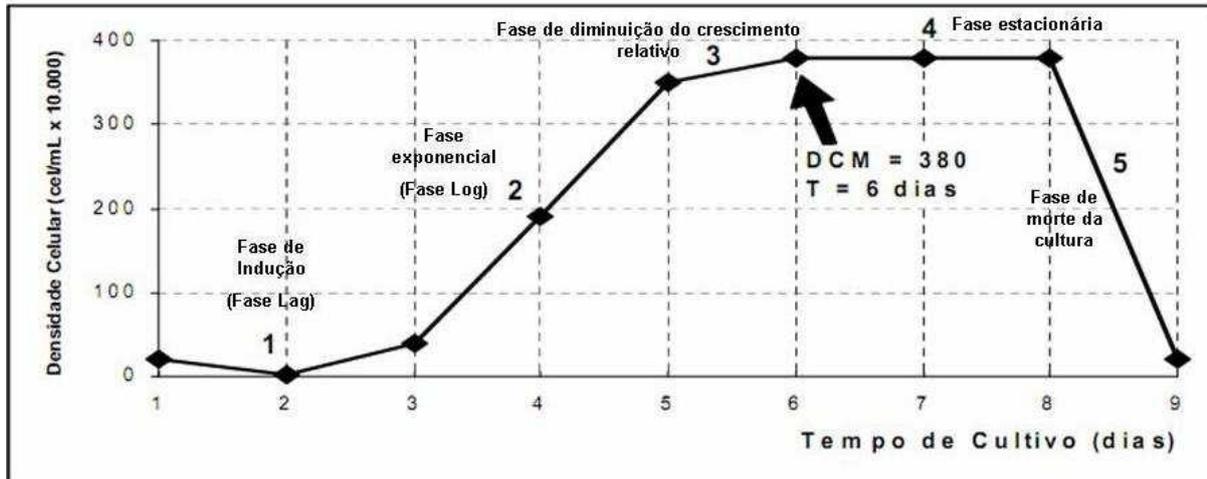


Figura 4: Curva teórica de crescimento de cultivo estacionário. Adaptado de GRESSLER, 2011.

GRESSLER (2011) descreve a partir da Figura 4, as principais fases de crescimento do cultivo:

1. Fase de indução (Fase Lag): É a fase inicial do cultivo, após a repicagem, período no qual a cultura se adapta às condições do cultivo, motivo pelo qual não há incremento populacional;
2. Fase Exponencial (Fase Log): é a fase na qual a cultura apresenta alto crescimento celular;
3. Fase Estacionária: nesta fase há uma diminuição dos nutrientes disponíveis e não há incremento líquido da população (adensidade celular permanece constante), a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade;
4. Fase de Morte da Cultura: Nesta fase o cultivo sofre um decréscimo no crescimento, proveniente da falta de nutrientes, do autosombreamento e da possível presença de metabólitos tóxicos.

Como limitantes do crescimento os principais elementos são carbono, nitrogênio, fósforo e ferro. O carbono constitui cerca de 50% da biomassa microalgal e por este motivo é considerado um dos elementos nutricionais mais importantes do cultivo. A fonte de carbono utilizada pode ser orgânica, inorgânica e gás carbônico atmosférico. Conforme SOARES (2011) de acordo com a fonte de carbono empregada os cultivos de microalga podem ser classificados em três tipos (SOARES, 2010):

- Heterotrófico: o fornecimento de carbono é realizado pela introdução de compostos orgânicos apropriados ao meio de cultura (glicose, glicerol, entre outros compostos orgânicos);

- Mixotrófico: o carbono é disponibilizado tanto por meio de compostos orgânicos quanto pelo CO<sub>2</sub> atmosférico e inorgânico;
- Autotrófico: (fotoautotrófico) – a única fonte de carbono disponibilizada é o CO<sub>2</sub> inorgânico e atmosférico. Neste caso, o dióxido de carbono pode ser disponibilizado às células por difusão (do ar atmosférico) ou por borbulhamento de ar através de compressores diretamente no meio de cultura, ou ainda através da adição de ácido carbônico e/ou carbonatos.

As microalgas existem em um variado número de classes e são distinguidas, principalmente, pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular (SCHMITZ,2012).

A escolha da microalga mais adequada para se trabalhar depende da aplicação dada ao microrganismo, que pode ir desde a produção de biocombustíveis ou bioativos até a biodegradação de efluentes, ainda devem ser considerados vários outros fatores, como por exemplo, a faixa de temperatura a assimilação de nutrientes, as especificações para o crescimento, a composição de ácidos graxos, carboidratos, proteínas, entre outros (PINTO, 2014)

A microalga *Desmodesmus sp.* é um gênero de algas verdes de água doce, pertencente ao grupo *Chlorophyta*. É uma microalga eucariótica, verde, de forma elipsoidal a ovóide, pode se distribuir em células únicas ou em cenóbio de 2-4-8-16 células. Entre as vantagens deste gênero estão a alta resistência e produtividade, podem alcançar seu maior crescimento em até 14 dias, ainda em relação aos custos com o cultivo, em regiões de climas tropicais a *Desmodesmus sp.* apresenta a vantagem de estar adaptada a temperaturas da água acima de 25°C (PINTO, 2014).

Dentre as principais aplicações ambientais das microalgas é possível citar a produção de biocombustíveis e de biosurfactantes, além da fixação de CO<sub>2</sub> e da biodegradação de efluentes (SCHMITZ,2012).

A composição dos efluentes depende da sua origem. Muitos efluentes podem conter grande quantidade de matéria orgânica, HPAs ou ainda metais tóxicos, representando assim um grave problema para o meio ambiente (SCHMITZ,2012).

A aplicação das microalgas no tratamento de águas residuais é promissora na remoção de nutrientes, metais pesados e compostos orgânicos tóxicos, como fenóis e cloro fenóis. Possibilitando a melhoria nos parâmetros de qualidade da água (GRESSLER,2011).

A primeira proposta do uso de microalgas em processos de biorremediação foi proposta em 1957 por Oswald e Gotaas. No entanto a idéia ganhou impulso com a clara necessidade de preservação ambiental na década de 80 (GRESSLER,2011).

Golueke, Oswald e Gotaas (1957) realizaram um trabalho de tratamento em águas residuais usando a combinação das atividades de bactérias e algas em lagoas de estabilização. Nas lagoas, as bactérias realizaram a decomposição de constituintes orgânicos, tornando estes disponíveis para as algas. O oxigênio liberado na fotossíntese algal foi utilizado pelas bactérias na oxidação da matéria orgânica (GOLUEKE *et al.*, 1957).

O estudo da capacidade de algumas espécies de microalgas e cianobactérias em metabolizar determinado composto policíclico aromático iniciou na década de 80, entre as espécies com esta capacidade estão *Chlorella autotrophica*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlamydomonas angulosa*, *Coccochloris elabens*, *Cylindrotheca* sp., *Dunahella tertiolecta*, *Nlicrocoleus chthonoplastes*, *Navicula* sp., *Nitzschia* sp., entre outras. A espécie, primeiro, precisa absorver o componente, para em seguida metabolizá-lo. Sabe-se que a biodegradação dos HPAs ocorre por rotas que envolvem enzimas e o processo de oxidação destes compostos. As cianobactérias e algas verdes em condições fotoautotróficas oxidam o naftaleno a 1-naftol, com pequenas quantidades de cis-1, 2-di-hidroxi-1, 2-Dihidronaftaleno e 4-hidroxi-1-tetralona (CERNIGLIA, 1993).

A eutrofização de águas pode ser reduzida significativamente pelo cultivo de microalgas, os cultivos permitem o aumento do oxigênio dissolvido na água, ampliando as possibilidades de recuperação dos parâmetros físico-químicos da água e conseqüentemente a fauna e flora locais (GRESSLER,2011).

Dönmez e colaboradores (2008) utilizaram o cultivo da cianobactéria *Phormidium* sp. imobilizada em suporte de alginato de para a remoção de corantes de indústria têxtil em efluente. Em todas as concentrações testadas os resultados obtidos variaram de 50 a 88% de remoção do corante no efluente (DÖNMEZ *et. al*, 2008).

A capacidade de remoção de metais tóxicos em efluentes foi demonstrada em diversos trabalhos, em especial com o uso da microalga *Spirulina*. Dal Magro e colaboradores (2013) obtiveram sucesso na remoção de Cromo VI em efluente utilizando a biomassa ativa da microalga *Spirulina patensis*. Foi apresentada uma capacidade de biossorção de Cromo (VI) máxima de 61,97% (DAL MAGRO *et al.*, 2013).

Hodaifa e colaboradores (2008) utilizaram água residual proveniente do enxágue em indústria de azeite de oliva para produção de biomassa de *Scenedesmus obliquus*. Os autores verificaram que a biomassa de lipídios foi dependente da porcentagem de água residual utilizada como meio de cultivo, alcançando os maiores teores de ácidos graxos mono-insaturados, poli-insaturados e ácidos graxos essenciais quando 100% da água do cultivo tratou-se da água de enxague industrial, rica em resíduos oleosos (HODAIFA *et al.*, 2008).

Mezzomo e colaboradores (2010) utilizaram cultivo de *Spirulina* no tratamento de efluente suíno, rico em fósforo e nitrogênio inorgânicos e verificaram a remoção dos componentes de fósforo do efluente e da Demanda Química de oxigênio (DQO), e ainda a possibilidade de produção de biomassa e seu uso na fabricação de ração animal (MEZZOMO *et al.*, 2010).

Yuan e colaboradores (2008) realizaram estudo na biodegradação de dois hidrocarbonetos aromáticos policíclicos típicos (HAPs), fenantreno e fluoranteno, utilizando diatomáceas enriquecidas a partir de um ecossistema aquático de mangue no estuário do rio Jiulong, na China. Foram utilizados cultivos das espécies *S. costatum* e *Nitzschia sp* de microalgas. Os resultados mostraram que as duas espécies de microalgas demonstraram maior capacidade de remover mais fenantreno do que fluoranteno (YUAN *et al.*, 2008).

A aplicação de microalgas na biorremediação e restauração de sistemas aquáticos favorece a fitoextração e a biodegradação de muitos poluentes orgânicos, no entanto ainda existem muitos compostos e espécies a serem estudados. Novas pesquisas e a engenharia genética podem contribuir para eficiência em processos de biorremediação, além do aumento da tolerância microalgal a estes poluentes. Ainda é necessário ampliar o estudo e controle de diferentes parâmetros de ecossistemas aquáticos como temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes objetivando o aumento da absorção, acumulação e biodegradação de diferentes poluentes por microalgas, tornando o processo de biorremediação e descontaminação de um ecossistema aquático mais eficaz (CHEKROUN *et al.*, 2014).

### 3.4- Emulsões

Na Indústria petroquímica as emulsões estão presentes em quase todas as etapas do processo, desde o reservatório até seu refino (KAKATI *et.al.*, 2014). As emulsões são uma mistura de líquidos constituídos de uma fase dispersa e outra contínua a qual é formada na presença de líquidos imiscíveis e um agente emulsificante acompanhado de agitação no sistema durante o processo de formação. As emulsões podem ser classificadas como óleo em água (O/A), onde o óleo é a fase dispersa e a água é a fase contínua; e água em óleo (A/O), onde a água é a fase dispersa e o óleo é a fase contínua (VENKATARAMANI e AICHELE, 2015, 2015; IIDA, 2007).

As emulsões podem ser definidas como uma dispersão, onde as fases são fluidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis. Neste sistema há uma fase dispersa finamente dividida em outra fase contínua, na presença de um surfactante, o agente emulsionante. Em uma emulsão do tipo óleo em água, este agente surfactante reúne propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas. As emulsões podem ser classificadas em relação ao tamanho das partículas dispersas, sendo mais estáveis quanto menores forem as mesmas (KILPATRICK, 2012).

Os derivados de petróleo, bem como o óleo cru podem formar inúmeras emulsões como óleo em água, sob condições específicas de pH e temperatura, sob a adição de formulações com surfactantes e emulsificantes combinados (IIDA, 2007).

As aplicações dos processos de emulsificação e demulsificação na indústria petroquímica são vastas, incluindo desde fluidos de perfuração até a biorremediação de mares e manguezais (KILPATRICK, 2012; IIDA, 2007).

Atualmente há uma demanda em estudos de emulsões de óleo cru principalmente pela descoberta de novas reservas de petróleo pesado, que contém uma maior quantidade de asfaltenos e formam emulsões mais facilmente (MESTRE, 2011). Estima-se que 40% da reserva brasileira de petróleo sejam de petróleo pesado (ANP).

As emulsões podem ser consideradas como termodinamicamente instáveis, mas possuindo um grau de estabilidade cinética. A propriedade física mais importante de uma emulsão é a sua estabilidade. Entende-se por estabilidade de uma emulsão a capacidade da mesma em manter sua homogeneidade durante um determinado período de tempo (KILPATRICK, 2012).

A formação de uma emulsão, bem como sua estabilidade, requer uma diminuição na energia livre do sistema, através da diminuição da energia interfacial entre dois líquidos imiscíveis. Os tensoativos ou emulsificantes, devido a sua estrutura

anfipática, podem adsorver nas diferentes interfaces, promovendo uma diminuição da tensão interfacial e conseqüentemente da energia livre do sistema (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

Os tensoativos são moléculas que apresentam afinidade por compostos orgânicos, superfícies das soluções com sólidos, líquidos ou gases e também pela água, podendo desta forma pertencer a dois meios imiscíveis. Estas características permitem o uso de tensoativos como conciliadores destas fases imiscíveis, formando emulsões, suspensões, espuma, microemulsões ou ainda propiciando umectação, formação de filmes líquidos e detergência de superfícies (DALTIM, 2011).

A porção hidrofóbica dos tensoativos geralmente é composta por cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas e em alguns casos por sistemas de anéis aromáticos. A porção hidrofílica pode ser aniônica, catiônica ou não-iônica. A classificação dos tensoativos ocorre em relação à porção hidrofílica da molécula (FLORENCE e ATTWOOD, 2011). A Figura 5 ilustra algumas moléculas de tensoativos e suas respectivas classificações.

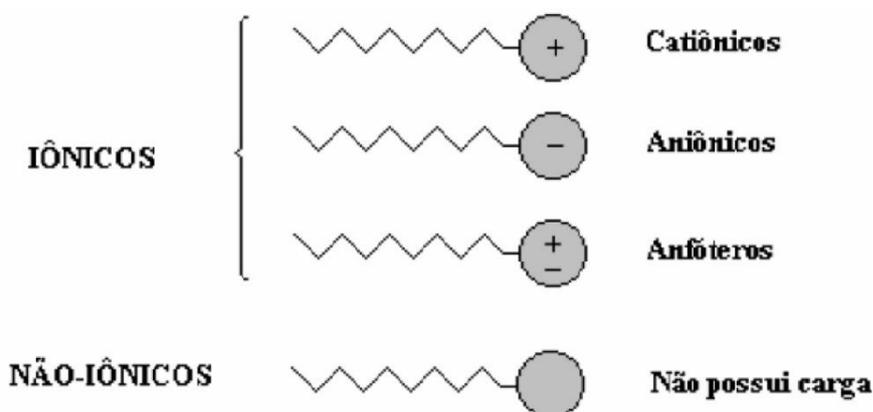


Figura 5: Classificação dos tensoativos. Fonte: Adaptado de SILVA, 2008.

Na superfície de um líquido as moléculas não estão completamente cercadas por moléculas como no seio da solução, logo estas moléculas da superfície não realizam as mesmas quantidades de interações que as moléculas presentes no seio da solução. Este desequilíbrio de forças acarreta a existência de uma força resultante de atração para dentro da solução exercida pelas moléculas do interior da solução sobre as moléculas superficiais, o que resulta na tendência espontânea da superfície em se contrair (CASTELLAN, 1972).

A tensão superficial é definida como a força que atua perpendicular a uma linha de 1 metro de comprimento ao longo da superfície em direção ao centro da solução (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

A contração da superfície é espontânea e acompanhada por um decréscimo na energia livre do sistema. Qualquer tentativa de expandir esta superfície contraída representa um acréscimo na energia livre do sistema (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

A energia livre da superfície de um líquido é definida como o trabalho necessário para aumentar  $1\text{m}^2$  na área da superfície. A Equação 1 expressa matematicamente a energia superficial (FLORENCE e ATTWOOD, 2011; CASTELLAN, 1972).

$$W = \gamma \Delta A \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

$W$  é o trabalho;

$\gamma$  é a tensão superficial;

$\Delta A$  é a variação na área da superfície.

Um desequilíbrio de forças semelhantes ao existente na superfície de um líquido ocorre na interface de dois líquidos imiscíveis promovendo uma tensão interfacial. As moléculas anfifílicas em uma solução tendem a se orientar entre os dois líquidos de tal modo que os grupos hidrofóbicos sejam removidos do meio aquoso. A mudança nas forças de atração e repulsão na interface promovida pela adição de um tensoativo permite o alcance de um estado de energia mínima na interface do sistema (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

Sem a adição de um tensoativo na interface do sistema há forças de repulsão entre os líquidos imiscíveis e as forças de atração entre as moléculas da água, bem como as forças de Van der Waals atraindo entre si os compostos orgânicos. A intrusão das moléculas de tensoativo na interface, impede o contato das moléculas de água com as moléculas hidrofóbicas eliminando assim as forças de repulsão o que conseqüentemente diminui a contração da interface (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

Há casos em que a redução da tensão interfacial entre dois líquidos pela adição de um tensoativo resulta em valores de tensão tão baixos, na ordem de  $10^{-3}\text{mN m}^{-1}$ , que ocorre um processo de emulsificação espontâneo (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

Ao acrescentar um tensoativo a um sistema com mais de uma fase, primeiramente o composto anfipático se acumula na região interfacial, reduzindo a tensão existente nesta, com o aumento da concentração do tensoativo este passa a se distribuir ao longo do sistema, mantendo o equilíbrio entre as moléculas presentes na interface ou na superfície e as moléculas do seio da solução (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

A adsorção dos tensoativos em solutos hidrofóbicos como o carbono representa uma maneira de reduzir o contato entre estes grupos e as moléculas de água contribuindo para um estado de mínima energia. Como consequência pode ser formada uma estrutura de agregados em solução, onde as moléculas constituintes estão geralmente arranjadas em uma estrutura esferoidal com os núcleos hidrofóbicos protegidos da água por um manto de grupos hidrofílicos. Esta estrutura é denominada micela (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

As emulsões podem ser explicadas em termos de formação destes agregados. As micelas formadas em uma emulsão são termodinamicamente instáveis, podendo ser quebradas, de acordo com a conveniência pela adição de composto que desequilibre as forças de interação intermoleculares existentes (MESTRE, 2011).

A adição de tensoativos a um sistema líquido bifásico é acompanhada por uma diminuição na tensão interfacial linear até a saturação da concentração de tensoativos na interface do sistema. A concentração na qual um tensoativo não promove mais a diminuição da tensão interfacial é denominada concentração micelar crítica (CMC) (MESTRE, 2011).

Ao atingir a CMC as moléculas anfifílicas tendem a proteger sua porção hidrofóbica do contato com as moléculas de água, formando assim as micelas (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

A Figura 6 indica a variação da tensão superficial em meio aquoso com a adição de tensoativo ao meio (MESTRE, 2011).

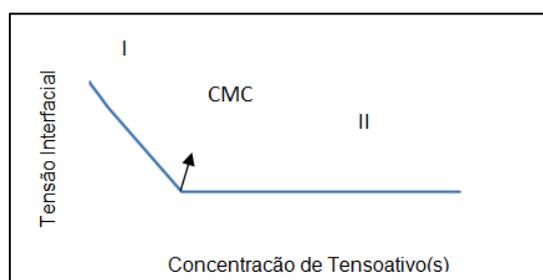


Figura 6: Variação da tensão superficial x Concentração de tensoativo. Adaptado de MESTRE, 2011.

Na Figura 6 observa-se uma diminuição da tensão interfacial com o aumento da concentração de tensoativo, na etapa I, a grande maioria das moléculas de tensoativo adsorvem-se na interface óleo-água, e a concentração superficial cresce rapidamente. A partir do valor da concentração micelar crítica (CMC) a concentração de tensoativos na interface está saturada e as moléculas de tensoativo adicionadas devem solubilizar-se na fase aquosa, para posterior formação das estruturas micelares, etapa II. Após atingida a CMC o valor da tensão interfacial se mantém constante em relação a novas adições do tensoativo (FLORENCE e ATTWOOD, 2011; MESTRE, 2011).

Após a CMC, qualquer molécula suplente de tensoativo encontra-se acima do seu limite de saturação na fase aquosa, e a sua solubilização ocorre sobre a forma de micelas. A CMC indica a menor concentração de tensoativo necessária para redução e estabilização da tensão superficial e interfacial de uma emulsão (MESTRE, 2011).

Os tensoativos apresentam propriedades de superfície e interfaciais, diretamente relacionadas à sua capacidade emulsionante, fazendo com que a escolha do tensoativo ou da mistura de tensoativos deva ser adequada a cada emulsão (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

As propriedades físico-químicas que influenciam a estabilidade das emulsões são a tensão superficial, as forças eletrostáticas, repulsão estérica, efeito Marangoni-Gibbs e estabilização por filme delgado. Uma baixa tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis facilita a formação de emulsões, pois facilita a criação e a estabilização de grandes áreas interfaciais (IIDA, 2007).

As forças eletrostáticas afetam a floculação e são mais importantes na estabilização de emulsões óleo-em-água. Geralmente as substâncias adquirem carga elétrica quando entram em contato com um meio polar, como a água. A origem dessa carga pode ser ionização dos tensoativos ou a adsorção de tensoativos e partículas sólidas carregadas. Essa carga elétrica leva a formação da dupla-camada elétrica que consiste em uma camada interna com íons de carga oposta ao da gotícula e uma camada externa ou difusa, na qual os íons estão distribuídos de acordo com a influência das forças elétricas e do movimento térmico. A dupla-camada elétrica, quando formada, previne a floculação pela repulsão dos íons adsorvidos (SCHRAMM, 1992).

As principais propriedades das emulsões são: condutividade elétrica, tamanho de gotas, viscosidade, reologia e estabilidade (SCHRAMM, 1992).

Em relação ao comportamento reológico das emulsões, em baixas a moderadas concentrações da fase dispersa, as mesmas apresentam um comportamento newtoniano. Para altas concentrações as emulsões apresentam comportamento de fluidos pseudo-plásticos (MAIA *et. al.*, 2012).

A escolha do surfactante como agente emulsionante, depende das características e tamanho da cadeia carbônica do óleo que será emulsionado em água, é importante verificar a relação entre os grupos hidrofílicos e lipofílicos da molécula do tensoativo, chamada de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB). Existe na atualidade uma gama de ativos com funções emulsionantes, surfactantes aniônicos, catiônicos e não iônicos, que podem ser álcoois, aminas, ésteres e amidas etoxilados, geralmente derivados de um polímero de moléculas de óxido de eteno, ou até biossurfactantes (FLORENCE e ATTWOOD, 2011).

Os principais fatores na escolha de uma solução emulsionante são o valor de HLB do tensoativo ou da mistura de tensoativos e sua concentração. Além destes, deve-se considerar a influência da estrutura química dos ativos escolhidos, e em alguns casos da presença de co-emulsionantes como álcoois e óleos que facilitam a solubilização dos tensoativos e dos óleos (MESTRE, 2011). A tabela 2 apresenta valores típicos de HLB e suas aplicações.

Tabela 2: Valores de HLB e suas aplicações. Fonte: Adaptado de MESTRE,2011.

<b>HLB</b>	<b>APLICAÇÕES</b>
1-3	Agente antiespumantes
3-6	Agentes emulsificantes (Emulsão A/O)
7-9	Agentes de molhabilidade
8-18	Agentes emulsificantes (Emulsão O/A)
13-16	Detergentes
16-18	Agentes Solubilizantes

Vale ressaltar que o valor do HLB não determina a eficiência do emulsificante e a escolha do tensoativo ou da mistura de tensoativos e seus respectivos valores de HLB deve ser feita experimentalmente (MESTRE, 2011).

Nos tensoativos iônicos a interação com as moléculas de água é forte e ocorre tanto nos tensoativos catiônicos quanto aniônicos devido à forte atração eletrostática

entre o pólo carregado da molécula do tensoativo e as respectivas cargas parciais dos átomos de hidrogênio e oxigênio (DALTIM, 2011).

Nos tensoativos não iônicos, a polaridade da molécula geralmente é devida à presença dos grupos etoxilados que concentram cargas parciais negativas nos átomos de oxigênio ao longo da molécula. A solubilidade em água, nestes tensoativos é mais fraca, uma vez que ocorre devido a cargas dispersas. Quanto maior o número médio de mols de oxido de etileno (EO) na molécula maior a solubilidade em água (DALTIM, 2011).

Em uma emulsão óleo em água os tensoativos recobrem a superfície das gotículas de óleo. Caso este tensoativo seja aniônico as gotículas de óleo adquirem superfícies carregadas negativamente, estas cargas negativas atraem as moléculas de água e contraíons de carga positiva presentes na solução aquosa, gerando uma dupla camada elétrica em volta de cada micela. Como as gotículas vizinhas vão apresentar carga eletrostática de mesmo sinal nas suas superfícies ocorrerá um efeito de repulsão entre as mesmas, impedindo a aproximação de gotículas de óleo e consequentemente reduzindo a probabilidade de coalescência. A emulsão neste caso é estabilizada por efeito eletrostático (DALTIM, 2011).

Em emulsões com o uso de tensoativos não iônicos as gotículas de óleo recobertas por tensoativos não apresentam dupla camada elétrica, pois estes tensoativos não possuem carga verdadeira. Como estes tensoativos apresentam partes polares muito longas a estabilização das emulsões ocorre por impedimento estérico (DALTIM, 2011).

Geralmente a melhor estabilização de uma emulsão se dá pela combinação dos dois efeitos, eletrostáticos e estéricos, sendo necessária a mistura de tensoativos iônicos e não iônicos. A escolha destes tensoativos depende da estrutura química do óleo, da estrutura dos tensoativos, da afinidade das partes polar e apolar pela água e pelo óleo (HLB) (DALTIM, 2011).

O uso de tensoativos apolar com estrutura ramificada reduz a mobilidade das gotículas formadas aumentando o efeito de impedimento estérico. A estrutura do tensoativo usado deve evitar a coalescência das gotículas de óleo e a consequente quebra da emulsão (DALTIM, 2011).

A quebra de uma emulsão é caracterizada pela perda irreparável da estrutura química da mistura assim como de suas propriedades físico-químicas. Diferentes mecanismos de quebra de emulsão podem ser empregados dependendo das condições do escoamento, propriedades dos fluidos, concentração de surfactante,

procedimento de formação da emulsão, entre outros, podendo ser favorecida a ocorrência de um ou mais mecanismos (KARCHER, 2008).

A quebra de uma emulsão pode ocorrer por diversos mecanismos, por ação térmica, mecânica, eletrostática e química. No que se referem aos mecanismos químicos, estes ocorrem graças à adição de um desemulsificante. Os desemulsificantes são constituídos de poliglicóis e poliésteres glicóis, aminas, álcoois, resinas e nonilfenóis etoxilados, álcoois polihídricos e sais de ácidos sulfônicos que apresentem propriedades interfaciais e se adsorvam na interface água-óleo mudando as suas propriedades físico-químicas e favorecendo assim a coalescência entre as gotas de água (LOPES *et. al.*, 2003; KOKAL, 2005).

A desestabilização de uma emulsão ocorre em três etapas: floculação, sedimentação e coalescência (GRAHAM *et. al.*, 2008). Entre as propriedades que são procuradas nos desemulsificantes destacam-se as altas velocidades de adsorção na interface água-óleo, deslocamento dos emulsificantes naturais que estabilizam as emulsões e a formação de películas finas e frágeis na interface água-óleo (WU *et. al.*, 2003).

Os desemulsificantes, aumentam a tensão nas interfaces localizadas entre as duas gotas, criando um gradiente de tensões entre esta região e as demais partes da interface da gota. Assim, favorecendo a remoção de mais emulsificantes na região entre as gotas, seguido da adsorção de desemulsificantes. A película rígida, inicialmente formada pelos emulsificantes é substituída por um filme fino e frágil de desemulsificantes de fácil ruptura. A drenagem da fase contínua entre as gotas produz a diminuição da concentração de espécies tensoativas localizadas nas interfaces. Estes espaços são ocupados pelas moléculas de desemulsificantes (MESTRE, 2011).

Entre os demulsificantes naturais a quitosana recebe destaque, trata-se de um biopolímero abundante na natureza, de baixo custo e atóxico. Este polímero possui grande área superficial e solubilidade em água dependente da escala de pH (CRINI *et. al.*, 2009).

A quitosana é um polímero obtido pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural extraído do exoesqueleto de crustáceos, insetos etc., composto pelas unidades monoméricas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose (LARANJEIRA e FAVERE, 2009). A Figura 7 ilustra as estruturas da quitina e quitosana.

O uso de quitosana em diversas áreas está diretamente relacionado ao peso molecular e ao grau de desacetilação do polímero, a sua aplicação é crescente no mundo em especial nos setores de materiais, indústria alimentícia e farmacêutica e agricultura. O elevado peso molecular da quitosana limita sua solubilidade em água, sendo seu grau de desacetilação extremamente importante para sua solubilidade aquosa (WESKA *et. al.*, 2007).

A quitosana é solúvel em soluções aquosas ácidas diluídas devido a protonação de seus grupamentos amina. Neste experimento o uso de quitosana como demulsificante se deu através da solubilidade deste biopolímero em água em pH ácido e sua insolubilidade em meios aquosos neutros ou básicos, esta propriedade, aliada à sua grande área superficial e suas interações químicas com moléculas orgânicas, permitem seu uso na separação de fases de uma emulsão do tipo óleo em água (CRINI *et. al.*, 2009).

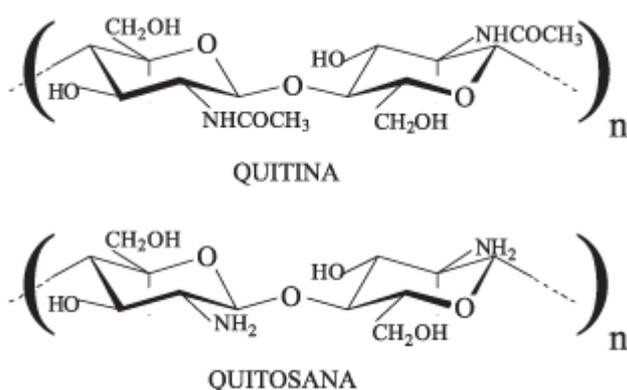


Figura 7: Representações das estruturas primárias de quitina e quitosana onde n é o grau de polimerização. Fonte: BATTISTI e CAMPANA-FILHO, 2008.

### 3.5-Métodos analíticos utilizados

#### 3.5.1- ESPECTROSCOPIA RAMAN

O estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria é realizado nas técnicas de espectroscopia, permitindo a obtenção de informações sobre a estrutura molecular e as ligações químicas. Nas moléculas, a região espectral onde as transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. A energia total de uma molécula é a soma das energias eletrônica, vibracional e rotacional, sendo a energia eletrônica muito maior que a vibracional e esta, muito maior do que a rotacional. Entre as diversas técnicas instrumentais que permitem a determinação de estruturas moleculares, níveis energéticos e ligações químicas, pode-se citar a espectroscopia de Infravermelho e a espectroscopia Raman (SALA, 2008).

As energias eletrônicas aparecem nas regiões do ultravioleta e da luz visível, as vibracionais aparecem na região do infravermelho e as rotacionais aparecem na região das microondas. Ao comparar os níveis energéticos de uma molécula observa-se valores bem diferentes, possibilitando que cada espectro possa ser estudado separadamente. A interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos atômicos origina os espectros vibracionais no infravermelho e o espalhamento Raman (GUIMARÃES, 2011).

O espalhamento Raman pode ser definido como o espalhamento inelástico da radiação eletromagnética que interage com as moléculas. Fisicamente os dois processos Raman e Infravermelho são diferentes. O infravermelho envolve uma ressonância entre a diferença de níveis de energia da molécula e a radiação eletromagnética. No Raman uma radiação monocromática, geralmente no visível, interage com a molécula e é espalhada com frequência ligeiramente modificada, acarretando uma variação na frequência que corresponde à diferença de energia entre dois estados vibracionais (SALA,2008).

Ambas as técnicas apresentam os mesmos valores de frequências vibracionais, mas os mecanismos envolvidos são distintos. No infravermelho é necessário haver uma variação no momento dipolar da molécula durante a vibração, enquanto na atividade Raman o momento dipolo considerado é o induzido pela radiação eletromagnética (SALA,2008).

Ao iluminar um grupo de moléculas com luz monocromática, cujo comprimento de onda não permite sua absorção, a maior parte da luz incidente é transmitida diretamente através da amostra com espalhamento elástico, Rayleigh, outra parte é espalhada em frequências menores ou maiores que da radiação original chamado espalhamento Raman (GUIMARÃES, 2011). A Figura 8 ilustra o mecanismo de interação da luz incidente em uma amostra.

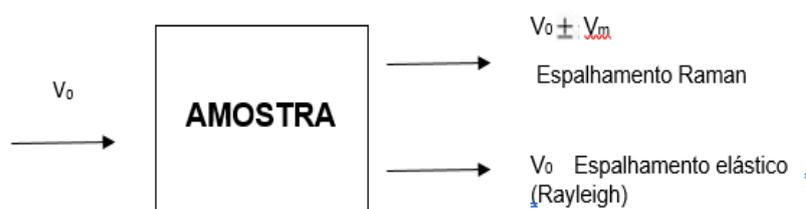


Figura 8: Mecanismo de interação da Luz. Fonte: Adaptado de GUIMARÃES, 2011.

Após a incidência da luz os elétrons distribuídos em torno de uma ligação na molécula sofrem uma distorção momentânea seguida da reemissão da radiação enquanto a ligação química retorna ao seu estado normal. Esta distorção envolve o espalhamento Raman. Enquanto distorcida, a molécula fica temporariamente polarizada e, de acordo com a mecânica quântica, uma vibração é ativa no espectro Raman e modifica o posicionamento dos núcleos atômicos envolvidos. A polarizabilidade é a facilidade da molécula em sofrer distorção quando submetida a um campo elétrico, de modo que os núcleos são atraídos pelo pólo negativo e os elétrons são atraídos pelo pólo positivo (GUIMARÃES, 2011).

O espalhamento Raman pode ser de dois tipos: Stokes e anti-Stokes. No espalhamento Raman Stokes, o fóton colide com a molécula, passando do estado fundamental para o estado virtual e, decai em seguida para um estado vibracional de energia. O fóton espalhado terá energia menor que a radiação incidente. No espalhamento Raman anti-Stokes o fóton encontra a molécula já em um estado excitado e a leva para a uma energia bem mais alta, quando chega ao estado virtual, a molécula decai para o estado fundamental. O fóton espalhado terá energia maior que a radiação incidente, conforme ilustra a Figura 9 (GUIMARÃES, 2011).

No espalhamento elástico, Rayleigh, as moléculas estão num estado denominado fundamental e sofrem colisão com o fóton de energia, as moléculas então passam

para um estado virtual voltando em seguida para o estado fundamental e o fóton é espalhado sem alteração de energia (GUIMARÃES, 2011).

A diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que átomos presentes nas moléculas estudadas estão vibrando. Os espectros Raman relacionam a intensidade do sinal obtido com as frequências energéticas onde acontece cada vibração, tornando possível seu uso na elucidação da estrutura molecular e dinâmica da amostra (FARIA, 2011).

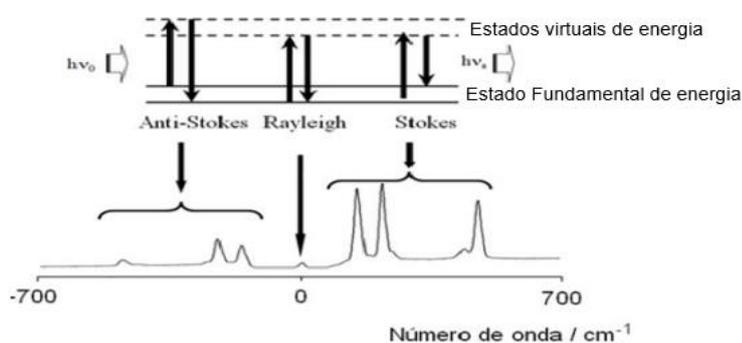


Figura 9: Mecanismo de espalhamento Rayleigh e Raman. Fonte: Adaptado de FARIA, 2011.

Geralmente as espécies a serem analisadas são complexas e por isto não há somente um tipo de vibração, a radiação espalhada inelasticamente é constituída por um número muito grande de diferentes frequências ou componentes espectrais as quais precisam ser separadas e ter sua intensidade medida. O espectro Raman traz um gráfico que representa a intensidade da radiação espalhada em função de sua energia dada em número de onda. Cada espécie química, seja um pigmento, corante, solvente, mineral, entre outros fornece um espectro que é como sua impressão digital permitindo sua identificação (FARIA, 2011).

A intensidade do sinal Raman depende tanto da intensidade da radiação incidente como do tipo de amostras a serem analisadas. As frequências vibracionais obtidas dependem de três fatores especificamente: as massas atômicas da amostra, os arranjos geométricos moleculares e as forças entre estes enlaces químicos. A interpretação de espectros vibracionais e elucidação da estrutura molecular pode ser realizada por duas metodologias. A primeira utiliza as frequências características dos grupos funcionais, a segunda faz uso da teoria de grupos aliada a métodos computacionais para determinar as frequências das vibrações moleculares (PETER, 2011).

As vibrações dos grupos funcionais das moléculas são mecanicamente independentes das demais partes que compõem a molécula, o que faz com que os mesmos grupos funcionais apresentem vibrações nas mesmas frequências ou com pequenos deslocamentos em moléculas distintas. Esta característica torna os grupos funcionais facilmente identificáveis nos espectros Raman e infravermelho (PETER, 2011). A Figura 10 apresenta as regiões onde se encontram alguns grupos funcionais característicos.

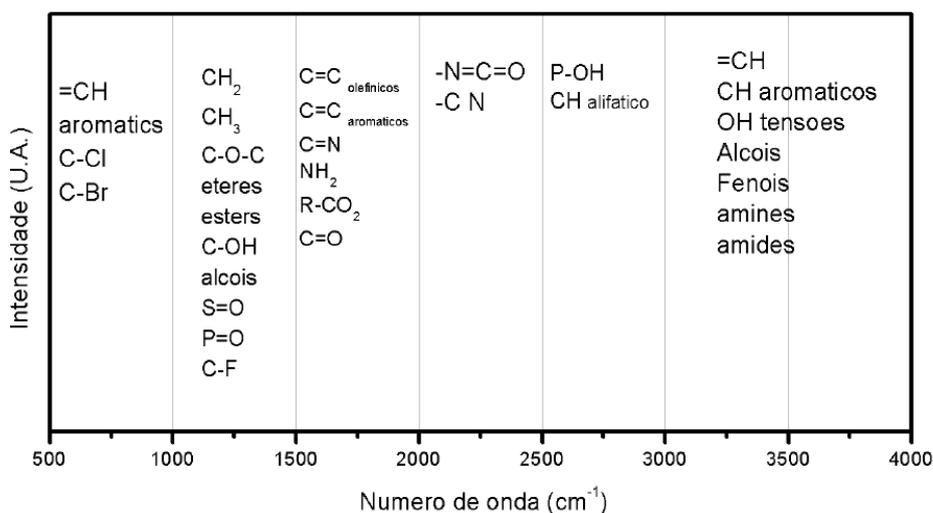


Figura 10: Regiões espectrais de alguns grupos funcionais característicos. Fonte: Adaptada de PETER, 2011.

A espectroscopia Raman não requer quase nenhum preparo da amostra e utiliza porções ínfimas da amostra (PETER, 2011). No trabalho com microalgas e avaliações destas de rotina estas vantagens são de grande importância, pois a retirada de grandes quantidades de amostra pode comprometer o cultivo e o tratamento da amostra necessário a análises cromatográficas é muito laborioso e dispendioso em termos de tempo.

As grandes vantagens que a espectroscopia Raman em comparação a outras técnicas instrumentais, principalmente em relação ao pré tratamento de amostras, vem ampliando seu uso em amostras biológicas. Em relação a estudos publicados com microalgas, é possível citar trabalhos que acompanham a variação dos teores de lipídeos e pigmentos em diferentes condições. (VILLAMIZAR, 2013)

Pilat e colaboradores (2012) utilizaram a espectroscopia Raman como um método simples para quantificar o  $\beta$ -caroteno produzido pela espécie de microalga *Trachydiscus minutus*. No experimento os autores utilizaram um gradiente de luz

intensa para induzir um incremento na produção de  $\beta$ -caroteno na célula, e acompanharam este incremento realizando as medidas de Raman *in vivo*, para tanto as células foram imobilizadas em uma solução de agarosa, e as medidas foram realizadas com um tempo de integração de 10 segundos. O comprimento de onda do laser utilizado foi de 785nm. A Tabela 3 apresenta os sinais Raman levados considerados neste estudo (PILAT *et. al.*, 2012).

Tabela 3: Sinais Raman do  $\beta$ -caroteno e lipídeos considerados por Pilat e colaboradores (2012).

Grupos	Sinal Raman (cm <sup>-1</sup> )
$\beta$ -caroteno C-C tensão	1157
$\beta$ -caroteno C=C tensão	1525
Vibração tipo tesoura CH <sub>2</sub> dos lipídeos	1445
Tensão C-C dos lipídeos	1656

O estudo concluiu que a concentração de  $\beta$ -caroteno nas células foi estimulada pela exposição à luz. Os resultados obtidos utilizando espectroscopia Raman foram comparados utilizando HPLC para análise de pigmentos e GC-MS para análise dos ácidos graxos (PILAT *et. al.*, 2012).

Villamizar (2013) utilizou a espectroscopia Raman para caracterizar carotenóides e lipídeos em microalgas das espécies *Nannochloropsis sp.* e *Haematococcus pluvialis*. Foi utilizado laser com comprimento de onda de 532nm. Os sinais Raman levados em consideração são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Sinais Raman do  $\beta$ -caroteno e lipídeos considerados por Villamizar (2013).

Grupos	Sinal Raman (cm <sup>-1</sup> )
$\beta$ -caroteno C-C tensão	1157
$\beta$ -caroteno C=C tensão	1525
Vibração tipo tesoura CH <sub>2</sub> dos lipídeos	1445
Tensão C-C dos lipídeos	1656
Tensão C-H dos lipídeos	2845-3107

### 3.5.2- CROMATOGRAFIA GASOSA

A cromatografia gasosa é uma técnica consolidada e utilizada em larga escala em laboratórios de pesquisa e indústrias. A técnica permite separar, analisar e quantificar gases ou substâncias voláteis. A separação das moléculas está baseada na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel gasosa (COLLINS *et. al.*, 2011).

Trata-se de uma técnica com poder de resolução excelente, permitindo a análise de dezenas de substâncias em uma mesma amostra. A técnica consiste em uma eluição. Uma corrente de gás passa continuamente pela coluna e quando a amostra vaporizada é introduzida nessa corrente de gás é arrastada através da coluna. As substâncias presentes na amostra terão diferentes velocidades ao longo da coluna, a depender de suas massas moleculares e características químicas, sendo então separadas. Em seguida chegam ao detector onde é gerado um sinal para sistema de registro (COLLINS *et. al.*, 2011).

Na cromatografia a fase móvel é arrastada através de uma fase estacionária colocada em uma coluna ou em uma superfície sólida. Os componentes da amostra são distribuídos entre as fases móvel e estacionária. Os compostos mais fortemente retidos na fase estacionária eluem de modo mais lento no fluxo da fase móvel. O contrário ocorre com os compostos que se ligam de modo mais fraco na fase estacionária. As diferenças de mobilidade permitem a separação dos componentes da amostra em bandas que podem ser analisadas qualitativa e quantitativamente (MOURA, 2009).

A separação cromatográfica é influenciada por diversos fatores químicos e físico-químicos. Estes dependem da natureza química dos compostos a serem separadas, da composição e fluxo da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária (MOURA, 2009).

Desde o final da década de 60 a cromatografia vem sendo utilizada para análise de HPAs. A literatura mostra trabalhos com cromatografia a gás com detecção por ionização de chama (CG/DIC) ou detecção por espectrometria de massas (CG/MS) (MOURA, 2009). Cristale e colaboradores (2008) analisaram a presença de 17 HPAs em material particulado atmosférico através de cromatografia a gás com detector por espectrometria de massas (CG/MS) com sucesso (CRISTALE *et. al.*, 2008). Utilizando, também CG/MS Gebara e colaboradores (2013) analisaram a presença de

16 HPAs em água subterrânea de postos de revenda de combustíveis (GEBARA *et al.*, 2013).

O espectrômetro de massas é um instrumento sofisticado e atua como um detector seletivo e universal. É constituído por três partes: fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons por aquisição (COLLINS *et al.*, 2011).

A estrutura das moléculas de HPAs, bem como suas propriedades físicas e químicas permitem que estas moléculas possam ser analisadas tanto por cromatografia gasosa quanto por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Estas técnicas permitem a análise destes compostos com inúmeras finalidades, incluindo o monitoramento ambiental onde muitas vezes são realizados ensaios de traços, o que torna fundamental o uso de métodos analíticos com baixos limites de detecção. O detector de espectrometria de massas tem sido muito utilizado na análise de HPAs em matrizes ambientais, por ser um detector que além de apresentar baixos limites de detecção, oferece informação estrutural dos compostos (CRISTALE *et al.*, 2008). A Figura 11 ilustra um esquema de CG/MS.

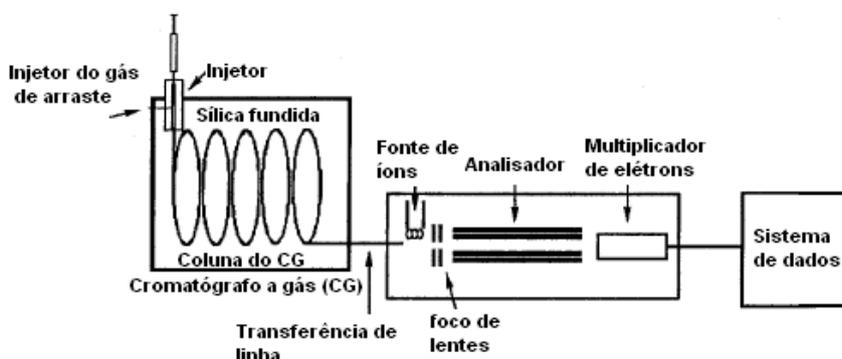


Figura 11: Esquema de CG/MS. Fonte: Adaptado de MOURA, 2009.

A espectrometria de massas possui grande potencial para fornecer informações da massa molar, bem como sobre a estrutura do analito. A base da espectrometria de massas é a produção de íons. Estes são subsequentemente separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ), e detectados. O resultado é um gráfico de abundância relativa dos íons produzidos em função da massa/carga ( $m/z$ ). Uma quantidade de dados enorme é gerada pelo espectrômetro de massas, tornando necessário o uso e aquisição de um bom banco de dados e de programas computacionais altamente avançados para o processamento de dados (MOURA, 2009).

Os ensaios cromatográficos requerem um pré-tratamento da amostra, o que representa a necessidade de realizar um procedimento de extração que tem por finalidade retirar os analitos da matriz. A extração é realizada utilizando adequadamente solventes, gases ou fluido supercrítico, extraindo os compostos de interesse com o mínimo de possíveis interferentes. A extração ideal deve apresentar alta seletividade, alto índice de recuperação, mínimo uso de solventes e compatibilidade com a matriz (MOURA, 2009).

Na determinação de HPAs em matriz líquida aquosa diversos procedimentos de extração vêm sendo utilizados como: extração líquido-líquido, extração em fase sólida, extração sortiva em barra de agitação, extração com solvente assistida por membranas e micro extração (GEBARA *et al.*, 2013).

Não há uma técnica de extração que reúna todas as características ideais, tornando a escolha da técnica de extração individual, dependente da matriz da amostra e da tecnologia disponível no laboratório. Com base nas possibilidades é escolhida a técnica que reúna as melhores características de seletividade, índice de recuperação, compatibilidade com a matriz, baixa toxidez do solvente e menor uso de solvente (MOURA, 2009).

Para extração em amostras de solo, água e sedimentos a eficiência depende principalmente do solvente e da matriz da amostra. A escolha dos solventes é determinada por muitos fatores tais como o custo, qualidade espectral, eficiência da extração, toxicidade e disponibilidade (MOURA, 2009).

A extração líquido-líquido é uma técnica simples, que vem sendo utilizada ao longo dos anos em todo o mundo. Nesta a separação de um componente de uma solução líquida homogênea ocorre pela adição de um solvente líquido, insolúvel ou com baixíssima solubilidade na matriz ou em um dos componentes e com grande solubilidade nos componentes a serem extraídos. O soluto ou analito difunde-se no solvente com velocidade característica até atingir as concentrações de equilíbrio em cada uma das fases formadas. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre duas fases e miscibilidade parcial dos líquidos. A extração líquido-líquido pode ter sua eficiência ampliada pelo uso de ultrassom, onde o uso de vibração favorece a transferência do analito da amostra para o solvente (MOURA, 2009)

## **4- MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados nos experimentos realizados com a finalidade em satisfazer os objetivos propostos. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioenergia e Catálise (LABEC) na Escola Politécnica e no laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica(LAPO/LAMUME) do Instituto de Física, ambos na Universidade Federal da Bahia.

### **4.1- Preparo das emulsões**

Para o preparo da emulsão óleo em água foi utilizado óleo residual pesado (óleo BPF), fornecido pela Petrobras com origem nos processos da refinaria Landulpho Alves (RLAM). Trata-se de uma mistura de hidrocarbonetos com uma ampla faixa de pesos moleculares, números de carbonos (C7 a C50) e pontos de ebulição (121 a 600°C), conforme ficha de informação de segurança de produto químico, FISPQ BR0304.

A escolha dos tensoativos levou em consideração múltiplos fatores: Custo financeiro, disponibilidade, estrutura química, toxidez, biodegradabilidade, fonte de Carbono e valor do HLB.

Por se tratar do processo de emulsificação de resíduo petroquímico, sabendo que este ocorre em grandes volumes e que o sucesso da aplicação de técnicas de tratamento está condicionado a sua viabilidade financeira foram selecionados ativos de fácil acesso no Brasil e com baixo custo.

Foram priorizados tensoativos produzidos a partir de fontes de carbono renováveis, com baixa toxidez e alta biodegradabilidade. Foi necessário selecionar um tensoativo aniônico, com alto valor de HLB, objetivando a alta solubilidade da fase aquosa e um tensoativo não ionico com baixo valor de HLB para solubilidade da fase oleosa. Ainda foi utilizado um tensoativo não iônico etoxilado, com estrutura carbônica ramificada com o objetivo de aumentar a estabilidade da emulsão por efeito de impedimento estérico evitando a possível coalescência das gotículas de óleo.

Com base nos critérios descritos para o preparo da solução emulsionante foram utilizados como reagentes: solução aquosa líquida de Lauril éter sulfato de sódio 27% (Less), Dietanolamida de ácido graxo de coco 80% (AMIDA 80), Monolaurato de sorbitan etoxilado 20EO (TWEEN 20).

O Lauril éter sulfato de sódio (Less) é um tensoativo aniônico, com alto poder de detergência, alta solubilidade em água e proveniente do álcool laurílico natural, é completamente biodegradável. Possui fórmula química  $C_{12}H_{26}O(CH_2CH_2O)_2SO_3^-Na^+$ . É comercializado com concentração de 27% (m/m) em solução aquosa. O valor de seu HLB é 43,9(OXITENO).

A Dietanolamida de ácido graxo de coco 80% (AMIDA 80), possui HLB no valor de 9,46 e é empregada em formulações com as finalidades: espessantes, estabilizantes de espuma, sobrenegordurantes e solubilizantes de essências e óleos. O grupamento amida de sua molécula possui forte interação com os íons sulfato presentes na molécula de Less, possibilitando, com o uso da combinação destes dois tensoativos um aumento na solubilidade de óleos na fase aquosa e a formação de espuma mais estável e densa(OXITENO).

O Monolaurato de sorbitan etoxilado 20EO, bem como a AMIDA 80, é um tensoativo não iônico produzido a partir de fontes de carbono 100% renováveis e de fácil biodegradabilidade, é muito utilizado em formulações como agente emulsionante. Possui HLB no valor de 16,7 (OXITENO).

As Figuras 12 e 13 ilustram as estruturas das moléculas de Amida 80 e Tween 20EO.

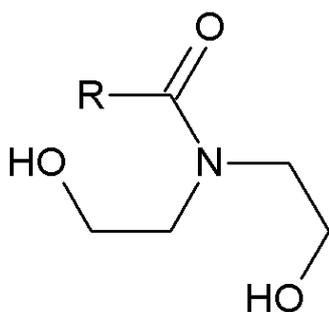


Figura 12: Estrutura da molécula de Dietanolamida de ácido graxo de coco, onde R representa a cadeia carbônica do ácido graxo de origem.

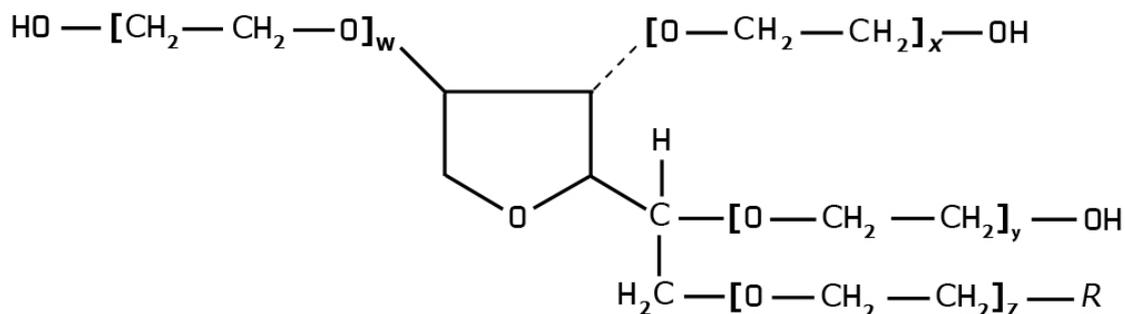


Figura 13: Estrutura da molécula de Monolaurato de sorbitan etoxilado, onde R = grupo alquila e  $X + Y + Z + W = n^{\circ}$  médio de moles de óxido de etileno (E0), neste caso a soma de X, Y, Z e W é 20. Fonte: Adaptado do boletim técnico Alkest, OXITENO.

A escolha dos tensoativos deste trabalho visou garantir boas propriedades de detergência, estabilidade da emulsão formada e boa qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão. A combinação de tensoativos teve como objetivo o aumento da estabilidade da emulsão por efeitos eletrostáticos e estéricos. Como pode ser visto na estrutura da molécula de Tween 20 E0, esta possui estrutura ramificada o que potencializa a estabilização da emulsão por efeito estérico (DALVIN, 2011).

Com objetivo de obter uma solução emulsionante, com baixas concentrações de tensoativos, boa estabilidade, baixa aderência de óleo às paredes e boa qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão foi realizado um planejamento estatístico, com auxílio do *software Statistica*, testando a eficiência de soluções emulsionantes com a combinação dos três tensoativos com diferentes concentrações totais de tensoativos e valores de HLB.

O HLB das misturas de tensoativos utilizados foi calculado através da soma dos valores correspondentes aos do HLB dos seus constituintes e de acordo com as respectivas concentrações, conforme a Equação 2 (FLORENCE e ATTWOOD, 2011). Os valores de HLB dos surfactantes foram fornecidos nas fichas técnicas dos respectivos reagentes pela empresa Oxiteno. A Equação 2 ilustra o cálculo do HLB da mistura de tensoativos.

$$HLB_{mistura} = f_1HLB_1 + f_2HLB_2 + \dots + f_nHLB_n \quad \text{Eq. 2}$$

Onde f é o percentual (m/m) do tensoativo dividido pela soma do percentual total de tensoativos.

Foi realizado um planejamento fatorial em dois níveis com duas variáveis independentes com triplicata no ponto central. Foram utilizadas como variáveis

independentes a concentração de tensoativos e os valores de HLB. Após a realização dos experimentos foi realizada uma análise de variância ANOVA. Foi utilizado o método dos mínimos quadrados para verificar a significância com intervalo de confiança de 95%.

A tabela 5 mostra os pontos experimentais do planejamento estatístico realizado.

Tabela 5: Planejamento estatístico com variáveis independentes HLB e concentração total de tensoativos para o preparo da solução emulsionante.

Experimento	HLB	Concentração total (%)
1	16,000	0,050
2	16,000	0,180
3	22,500	0,180
4	22,500	0,050
5	19,250	0,115
6	19,250	0,115
7	19,250	0,115

Após verificar as faixas de valores ótimos para a concentração total de tensoativos e para os valores de HLB foi realizado um novo experimento para elaboração da formulação final, priorizando o uso de ativos nas menores faixas de concentração obtidas.

Os testes de emulsificação foram realizados com 20% (v/v) do óleo e 80% (v/v) de solução aquosa contendo 2% em massa da mistura de emulsionantes. Os testes foram realizados com o sistema na temperatura de 60°C em provetas de 50mL, com ligeira agitação manual seguida de agitação em Vortex, IKA-Genius 3, por período de tempo de 1 (um) minuto.

A quebra das emulsões foi realizada com a adição de solução de quitosana 1% em meio ácido (HCl 1,0M), até concentração final de quitosana de 800ppm, e após a completa homogeneização foi adicionada solução de NaOH 0,5M até a neutralização do sistema para pH na faixa de 7,1 a 7,4. Também foi observada a quebra das emulsões sem adição de nenhum componente após período de tempo médio de 24 horas.

A quitosana utilizada foi obtida da empresa Polymar, com grau de pureza para uso comercial e grau de acetilação GD, calculado em 74,27%. Foi medido o grau de desacetilação do produto através de técnica potenciométrica, utilizando solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1M como solução titulante e a quitosana diluída em solução de HCl 0,1M. Conforme metodologia adaptada de Santos e colaboradores (2011). O grau de desacetilação (GD) foi calculado, a partir da Equação 3 (SANTOS et. al., 2011).

$$\%GD = (M(V_2 - V_1) \cdot 161 \cdot 100) / W \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

- GD é o grau médio de desacetilação;
- $V_1$  é o volume de base usado na neutralização de HCl em excesso, expresso em mL;
- $V_2$  é o volume de NaOH correspondente à neutralização dos grupos amino presentes no polímero, expresso em mL;
- M é a concentração da solução de NaOH;
- W é a massa da quitosana em mg;
- E O valor 161 corresponde à massa equivalente a um monômero do polímero.

A partir de ambas volumetrias potenciométricas foram traçadas as curvas de titulação, e a partir destas foi utilizado o método da primeira e da segunda derivadas para encontrar as inflexões correspondentes a  $V_1$  e  $V_2$ . As curvas obtidas encontram-se no apêndice A.

Como variáveis de resposta foram avaliados os critérios de estabilidade da emulsão por período de 6 horas, a qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão e a limpeza das paredes das provetas. Foi atribuído valor de 100% para estabilidade, emulsões que não apresentaram quebra após seis horas, para o critério limpeza foi atribuído 100% para ausência de aderência de gotículas de óleo à parede das provetas, já para a qualidade da água foi atribuído o percentual máximo na ausência virtual de cor e turbidez da fase aquosa inferior à 100NTU após 24 horas. Para a medida da turbidez foi utilizado turbidímetro TB-1000P-MS TecnoPON.

## 4.2 Cultivos de *Desmodesmus sp*

A escolha da espécie de microalga para este trabalho foi baseada na disponibilidade da espécie na Bahia, na resistência às condições adversas e as temperaturas de água superiores à 25°C, bem como a alta produtividade.

A espécie *Desmodesmus sp.* apresenta boa termotolerancia e resistência. É abundante na Bahia e mostra boa adaptação às condições adversas como as águas do Dique do Tororó e ainda pode ser utilizada na produção de biodiesel. Embora até a elaboração deste trabalho não tenham sido encontradas publicações sobre seu uso na biodegradação de óleo residual pesado, o fato da espécie se adaptar a poluentes urbanos e a altas temperaturas despertou a curiosidade sobre sua capacidade de biodegradação e a possibilidade do seu uso neste trabalho.

Neste estudo foi utilizada a espécie *Desmodesmus sp* proveniente do Dique do Tororó, (Salvador, Ba) posteriormente isolada no LABEC onde as microalgas são mantidas em um banco dentro de incubadora de fotoperíodo (411 FDP, Nova ética), com iluminação contínua através de lâmpadas fluorescentes de 30 Watts fornecendo luminosidade de cerca 35  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sob temperatura média de 22°C.

Em todos os cultivos deste trabalho foi utilizado o meio sintético Bold's Basal Medium (BBM), preparado conforme Lourenço, 2006. A Tabela 6, mostra a composição e concentração de nutrientes no meio BBM.

Tabela 6: Concentração de nutrientes nos cultivos em meio BBM. Fonte: Adaptado de LOURENÇO, 2006.

Reagente	Concentração final (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$1,75 \times 10^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,50 \times 10^{-2}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$7,50 \times 10^{-2}$
$\text{NaNO}_3$	$2,50 \times 10^{-1}$
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$7,50 \times 10^{-2}$
$\text{NaCl}$	$2,50 \times 10^{-2}$
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	$1,00 \times 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (diluído em $\text{H}_2\text{SO}_4$ aquoso)	$4,98 \times 10^{-3}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$1,09 \times 10^{-2}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$1,81 \times 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,22 \times 10^{-4}$
$\text{NaMoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$3,90 \times 10^{-4}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$7,90 \times 10^{-5}$
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$4,94 \times 10^{-5}$

#### 4.2.1 CULTIVO MÃE

Foi preparado um inóculo mãe com o objetivo de garantir que a maior população de células estivesse na mesma fase de crescimento e nas mesmas condições para os posteriores preparos dos cultivos experimentais a partir do cultivo mãe.

O cultivo mãe foi preparado e mantido em erlenmeyer. Foi armazenado em prateleira com temperatura ambiente média de 25°C, iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes de 15 Watts, obtendo-se uma luminosidade aproximada de 70  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  na superfície do erlenmeyer de modo contínuo. Foi fornecido ao cultivo borbulhamento de ar contínuo. A Figura 14 mostra uma imagem do cultivo mãe.



Figura 14: Cultivo mãe de *Desmodesmus* sp. em prateleira.

O crescimento do cultivo foi acompanhado até a fase latente, através do método de contagem celular na câmara de Neubauer com o microscópio ótico (Axiostar plus, Zeiss).

#### 4.2.2 CULTIVO COM BPF NÃO EMULSIONADO

Foram tomadas alíquotas de 100mL do cultivo mãe na fase estacionária, transferidas para erlenmeyer de 250mL e adicionados diferentes quantidades de óleo BPF, conforme Tabela 7. Os erlenmeyer foram mantidos em prateleiras nas mesmas condições de luminosidade, temperatura e borbulhamento de ar do cultivo mãe. O crescimento celular destes foi avaliado por período de 3 semanas.

Tabela 7: Cultivos experimentais com óleo BPF não emulsionado.

Cultivo Experimental	Teor de óleo BPF % (m/v)
1	0,0
2	0,1
3	0,5
4	1,0
5	5,0
6	10,0

A Figura 15 mostra os cultivos experimentais com óleo BPF, logo após seu preparo, onde os erlenmeyer podem ser visualizados em ordem decrescente de concentração de óleo BPF.

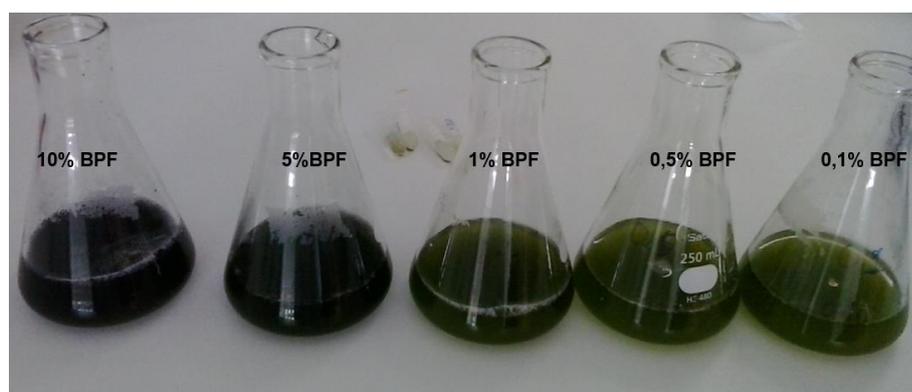


Figura 15: Cultivos Experimentais com óleo BPF não emulsionado em diferentes concentrações.

#### 4.2.3 CULTIVO COM BPF EMULSIONADO

Foram tomadas alíquotas de 100mL do cultivo mãe na fase estacionária transferidas para erlenmeyer de 250mL e adicionado 1% (v/v) de emulsão de óleo BPF. A Tabela 8 mostra os componentes dos experimentos realizados. Nos experimentos trabalhou-se com meio restrito, nestes o meio foi diluído em 50% (v/v) em água miliQ. Os erlenmeyer foram mantidos em incubadoras, sob temperatura de 27°C, agitação de 150rpm, iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes de 15 Watts, obtendo-se uma luminosidade aproximada de 70  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  na superfície dos erlenmeyers de modo contínuo. A única fonte de carbono fornecida aos cultivos foi proveniente da emulsão adicionada. Os cultivos 3 e 4 foram realizados em duplicata.

Tabela 8: Experimento com emulsão de óleo BPF.

Cultivo	Meio	Adicionado
1	Meio BBM restrito (diluído 50% v/v)	-----
2	Meio BBM normal	-----
3	Meio BBM restrito (diluído 50% v/v)	1% de óleo BPF emulsionado
4	Meio BBM restrito (diluído 50% v/v)	1% de Solução emulsionante

O experimento teve duração de 90 dias, com avaliação de crescimento do cultivo através de contagem celular, conforme procedimento de LOURENÇO (2006).

O experimento contendo emulsão de óleo BPF foi acompanhado por técnica de espectroscopia Raman. Após os 90 dias foi realizada avaliação cromatográfica dos compostos policíclicos aromáticos presentes no extrato do meio ao final do experimento.

### **4.3 Contagem celular**

Em todos os cultivos, tanto no cultivo mãe como nos experimentos com óleo BPF o crescimento foi acompanhado utilizando o método de contagem celular na câmara de Neubauer com o microscópio ótico Axiostar *plus*, Zeiss, conforme metodologia de LOURENÇO (2006).

#### 4.4 Análises de Espectroscopia Raman

Para as análises em espectroscopia Raman foi utilizado equipamento Raman (JASCO NRS-5100) do laboratório LAPO/LAMUME do Instituto de Física da UFBA. O equipamento conta com microscópio acoplado com três objetivas (5x, 20x, 100x  $\mu\text{m}$ ), fonte laser com emissão em 532 nm com uma potência máxima de 50 mW.

As análises foram realizadas com as amostras *in vivo*. Para cada análise foi coletado 1mL do cultivo transferidos para Eppendorf e centrifugados por 5 minutos e rotação de 4000rpm. A região espectral utilizada em todas as medições foi de 800 à 2000  $\text{cm}^{-1}$ .

Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Foram levados em conta os sinais do  $\beta$ -caroteno.

#### 4.5 Análises de CG-MS

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em equipamento da Agilent CG7890B, com injeção manual, com detector de massas quadrupolo 5977AMSD e coluna com fase (5%-fenil dimetilpolisiloxano, 30m de comprimento e diâmetro interno de 0,25mm (HP5MS).

O Software Masshunter (Agilent Technologies) e biblioteca *NIST* 2.0 foram utilizados para controle do instrumento e tratamento de dados, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi hélio (99,999% de pureza, White Martins, Brasil) em fluxo constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup>.

A programação do forno da coluna foi, inicialmente, 50°C/min, a 180°C com taxa de aquecimento 10°C/min. A temperatura foi mantida por 3 minutos, em seguida foi elevada com taxa de 7°C/min até 230°C. E finalmente a temperatura foi elevada até 370°C a 10°C/min. A temperatura do forno foi mantida por 5 min. O volume de injeção foi de 1 µL, utilizando split na razão 1/100. A aquisição no modo varredura de íons de 78-320 m/z.

Não foram realizadas análises com fins quantitativos, apenas qualitativos, não sendo então necessária a realização de curva de calibração.

A amostra de óleo BPF foi diluída em Hexano e filtrada, para uma concentração final de 0,2840 mg/L.

Os HPAs foram extraídos do meio de cultivo com óleo BPF emulsionado após noventa dias. O cultivo foi centrifugado por 20 minutos com rotação de 4000rpm. A fase aquosa foi filtrada. Em seguida foi realizada uma extração líquido-líquido da fase aquosa utilizando 20mL da fase aquosa e 50mL de n-Hexano (Sigma Aldrich, grau de pureza para CG).

Após a separação das fases, a fase orgânica foi concentrada, através de processo de evaporação com gás nitrogênio para um volume de 10mL.

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Emulsões

A tabela 9 mostra os resultados obtidos na avaliação da concentração total de tensoativos e de diferentes valores de HLB, nos critérios de limpeza, estabilidade da emulsão e qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão.

Tabela 9: Resultado do planejamento estatístico com variáveis independentes HLB e concentração total de tensoativos para o preparo da solução emulsionante.

Experimento	HLB	Concentração total (%)	Limpeza (%)	Estabilidade Emulsão (%)	Qualidade da fase aquosa(%)
1	16,000	0,050	50	40	40
2	16,000	0,180	100	100	100
3	22,500	0,180	100	100	70
4	22,500	0,050	50	20	50
5	19,250	0,115	90	90	70
6	19,250	0,115	90	90	70
7	19,250	0,115	90	90	70

Os resultados mostram que emulsões estáveis não são formadas com baixos valores nas concentrações de emulsionantes, bem como não é possível promover a limpeza das paredes das provetas. Quando estas variáveis se encontram em valor intermediário a limpeza e a estabilidade da emulsão apresentam-se satisfatórias, 90%. A qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão apenas foi considerada satisfatória para baixos valores de HLB.

A análise de variância (ANOVA) apresentou valores de  $R^2$  0,82639; 0,86634 e 0,98000 para as variáveis resposta estabilidade da emulsão, limpeza e qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão, respectivamente.

Com o objetivo de visualizar quais parâmetros e interações apresentaram influência significativa em cada variável resposta foram traçados diagramas de Pareto (Figuras 16, 17 e 18) e gráficos de efeitos principais (Figuras 19, 20 e 21).

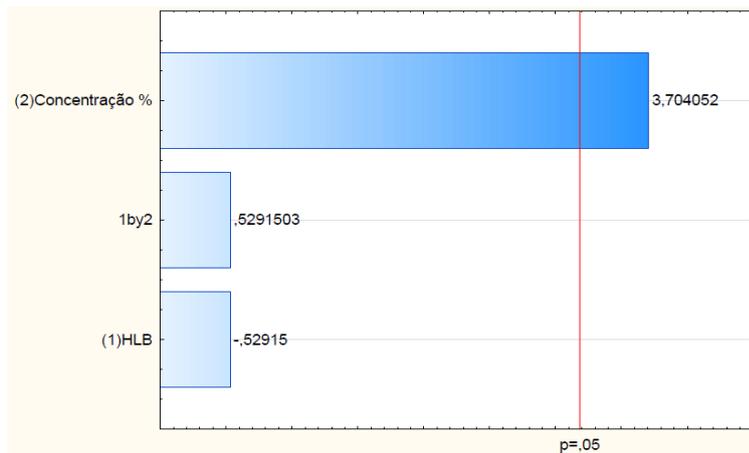


Figura 16: Gráfico de Pareto para variável resposta estabilidade da emulsão.

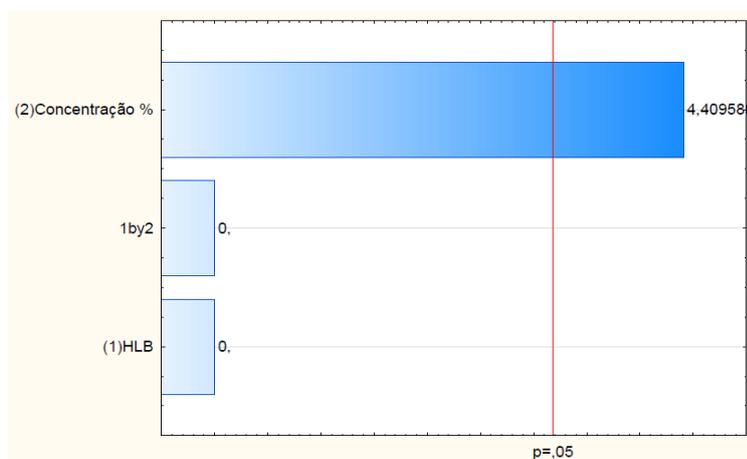


Figura 17: Gráfico de Pareto para variável resposta limpeza.

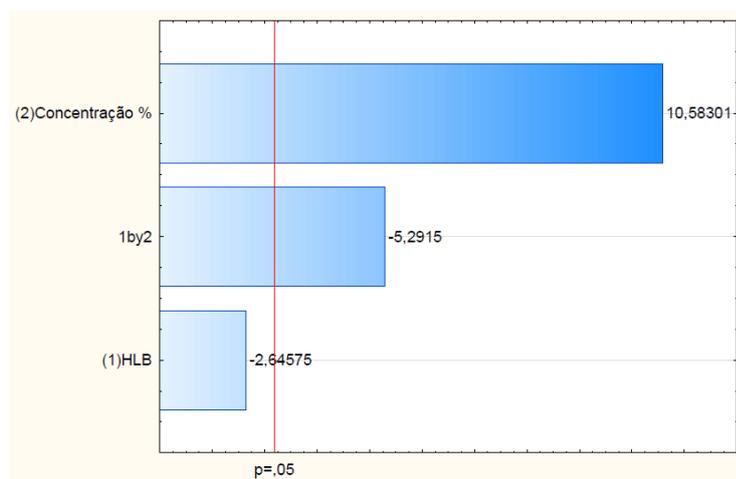


Figura 18: Gráfico de Pareto para variável resposta qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão.

Nas Figuras 16 e 17 é possível verificar que para a estabilidade da emulsão e limpeza das paredes apenas a concentração de tensoativos mostrou significância estatística, para intervalo de confiança 95%. Em relação à qualidade da fase aquosa

a concentração de tensoativos e a interação desta com o HLB mostrou significância, conforme ilustrado na Figura 18.

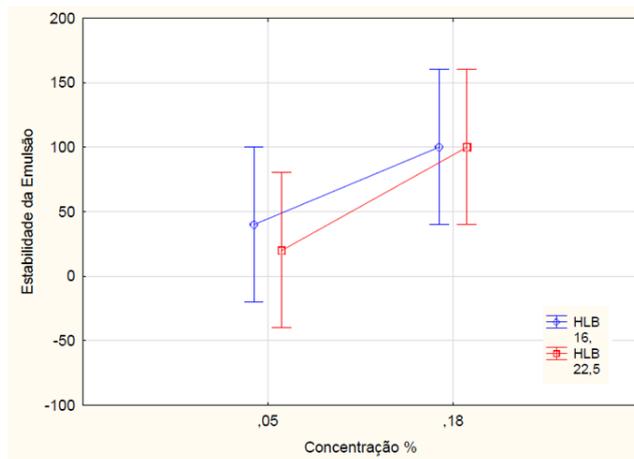


Figura 19: Gráfico de efeitos principais para a estabilidade da emulsão.

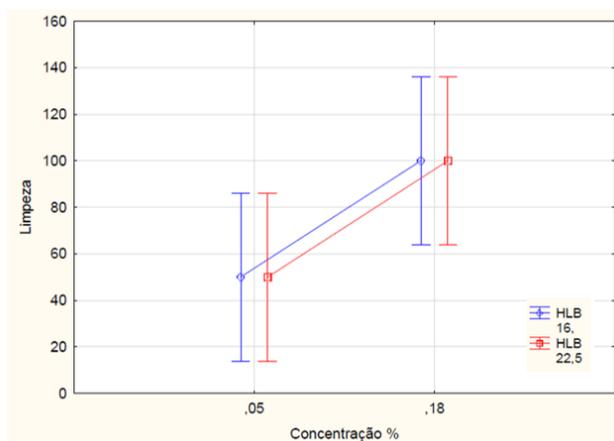


Figura 20: Gráfico de efeitos principais para a limpeza.

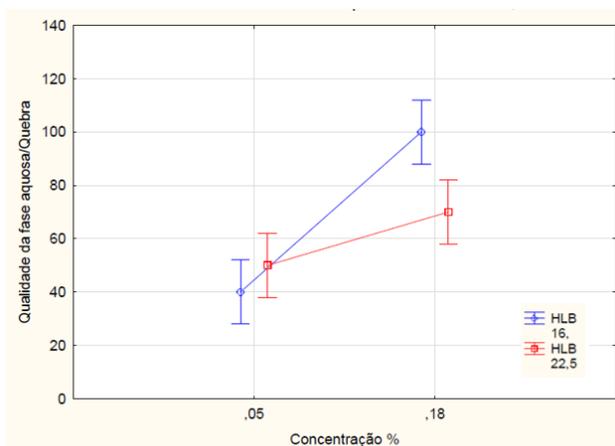
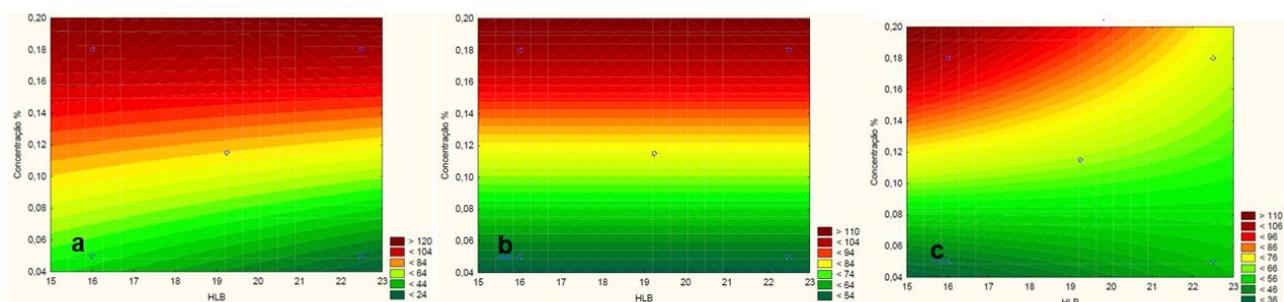


Figura 21: Gráfico de efeitos principais para a qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão.

Nas Figuras 19 e 20 é possível perceber que tanto a estabilidade da emulsão quanto a limpeza são eficientes para os valores de concentração de tensoativos mais altos, não são visualizadas interações entre as variáveis HLB e concentração de tensoativos. Já na Figura 21, é visualizada a interação entre as variáveis independentes e a qualidade da fase aquosa atinge seu máximo para o menor valor do HLB, 16, e para a máxima concentração.

As Figuras 22a, 22b e 22c mostram as curvas de nível para a estabilidade da emulsão, limpeza e qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão, respectivamente. No eixo das abscissas encontram os valores de HLB e no eixo das ordenadas os valores da concentração total de tensoativos.



Figuras 22a, 22b e 22c: Curvas de nível: **Figura 22a** Curva de nível para a estabilidade da emulsão. **Figura 22b** Curva de nível para limpeza. **Figura 22c** Curva de nível para a qualidade da água após a quebra da emulsão.

Nas Figuras 22a e 22b é possível observar regiões ótimas para a estabilidade da emulsão e limpeza em concentrações altas para uma ampla faixa de valores de HLB. O mínimo valor do HLB, 16, foi escolhido com base nas aplicações teóricas, este valor se enquadra na faixa necessária a emulsões do tipo óleo em água, a uma boa detergência, bem como para ação solubilizante. Esta faixa foi ampliada objetivando encontrar o menor valor na concentração total de tensoativos com qualidade nas três variáveis resposta.

Na figura 22c observa-se uma região ótima para a qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão nas maiores concentrações de tensoativos e menores valores de HLB.

As Figuras 23, 24 e 25 mostram as superfícies de resposta para a estabilidade da emulsão, limpeza e qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão.

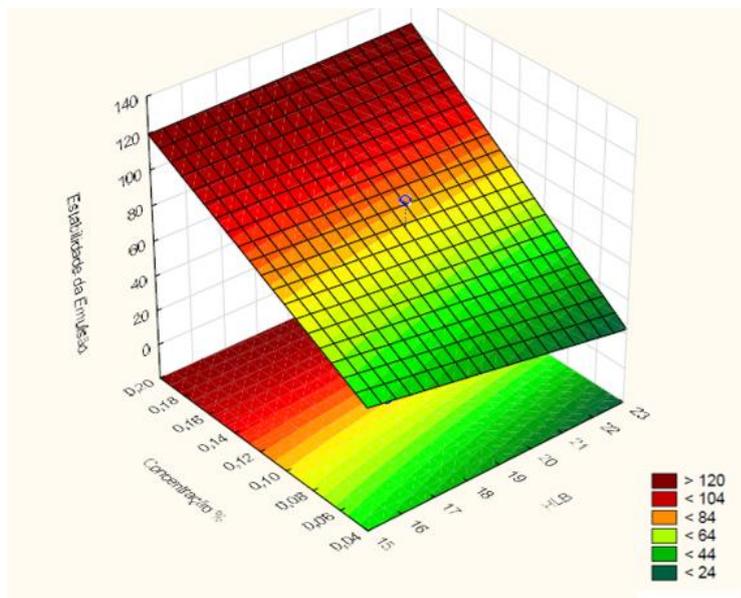


Figura 23: Superfície de resposta para a estabilidade da emulsão.

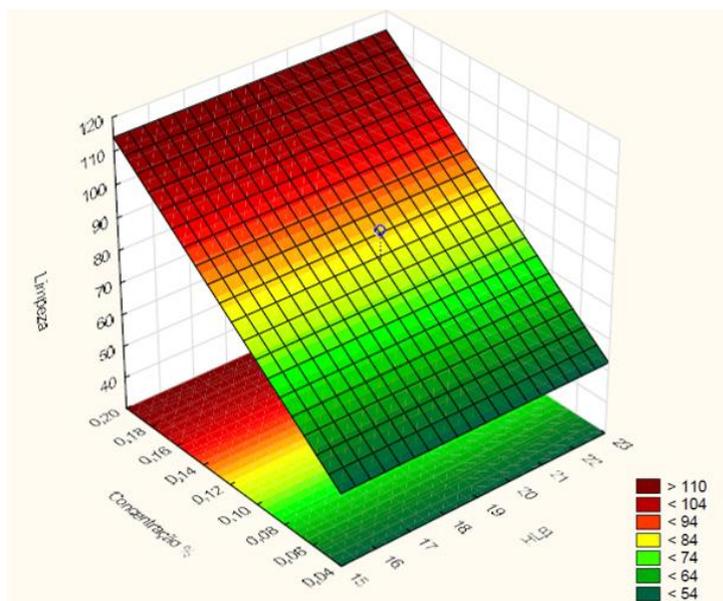


Figura 24: Superfície de resposta para a limpeza.

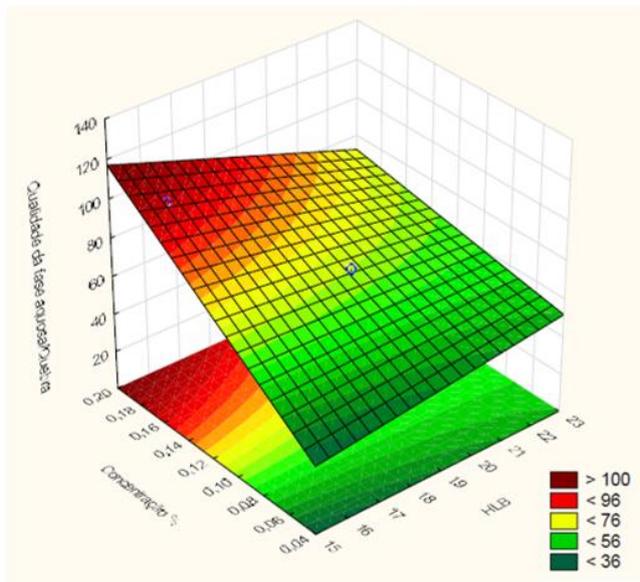


Figura 25: Superfície de resposta para a qualidade da água após a quebra da emulsão.

Os gráficos de superfície de resposta traçados não objetivaram traçar um modelo matemático, apenas almejavam uma visão mais clara das regiões ótimas de trabalho, para desenvolvimento de uma formulação que atenda bons resultados nas três variáveis de resposta.

Foi possível observar nos gráficos de curva de nível e superfícies de resposta que as regiões ótimas de trabalho, encontram-se na área de extrapolação dos gráficos, acima de 100%, fora da área experimental. Este fato mostra que para uma aplicação mais adequada da ferramenta poderia ter sido realizado um delineamento composto central. No entanto neste trabalho, estes gráficos objetivaram auxiliar o desenvolvimento da formulação emulsificante, como uma tendência, uma vez que as regiões ótimas de máximo para as variáveis resposta: estabilidade da emulsão e limpeza apresentaram um máximo nas variáveis concentração e HLB, enquanto a variável qualidade da fase aquosa apresentou região ótima em valores mínimos de HLB. Estes resultados, antagonicos de certo modo, acarretaram uma busca experimental em torno de valores intermediários que permitissem qualidade aos resultados das três variáveis resposta.

Nos experimentos foi observado que o Lauril Éter Sulfato de Sódio é o ativo mais importante para o critério de limpeza, e este fato é concordante com a alta aplicabilidade deste tensoativo na função de detergência (DALVIN, 2011). Também foi observado sua maior eficácia com concentração de 5% (m/m). Esta concentração representa um total de ativo real de 1,35% (m/m), uma vez que o produto comercial é

uma solução aquosa com concentração de 27% (m/m). Em razão desta observação na segunda batelada de experimentos a concentração de LESS foi mantida constante em 5%, ou seja, concentração real 1,35% (m/m).

Foi observado que na faixa de valores de HLB testados, o mesmo mostrou pouca significância para a estabilidade da emulsão e para a limpeza, em relação a qualidade da fase aquosa o valor do HLB só mostrou interferência negativa quando em seu valor máximo, 22,5. Em relação à concentração total de tensoativos, para todas as variáveis resposta, a mesma gerou resultados positivos em valores altos, ainda que a partir de 0,115% (m/m) foram observados valores médios a altos para as três variáveis resposta.

A interpretação destes resultados possibilitou elaborar os novos testes com a mistura dos ativos Amida 80 (Dietanolamida de ácido graxo de coco 80%), Tween 20 (Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 E0) e LESS 27% (Lauril Éter Sulfato de Sódio 27%) usando valores intermediários para a concentração e para o HLB, levando em consideração a interação dos fatores, suas respectivas influências nas variáveis resposta e as regiões ótimas.

Foi elaborada uma solução emulsificante conforme a Tabela 10. A solução apresentou 100% de resposta para os critérios de estabilidade da emulsão, limpeza e qualidade da fase aquosa após a quebra da emulsão com quitosana. Foi possível elaborar a solução com uma concentração total de ativos em valor intermediário, 0,114% (m/m) conforme previsto nos resultados do planejamento estatístico.

Tabela 10: Composição da solução emulsionante utilizada.

Concentração Solução Less 27%	Concentração real Less (m/m)	Concentração Amida 80 (%) (m/m)	Concentração Tween 20E0 (%) (m/m)	Concentração total de tensoativos (%) (m/m)	HLB
5	1,35	3,5	6,5	0,114	17,82

A Tabela 10 mostra a composição da solução emulsificante, os valores de HLB da mistura, bem como a concentração total de tensoativos. Para o cálculo da concentração total de tensoativos foi considerada a concentração real, 1,35% (m/m), de Lauril éter sulfato de sódio (LESS) 27% (m/m).

O desenvolvimento de uma emulsão óleo em água, onde o componente oleoso é uma mistura complexa como a existente em um óleo residual pesado é um desafio, pois não se sabe exatamente a estrutura química de todos os componentes da mistura. Foi observado que a interação entre os ativos Lauril Éter Sulfato de Sódio e Amida 80 permitiu a emulsificação inicial dos componentes e a presença da Amida 80, por se tratar de molécula tensoativa com baixo caráter hidrofílico, foi fator determinante para a estabilidade da emulsão.

Foi observado um incremento na estabilidade da emulsão pela adição do TWEEN 20 E0, em especial após período de 6 horas de observação. Este fato é condizente com sua estrutura química ramificada e com as predições teóricas de seu incremento à estabilidade por efeito estérico. Também foi observado que na presença deste tensoativo a quebra da emulsão pela adição de quitosana ocorreu em maior velocidade com melhoria na turbidez da fase aquosa.

Os experimentos e resultados obtidos indicaram que o planejamento estatístico foi uma ferramenta útil para definir as faixas de concentração total de tensoativos e valores de HLB no preparo das emulsões e que foram alcançados os melhores resultados para estabilidade das emulsões através da combinação dos efeitos eletrostáticos e estéricos dos tensoativos utilizados.

A emulsão produzida apresentou facilidade de escoamento nas paredes da proveta, demonstrando sua aplicabilidade para remoção de resíduos de óleo BPF de tanques e demais equipamentos, podendo ser utilizada na limpeza e manutenção de equipamentos industriais, com redução do consumo de água e solventes, bem como com ganhos de tempo e redução de custos financeiros.

Preende-se que esta solução emulsificante desenvolvida, além da sua utilização para a biodegradação dos resíduos petroquímicos, possa ser aplicada na descontaminação de equipamentos industriais.

## 5.2 Crescimento dos cultivos de *Desmodesmus sp.*

### 5.2.1 CULTIVO MÃE

O cultivo mãe se manteve em crescimento exponencial até o 14<sup>o</sup> dia, atingindo a fase estacionária em seguida, conforme mostra a Figura 26. No 21<sup>o</sup> dia, ainda em fase estacionaria foram coletadas as amostras para os experimentos com o óleo BPF.

Por se tratar da curva de crescimento de seres vivos, os pontos estão sujeitos a flutuações, naturais da variação da multiplicação e morte celular, como pode ser observado no sétimo dia de cultivo.

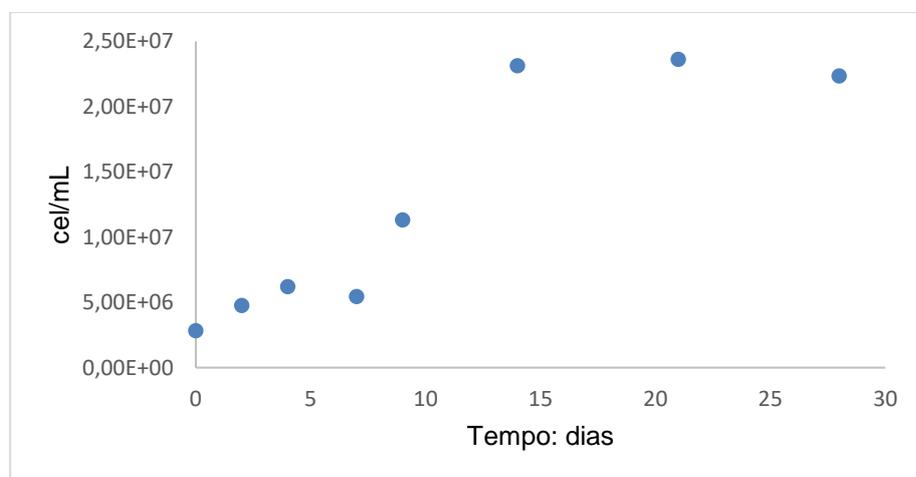


Figura 26: Curva de crescimento do cultivo mãe.

### 5.2.2 CULTIVO COM ÓLEO BPF NÃO EMULSIONADO

Os cultivos com óleo BPF não emulsionado tiveram seu crescimento celular acompanhado por período de tempo de 23 dias. Neste intervalo os cultivos não atingiram a fase estacionária sendo mantidos em fase de crescimento exponencial.

No entanto embora houvesse crescimento celular o óleo adicionado ao cultivo em sua grande maioria se aderiu as paredes dos erlenmeyers durante o experimento, mostrando que caso seja possível que a espécie de microalga *Desmodesmus sp.* biodegrade os componentes do óleo, este processo seria extremamente lento, uma vez que o contato entre as microalgas e o óleo é mínimo.

A Figura 27 ilustra as curvas de crescimento para os experimentos com diferentes concentrações de óleo BPF.

Não é possível avaliar se houve biodegradação do óleo BPF, uma vez que a maior quantidade deste aderiu as paredes, no entanto é possível observar na Figura 27 uma fase de crescimento exponencial menos acentuada no experimento sem óleo BPF.

Também é possível observar que o cultivo acrescido de 1% de óleo BPF apresentou a maior taxa de crescimento.

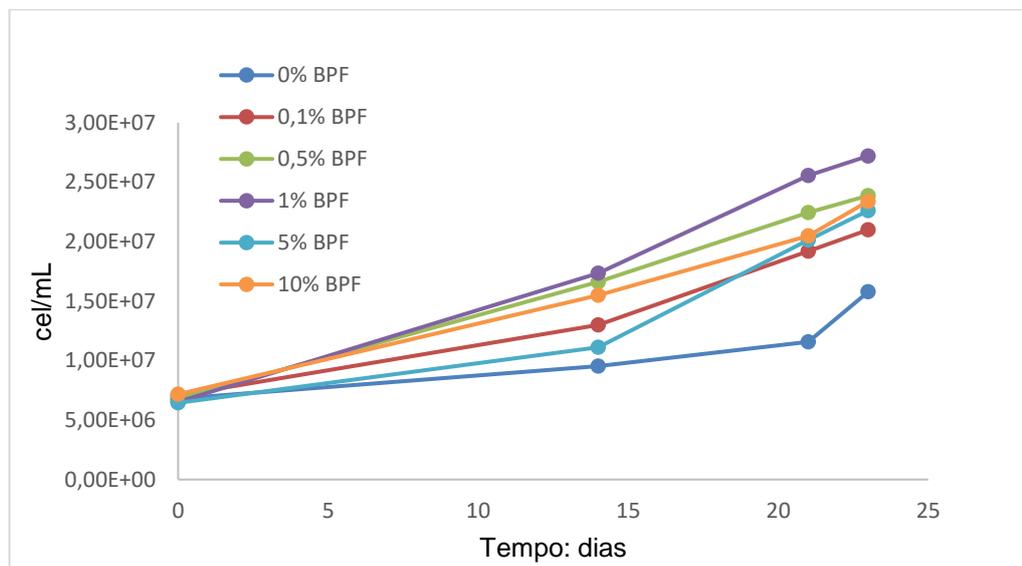


Figura 27: Curvas de crescimento dos cultivos com óleo BPF não emulsionado.

### 5.2.3 CULTIVO COM ÓLEO BPF EMULSIONADO

Neste experimento não foi fornecido aos cultivos fonte de carbono, proveniente do borbulhamento de ar. Nos cultivos 1, 2 e 4, onde não foi adicionada a emulsão de óleo BPF foi observado o início da fase de morte das microalgas no 62º dia, bem como coloração amarelada dos cultivos após cerca de 60 dias. A Figura 28 mostra uma fotografia tirada no 69º dia do cultivo.

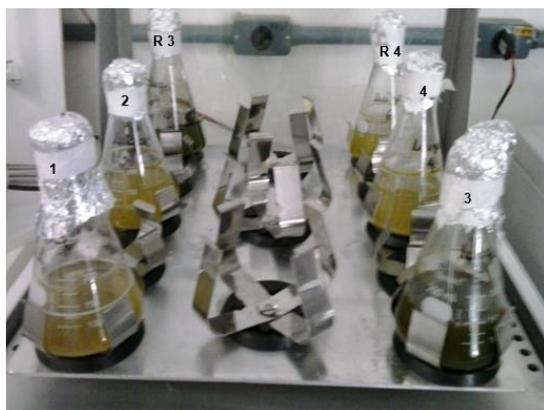


Figura 28: 69º dia do experimento.

As imagens da Figura 28 foram numeradas conforme a descrição dos cultivos na Tabela 11. Os experimentos R3 e R4 se referem as duplicatas dos cultivos 3 e 4 respectivamente. Na imagem a coloração amarelada dos cultivos sem adição de óleo BPF é mostrada. Este fato poderia ser explicado pela produção de algum pigmento

pela espécie, ou pela diminuição da produção de clorofila, já que na ausência de fonte de carbono a fotossíntese é inibida.

Tabela 11: Experimentos com replicatas para emulsão de óleo BPF.

Cultivo	Meio	Adicionado
1	Meio BBM restrito (diluído 50% v/v)	-----
2	Meio BBM normal	-----
3	Meio BBM restrito (diluído 50% v/v)	1% de óleo BPF emulsionado
R3	Meio BBM restrito (diluído 50% v/v)	1% de óleo BPF emulsionado
4	Meio BBM restrito (diluído 50% v/v)	1% de Solução emulsionante
R4	Meio BBM restrito (diluído 50% v/v)	1% de Solução emulsionante

A Figura 29 mostra as curvas de crescimento para os cultivos de 1 a 4 e as respectivas réplicas R3 e R4.

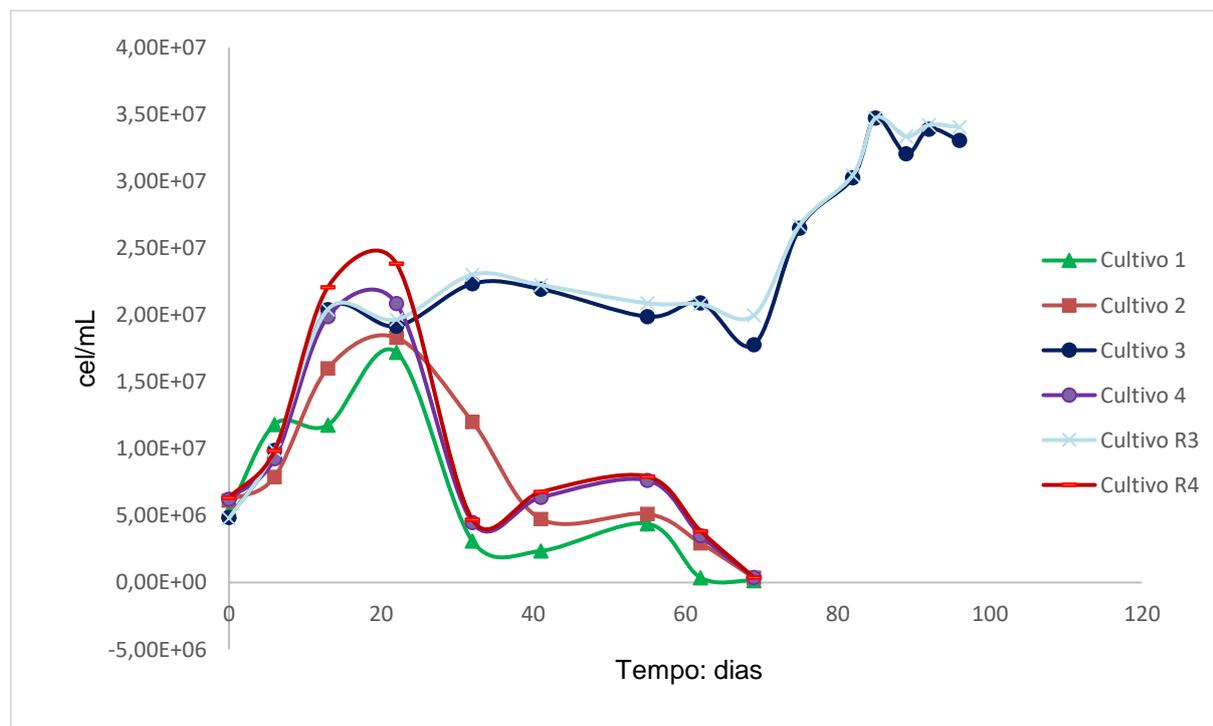


Figura 29: Curvas de crescimento dos experimentos com óleo de BPF emulsionado. As condições dos cultivos 1, 2, 3, R3, R4 e 4 estão descritas na Tabela 11.

Na Figura 29, é possível perceber que nenhum dos cultivos teve crescimento, conforme previsão de curva teórica, (ilustrada na Figura 4). Os cultivos sem a fonte de carbono adicional praticamente não apresentaram fase estacionária e após cerca de 20 dias em média entraram em fase de decréscimo, voltando a ter uma fase de crescimento relativamente pequeno em torno do 40º dia, para logo após no 55º dia entrarem em fase de morte.

Em relação ao cultivo 3 e sua réplica R3, onde foram adicionados o óleo BPF, também não foi seguida a curva de crescimento teórica, houve uma fase de crescimento exponencial e após cerca de 30 dias o cultivo entrou na fase estacionária, no entanto após esta não foi observado decréscimo ou fase de morte e sim uma nova fase de crescimento exponencial. É interessante notar que a fase latente dos cultivos 3 e R3 é iniciada no mesmo período que a fase de decréscimo dos demais cultivos e que a segunda fase de crescimento exponencial começa simultaneamente a fase de morte dos cultivos isentos de óleo BPF.

Estes dados despertam a possibilidade de mudanças no metabolismo das microalgas em condições adversas do seu habitat ocorrerem em períodos de tempo muito próximos. É possível avaliar que na primeira fase de crescimento exponencial as microalgas utilizaram o gás carbônico presente dentro dos erlenmeyers como fonte de carbono. Em seguida os cultivos 1,2, R4 e 4 não obtiveram carbono de outras fontes, entrando em fase de morte, enquanto o cultivo 3 entrou na fase latente, onde possivelmente se adaptou a usar o óleo residual como fonte de carbono. Após esta suposta adaptação iniciou novamente uma fase de crescimento exponencial, biodegradando o óleo como consequência de seu metabolismo.

### 5.3 Espectroscopia Raman

O espectro Raman para a espécie *Desmodemus sp* foi realizado com medidas em triplicada, a partir de amostra do cultivo mãe. A Figura 30 mostra o resultado obtido, onde é possível identificar em  $1153\text{ cm}^{-1}$  o sinal referente a tensão C-C e em  $1523\text{ cm}^{-1}$  o sinal referente a tensão C=C, ambos da molécula de  $\beta$ -caroteno.

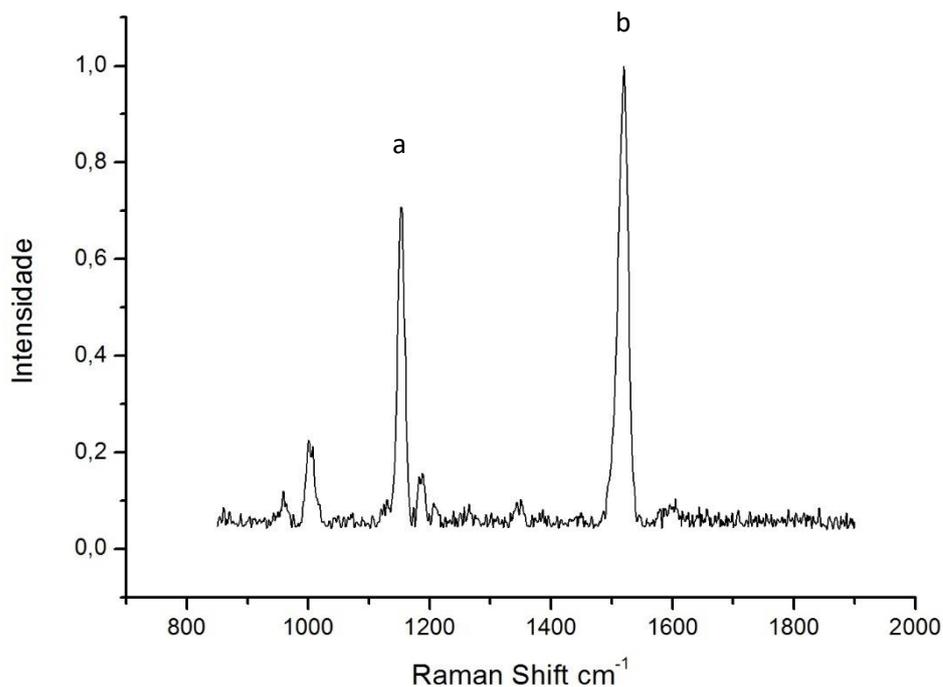


Figura 30: Espectro Raman para amostra de *Desmodemus sp*. Sinal a: tensão C-C e sinal b: tensão C=C, ambas da molécula de  $\beta$ -caroteno.

Ao acompanhar o cultivo de *Desmodemus sp* com adição da emulsão de óleo BPF, foi observada uma diminuição na intensidade dos sinais referentes ao  $\beta$ -caroteno até o 24º dia de cultivo, com crescimento dos sinais após este período, sem que os sinais se tornassem tão intensos quanto no dia 0, ao longo do experimento, conforme pode ser observado na Figura 31.

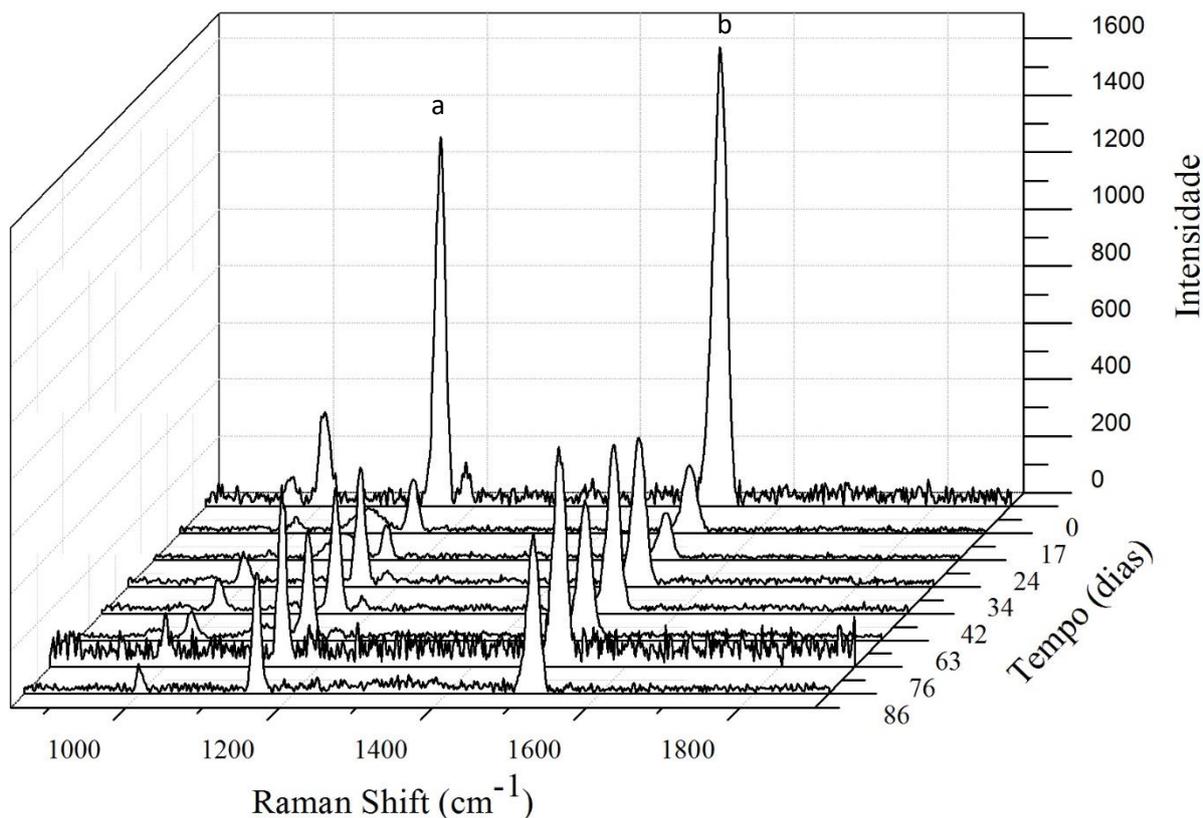


Figura 31: Espectro Raman para amostra de *Desmodesmus sp.* Sinal a: tensão C-C e sinal b: tensão C=C, ambas da molécula de  $\beta$ -caroteno.

O decréscimo na intensidade dos sinais referentes a molécula de  $\beta$ -caroteno demonstra que o processo de biodegração dos componentes do óleo BPF pela microalga *Desmodesmus sp.*, interferem no seu metabolismo produtivo de pigmentos.

Este decréscimo pode ser causado por inúmeras modificações metabólicas como uma diminuição da atividade fotossintética, ou a diminuição na produção de pigmentos apenas pela requisição de produção de enzimas para biodegradação dos componentes do óleo. A compreensão deste metabolismo requer uma variedade de experimentos e análise de possíveis intermediários do processo de biodegradação e de produção dos pigmentos.

Os ensaios com espectroscopia Raman apresentaram alta praticidade para o acompanhamento de carotenoides no cultivo de microalgas, necessitando apenas de uma pequena quantidade da amostra *in vivo* para cada ensaio.

#### 5.4- Cromatografia

A comparação do cromatograma obtido para o óleo BPF e para o extrato do meio do cultivo 3, após 90 dias de experimento, mostra a ocorrência de biodegradação dos componentes do óleo, conforme ilustrado nas Figuras 32 e 33.

Foi identificada a presença de 8 compostos do tipo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na amostra de óleo BPF. O HPA mais abundante na amostra foi o acenaftileno, mas ainda foram encontrados: naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo antraceno, criseno, dibenzo antraceno e perileno benzeno, conforme mostrado na Figura 32.

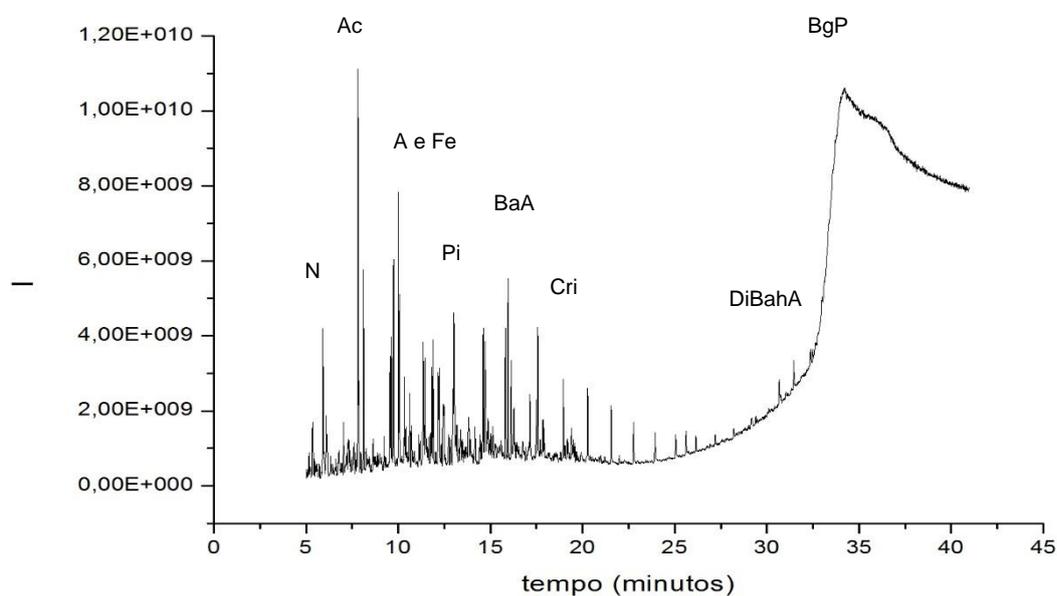


Figura 32: Cromatograma do óleo BPF, ampliado com identificação dos HPAs encontrados. Nos tempos de retenção: 5,921 N (naftaleno); 7,808 Ac (acenaftileno); 10,002 A e Fe (antraceno e fenantreno); 13,021 Pi (Pireno); 15,962 BaA (benzo antraceno); 18,954 Cri (criseno); 31,453 DiBahA (dibenzo antraceno) e 34,217 BgP (perileno benzeno).

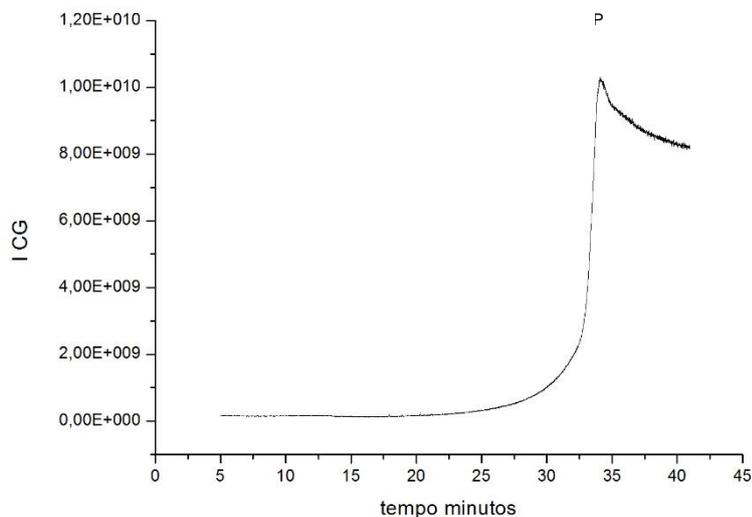


Figura 33: Cromatograma do extrato do meio de cultivo 3, ampliado com identificação do HPAs encontrado. No tempo de retenção 34,062 BgP (perileno benzeno).

O ensaio cromatográfico realizado com o extrato do meio do cultivo 3 mostrou que os componentes orgânicos presentes no óleo BPF, incluindo os HPAs foram degradados completamente no período de 90 dias do experimento, com exceção do perileno benzeno, que sofreu redução na sua quantidade, mas não se degradou por completo.

Avaliando os valores das áreas referentes aos picos do perileno benzeno no óleo BPF e no extrato do cultivo 3 obtem-se os valores aproximados  $3,66 \times 10^{10}$  und de área e  $1,92 \times 10^{10}$  und de área. Estes valores mostram uma redução de 50% da área do pico cromatográfico, sugerindo que cerca da metade do Perileno Benzeno tenha sido biodegradada.

Acredita-se que quanto mais pesado seja um composto mais lenta e difícil seja sua biodegração pelas microalgas, este fato justifica a presença de perileno benzeno no extrato do cultivo não degradado. Não se pode afirmar qual o período de tempo necessário à biodegradação deste aromático.

Em relação aos demais compostos orgânicos presentes no óleo BPF, a Figura 33, apresenta um cromatograma, onde não há dúvidas da ausência destes compostos, confirmando a capacidade da espécie *Desmodesmus* sp em degradar os mesmos, quando emulsionados em meio aquoso de cultivo BBM.

Para uma melhor compreensão do processo de biodegradação estudado seria necessário um acompanhamento com ensaios cromatográficos periódicos ao longo do experimento, bem como de solução padrão de HPAs.

A solução padrão permitiria a realização de ensaios quantitativos e o acompanhamento periódico do cultivo permitiria medir a taxa de biodegradação dos componentes presentes no óleo BPF, bem como a identificação dos intermediários formados no processo metabólico.

O acompanhamento periódico requer um volume de cultivo grande, com no mínimo cerca de 15 litros, uma vez que são necessários retiradas de volumes para extração e posterior análises significativas.

O conhecimento do metabolismo de biodegradação dos HPAs permitiria o teste em diferentes condições com a finalidade de acelerar o processo ampliando sua viabilidade para aplicação industrial.

## 6- CONCLUSÕES

Os dados cromatográficos, aliados às curvas de crescimento dos cultivos de *Desmodesmus sp.* com óleo BPF mostraram que houve degradação completa dos componentes orgânicos presentes no óleo, à exceção do perileno benzeno onde ocorreu degradação parcial, cerca de 50% do composto foi degradado. Nas amostras centrifugadas previamente aos ensaios de espectroscopia Raman após cerca de 25 dias não foi mais observada a presença de óleo sobrenadante.

A variação da curva de crescimento em relação a curva teórica de crescimento celular aliada aos dados da diminuição na produção de  $\beta$ -caroteno evidenciados nos ensaios de espectroscopia Raman, mostraram que para metabolizar os compostos orgânicos presentes no cultivo a espécie *Desmodesmus sp.* alterou seu metabolismo de produção de pigmentos e de multiplicação celular.

Para atingir a formulação emulsificante final foi necessário o uso da ferramenta Statistica aliada a compreensão do conjunto de interações físico-químicas, não apenas entre a solução tensoativa e as fases imiscíveis, mas também as interações entre os ativos propriamente ditos.

A concentração final de tensoativos utilizados foi relativamente baixa, sendo 0,114% (m/m) na solução emulsionante,  $2,28 \times 10^{-3}\%$  na emulsão óleo em água e  $2,28 \times 10^{-5} \%$  nos cultivos.

O uso de soluções emulsificantes em resíduos petroquímicos pode ser útil na descontaminação de equipamentos industriais, minimizando o uso de solventes e facilitando o escoamento dos resíduos, e sua biodegradação em parques industriais ou em derramamentos de óleo cru e seus derivados no meio ambiente.

Para o uso de soluções emulsificantes para descontaminação de equipamentos industriais, sem a posterior biodegradação dos resíduos, a quebra da emulsão se faz necessária para a separação das fases, para que a fase orgânica seja recuperada ou destinada à queima em *flare* por exemplo, e a fase aquosa seja transferida para uma estação de tratamento de efluentes. Neste caso o uso da quitosana como agente demulsificante se mostrou eficiente, com alta velocidade na quebra da emulsão, sem afetar a qualidade da fase aquosa.

A espécie de microalga *Desmodesmus sp.* apresentou fácil adaptabilidade às condições propostas no presente trabalho.

Os dados cromatográficos obtidos e as curvas de crescimento dos cultivos com óleo BPF emulsionado permitiram ao presente trabalho concluir que é possível o uso

de emulsões de resíduos petroquímicos para posterior biodegradação por microalgas da espécie *Desmodesmus sp.*

## 7- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Fazer uso de padrões de HPAs para análises cromatográficas, permitindo a realização de ensaios quantitativos e o cálculo da taxa de biodegradação individual dos compostos policíclicos aromáticos;
- Testar outras espécies de microalgas assim como consórcios de espécies;
- Avaliar parâmetros do efluente industrial após o processo de biodegradação, como DBO e DQO;
- Acompanhar os teores de clorofila dos cultivos;
- Analisar os teores de lipídeos e outras frações importantes (do ponto de vista de futuras aplicações industriais) da biomassa após o cultivo com biodegradação;
- Estudar o mecanismo de biodegradação dos HPAs em microalgas, verificando a presença de intermediários nas células e suas respectivas características tóxicas.

## REFERÊNCIAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas. Classificação de Resíduos Sólidos. NBR 10.004:2004.

ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fábio e JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. Eclética Química, vol 35, nº3, 2010.

ANDRADE, Michele da Rosa e COSTA, Jorge Alberto Vieira. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, set./out., 2008.

ANP, Agência Nacional do Petróleo. Disponível em [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br)

BATTISTI, Marcos Valério e CAMPANA-FILHO, Sérgio P. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosana de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. Quím. Nova vol.31 no.8 São Paulo, 2008.

BIGNETTI, Bernardo. O planejamento de uma parada de manutenção industrial na indústria petroquímica: uma análise de ferramentas aplicadas. Especialização em gestão empresarial. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

BRAGA et al. Caracterização ambiental dos resíduos oleosos provenientes das atividades de exploração & produção de óleo e gás no norte do estado do Espírito Santo. VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Vitória, 2002.

BRASKEN. Ficha de Segurança de Produto Químico/ ÓLEO PETROQUÍMICO BTE, 2016.

BRASIL, Lei 12305, 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências.

CARUSO Miriam Solange Fernandes e ALABURDA, Janete. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 67(1):1-27, 2008.

CASTELLAN, Gilbert. W. Físico-Química, volume 1. Tradução Luiz carlos Guimarães. Editora: Ao Livro Técnico. p. 441-461. Rio de Janeiro, 1972.

CERNIGLA, Carl E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Current Opinion in Biotechnology, 4, p.331-339, 1993.

CHEKROUN, Kaoutar Bem; Sánchez, Esteban e Baghour, Mourad. The role of algae in bioremediation of organic pollutants. *International Research Journal of Public and Environmental Health* Vol.1 (2), p. 19-32, April 2014.

COLLIS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. Fundamentos de Cromatografia. p. 203-270. Editora da UNICAMP. Campinas, 2006.

COSTA, Alciléa de Fátima. Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHS): 1-Hidroxipireno Urinário, com os trabalhadores do CESTEHE/FIOCRUZ. Dissertação de mestrado em saúde pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

COTTA, Jussara Aparecida de Oliveira. Aplicação de vermicompostagem para biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Tese de doutorado em química analítica. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2008.

CRINI, G.; RENAULT, F.; SANCEY, B. Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach *European Polymer Journal* 45 (2009) p. 1337–1348, 2009.

CRISTALE, J.; SILVA, F.S. e MARCHI M. R. R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. *Eclética química*, vol 33, nº4, 2008.

DAL MAGRO, Clinei, DEON, Maitê Carla, THOMÉ, Antônio, PICCIN Jeferson Steffanello e COLLA Luciane Maria. Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. *QuimICA Nova*, Vol. 36, No. 8, 1139-1145, 2013.

DALTIN, Decio. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. Editora Blucher. p. 1-105; 158-270. São Paulo, 2011.

DÖNMEZ, G.; ERTUĞRUL, S.; BAKIR, M. Treatment of dye-rich wastewater by an immobilized thermophilic cyanobacterial strain: *Phormidium* sp. *Ecological Engineering*. v. 32. p. 244–248, 2008.

FARIA, Dalva L. A. Entenda o que é espectroscopia Raman. *QuímicaViva - CRQ-IV*, 2011.

FAHIM, Mohamed A; AL SAHHAF, Taher A; ELKILANI, Amal S. Introdução ao refino de petróleo (Série Engenharia de petróleo). Tradução de Lersch Traduções. Editora: Elsevier. Rio de Janeiro, 2012.

FLORENCE, Alexander T. e ATTOWOOD, David. Princípios Físico-Químicos em Farmácia. Tradução Zuleika Rothschild et. al., 2ªed. São Paulo, Pharmabooks, p. 247- 372, 2011.

FRANCISCO, Jéferson Luiz e FRANÇA, Karime Cruz. Métodos de Tratamento de Resíduos de Petróleo. Dossiê Técnico, Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro – REDETEC, 2007.

GEBARA, Sâmya Soler, et. al. Métodos para análises de HPA e BTEX em águas subterrâneas de postos de revenda de combustíveis: um estudo de caso em Campo Grande, MS, Brasil. Quím. Nova vol.36 no.7 São Paulo, 2013.

GLASS, Sherman J. “Sharing perspectives on the global petrochemical industry”. ExxonMobil Chemical senior vice president. Apresentação na CMAI World Petrochemical Conference, Houston, TX, 21 março, 2007.

GRESSLER, Pablo Diego. Avaliação da eficiência de *Desmodesmus subspicatus* (R.Chodat) E.Hegewald & A.Schmidt (Chlorophyceae) cultivada em fotobiorreator tubular com efluente da ete-unisc, visando biorremediação e obtenção de energia. Mestrado em Tecnologia Ambiental, área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. Santa Cruz do Sul, março de 2011.

GUIMARÃES, Cleudes. Espectroscopia Raman e Infravermelho na molécula (4E)-4((E)-3-fenilalilidenomanino)-1,2-dihidro-2,3-dimetil-1-fenilpirazol-5-ona 2011. Dissertação de mestrado em física. Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

HARITASH, A. K. E KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* 169 (2009) 1–15, 2009.

IIDA, Patrícia et al. Estudo Do Efeito Da Água Em Emulsões De Petróleo. 4º PDPETRO, Campinas, 21-24 de Outubro de 2007.

GOLUEKE C. G., OSWALD, W. J., GOTAAS H. B.. Digestion of Algae *Appl Microbiol*, vol 5 p. 47-55, 1957.

GRAHAM, Brendan F., MAY, Eric F. e TRENGOVE, Robert D. Emulsion Inhibiting Components in Crude Oils. *Energy & Fuels*, 22, 1093–1099, 2008.

HARUN R, SINGH M, FORDE G.M, DANQUAH M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 p.1037–1047, 2010.

HODAIFA, GASSAN; MARTINEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S. Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 1111-1117, 2008.

KAKATI, Himangshu et al. Formation and Dissociation in Oil-in-Water Emulsion. *Energy & Fuels*, 28, p. 4440–4446, 2014.

KARCHER, V. Determinação Experimental da Energia Interfacial de Emulsões de Água em Óleo Pesado. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação Interdisciplinar de Ciências e Engenharia de Petróleo. UNICAMP, Campinas/SP, 2008.

KILPATRICK, Peter K. Water-in-Crude Oil Emulsion Stabilization: Review and Unanswered Questions. *Energy & Fuels*, 26, p. 4017–4026, 2012.

KOKAL, S. Crude oil emulsions: A state-of-the-art Review, Society of petroleum engineers- Revision of SPE 77497, p.1-13, 2005.

LARANJEIRA M.C.M. e FÁVERE V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, Vol. 32, No. 3, p. 672-678, 2009.

LOPES, Wilson e ANDRADE, Jailson B de. Fontes, Formação e Quantificação de hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA). *Química Nova*, 19 (5) p. 497-516, 1996.

LOPES, J.M.; NEVES, G. B. M.; LUCAS, E.F. Avaliação da variação da viscosidade de óleo cru em função da adição de desemulsificante. 2º Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás, Rio de Janeiro/RJ, 2003.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações. Editora RIMA, São Carlos, 2006.

MACHADO, Carlos José Saldanha; TEIXEIRA, Beatriz Martins e VILANI, Rodrigo Machado. Análise da política nacional de resíduos sólidos e a indústria do petróleo. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, v. 35, p. 181-193, 2015.

MAIA FILHO, Dilson C et al. Aging of water-in-crude oil emulsions: Effect on rheological parameters *Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects*. 405 p.73 -78, 2012.

MESTRE, C.S.L. Avaliação de tensoactivos de alto peso molecular para sua aplicação na Indústria do Petróleo. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior Técnico - Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, Portugal, 2011.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A.G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P.O.; LAGO, M.C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MOURA, Dayanne Chianca. Comparação entre metodologias de extração de HPAs em água utilizando um planejamento fatorial com quantificação no CG/EM. Dissertação de mestrado em química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2009.

OKUTAN, H, DILEK, D, ÇITROGLU, M, EKINCI, E. Polycyclic aromatic compounds detected in pyrolysis residues of seyitomer oil slale and lignite. *Enviromental Tchnology*, V15,Iss 4, 1994. (Publicado online:17/12/2008)

OLIVEIRA, Débora Machado de. Aplicação da técnica de solidificação/estabilização para resíduos oleosos da industria petrolífera, utilizando solo argiloso e bentonite. Tese de mestrado em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

OSWALD, W.J. and GOTAAS, H.B. Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Am. Sot. Civ. Eng.* v. 122, p. 73-105, 1957.

OXITENO, Boletins técnicos. Disponíveis em: <http://www.oxiteno.com>

PETER, J. Larkin. *IR and Raman Spectroscopy*. P. 1-62- USA: Elsevier, 2011  
Sala O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman*. Editora UNESP, São Paulo, 2008.

PETROBRAS, Petrobras Distribuidora S.A. Ficha de Segurança de Produto Químico, FISPQ) BR0304, 2014.

PILÁT, Zdeněk. Raman microspectroscopy of algal lipid bodies:  $\beta$ -carotene quantification. *J Appl Phycol* (2012) 24: P. 541–546, 2012.

PINHATI et al. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. *Química Nova*, Vol. 37, No. 8, p. 1269-1274, 2014.

PINTO, Luisa Fernanda Ríos. Estudo do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. visando a produção de biodiesel. Tese de doutorado em engenharia química. Universidade Estadual de Campinas, 2014.

SANTOS, M. C.; CIRILO, A. T. de O.; NUNES, M. L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão "Saburica" (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). *Scientia Plena*, vol.7, nº09, p. 1-3, 2011.

SATYANARAYANA K.G, MARIANO A.B. VARGAS J.V.C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of Energy Research*,35:291–311, 2011.

SCHRAMM, Laurier. L. *Emulsions: Fundamentals And Applications In The Petroleum Industry*, Advanced Chemistry Series 231. Washington: ACS, p. 79-129, 1992.

SCHMITZI, Roberta; DAL MAGRO, Clinei e COLLA, Luciane Maria. Aplicações ambientais de microalgas. *Revista CIATEC – UPF*, vol.4 (1), p.48-60, 2012.

SILVA, P.K.L. *Remoção de Óleo da Água de Produção por Flotação em Coluna Utilizando Tensoativo de Origem Vegetal*. 2008. 104 f. Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SOARES, Diniara. *Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo*. Tese de mestrado em ciências: Bioquímica. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

TORRES, Eduardo Mc Mannis. *A evolução da indústria petroquímica brasileira*. *Química Nova*, 20 (especial), 1997.

VENKATARAMANI, Deepika e AICHELE, Clint P. Concentrated Emulsion Characterization in Flowing Conditions. *Energy Fuels*, 29, p. 2801–2807, 2015.

VILLAMIZAR, Sonia Milena Gómez. *Caracterização de carotenoides e lipídeos de microalgas in vivo utilizando espectroscopia Raman*. Dissertação de mestrado em Engenharia Industrial (PEI). Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

WESKA et. Al. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 80 (2007), p. 749–753, 2007.

YUAN, Dong-Xing et al. Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin* 56 (2008) p. 1400–1405, 2008.

WU, J et al. Effect of Demulsifier Properties on Destabilization of Water-in-Oil Emulsion *Energy & Fuels*, 17, p.1554-1559, 2003.

## APENDICE A

### GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA

As Figuras 34, 35 e 36 mostram a curva de titulação potenciométrica para o HCl 0,1M e os gráficos da primeira e segunda derivada em função dos respectivos volumes médios.

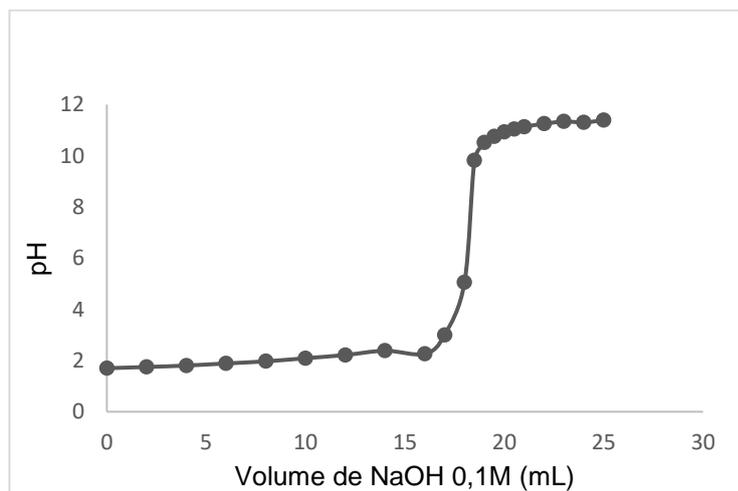


Figura 34: Curva de titulação potenciométrica para o HCL 0,1M.

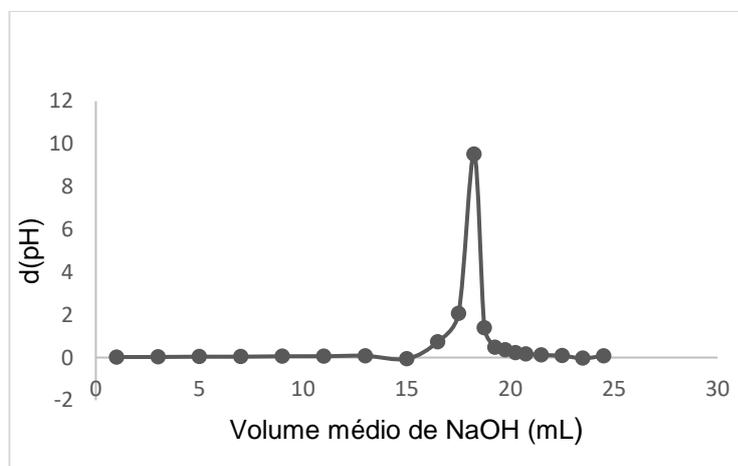


Figura 35: Curva da primeira derivada da titulação potenciométrica para o HCL 0,1M.

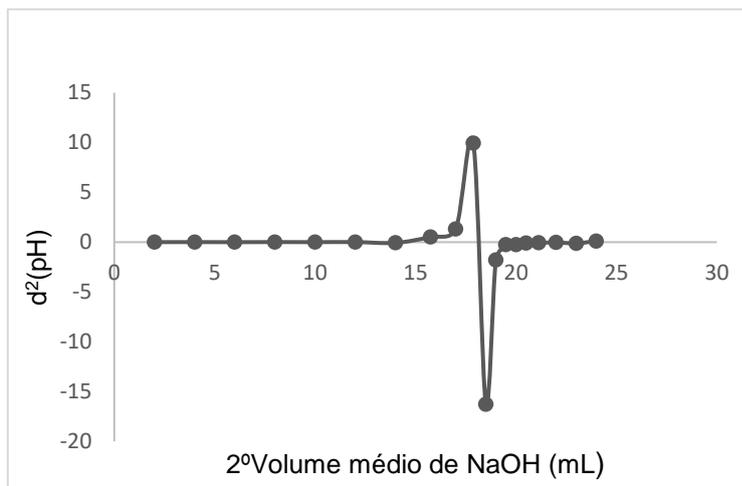


Figura 36: Curva da segunda derivada da titulação potenciométrica para o HCL 0,1M.

As Figuras 37, 38 e 39 mostram a curva de titulação potenciométrica para a quitosana em solução de HCl 0,1M e os gráficos da primeira e segunda derivada em função dos respectivos volumes médios.

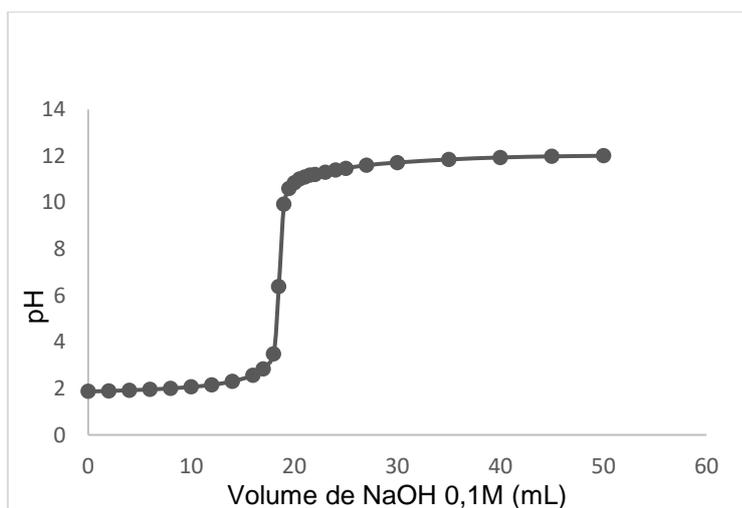


Figura 37: Curva de titulação potenciométrica para a quitosana em solução de HCL 0,1M.

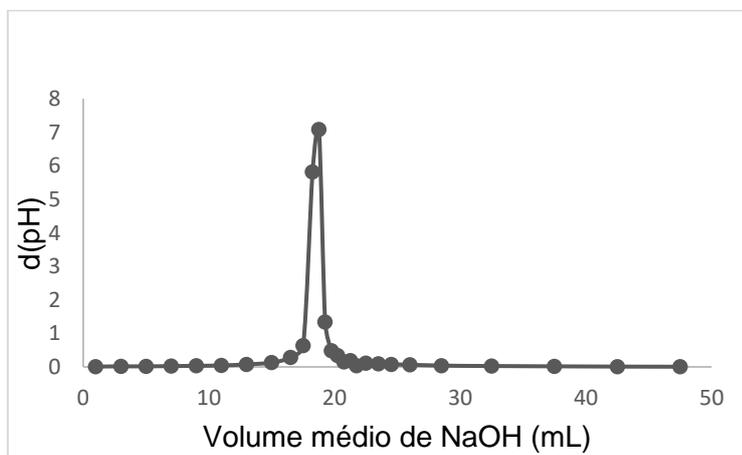


Figura 38: Curva da primeira derivada da titulação potenciométrica para a quitosana em solução de HCL 0,1M.

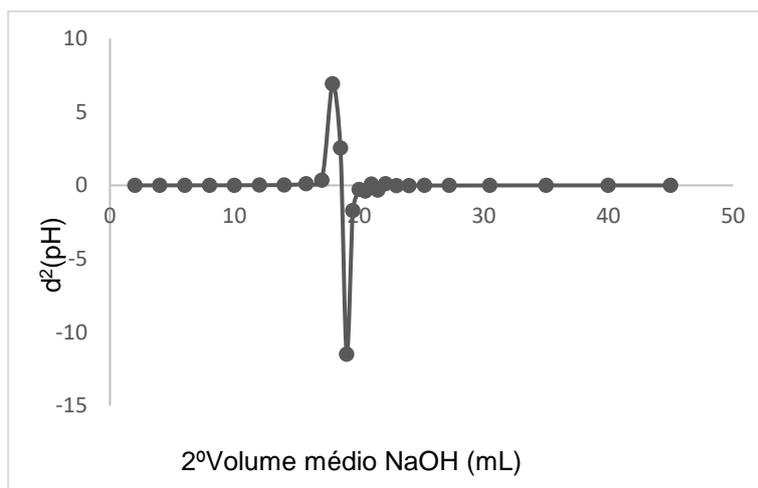


Figura 39: Curva da segunda derivada da titulação potenciométrica para a quitosana em solução de HCL 0,1M.

A partir dos dois pontos de inflexão das curvas de segunda derivada, foi obtido seu valor igual a zero que equivale aos volumes  $V_1$  e  $V_2$  para a solução de HCl e de quitosana respectivamente. Com base na Equação 4 foi calculado o grau de desacetilação da quitosana,  $GD = 74,27\%$ . O valor apresentado para a amostra de quitosana utilizada está em conformidade com o esperado para um produto comercial.

**UFBA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA POLITÉCNICA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI**

Rua Aristides Novis, 02, 6º andar, Federação, Salvador BA

CEP: 40.210-630

Telefone: (71) 3283-9800

E-mail: [pei@ufba.br](mailto:pei@ufba.br)

Home page: <http://www.pei.ufba.br>

