

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**DIEGO TODESCATO**

**REMOÇÃO DE COMPOSTOS SULFURADOS E  
NITROGENADOS DO GASÓLEO PESADO (GOP) EM SISTEMA  
BIFÁSICO PELO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 EM  
REATOR BATELADA**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selene M. A. Guelli Ulson de Souza e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora de Oliveira

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Todescato, Diego

Remoção de Compostos Sulfurados e Nitrogenados do Gasóleo Pesado (GOP) em Sistema Bifásico pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em Reator Batelada / Diego Todescato; orientador, Antônio Augusto Ulson de Souza; coorientadora, Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza; coorientadora, Débora de Oliveira – Florianópolis, SC; 2014.

94 pg.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Biorremediação. 3. *Rhodococcus erythropolis*. 4. Enxofre. 5. Nitrogênio. I. Souza, Antônio Augusto Ulson de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. III. Título.

Diego Todescato

**REMOÇÃO DE COMPOSTOS SULFURADOS E  
NITROGENADOS DO GASÓLEO PESADO (GOP) EM SISTEMA  
BIFÁSICO PELO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 EM  
REATOR BATELADA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 12 de março de 2014.

---

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado  
Coordenador do Curso

---

Prof. Antônio Augusto Ulson de Souza, Dr.  
Orientador - Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Débora de Oliveira, Dr.<sup>a</sup>  
Coorientadora - Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza, Dr.<sup>a</sup>  
Coorientadora - Universidade Federal de Santa Catarina

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Antônio Augusto Ulson de Souza, Dr.  
Presidente - Universidade Federal de Santa Catarina

---

Profa. Denise Esteves Moritz, Dr.<sup>a</sup>

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. José Vladimir de Oliveira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Vitor Jorge Paes Vilar, Dr.  
Universidade do Porto - FEUP

Dedico esta dissertação aos meus pais,  
Valdemir e Elsa.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFSC, pela oportunidade de realizar o mestrado;

A CAPES, pela bolsa e apoio financeiro concedidos viabilizando o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus orientadores, Professor Antônio Augusto Ulson de Souza, Prof.<sup>a</sup> Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza e a Prof.<sup>a</sup> Débora de Oliveira, pela confiança no meu trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, e pela oportunidade de realizar esta pesquisa;

Aos Professores Denise Esteves Moritz, Rogério Marcos Dallago e José Vladimir de Oliveira, pelo repasse de seus conhecimentos, sugestões e ideias para que o trabalho fosse realizado da melhor forma.

Aos meus pais Valdemir e Elsa, pelo amor, carinho, ajuda, apoio, conselhos e incentivo nos momentos alegres e também nos difíceis;

As amigas e colegas de pesquisa Danielle Maass e Daniela Gier Della Rocca, por estarem sempre dispostas para a realização deste trabalho.

Aos amigos do LABSIN/LABMASSA, em especial Fabíola Hackbarth, Josi Fontana, Leonardo Oliveira e Marthina Jönk, pela companhia de todas as horas.

E a todos que, embora não citados neste agradecimento, de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.



*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

Martin Luther King



## RESUMO

A queima de combustíveis fósseis tem liberado uma grande quantidade de poluentes na atmosfera. A chuva ácida é extremamente prejudicial para a fauna e flora; acelera os processos de corrosão de prédios e monumentos; e gera graves problemas de saúde para o ser humano. Outro fato preocupante é a redução da qualidade do petróleo, os poços de petróleo leve estão se esgotando. Considerando esses fatores muitos países estão reformulando sua legislação a fim de exigir a comercialização de combustíveis com menores teores de impurezas. Os processos de dessulfurização e desnitração existentes não são capazes de remover o enxofre e nitrogênio a níveis tão baixos. Com esse contexto tem-se desenvolvido um novo processo denominado biorremediação, o qual surge o interesse em desenvolver um processo no qual ocorre à degradação dos compostos através da ação de micro-organismos que atuam como catalisadores. A bactéria *Rhodococcus erythropolis* vem despontando como uma das mais promissoras na remoção e degradação de compostos indesejados do petróleo. Um estudo sobre o meio de crescimento e condições de cultivo torna-se necessário no sentido de se obter um meio nutritivo eficiente e ao mesmo tempo economicamente viável aos processos industriais. Nesse trabalho buscou-se analisar a capacidade da cepa nacional *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 de remover enxofre e nitrogênio de gasóleo pesado (GOP) em reator descontínuo utilizando concentrações de fase orgânica, com frações variando de 10 a 100% (m/m). As melhores condições de cultivo para o crescimento do *R. erythropolis* ATCC4277 foram temperatura de 23,7 °C, agitação de 180 rpm e com uma concentração de extrato de levedura de 6,15 g.L<sup>-1</sup>, CaCO<sub>3</sub> de 1,1 g.L<sup>-1</sup>, glicose 2,0 g.L<sup>-1</sup> e malte 5,0 g.L<sup>-1</sup>. O *R. erythropolis* ATCC4277 foi capaz de degradar os compostos de enxofre e nitrogênio presentes no gasóleo pesado, com uma remoção de 26,70 e 51,74%, respectivamente, para a fração óleo/água de 90%, resultado superior ao obtido na fração de 10%, a qual remoção foi de 7,64 e 39,02%.

**Palavras-chave:** Biorremediação. *Rhodococcus erythropolis*. Enxofre. Nitrogênio. Gasóleo pesado.



## ABSTRACT

The burning of fossil fuels has released a large amount of pollutants in the atmosphere. Acid rain is extremely harmful for fauna and flora; accelerates the corrosion processes of buildings and monuments; and creates serious health problems for humans. Another concerning fact is the reduction on the quality of the oil, the light oil well are being depleted. Considering these factors many countries are reformulating their laws in order to require the commercialization of fuels with lower levels of impurities. The processes of desulfurization and denitrification existing aren't capable of removing the sulfur and the nitrogen at such low levels. In this context a new process has been developed, called bioremediation, which appears into interest to develop a process in which occurs the degradation of compounds through the action of microorganisms that act as catalysts. The bacteria *Rhodococcus erythropolis* has been emerging as one of the most promising agents in the removal and degradation of unwanted components of oil. A study about the growth medium becomes necessary in order to obtain not only a nutritive and efficient medium but also economically viable for the industrial processes. This work is looking for to analyze the capacity of the national strain *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 of removing sulfur and nitrogen of heavy crude oil (HCO) in a batch reactor using concentrations of the organic phase, with fractions varying from 10 to 100% (m/m). The best cultivation conditions for the growth of *R. erythropolis* ATCC4277 were temperature of 23,7°C, agitation of 180 rpm and with concentrations of 6,15 g.L<sup>-1</sup> yeast extract, 1,1 g.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, 2,0 g.L<sup>-1</sup> glucose and 5,0 g.L<sup>-1</sup> malt. The *R. erythropolis* ATCC4277 was capable of degrading the components of sulfur and nitrogen present in the heavy crude oil, with a removal of 26,70 and 51,74%, respectively, for the fraction oil/water of 90%, higher result than the obtained with 10% fraction, which removal was of 7,64 and 39,02%.

**Keywords:** Bioremediation. *Rhodococcus erythropolis*. Sulfur. Nitrogen. Heavy diesel.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Constituição do petróleo.....	29
Figura 2. Teor de enxofre em frações de petróleos de diferentes tipos.....	31
Figura 3. Teor de nitrogênio em frações de diferentes tipos de petróleos.....	32
Figura 4. Esquema das torres de destilação para a obtenção da fração estudada.....	34
Figura 5. Características de petróleos: rendimento das frações básicas.....	35
Figura 6. Via metabólica “4S” da degradação do composto DBT.....	40
Figura 7. Diagrama conceitual de algumas etapas da dessulfurização de compostos Cx-DBTs.....	41
Figura 8. Comparação no crescimento de <i>Rhodococcus erythropolis</i> sob diferentes formas de agitação e tempo de inoculação.....	53
Figura 9. Gasóleo pesado sob influência de diferentes formas de esterilização.....	54
Figura 10. Comparação no crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> em meios com diferentes proporções de gasóleo pesado.....	56
Figura 11. Gráfico de Pareto em função dos valores estatísticos do teste t.....	61
Figura 12. Curvas de nível para os fatores de $\text{CaCO}_3$ e extrato de levedura para o crescimento de <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	62
Figura 13. Curvas de nível para os fatores de agitação e temperatura para o crescimento de <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	63
Figura 14. Cinética do crescimento de <i>Rhodococcus erythropolis</i> sob diferentes condições planejamento experimental.....	64
Figura 15. Comparação no crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> , com aeração, sem a adição de Extrato de malte, e sem a adição de $\text{CaCO}_3$ em relação aos experimentos do planejamento experimental.....	65
Figura 16. Comparação no crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> com aeração (A) e somente com agitação de 200 rpm (B).....	66
Figura 17. Gráfico de Pareto, em função dos valores estatísticos do teste t.....	69
Figura 18. Valores preditos pelo modelo polinomial versus observados experimentalmente para a resposta do crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	70
Figura 19. Superfície de resposta da concentração de $\text{CaCO}_3$ versus extrato de levedura para o crescimento de <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	71
Figura 20. Superfície de resposta da agitação versus temperatura para o crescimento de <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	72
Figura 21. Comparativo das cinéticas de crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> utilizando o meio inicial e o meio otimizado.....	73
Figura 22. Remoção de nitrogênio total nas diversas condições experimentais estudadas.....	76
Figura 23. Remoção de enxofre total nas diversas condições estudadas.....	78

Figura 24. Diferença nas emulsões 50 e 10% de GOP.....	79
Figura 25A. Curva de calibração do crescimento <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	91
Figura 26A. Curva de calibração da concentração de glicose até 2,0 g/L.....	91
Figura 27A. Curva de calibração da concentração de glicose até 10 g/L.....	92
Figura 28B. Cinéticas do Planejamento experimental. ....	93
Figura 29B. Cinéticas do planejamento para otimização. ....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise elementar do óleo cru típico (% em massa). .....	29
Tabela 2. Composição do meio de manutenção YMA.....	46
Tabela 3. Composição do meio de fermentação YM modificado. ....	46
Tabela 4. Construção do ensaio para a determinação da CIM. ....	50
Tabela 5. Fatores e níveis estudados no planejamento experimental $2^{(6-1)}$ .....	52
Tabela 6. Fatores e seus respectivos níveis estudados na otimização. ....	52
Tabela 7. Planejamento experimental fatorial parcial $2^{(6-1)}$ e as respostas em termos de crescimento celular.....	58
Tabela 8. Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos. ....	60
Tabela 9. Cálculo dos coeficientes e respectivos índices estatísticos.....	60
Tabela 10. Planejamento experimental $2^4$ com pontos axiais para otimização das condições experimentais para o crescimento de <i>Rhodococcus erythropolis</i> . ....	67
Tabela 11. Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para otimização. ....	68
Tabela 12. Cálculo dos coeficientes e respectivos índices estatísticos.....	68
Tabela 13. Comparativo dos meios de crescimento antes e depois da otimização. ....	72
Tabela 14. Comparativo na remoção de nitrogênio nos dois tipos de meio de crescimento, inicial e otimizado, para diferentes concentrações de gásóleo pesado. ....	75
Tabela 15. Comparativo na remoção de enxofre nos dois tipos de meio de crescimento, inicial e otimizado, para diferentes concentrações de gásóleo pesado. ....	77



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Petróleo Bruto
BDS	Biodessulfurização
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cx-BT	Benzo-alquilados
Cx-DBT	Dibenzotiofenos
DBT	Dibenzotiofeno
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo
GOL	Gasóleo Leve
GOP	Gasóleo Pesado
GOR	Gasóleo Residual
HC	Hidrocraqueamento
HDS	Hidrodesulfurização
HPAS	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
ME	Extrato de Malte
PASHS	Enxofre Heterocíclico Poli aromático
RAT	Resíduo da Destilação Atmosférica
RV	Resíduo de Vácuo
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Correlação
U-CC	Unidades de Craqueamento Catalítico
YMA	Yeast Malt Extract Agar
YM	Yeast Malt Extract
YE	Extrato de Levedura
$\lambda$	Comprimento de Onda



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 OBJETIVOS .....	24
1.1.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	24
1.1.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	24
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>27</b>
2.1 PETRÓLEO .....	27
2.1.1 <b>Histórico</b> .....	27
2.1.1.1 <i>O petróleo no mundo</i> .....	27
2.1.1.2 <i>O petróleo no Brasil</i> .....	28
2.1.2 <b>Composição do Petróleo</b> .....	28
2.1.2.1 <i>Compostos Sulfurados</i> .....	30
2.1.2.2 <i>Compostos Nitrogenados</i> .....	32
2.1.3 <b>Gasóleo Pesado (GOP)</b> .....	33
2.2 BIORREMEDIAÇÃO .....	35
2.2.1 <b>Biodessulfurização</b> .....	36
2.3 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS .....	43
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
3.1 MATERIAIS UTILIZADOS .....	45
3.1.1 <b>Micro-organismo</b> .....	45
3.1.2 <b>Meio de Manutenção</b> .....	46
3.1.3 <b>Meio de Cultura</b> .....	46
3.1.4 <b>Meio de Fermentação</b> .....	46
3.2 MÉTODOS .....	47
3.2.1 <b>Reativação das Células de <i>Rhodococcus erythropolis</i> Liofilizadas</b> .....	47
3.2.2 <b>Determinação da Concentração Celular</b> .....	47
3.2.2.1 Turbidimetria .....	47
3.2.2.2 <i>Determinação Gravimétrica da Concentração Celular</i> .....	48
3.2.3 <b>Determinação da Curva de Crescimento Celular do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277</b> .....	49
3.2.4 <b>Determinação da Concentração de Açúcares no Caldo Fermentativo pelo Método DNS</b> .....	49
3.2.5 <b>Método da Macrodiluição em Caldo</b> .....	50
3.2.6 <b>Dessulfurização por Células Livres de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em Sistema Reacional Bifásico</b> .....	51

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>53</b>
4.1 INFLUÊNCIA DO TIPO DE AGITAÇÃO NO CRESCIMENTO DE <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> .....	53
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	57
4.3 OTIMIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	66
4.4 DESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO EM REATOR DESCONTÍNUO PELO <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ATCC4277 .....	76
<b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>81</b>
5.1 CONCLUSÕES .....	81
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	82
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>93</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Com a crescente demanda por fontes de energia, o consumo de petróleo tem aumentado acentuadamente, em contrapartida a sua qualidade do mesmo vem diminuindo, petróleos mais leves com menores teores de impurezas (enxofre e nitrogênio) vêm esgotando suas reservas e as leis ambientais se tornando cada vez mais rígidas.

A remoção destes compostos sulfurados e nitrogenados envolve um alto gasto energético; desta forma, algumas tecnologias alternativas vêm sendo empregadas para reduzir a emissão de poluentes, dentre elas pode-se citar como alternativa interessante a remoção por biorremediação.

É de extrema importância a seleção de novas cepas microbianas com a capacidade de remover compostos indesejados (enxofre, nitrogênio, oxigênio, metais) de combustíveis fósseis, sem que ocorra a diminuição do valor energético, que sejam industrialmente e ambientalmente estáveis. Apesar da ampla área a ser estudada, somente nas últimas décadas verificou-se o aumento do interesse industrial neste setor específico.

Apesar da busca por novos micro-organismos ou da melhoria das condições de crescimento dos já existentes, não é de interesse biotecnológico obter micro-organismos que atendam somente a este tipo de característica, mas sim de que apresentem crescimento psicofílico, já que este fato pode atuar como empecilho para a instalação em escala industrial. São necessários que os micro-organismos apresentem boa capacidade, eficiência na remoção de compostos indesejados, e apresentem uma alta velocidade de adaptação e crescimento.

Desta forma, o interesse reside em selecionar e explorar micro-organismos psicotolerantes, com alta capacidade metabólica e que apresentem condições mesofílicas de crescimento. Por apresentar uma grande versatilidade metabólica, o *Rhodococcus erythropolis* é um micro-organismo que possui algumas destas características. O estudo destes micro-organismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos pode gerar benefícios econômicos e estratégicos em diversas áreas.

Os cálculos sobre o capital necessário para instalar uma unidade de biodessulfurização são 50% inferiores aos da instalação de uma unidade

de hidrodessulfurização e 15% menores que os de operação, portanto, com os recentes avanços na atividade microbiana, a viabilidade econômica da biodessulfurização vem se tornando cada vez mais competitiva com a hidrodessulfurização e outras tecnologias utilizadas na remoção destes compostos (McFARLAND, 2000).

Tendo em vista que não foi encontrado na literatura um trabalho que utilize um micro-organismo de cepa nacional como biocatalisador no processo de biorremediação de gásóleo pesado, constatou-se ser de extrema importância um estudo a fim de obter maiores contribuições para as áreas científicas e industriais.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a capacidade de dessulfurização e desnitração de gásóleo pesado por rota biotecnológica utilizando o *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência das concentrações de substrato do meio de cultura bem como os fatores temperatura e agitação no crescimento do micro-organismo;
- Reduzir o tempo de adaptação do *Rhodococcus erythropolis* no meio de crescimento;
- Maximizar o crescimento celular do *Rhodococcus erythropolis*;
- Avaliar a influência do meio de crescimento na remoção de nitrogênio e enxofre;
- Verificar a influência da concentração de gásóleo pesado no crescimento do *Rhodococcus erythropolis*;
- Avaliar a eficiência na remoção de compostos sulfurados e nitrogenados de gásóleo pesado.

## 1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Visando uma melhor compreensão do leitor, a estrutura da dissertação é apresentada a seguir.

No Capítulo I é apresentado o levantamento bibliográfico dos principais trabalhos que abordam os aspectos fundamentais envolvidos no processo de dessulfurização. Também são abordadas as características gerais do gasóleo pesado, bem como o histórico do petróleo no Brasil e no mundo. Além disso, descritas as características do *Rhodococcus erythropolis* e sua utilização na biorremediação. Expõem-se ainda algumas das pesquisas mais relevantes relacionadas com o presente trabalho.

No Capítulo II é apresentada a metodologia empregada nos estudos da capacidade de dessulfurização do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277; da resistência às variações de concentração de gasóleo pesado, do planejamento experimental, a fim de avaliar os efeitos da temperatura, agitação, concentração de  $\text{CaCO}_3$ , extrato de levedura, extrato de malte e glicose, no meio de crescimento na avaliação da remoção de compostos sulfurados e nitrogenados. Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

No Capítulo III são apresentados os resultados das análises do percentual de remoção de enxofre; do percentual de remoção de nitrogênio do gasóleo pesado; da cinética do processo de crescimento.

No Capítulo IV são apresentadas as principais conclusões obtidas neste trabalho e as sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

Nos Apêndices A são apresentadas as curvas de calibração do crescimento obtidas no presente trabalho.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentado o levantamento bibliográfico dos principais trabalhos abordando os aspectos fundamentais envolvidos no processo da indústria de petróleo. Também são abordadas as características gerais do gásóleo pesado, bem como o histórico do petróleo no Brasil e no mundo. Além disso, descreve-se sobre o processo de biodegradação de compostos indesejados no petróleo, do mesmo modo são apresentadas as características do *Rhodococcus erythropolis*.

### 2.1 PETRÓLEO

#### 2.1.1 Histórico

##### 2.1.1.1 O petróleo no mundo

O fato é que ainda não se sabe quando foi despertado o interesse do homem sobre o petróleo, mas sabe-se que tanto petróleo, asfalto e betume, eram conhecidos desde os primórdios da civilização. Os registros remetem da sua utilização por fenícios, egípcios, gregos e romanos. No novo mundo, os índios pré-colombianos, incas, maias e outras civilizações mais antigas já tinham contato com o petróleo, o qual era retirado de exsudações naturais encontradas em todos os continentes (THOMAS *et al.*, 2004).

Em 1887, o surgimento dos motores a explosão fez com que outras frações antes descartadas, como gasolina e óleo diesel, passassem a ter grande aplicação. Até o fim do século era utilizado o método de percussão. Em 1900, o americano Anthony Lucas, utilizando o processo rotativo, encontrou óleo a uma profundidade de 354 metros. O evento foi considerado um marco, tanto na perfuração rotativa quanto na história do petróleo (FARAH, 2012).

A década de 60 registra a abundância do petróleo disponível no mundo, o excesso de produção, aliados aos baixos preços praticados pelo mercado, acabaram estimulando o consumo desenfreado. Os anos 70 foram marcados pelas brutais elevações nos preços de petróleo, tornando viáveis as grandes descobertas no Mar do Norte e no México. Já nos anos de 80 e 90, os avanços tecnológicos reduzem os custos de exploração e de

produção, criando assim um novo ciclo econômico para a indústria petrolífera. Fato que ficou evidente em 1996, quando as reservas mundiais eram 60% maiores que em 1980, e os custos médios de prospecção e produção 60% menores para o mesmo período (THOMAS *et al.*, 2004).

A produção mundial vem crescendo, de 2002 a 2012 o aumento foi de 14,9%, o qual foi de 2,2% somente em 2012. A América central e do sul são responsáveis por 9,2% da produção mundial (BRITISH PETROLEUM, 2013).

#### 2.1.1.2 O petróleo no Brasil

O primeiro campo comercial brasileiro foi descoberto em 1941, em Candeias, na Bahia. Em 1953, o governo de Vargas instituiu o monopólio estatal e criou a Petrobras, que deu partida decisiva nas pesquisas do petróleo brasileiro.

Desde sua criação, a Petrobras já descobriu e explora uma grande quantidade de poços de petróleo ao longo de todo o território nacional. Além disso, cada década de existência da empresa é marcada por avanços tecnológicos de grande relevância na exploração do petróleo no país (THOMAS, 2004).

A produção brasileira diminuiu em 2012, cerca de 2,0%, mas no acumulado dos últimos 10 anos soma um aumento de 43,5%, a produção nacional hoje é responsável por 2,7% da produção mundial e, em relação ao consumo, o país teve um aumento de 2,5% em 2012 (BRITISH PETROLEUM, 2013).

#### 2.1.2 Composição do Petróleo

Segundo FARAH (2012), as diferentes famílias de hidrocarbonetos presentes no petróleo apresentam propriedades bem distintas entre si, o que reflete em suas características, que variam bastante de acordo com o tipo de hidrocarboneto predominante - parafínicos, naftênicos e aromáticos. O petróleo, a temperatura ambiente, é inflamável e sua densidade pode variar bastante, entre 0,75 e 1,0. Apesar das diferenças em suas características físicas, a sua composição elementar, apresentada na Tabela 1, varia pouco.

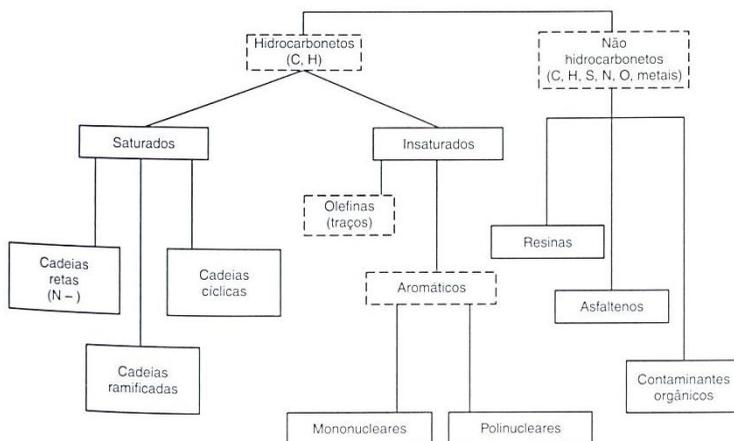
Tabela 1. Análise elementar do óleo cru típico (% em massa).

<b>Elemento</b>	<b>Composição</b>
Hidrogênio	11-14%
Carbono	83-87%
Enxofre	0,06-8%
Nitrogênio	0,11-1,7%
Oxigênio	0,1-2%

Fonte: THOMAS *et al.* (2004).

A elevada proporção de carbono e hidrogênio em relação aos outros constituintes existentes no petróleo mostra que os hidrocarbonetos são seus principais constituintes, alcançando mais de 90% de sua composição. No entanto, as diferenças entre as propriedades físicas e químicas desses hidrocarbonetos são elevadas, o que resulta em uma diversidade de características dos petróleos para uma faixa estreita de variação de composição elementar de óleo bruto (FARAH, 2012). A Figura 1 apresenta a constituição do petróleo, conforme a classificação.

Figura 1. Constituição do petróleo.



Fonte: FARAH (2012).

### 2.1.2.1 Compostos Sulfurados

O enxofre é o terceiro elemento mais abundante encontrado no petróleo, apresentando uma concentração que fica na faixa de 0,06 e 8,0%, sendo considerada como concentração média 0,65% em massa. Normalmente, encontra-se esse elemento no petróleo sob as formas de sulfetos, polissulfetos, benzotiofenos e derivados, moléculas policíclicas com nitrogênio e oxigênio, gás sulfídrico, dissulfeto de carbono, sulfeto de carbonila e enxofre elementar (muito raro).

Os compostos sulfurados são indesejáveis por:

- Aumentarem a polaridade dos óleos (aumentando a estabilidade das emulsões);
- Serem responsáveis pela corrosividade dos produtos do petróleo;
- Contaminarem os catalisadores utilizados nos processos de transformação;
- Determinarem a cor e o cheiro dos produtos finais.

O teor de enxofre total do petróleo é excelente indicativo do tratamento necessário aos seus derivados. De forma geral, quanto mais pesado for o petróleo, maior será seu teor de enxofre, embora ocorram muitas exceções, como em alguns petróleos brasileiros (FARAH, 2012).

De acordo com o teor de enxofre, o óleo é classificado ainda em:

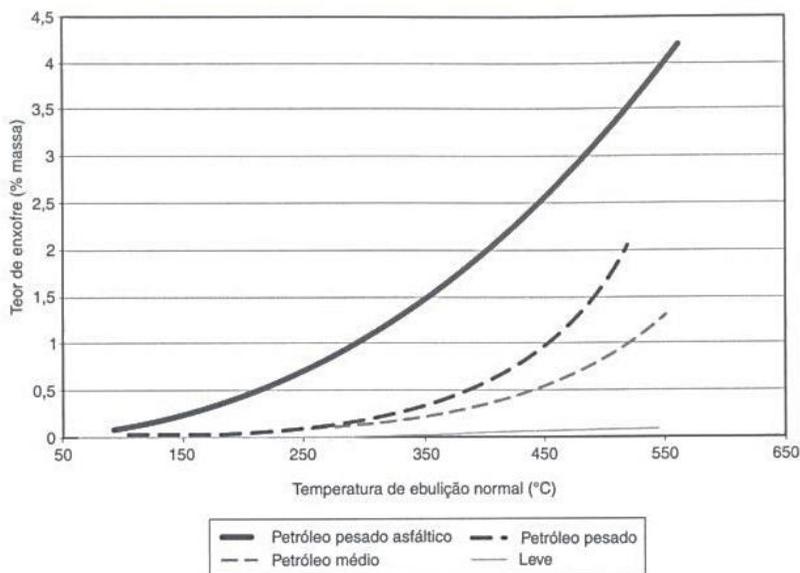
- ✓ Óleo doce - apresenta baixo conteúdo de enxofre (menos de 0,5 % de sua massa);
- ✓ Óleo ácido - apresenta teor elevado de enxofre (bem acima de 0,5 % de sua massa).

Os petróleos ácidos são os que possuem compostos de enxofre em alta percentagem, tendo cheiro peculiar. Estes contêm gás sulfídrico, que é perigosamente tóxico. Chaminés, filtros e outros dispositivos evitam a emissão de gases, vapores e poeiras para a atmosfera; unidades de recuperação retiram o enxofre dos gases, cuja queima produziria dióxido de enxofre, um dos principais poluentes dos centros urbanos (THOMAS, 2004).

Panda *et al.* (2007) descrevem que as características estruturais dos compostos sulfurados que podem ter influência sobre a resistência a hidrodessulfurização aumentam na seguinte ordem: sulfetos < tiofeno <

benzotiofeno < benzonaftiofeno < tetrahidro benzonaftiofeno < dibenzotiofeno. A quantidade de enxofre presente no petróleo aumenta as temperaturas de ebulição como mostra a Figura 2, elevando-se assim os gastos no processo de destilação. As refinarias vêm sendo renovadas para processar petróleos brasileiros com baixo teor de enxofre que dão origem a combustíveis menos poluentes.

Figura 2. Teor de enxofre em frações de petróleos de diferentes tipos.



Fonte: FARAH (2012).

Existem muitos processos de dessulfurização, o mais utilizado é a hidrodessulfurização (HDS). A remoção de enxofre do petróleo bruto e de suas frações é conduzida a altas temperaturas, sob pressão de hidrogênio e com uso de catalisadores do tipo Co-Mo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e Ni-Mo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ocorrendo a conversão de compostos sulfurados a H<sub>2</sub>S e hidrocarbonetos. A principal limitação do processo de HDS é que ele não é igualmente efetivo para todos os compostos sulfurados. Apesar de ser bastante eficaz para destilados de baixo e médio ponto de ebulição, a

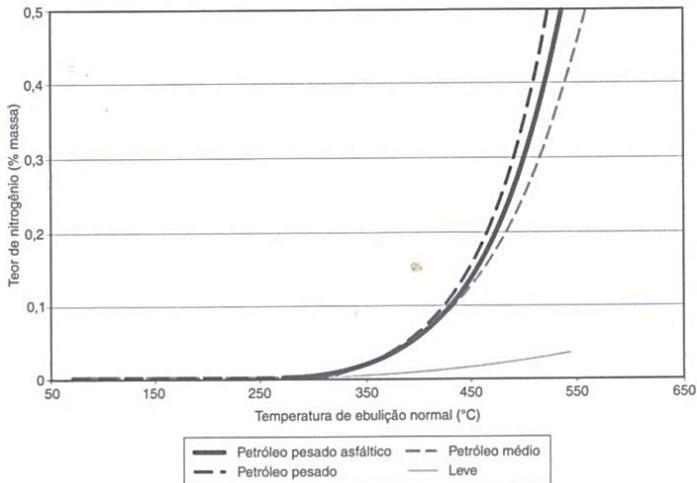
HDS não é eficiente para frações pesadas como gasóleo pesado (GOP) e resíduo de vácuo (RV) (ABADIE, 2002).

### 2.1.2.2 Compostos Nitrogenados

Os compostos nitrogenados se apresentam no petróleo, quase que em sua totalidade, na forma orgânica, podendo ocorrer uma pequena transformação em  $\text{NH}_3$ , quando submetido ao processo de hidrocrackeamento (HC). São responsáveis por problemas como desativação de catalisadores de craqueamento, formação de gosmas, depósitos de resíduos e alteração de cor em frações do petróleo, além da poluição ambiental. Em óleo diesel, estes compostos causam envenenamento de catalisadores, que atuam como pró-oxidantes formando gomas e causando mau cheiro, além de contribuírem para as emissões gasosas, causando poluição atmosférica (MÜHLEN, 2007).

A quantidade de compostos nitrogenados presentes no petróleo afeta a temperatura de ebulição do mesmo como mostra a Figura 3. O principais compostos encontrados são: piridinas, quinolinas, benzoquinolinas, azacarbazóis, pirróis, indóis, carbazóis e amidas.

Figura 3. Teor de nitrogênio em frações de diferentes tipos de petróleos.



Fonte: FARAH (2012).

### 2.1.3 Gasóleo Pesado (GOP)

Em suma, na destilação atmosférica, o petróleo é aquecido e fracionado em uma torre, de onde são extraídos, por ordem crescente de densidade, gases combustíveis, GLP, gasolina, nafta, solventes e querosenes, óleo diesel e um óleo pesado, chamado de resíduo atmosférico, extraído pelo fundo da torre. Este resíduo é reaquecido e enviado para outra torre onde o fracionamento se dá a uma pressão abaixo da atmosférica, sendo então extraída mais uma parcela de óleo diesel e um produto chamado genericamente de gasóleo. O resíduo de fundo desta destilação, a vácuo, pode ser especificado como óleo combustível ou asfalto, ou até mesmo servir como carga de outras unidades mais complexas de refinação, sempre com o objetivo de se produzir produtos mais nobres do que a matéria-prima que os gerou (LAFAY, 2005).

Visando-se auferir um aumento da qualidade intrínseca do produto, outras etapas se fazem necessárias, como a destilação a vácuo, craqueamento térmico ou catalítico, etc., além dos processos de tratamento, onde são retiradas as substâncias indesejáveis do produto (enxofre, nitrogênio, amônia, etc.) (ABADIE, 2002).

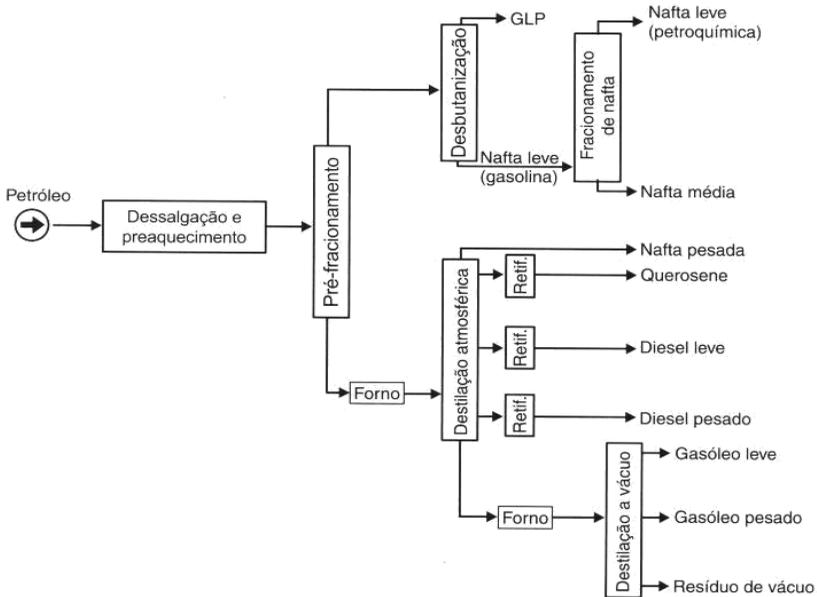
A separação dos componentes do petróleo é realizada por grupos de componentes dentro de uma faixa de destilação. Este conjunto de componentes misturados numa única faixa recebe o nome de fração (SANTESTEVAN, 2008).

Após a retirada das frações mais leves através da destilação atmosférica, o resíduo da destilação atmosférica (RAT) que é rico em compostos pesados, passa a ser utilizado como carga para a unidade de fracionamento a vácuo. Esta destilação a vácuo permite a separação de outras frações comercialmente interessantes, tais como gasóleo leve (GOL), gasóleo pesado (GOP) e gasóleo residual (GOR). O resíduo da destilação a vácuo se constitui em uma fração denominada resíduo de vácuo (RV) (MÜHLEN, 2007).

A coluna de destilação de vácuo passou a ser incorporada à unidade de destilação com a finalidade de obter frações mais leves, presentes no resíduo da destilação atmosférica.

Os processos de fracionamento à pressão atmosférica e a vácuo estão ilustrados na Figura 4.

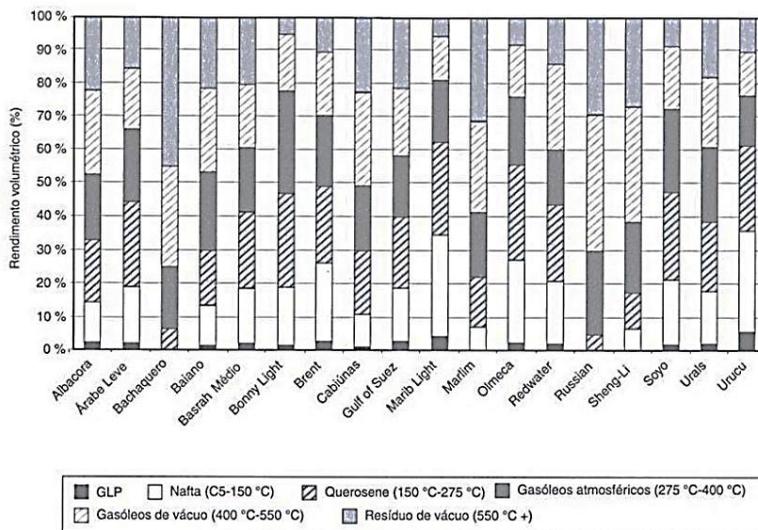
Figura 4. Esquema das torres de destilação para a obtenção da fração estudada



Fonte: FARAH (2012).

Os gasóleos de vácuo são produtos intermediários e compõem as correntes de alimentação de Unidades de Craqueamento Catalítico (UCC) ou formam frações lubrificantes, segundo esquemas de refinis para produção de combustíveis ou lubrificantes, respectivamente. Apesar de compor grande parte do produto da destilação, como demonstra a Figura 5, essas frações começaram a ser obtidas na destilação de petróleo apenas quando a indústria automobilística passou a exigir combustível em quantidade superior e de elevada qualidade (ABADIE, 2002).

Figura 5. Características de petróleos: rendimento das frações básicas.



Fonte: FARAH (2012).

## 2.2 BIORREMEDIAÇÃO

As recentes regulamentações e as tentativas de diminuir a liberação de compostos tóxicos, fez com que seja limitada a concentração máxima de enxofre presente nas frações de combustíveis, e com a constante diminuição da qualidade nas reservas de petróleo, fazem com que a remoção do enxofre seja a principal preocupação das refinarias (MARIANO, 2001).

Além dos altos níveis de poluentes industriais gerados, o uso de pesticidas e da poluição gerada pelo acúmulo de poluentes de petróleo: benzeno, óxidos de enxofre, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS), entre outros, acabam acumulando-se no solo, rios e lagos, e não são tratados adequadamente. A fim de evitar a contaminação e facilitar a degradação destes poluentes, novos processos têm sido desenvolvidos.

O processo de biorremediação envolve o uso de agentes biológicos, tais como micro-organismos, em descontaminação e desintoxicação de poluentes químicos do ambiente. Os principais agentes

biológicos utilizados são enzimas produzidas por micro-organismos, mas no campo podem também ser usadas associações bacterianas com plantas (MALAJOVICH, 2011).

### **2.2.1 Biodessulfurização**

Alguns níveis de tolerância exigidos pela legislação chegam a representar uma remoção de 99,99% do enxofre contido em um óleo cru típico. Para tal, as indústrias têm utilizado processos chamados de hidrodessulfurização profunda e hidrodessulfurização ultra profunda. Todavia, reconhece-se que os processos de hidrogenação catalítica existentes não são capazes de atender os níveis de remoção exigidos, e isso vem impulsionando inúmeras pesquisas a fim de se encontrar uma solução para tal problema (OYAMA *et al.*, 2008).

Uma das alternativas para substituir e/ou complementar o processo de HDS é o processo biológico denominado de biodessulfurização (BDS). Na BDS utilizam-se micro-organismos para degradar os compostos organossulfurados presentes nos combustíveis fósseis. Como os micro-organismos atuam ao nível da remoção do enxofre ligado covalentemente a matrizes orgânicas, este processo torna-se mais eficaz para a dessulfurização dos combustíveis fósseis do que a HDS (ALVES, 1999).

A BDS é um processo que remove enxofre a partir de combustíveis fósseis, como o petróleo, utilizando uma série de reações enzimáticas. Este processo também permite o armazenamento de enxofre orgânico como combustível fóssil.

A biodessulfurização apresenta-se como uma tecnologia alternativa pela grande especificidade de enzimas produzidas por micro-organismos, e com baixos custos da biotransformação. No caso da remoção de enxofre dos combustíveis é seletiva, visto que minimiza o consumo de energia e potencializa a remoção dos compostos sulfurados (SANCHEZ *et al.*, 2004).

A dessulfurização permite a redução do teor de enxofre no petróleo. Reduzindo as emissões de poluentes atmosféricos. No entanto, este possui uma grande desvantagem quando se considera os processos convencionais de tratamento: o elevado custo de operação do processo usado nas refinarias para eliminar o enxofre. A hidrodessulfurização processa a alta pressão (150-250 psig) e a alta temperatura (200 –

425 °C), que usa gás de hidrogênio para reduzir o enxofre a partir de frações de petróleo, especialmente diesel, resultando sulfeto de hidrogênio, que é separado do combustível. Este processo não remove todas as moléculas de enxofre, o enxofre heterocíclico poliaromático (PASHS) não é removido das frações petrolíferas pesadas. Estas limitações tecnológicas e uso econômico tem colocado o uso de micro-organismos como opção mais viável para a remoção de contaminantes (ABADIE, 2002).

É possível que a forma mais rentável e eficiente de operação seja a utilização de processos mistos, HDS e BDS, no qual o óleo é submetido a um pré-tratamento de HDS para reduzir o teor de enxofre para 200-300 ppm, e um tratamento subsequente por BDS visando diminuir esse conteúdo abaixo de 50 ppm, e este só deve agir em um pequeno número de compostos de enxofre, os quais são mais difíceis de serem removidos pela HDS (SANCHEZ *et al.*, 2004).

Embora desde 1950 os EUA tenha a patente do processo de biodessulfurização, até o momento nenhum é amplamente usado em processos industriais. Alternativamente ao uso de células intactas, a utilização de enzimas livres ou imobilizadas tem sido objeto de patentes para aplicação em processos de biodessulfurização. Algumas empresas empregam biodessulfurização. Desde 1992, a americana “Energia BioSystems Corporation” tem investido em processos microbiológicos para biodessulfurização, a qual desenvolveu uma instalação piloto onde pode dessulfurizar até 5 barris de petróleo por dia (ALVES *et al.*, 1999).

Há mais de quatro décadas que se desenvolveu o conceito de utilizar micro-organismos na remoção do enxofre de combustíveis fósseis. Isso ocorreu quando se descobriram micro-organismos acidófilos capazes de oxidar compostos sulfurosos como o *Acidianus*, *Sulpholobus* e o *Thiobacillus*. No entanto, os primeiros estudos não apresentaram resultados satisfatórios. Somente nesta última década é que esta área mostrou um desenvolvimento significativo (SANCHEZ *et al.*, 2004).

Inicialmente, focou-se na utilização do dibenzotiofeno (DBT) como um composto modelo nos processos de dessulfurização, em virtude de que o DBT e os derivados de DBT representam a maior proporção de enxofre tiofênico no petróleo e seus destilados, e de que os DBTs alquil-substituídos são os mais difíceis de remover entre todos os compostos

organossulfurados (alguns deles resistem até mesmo ao tratamento com HDS ultra profunda) (OLDFIELD *et al.*, 1998).

Inúmeros micro-organismos, pertencentes a diferentes gêneros, já se mostraram capazes de remover o enxofre presente no DBT como, por exemplo, *Brevibacterium* sp. (AFFERDEN *et al.*, 1990), *Corynebacterium* sp. (MAGHSOUDI *et al.*, 1999), *Rhodococcus* sp. (MAGHSOUDI *et al.*, 2001), *Paenibacillus* sp. (IZUMI *et al.*, 2001), *Pseudomonas* sp. (KEULEN *et al.*, 1998), *Gordonia* sp. (CHANG *et al.*, 2001) e *Bacillus* sp. (KIRIMURA *et al.*, 2000). No entanto, os produtos obtidos ao final do processo de BDS nem sempre são os mesmos e, com isso, nem todos são vantajosos financeiramente, tanto quando se pensa nos custos para removê-los definitivamente, quanto na diminuição do potencial energético do combustível processado.

A divergência na formação dos produtos pelos micro-organismos supracitados se deve, principalmente, às diferentes vias metabólicas utilizadas por cada um deles no processo de BDS, dentre as quais se destacam três: A via Kodama descrita em 1970, a via Van der Afferden descrita em 1990 e a 4S descoberta após estudos com *Rhodococcus* na década de 90.

Na via de Kodama, o esqueleto carbônico do DBT é parcialmente oxidado e clivado, com a ligação do carbono, o enxofre permanece intacto, esta via também é referida como “degradação do DBT”, para distinguir da “dessulfurização do DBT” (SILVA, 2009).

Em 1990, Van Afferden propôs uma via metabólica diferente (utilizando como micro-organismo a *Brevibacterium* sp.), na qual o DBT é convertido a benzoato e sulfito, que por sua vez é oxidado a sulfato, por oxidação abiótica. Então, o benzoato é totalmente mineralizado a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O). Assim, o DBT é utilizado como nutriente pela bactéria como fonte de carbono e enxofre (AFFERDEN *et al.*, 1990). Esta via de degradação do DBT não é muito interessante para os processos de BDS de combustíveis fósseis, uma vez que a mineralização completa da estrutura carbonada implicará necessariamente em uma diminuição da energia química dos combustíveis (ALVES *et al.*, 1999).

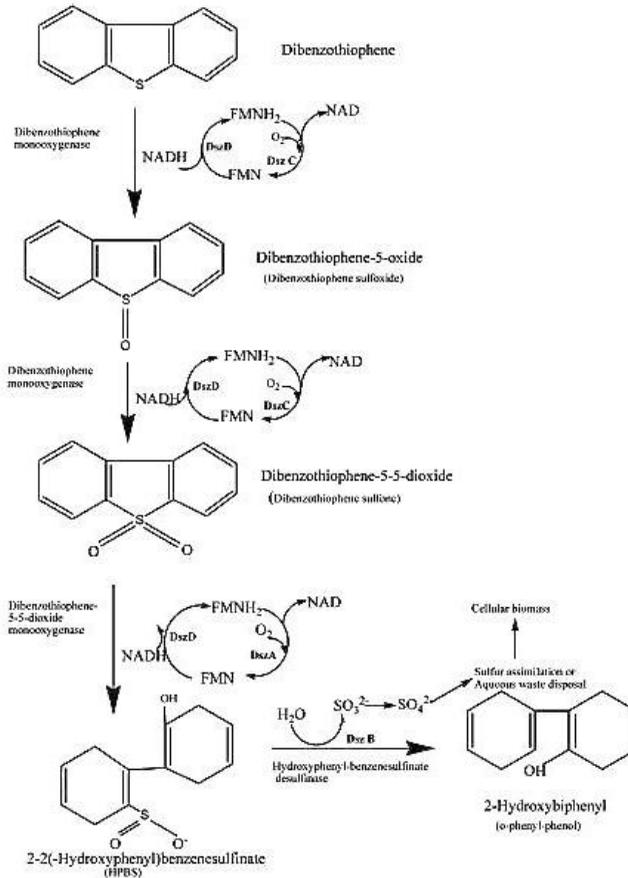
Outra forma é a via metabólica representada na Figura 6, a via sulfóxido-sulfona-sulfonato-sulfato, mais conhecida como “4S”, foi apresentada pela primeira vez por Kilbane (1999). Trata-se de uma via específica para a remoção do átomo de enxofre presente no DBT, em que

o grupo tiofênico sofre um ataque oxidativo progressivo. Esta via envolve um sistema multienzimático, com três atividades diferentes (GRAY *et al.*, 1996).

A primeira enzima é uma monooxigenase do DBT, que oxida o DBT a 5,5'-dióxido de DBT em dois passos; a segunda enzima é também uma monooxigenase que converte o 5,5'-dióxido de DBT em 2'-hidroxibifenilo-2-sulfinato e, finalmente, uma liase que catalisa a quebra da ligação C-S transformando o 2'-hidroxibifenilo-2-sulfinato em dois produtos finais, 2-hidroxibifenila (2-HBP) e sulfato.

A via "4S" é a mais adequada para o processo de BDS, uma vez que o átomo de enxofre é removido do DBT sob a forma de um produto tratável (sulfato), apresentando uma pequena perda de seu valor energético. As linhagens que se utilizam dessa têm sido extensivamente estudadas a fim de se obter uma ferramenta biológica que seja de fundamental importância no tratamento em larga escala dos combustíveis fósseis (WANG & KRAWIEC, 1994).

Figura 6. Via metabólica “4S” da degradação do composto DBT.



Fonte: GUPTA *et al.* (2005).

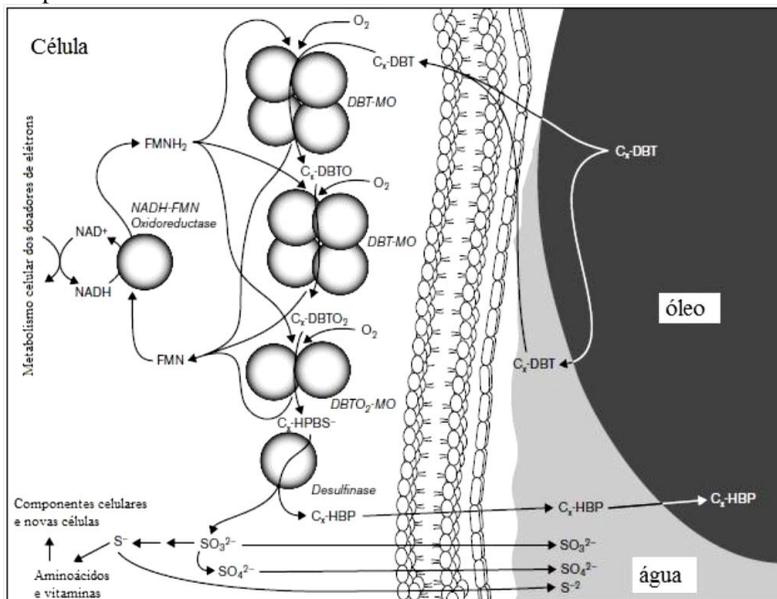
A maioria dos trabalhos relacionados ao processo de BDS realizados na última década focou-se no metabolismo de compostos heterocíclicos de enxofre, particularmente do DBT, pelas linhagens de *Rhodococcus* sp. Esta espécie parece ser a mais apropriada ao metabolismo de compostos organossulfurados. Folsom *et al.* (1999), por exemplo, consolidam em seu trabalho a capacidade do *Rhodococcus* sp. de

fazer uso da via metabólica “4S” para remover o enxofre de compostos benzo-alkilados e dibenzotiofenos (Cx-BT e Cx-DBT).

Além da capacidade de degradar o DBT pela via “4S”, o *Rhodococcus* sp. possui uma característica hidrofóbica, o que faz com que, em um sistema bifásico óleo/água, essa bactéria fique na interface. Isso significa que as linhagens de *Rhodococcus* são capazes de acessar os compostos extremamente hidrofóbicos de Cx-DBTs diretamente no óleo, enquanto que outras espécies como a *Pseudomonas* só conseguem acessar esses compostos (em quantidade muito inferior) na fase aquosa. Tal atributo melhora expressivamente a taxa de transferência de massa, aumentando assim o percentual de degradação do DBT.

Na Figura 7 tem-se um diagrama conceitual de alguns passos da dessulfurização do óleo, onde se observa que o micro-organismo é capaz de acessar os compostos Cx-DBTs tanto na fase aquosa quanto na orgânica (MONTICELLO, 2000).

Figura 7. Diagrama conceitual de algumas etapas da dessulfurização de compostos Cx-DBTs.



Fonte: MONTICELLO (2000).

Outra característica interessante das linhagens de *Rhodococcus* é a sua capacidade de sobreviver aos efeitos tóxicos de muitos solventes, adaptando sua membrana celular a fim de manter funções biológicas essenciais. Mudanças na composição dos ácidos graxos da membrana, com vistas a manter a mesma fluidez da membrana, parece ser a maior resposta dessa bactéria a compostos altamente tóxicos (HEIPIEPER *et al.*, 1994; CARVALHO *et al.*, 2005a). Isso faz com que o *Rhodococcus* cresça, sem maiores problemas, na presença da maioria dos n-alcenos, alcoóis, terpenos e óleo diesel, conforme descrito por Carvalho *et al.* (2004, 2005a, 2005b, 2005c, 2009), Guchhait *et al.* (2005) e Maghsoudi *et al.* (2001).

Sulfatases são um grupo diverso de enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica de um éster sulfato, resultando na liberação de sulfato inorgânico com o álcool correspondente. A alquilsulfatase (EC 3.1.6.X), *Rhodococcus ruber* (DSM44541), tem uma alta seletividade na hidrólise de sec-alquilsulfatos, resultando em álcool, éster e seu éster sulfato correspondente não reativo.

Castorena *et al.* (2002) mostram que a estirpe *Rhodococcus* sp. IMP-S02 é capaz de dessulfuração 4,6-DBT, que é um derivado de DBT, que é muito difícil de ser removido, com 60% de rendimento.

Atividades que envolvem micro-organismos do gênero *Rhodococcus* são diversas: estes são capazes de degradar limoneno, ciclohexanol, atrazina, dibenzotiofeno (DBT), éter metil butílico terciário, acetileno, benzonitrila, estireno e acrilonitrila e possuem uma alta atividade enzimática, sulfatase e nitrilases além de possuir uma grande especificidade isomérica. E estão relacionados com uma variedade de processos de biodegradação de solos contaminados com hidrocarbonetos (SANCHEZ *et al.*, 2004).

Um estudo realizado pela Cavalca *et al.* (2002), com a estirpe de *Rhodococcus* sp. demonstra que quando inoculada em solo contaminado com naftaleno, onde não afete a população nativa do solo, o mesmo mantém o crescimento e degrada o naftaleno. Ferraroni *et al.* (2002) relataram a presença da enzima 4-clorocatecol-1-2-oxigenase R. ICP densos, enzimas envolvidas na degradação aeróbica de compostos organoclorados, particularmente na biotransformação clorofenol.

Polissacarídeos extracelulares do *R. rhodochrous* estimulam a degradação de compostos aromáticos no petróleo bruto (light árabe) por

bactérias marinhas. Iwabuchi *et al.* (2002) informaram que o polissacarídeo, constituído por D -glucose, ácido D- glucurônico D-manose e lipídico do ácido, estimula degradação de petróleo bruto (AF), adicionando-o a um meio nutritivo com água do mar e AF, o mesmo é emulsionado, permitindo o crescimento bacteriano e a degradação do óleo bruto. Na ausência do polissacarídeo não tem crescimento bacteriano, por conseguinte, nenhuma degradação óleo. As implicações deste polissacarídeo em processos de biorremediação são grandes.

### 2.3 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Existem muitos estudos reportados na literatura sobre a aplicação de micro-organismos na biorremediação, em especial para a remoção de compostos sulfurados e na decomposição de compostos orgânicos. No entanto, a maioria dos estudos são realizados em meio sintético ou com frações finais do processo.

Os resultados desta pesquisa serão de grande relevância para determinar a viabilidade técnica do uso do *Rhodococcus erythropolis* na remoção de compostos sulfurados e nitrogenados através do processo de biorremediação, visando à descontaminação dos derivados de petróleo.

Para a implementação de uma nova tecnologia de remoção de enxofre e nitrogênio, deve ser estabelecida uma série de requisitos para competitividade técnica e econômica do processo como: a elevada eficiência na remoção destes compostos pelo micro-organismo, elevada capacidade de adaptação ao meio (fase lag menor possível), não apresentar produção secundária de produtos mais tóxicos, apresentar baixo custo de operação e serem adaptáveis a diferentes configurações nas refinarias.

Segundo MCFARLAND (1999), o uso de micro-organismos vem tornando-se uma aplicação viável, tanto do ponto de vista técnico como econômico, uma vez que permite um menor custo de operação e instalação.

A principal contribuição desse trabalho é o estudo da capacidade de aplicação do *Rhodococcus erythropolis* para remoção de compostos sulfurados e nitrogenados presentes em gasóleo pesado. A biorremediação dos diferentes compostos, considerando os sistemas água/óleo será avaliada em batelada e em diferentes concentrações.

Também serão realizados ensaios para a otimização do crescimento do micro-organismo, com o objetivo de alcançar a maior concentração de células com a menor quantidade de meio de crescimento.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e equipamentos empregados no desenvolvimento dos ensaios laboratoriais realizados, bem como as principais metodologias utilizadas.

Os procedimentos envolvendo a otimização das condições experimentais para o crescimento do micro-organismo envolveram as etapas de inoculação e crescimento, análise do crescimento, fermentação em reatores descontínuos contendo variação de 0 a 100% (m/m) da mistura óleo/água e análises do teor de enxofre dos compostos após fermentação.

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa-LABMASSA do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As análises de CHNS das amostras de gasóleo foram realizadas no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e as análises de microscopia de ótica foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica-ENGEBIO do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

#### 3.1 MATERIAIS UTILIZADOS

##### 3.1.1 Micro-organismo

A partir de estudos realizados por Li *et al.* (2008); Yu *et al.* (2006); Carvalho *et al.* (2005); Maghsoudi *et al.* (2001); Izumi *et al.* (1994); optou-se pela utilização do micro-organismo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 para a realização dos ensaios de dessulfurização, uma vez que tais autores destacam a capacidade do mesmo em remover significativas quantidades de enxofre de compostos modelo como o DBT bem como de combustíveis fósseis reais como o diesel e a gasolina. Tal bactéria foi adquirida da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas, São Paulo.

### 3.1.2 Meio de Manutenção

O meio Yeast Malt Extract Agar (YMA) foi escolhido por ter sido sugerido como o melhor meio de manutenção pela própria Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello. A composição do meio YMA é descrita a seguir na Tabela 2.

Tabela 2. Composição do meio de manutenção YMA.

<b>Composto</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
Extrato de Levedura (YE)	Biolife	4,0
Extrato de Malte (ME)	Biolife	10,0
Glicose	Vetec	4,0
CaCO <sub>3</sub>	Nuclear	2,0
Ágar	Himedia	20,0

### 3.1.3 Meio de Cultura

Para o inóculo empregou-se o meio YMA (Tabela 2) sem ágar (YM), uma vez que se desejava um meio líquido. O mesmo se deu no meio de crescimento, no entanto, visando à produção das enzimas “dessulfurizantes” suplementou-se o meio com 0,5 mM de DBT (MA *et al.*, 2006).

### 3.1.4 Meio de Fermentação

O meio de fermentação empregado foi o YM modificado, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Composição do meio de fermentação YM modificado.

<b>Composto</b>	<b>Marca</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
Extrato de Levedura (YE)	Biolife	4,0
Extrato de Malte (ME)	Biolife	10,0
Glicose	Vetec	4,0
CaCO <sub>3</sub>	Nuclear	2,0

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Reativação das Células de *Rhodococcus erythropolis* Liofilizadas

Primeiramente desinfetou-se a ampola contendo as células liofilizadas com gaze embebida em etanol 70%. Em seguida riscou-se a mesma com uma caneta com ponta de diamante na altura média do tampão de algodão permitindo, assim, a quebra da ampola no local onde foi riscada pela caneta. Em ambiente asséptico removeu-se o tampão de algodão da ampola com o auxílio de uma pinça e adicionou-se 0,2 mL de água destilada (estéril) no interior da ampola.

Após a abertura da ampola, as células de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 foram reativadas despejando-se o conteúdo da ampola em um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de meio YM obtendo-se assim uma suspensão das células que permaneceram no tubo por aproximadamente 15 min a fim de se reidratarem.

Uma vez reidratadas, as células foram incubadas em meio YM por 24 h em incubadora refrigerada com agitação (marca TECNAL, modelo TE-424) a 28 °C e 150 rpm. A partir da cultura crescida no caldo, as células foram transferidas para placas de Petri contendo meio de manutenção YMA e deixadas em incubadora a 28 °C por 48 h. Decorrido este tempo, as placas de Petri foram armazenadas em geladeira a 10 °C.

### 3.2.2 Determinação da Concentração Celular

#### 3.2.2.1 Turbidimetria

Inocularam-se duas alças de células da cultura estoque em um frasco Erlenmeyer contendo meio de manutenção YM previamente autoclavado a 121 °C por 20 min. O meio inoculado permaneceu em incubadora a 28 °C e 150 rpm por 24 h. Posteriormente, transferiu-se 5% (v/v) do inóculo para outro frasco Erlenmeyer contendo meio de crescimento YM esterilizado. Este permaneceu em incubadora a 28 °C e 150 rpm por 48 h.

Decorrido esse tempo, utilizou-se uma alíquota do meio de crescimento (diluição 1:10) para fazer uma varredura automática no

espectrofotômetro UV-Vis (marca Shimadzu, modelo UV-1240) a fim de se determinar o comprimento de onda ideal para se efetuar as leituras. O comprimento de onda que apresentou maior absorvância foi o de 600 nm.

Uma vez determinado o comprimento de onda a ser utilizado nas leituras foram preparadas diferentes diluições (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10) do meio de crescimento contendo as células de *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 para que com seus respectivos valores de absorvância fosse possível construir uma curva de calibração (MORITZ, 1998).

### 3.2.2.2 Determinação Gravimétrica da Concentração Celular

Como a turbidimetria é um método indireto para a determinação da concentração celular é necessário à utilização de um método direto como a gravimetria para a construção de uma curva de calibração absorvância versus concentração celular seja possível (MORITZ, 1998).

A determinação gravimétrica da concentração celular é expressa como massa de células secas por unidade de volume. Por isso, cinco alíquotas de 10 mL foram retiradas do meio de crescimento citado no item 3.2.2.1 e filtradas a vácuo através de uma membrana de acetato de celulose com poros de 0,45 µm previamente secas até atingirem uma massa constante em micro-ondas por aproximadamente 15 min. Após a filtragem, as membranas contendo as células foram novamente secas em micro-ondas por aproximadamente 15 min (até atingirem uma massa constante). A concentração de biomassa é obtida pela diferença entre a massa das membranas dividida pelo volume da alíquota, conforme a Equação 1 (MORITZ, 1998).

$$[X] \frac{g}{L} = \frac{M_{membrana\ final}(g) - M_{membrana\ inicial}(g)}{V_{Alíquota}(L)} \quad (1)$$

Com isso, a curva de calibração que correlaciona a absorvância com a concentração celular pôde ser construída. A curva obtida apresentou limites de linearidade obtendo um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,997. A curva de calibração obtida é apresentada no Apêndice A. Todas as concentrações celulares presentes neste trabalho foram determinadas por turbidimetria utilizando-se dessa curva de

calibração para converter os valores de absorvância em concentração celular.

### **3.2.3 Determinação da Curva de Crescimento Celular do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277**

De início foram inoculadas duas alçadas de células da cultura estoque em um frasco Erlenmeyer contendo meio de manutenção YM (previamente autoclavado a 121 °C por 20 min). O meio permaneceu em uma incubadora a 28 °C e 150 rpm por 24 h. Posteriormente transferiu-se 10% (v/v) do inóculo para outro frasco Erlenmeyer contendo meio de crescimento YM esterilizado. Neste instante retirou-se a primeira alíquota do meio de crescimento e leu-se sua absorvância no espectrofotômetro ( $\lambda=600$  nm); até que o crescimento do micro-organismo atingisse a fase estacionária.

Com os dados obtidos através desse método foi possível construir as curvas de crescimento do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 para o ensaio (Apêndice A) bem como identificar a fase log de cada curva de crescimento (Apêndice A).

### **3.2.4 Determinação da Concentração de Açúcares no Caldo Fermentativo pelo Método DNS**

Segundo Ghose (1987), deve-se misturar uma alíquota de 1 mL do caldo fermentativo com 1,5 mL do reagente DNS (descrito no item 2.1.3) e então se ferve esse montante em banho-maria por 5 min. Passado esse tempo, a amostra foi imediatamente resfriada. Assim que a mesma atingiu a temperatura ambiente realizou-se a leitura da absorvância no espectrofotômetro ( $\lambda=540$  nm).

Utilizando esta metodologia foram construídas duas curvas de calibração (Apêndice B), uma até 10 g L<sup>-1</sup> e outra até 2,0 g L<sup>-1</sup> de açúcar redutor, que visam relacionar a absorvância obtida com a concentração de açúcar no caldo fermentativo. As curvas obtidas apresentaram limites de linearidade com coeficientes de correlação (R<sup>2</sup>) iguais a 0,998 e 0,999, respectivamente.

### 3.2.5 Método da Macrodiluição em Caldo

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (OTROSKY *et al.*, 2008).

Conduziram-se os ensaios para determinação da CIM pelo método da macrodiluição em caldo utilizando diferentes concentrações de GOP em frascos Erlenmeyer fechado com rolhas de algodão.

Os experimentos com o GOP foram conduzidos em frascos Erlenmeyer contendo diferentes concentrações de meio de cultura YM e desse óleo, conforme apresentado na Tabela 2.3.

Tabela 4. Construção do ensaio para a determinação da CIM.

Concentração GOP (%)	Massa meio de cultura (g)	Massa GOP (g)
0	100	0
10	90	10
20	80	20
30	70	30
40	60	40
50	50	50
60	40	60
70	30	70
80	20	80
90	10	90
100	0	100

Esses Erlenmeyers permaneceram na incubadora a 28 °C por 30 h sob agitação de 150 rpm e as concentrações celulares obtidas ao término das 24 h foram comparadas à concentração final obtida no frasco controle. Em seguida foram transferidos 3,0 mL para um novo meio de crescimento, a fim de avaliar se o *Rhodococcus erythropolis* possui a capacidade de sobreviver em altas concentrações de GOP.

### **3.2.6 Dessulfurização por Células Livres de *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em Sistema Reacional Bifásico**

A primeira etapa na determinação da capacidade de dessulfurização do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 consistiu em inocular duas alçadas de células da cultura estoque em um frasco Erlenmeyer contendo meio de manutenção YM, o qual foi previamente autoclavado a 121 °C por 20 min. Na sequência deixou-se o inóculo na incubadora a 28 °C e 150 rpm por 24 h.

Na etapa seguinte, visando o aumento da massa celular total, transferiu-se 10% (v/v) do inóculo para um frasco Erlenmeyer contendo meio de cultura YM esterilizado (conforme item 3.2.2.1). A cultura permaneceu durante 18 h na incubadora a 28 °C e 150 rpm.

Posteriormente, o conteúdo do Erlenmeyer foi centrifugado (centrífuga marca Jouan, modelo B4I) a 7000xg durante 10 min, descartando-se o sobrenadante. As células centrifugadas foram então transferidas, em assepsia, para o frasco contendo o meio fermentativo, acrescido da fase orgânica a ser dessulfurizada.

O sistema de biocatálise era composto por duas fases: uma aquosa (o meio fermentativo YM) e outra orgânica (gasóleo pesado). Testaram-se dez concentrações distintas da fase orgânica: 10 - 100% (m/m), visando estabelecer seu impacto no percentual de dessulfurização. O sistema biocatalítico permanecia na incubadora por 30 h a 28 °C e 150 rpm. No final da fermentação foi realizado uma extração ácida com 0,2 M de ácido clorídrico, e o conteúdo do Erlenmeyer era centrifugado a 5000 rpm durante 10 min a fim de se obter uma separação das duas fases. Posteriormente a fase orgânica foi enviada para análise do enxofre e nitrogênio total.

### **3.2.7 Análise do Planejamento Experimental**

A etapa para avaliar a influência de cada variável foi realizada utilizando planejamento experimental e software STATISTICA 10. Os níveis de estudo de cada variável são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Fatores e níveis estudados no planejamento experimental  $2^{(6-1)}$ .

<b>Fatores</b>	<b>Nível</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
A	Extrato de Levedura ( $\text{g L}^{-1}$ )	2,0	4,0	6,0
B	Glicose ( $\text{g L}^{-1}$ )	2,0	4,0	6,0
C	Extrato de Malte ( $\text{g L}^{-1}$ )	5,0	10	15
D	$\text{CaCO}_3$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	1,0	2,0	3,0
E	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	24	28	32
F	Agitação (rpm)	100	150	200

Para a otimização construiu-se um novo planejamento adicionando pontos axiais e a construção de uma nova tabela. A Tabela 6 apresenta os níveis e os fatores estudados neste novo planejamento experimental.

Tabela 6. Fatores e seus respectivos níveis estudados na otimização.

<b>Fatores</b>	<b>Nível</b>	<b>-2</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+2</b>
A	Extrato de Levedura ( $\text{g L}^{-1}$ )	2,0	4,0	6,0	8,0	10
B	$\text{CaCO}_3$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	0,2	0,6	1,0	1,4	1,8
C	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	20	22	24	26	28
D	Agitação (rpm)	130	160	190	220	250

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

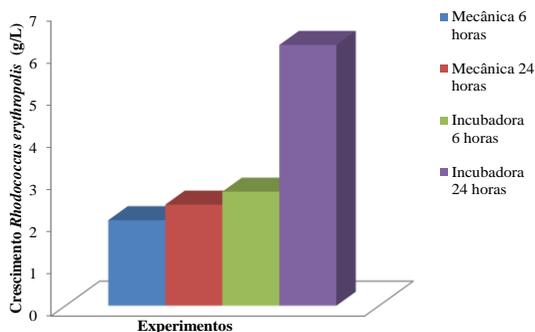
Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais do estudo em batelada para a remoção de compostos sulfurados e nitrogenados do gasóleo pesado (GOP). Destaca-se também a otimização do meio de crescimento, etapa prévia ao estudo da dessulfurização e desnitração.

### 4.1 INFLUÊNCIA DO TIPO DE AGITAÇÃO NO CRESCIMENTO DE *Rhodococcus erythropolis*

Na tentativa de utilizar outras formas de agitação, agitação mecânica (reator CSTR) e agitador orbital, buscou-se testar a influência desta variável no crescimento do *Rhodococcus erythropolis*, visando ampliar a aplicabilidade dessa bactéria no âmbito industrial, principalmente quando se pensa em processos petroquímicos, onde é exigida uma maior força mecânica, e sem a utilização de um suporte para o micro-organismo.

Na Figura 8 observa-se o crescimento do *R. erythropolis* em dois momentos, após 6 e 24 horas de inoculação, em dois tipos de agitação, mecânica realizada por uma hélice em contato com o micro-organismo (CSTR) e orbital na incubadora, ambas a 200 rpm.

Figura 8. Comparação no crescimento de *Rhodococcus erythropolis* sob diferentes formas de agitação e tempo de inoculação.



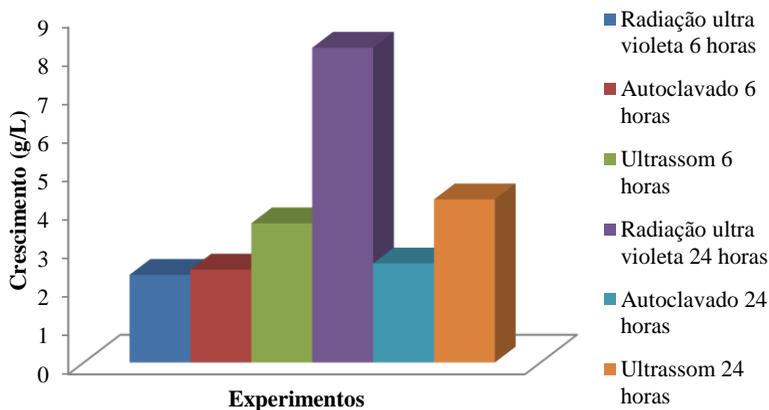
Foi possível observar que o *R. erythropolis* não foi capaz de se desenvolver na agitação realizada pela hélice. Isso ocorreu provavelmente devido ao fato de sua parede celular não suportar o impacto causado. TINOI *et al.* (2005) verificaram que em taxas de agitação baixas (100 a 150 rpm) tem-se menor crescimento celular de *Rhodotorula glutinis*, devido à diminuição da disponibilidade de nutrientes na superfície das células. Ao contrário, em altas taxas de agitação (>250 rpm) ocorreu ruptura celular da mesma.

Outro fator analisado previamente para a realização dos experimentos foi o tipo de esterilização a ser submetido no GOP. Foram testados 3 formas de esterilização: Autoclave, Câmara UV e Câmara UV com ultrassom, sob diferentes condições, explicitadas abaixo.

- Autoclave: 20 minutos a 121 °C;
- Câmara UV: 60 minutos;
- Câmara UV: 60 minutos seguidos de 60 minutos com ultrassom.

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos nestes testes.

Figura 9. Gasóleo pesado sob influência de diferentes formas de esterilização.



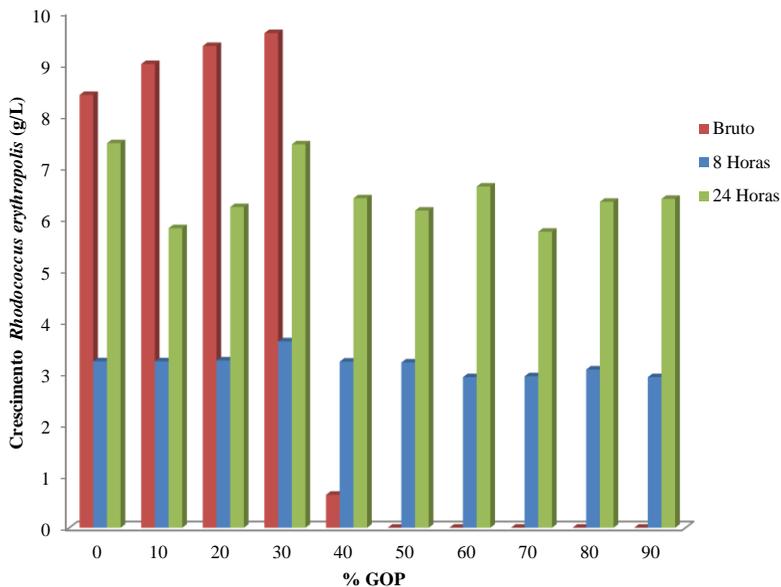
Através desta foi possível observar que mesmo sem a adição do *R. erythropolis* ocorreu o crescimento de micro-organismos nas amostras que foram colocadas somente na câmara UV. Vasconcelos (2006) obteve a recuperação de 92 linhagens de bactérias aeróbias presentes em águas residuais de refinarias. Dentre as isoladas as bactérias do gênero *Bacillus* se destacaram pela quantidade. Também foram encontradas *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Brevibacillus*.

Vários autores relatam sobre comunidades microbianas de petróleo e micro-organismos que utilizam hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia (TOLEDO *et al.*, 2006), assim é necessário que o meio esteja asséptico a fim de evitar que estas bactérias presentes interfiram no crescimento do *R. erythropolis*. Linhagens de *Bacillus* sp., em geral, são ditas como degradadoras secundárias, ou seja, assimilam os metabólitos produzidos por bactérias tidas como degradadoras primárias, iniciando o processo de biotransformação de hidrocarbonetos (DUTEAU *et al.*, 1998).

Porém este estudo preliminar é um método qualitativo, tornando assim necessários a realização de estudos mais aprofundados, a fim de determinar formas eficientes da esterilização do GOP, ou quais micro-organismos estão presentes no GOP.

Também foram realizados testes preliminares a fim de verificar se o *R. erythropolis* realmente era capaz de crescer em meios que contêm GOP. Acompanhou-se o crescimento para vários percentuais água/gasóleo, como mostra a Figura 10. É possível observar que nas amostras brutas, em que não ocorreu a formação de emulsão, a adição de GOP ajudou no crescimento do *R. erythropolis*.

Figura 10. Comparação no crescimento do *Rhodococcus erythropolis* em meios com diferentes proporções de gasóleo pesado.



Por apresentar uma característica hidrofóbica, o *R. erythropolis* é capaz de em sistema bifásico óleo/água, permanecer na interface. Isso significa que as linhagens de *Rhodococcus* são capazes de acessar os compostos extremamente hidrofóbicos diretamente no óleo, e assim não inibir o crescimento. Além disso, a quantidade de carbono disponível no meio pode ser utilizada como fonte de carbono para o crescimento microbiano.

A fácil adaptação do micro-organismo a meios complexos se deve ao fato de que essas bactérias podem modular a viscosidade de lipídios da membrana para manter ou aumentar a fluidez da mesma através da diminuição do grau de saturação, através do aumento da razão *cis/trans* dos ácidos graxos, e aumentando a quantidade relativa de ácidos graxos ramificados (WHYTE *et al.*, 1999). Maass (2011) observou o mesmo comportamento quando da utilização de *R. erythropolis* na dessulfurização de óleo diesel A S1800.

Com a análise dos dados definiu-se autoclavar o gasóleo pesado, tendo em vista a alta quantidade de micro-organismos no mesmo. Optou-se por utilizar a agitação orbital em incubadora devido ao maior crescimento obtido.

#### 4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Como uma etapa preliminar do estudo, realizou-se um planeamento experimental para analisar o comportamento do crescimento do *R. erythropolis* em sistema batelada, frente a alguns fatores delimitados em níveis pré-definidos.

O primeiro passo consistiu na triagem de variáveis, onde se estudou a influência dos seguintes fatores no crescimento celular: A) Concentração de extrato de levedura ( $\text{g L}^{-1}$ ); B) Concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ); C) Concentração de extrato de malte ( $\text{g L}^{-1}$ ); D) Concentração de  $\text{CaCO}_3$  ( $\text{g L}^{-1}$ ); E) Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ); F) Agitação (rpm).

O planeamento  $2^{6-1}$  corresponde a 1/2 do planeamento completo  $2^6$ , e por isso mesmo só produz  $2^5$  observações independentes, que são as repostas dos 32 ensaios e 4 ensaios no ponto central. Os níveis foram definidos com base no meio de crescimento YM já utilizado.

A Tabela 7 apresenta os níveis estudados para cada fator, a matriz de planeamento fatorial parcial  $2^{6-1}$  e as repostas obtidas para cada ensaio em termos de crescimento celular.

Na Tabela 8 apresentam-se os valores obtidos para os efeitos referentes aos fatores concentração de extrato de levedura, concentração de  $\text{CaCO}_3$ , concentração de extrato de malte, concentração de glicose, agitação e temperatura e seus respectivos índices estatísticos. Para a análise do crescimento fez-se a diferença entre a concentração inicial e a concentração em 18 horas, tempo em que o *R. erythropolis* atinge a fase estacionária.

Analisando-se as Tabelas 8 e 9 e a Figura 11 verifica-se que os termos lineares da concentração de extrato de levedura,  $\text{CaCO}_3$ , agitação, temperatura e a interação entre os dois termos lineares (1) e (6) são significativos, onde o  $\text{CaCO}_3$  juntamente com o extrato de levedura são fatores que possuem maior efeito sobre o crescimento.

Tabela 7. Planejamento experimental fatorial parcial  $2^{(6-1)}$  e as respostas em termos de crescimento celular.

<b>Exp.</b>	<b>A (g/L)</b>	<b>B (g/L)</b>	<b>C (g/L)</b>	<b>D (g/L)</b>	<b>E (°C)</b>	<b>F (rpm)</b>	<b>Crescimento (g/L)</b>
1	(-1) 2,0	(-1) 2,0	(-1) 5,0	(-1) 1,0	(-1) 24	(-1) 100	2,42
2	(1) 6,0	(-1) 2,0	(-1) 5,0	(-1) 1,0	(-1) 24	(1) 200	5,60
3	(-1) 2,0	(1) 6,0	(-1) 5,0	(-1) 1,0	(-1) 24	(1) 200	1,56
4	(1) 6,0	(1) 6,0	(-1) 5,0	(-1) 1,0	(-1) 24	(-1) 100	4,03
5	(-1) 2,0	(-1) 2,0	(1) 15	(-1) 1,0	(-1) 24	(1) 200	1,51
6	(1) 6,0	(-1) 2,0	(1) 15	(-1) 1,0	(-1) 24	(-1) 100	3,55
7	(-1) 2,0	(1) 6,0	(1) 15	(-1) 1,0	(-1) 24	(-1) 100	1,83
8	(1) 6,0	(1) 6,0	(1) 15	(-1) 1,0	(-1) 24	(1) 200	5,28
9	(-1) 2,0	(-1) 2,0	(-1) 5,0	(1) 3,0	(-1) 24	(1) 200	1,21
10	(1) 6,0	(-1) 2,0	(-1) 5,0	(1) 3,0	(-1) 24	(-1) 100	0,08
11	(-1) 2,0	(1) 6,0	(-1) 5,0	(1) 3,0	(-1) 24	(-1) 100	0,0
12	(1) 6,0	(1) 6,0	(-1) 5,0	(1) 3,0	(-1) 24	(1) 200	3,94
13	(-1) 2,0	(-1) 2,0	(1) 15	(1) 3,0	(-1) 24	(-1) 100	0,0
14	(1) 6,0	(-1) 2,0	(1) 15	(1) 3,0	(-1) 24	(1) 200	4,06
15	(-1) 2,0	(1) 6,0	(1) 15	(1) 3,0	(-1) 24	(1) 200	0,77

16	(1) 6,0	(1) 6,0	(1) 15	(1) 3,0	(-1) 24	(-1) 100	0,91
17	(-1) 2,0	(-1) 2,0	(-1) 5,0	(-1) 1,0	(1) 32	(1) 200	1,14
18	(1) 6,0	(-1) 2,0	(-1) 5,0	(-1) 1,0	(1) 32	(-1) 100	0,0
19	(-1) 2,0	(1) 6,0	(-1) 5,0	(-1) 1,0	(1) 32	(-1) 100	0,96
20	(1) 6,0	(1) 6,0	(-1) 5,0	(-1) 1,0	(1) 32	(1) 200	6,91
21	(-1) 2,0	(-1) 2,0	(1) 15	(-1) 1,0	(1) 32	(-1) 100	0,82
22	(1) 6,0	(-1) 2,0	(1) 15	(-1) 1,0	(1) 32	(1) 200	5,77
23	(-1) 2,0	(1) 6,0	(1) 15	(-1) 1,0	(1) 32	(1) 200	2,28
24	(1) 6,0	(1) 6,0	(1) 15	(-1) 1,0	(1) 32	(-1) 100	1,97
25	(-1) 2,0	(-1) 2,0	(-1) 5,0	(1) 3,0	(1) 32	(-1) 100	0,0
26	(1) 6,0	(-1) 2,0	(-1) 5,0	(1) 3,0	(1) 32	(1) 200	0,71
27	(-1) 2,0	(1) 6,0	(-1) 5,0	(1) 3,0	(1) 32	(1) 200	0,0
28	(1) 6,0	(1) 6,0	(-1) 5,0	(1) 3,0	(1) 32	(-1) 100	0,0
29	(-1) 2,0	(-1) 2,0	(1) 15	(1) 3,0	(1) 32	(1) 200	0,0
30	(1) 6,0	(-1) 2,0	(1) 15	(1) 3,0	(1) 32	(-1) 100	0,0
31	(-1) 2,0	(1) 6,0	(1) 15	(1) 3,0	(1) 32	(-1) 100	0,0
32	(1) 6,0	(1) 6,0	(1) 15	(1) 3,0	(1) 32	(1) 200	2,28

33	(0) 4,0	(0) 4,0	(0) 10	(0) 2,0	(0) 28	(0) 150	2,74
34	(0) 4,0	(0) 4,0	(0) 10	(0) 2,0	(0) 28	(0) 150	3,22
35	(0) 4,0	(0) 4,0	(0) 10	(0) 2,0	(0) 28	(0) 150	2,29
36	(0) 4,0	(0) 4,0	(0) 10	(0) 2,0	(0) 28	(0) 150	1,73

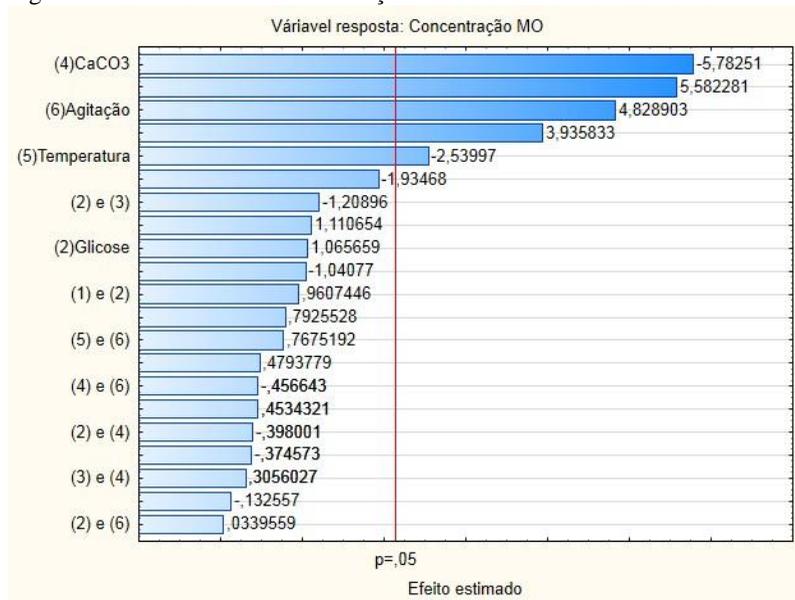
Tabela 8. Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos.

	Efeito	Erro Padrão	Teste <i>t</i> de Student	Nível <i>P</i>
<b>Média/Interações</b>	<b>1,93</b>	<b>0,161</b>	<b>11,971</b>	<b>0,000</b>
<b>(1) Ext. Levedura</b>	<b>1,91</b>	<b>0,342</b>	<b>5,582</b>	<b>0,000</b>
(2) Glicose	0,36	0,342	1,065	0,304
(3) Malte	0,15	0,342	0,453	0,657
<b>(4) CaCO<sub>3</sub></b>	<b>-1,98</b>	<b>0,342</b>	<b>-5,782</b>	<b>0,000</b>
<b>(5) Temperatura</b>	<b>-0,87</b>	<b>0,342</b>	<b>-2,539</b>	<b>0,023</b>
<b>(6) Agitação</b>	<b>1,65</b>	<b>0,342</b>	<b>4,828</b>	<b>0,000</b>
<b>Interação (1) e (6)</b>	<b>1,35</b>	<b>0,342</b>	<b>3,935</b>	<b>0,001</b>

Tabela 9. Cálculo dos coeficientes e respectivos índices estatísticos.

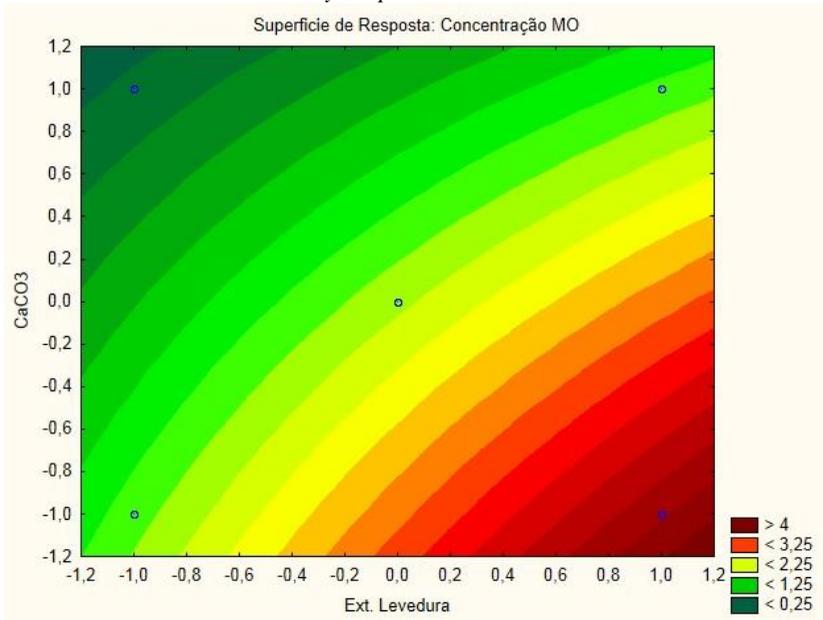
	Coeficiente	Erro Padrão	-95% Limite de Confiança	95% Limite de Confiança
<b>Média/Interações</b>	<b>1,93</b>	<b>0,161</b>	<b>1,587</b>	<b>2,279</b>
<b>(1) Ext. Levedura</b>	<b>0,95</b>	<b>0,171</b>	<b>0,589</b>	<b>1,323</b>
(2) Glicose	0,18	0,171	-0,185	0,549
(3) Malte	0,08	0,171	-0,289	0,444
<b>(4) CaCO<sub>3</sub></b>	<b>-0,99</b>	<b>0,171</b>	<b>-1,357</b>	<b>-0,623</b>
<b>(5) Temperatura</b>	<b>-0,44</b>	<b>0,171</b>	<b>-0,802</b>	<b>-0,067</b>
<b>(6) Agitação</b>	<b>0,83</b>	<b>0,171</b>	<b>0,459</b>	<b>1,194</b>
<b>Interação (1) e (6)</b>	<b>0,67</b>	<b>0,171</b>	<b>0,306</b>	<b>1,041</b>

Figura 11. Gráfico de Pareto em função dos valores estatísticos do teste t.



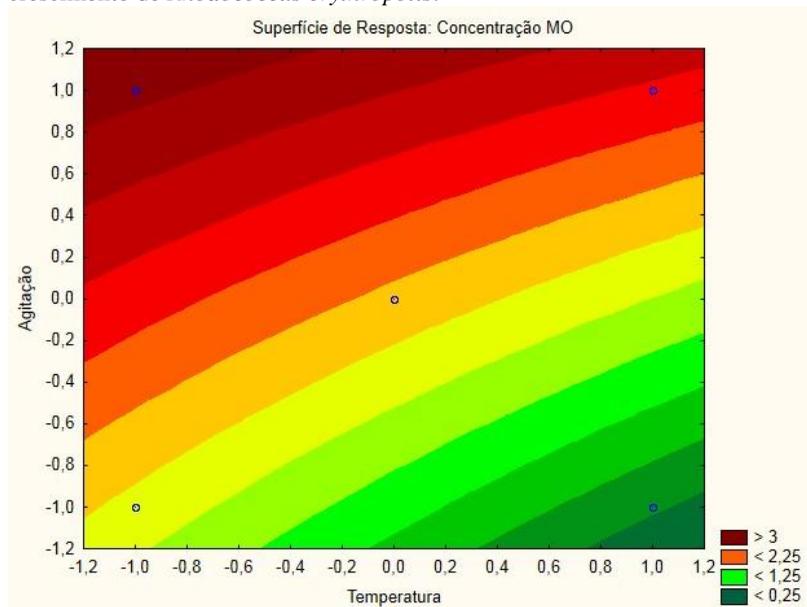
A Figura 12 apresenta as curvas de nível correspondentes à superfície de resposta gerada pelo modelo linear e verifica-se que com a redução da concentração do  $\text{CaCO}_3$  e o aumento da concentração de extrato de levedura conduz à maiores concentrações celulares, considerada região de condição experimental ótima de processo. Essa região ótima é definida no intervalo de concentração de  $\text{CaCO}_3$  de 0,8 a 1,4  $\text{g L}^{-1}$  (níveis -1,2 a -0,6) e concentração de extrato de levedura de 4,8 a 6,4  $\text{g L}^{-1}$  (níveis 0,4 a 1,2).

Figura 12. Curvas de nível para os fatores de  $\text{CaCO}_3$  e extrato de levedura para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.



A Figura 13 mostra que com a redução da temperatura e o aumento da agitação, a concentração de células, após o crescimento, encontra-se num nível máximo na região ótima de processo com agitação de 160 a 210 rpm (níveis 0,2 a 1,2) e temperatura de 23,2 a 26,4 °C (níveis -1,2 a -0,4).

Figura 13. Curvas de nível para os fatores de agitação e temperatura para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.

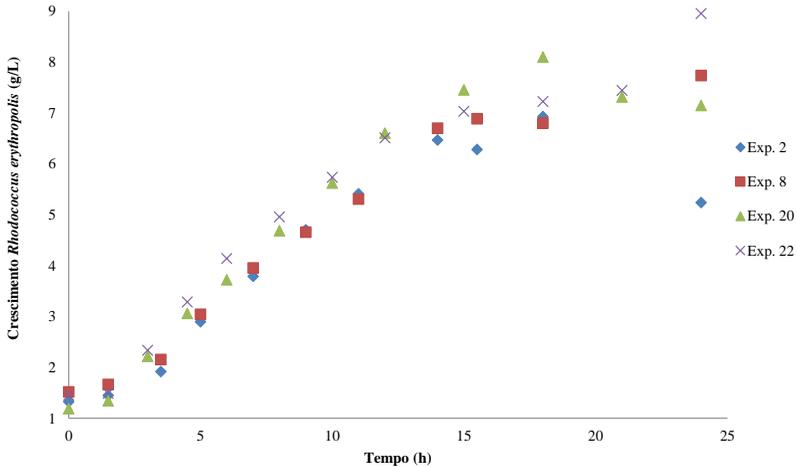


Concluída esta etapa optou-se por otimizar os resultados obtidos neste planejamento experimental com um novo planejamento experimental com pontos axiais, em vista dos resultados encontrados nesta etapa de triagem.

Foram realizados alguns experimentos a fim de sanar algumas dúvidas referente a adição de  $\text{CaCO}_3$ , malte e por se tratar de um micro-organismo aeróbico se a sua realização com aeração traria benefícios junto ao crescimento do *R. erythropolis*.

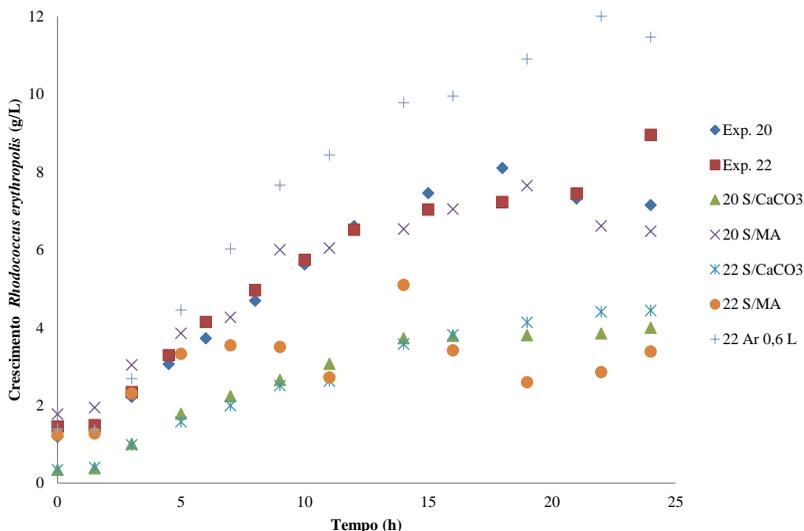
Foram acompanhadas as cinéticas de todos os experimentos do planejamento experimental durante 24 horas. O Anexo B apresenta todas as curvas cinéticas obtidas. Dentre as cinéticas podem-se destacar quatro, as quais apresentaram fase de adaptação menor que 8 horas, e uma fase exponencial maior, conduzindo, ao final do experimento, a uma quantidade maior de células. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 14.

Figura 14. Cinética do crescimento de *Rhodococcus erythropolis* sob diferentes condições planejamento experimental.



Com base no apresentado anteriormente, optou-se por utilizar as condições experimentais dos experimentos 20 e 22 para a realização de alguns testes complementares, visando à maximização do crescimento celular, em vista que os mesmos apresentam uma menor fase lag e foram os que apresentaram um maior crescimento celular. Os mesmos foram realizados seguindo o mesmo procedimento experimental, apenas retirando o  $\text{CaCO}_3$ , tendo em vista que esta variável inibiu o crescimento do *R. erythropolis*. Um teste adicional foi também realizado retirando-se o extrato de malte, tendo em vista o alto custo deste composto, o que pode vir a inviabilizar economicamente a implantação do processo em nível industrial. Além disso, por se tratar de um micro-organismo aeróbico, optou-se por realizar um experimento aerado a fim de verificar o comportamento cinético do crescimento sob estas novas condições. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 15.

Figura 15. Comparação no crescimento do *Rhodococcus erythropolis*, com aeração, sem a adição de Extrato de malte, e sem a adição de  $\text{CaCO}_3$  em relação aos experimentos do planejamento experimental.

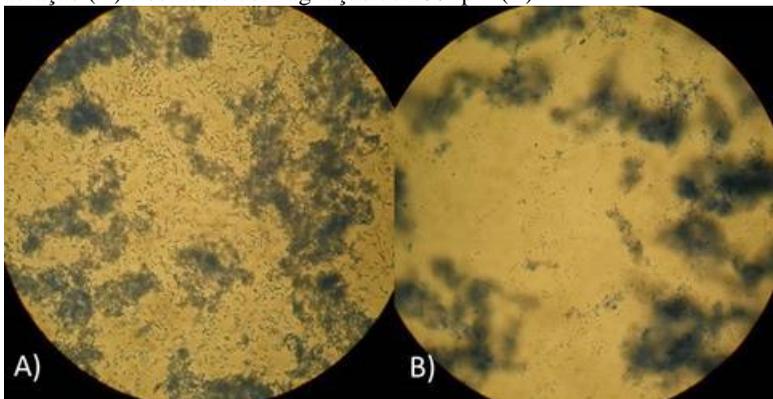


A retirada do  $\text{CaCO}_3$  do meio mostrou que o micro-organismo não se desenvolve da mesma forma, demonstrando a necessidade de pequenas quantidades deste composto para o satisfatório crescimento celular. O mesmo comportamento não foi observado por Pinotti (2000), que obteve como resultado que a retirada de carbonato não interfere no metabolismo de *Bacillus megaterium* ATCC 14945.

Com relação ao extrato de malte, pôde-se observar que o mesmo não interfere significativamente no crescimento celular, desde que seja adicionada glicose suficiente para o desenvolvimento microbiano, como visto a retirada de malte do experimento 22 mantendo apenas  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  de glicose fez com que o mesmo tivesse um crescimento de apenas  $3,5 \text{ g L}^{-1}$ , valor muito menor quando comparada com o experimento com malte, que teve  $7,44 \text{ g L}^{-1}$ . Já o experimento 20 sem malte a quantidade de glicose é de  $6,0 \text{ g L}^{-1}$ , e o crescimento foi de  $7,64 \text{ g L}^{-1}$ , valor próximo ao com adição de malte que foi de  $8,10 \text{ g L}^{-1}$ .

O experimento realizado com aeração de  $0,6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  de ar, foi o que mais se destacou, tendo em vista que houve um aumento significativo na biomassa, onde passou de  $7,8 \text{ g L}^{-1}$  para  $12 \text{ g L}^{-1}$ , um aumento de 53,8%, também foi observado que o mesmo formou aglomerados de micro-organismos e que as células ficaram maiores como mostra a Figura 16. Esse fato se deve ao *R. erythropolis* ser aeróbico, e assim com aeração a quantidade de oxigênio dissolvido é maior, tornando o meio propício para o seu crescimento.

Figura 16. Comparação no crescimento do *Rhodococcus erythropolis* com aeração (A) e somente com agitação de 200 rpm (B).



### 4.3 OTIMIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Com os resultados obtidos do planejamento experimental  $2^{6-1}$ , realizou-se um novo planejamento experimental para a otimização dos níveis. Para isso, os fatores que não foram estatisticamente significativos foram mantidos ao menor nível, fixando-se a concentração de malte em  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  e a concentração de glicose em  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ .

Os demais fatores foram deslocados levando em consideração os efeitos apontados no planejamento fatorial, concentração de extrato de levedura (A) e agitação (D) (efeito positivo) e concentração de  $\text{CaCO}_3$  (B) e a temperatura (C) (efeito negativo). O planejamento  $2^4$  completo com pontos axiais estudado nesta etapa é apresentado na Tabela 10.

Na Tabela 10 apresentam-se os níveis estudados para os fatores, a matriz do planejamento fatorial completo  $2^4$  com pontos axiais e as respostas obtidas para cada ensaio em termos de crescimento celular. Para a análise do crescimento fez-se a diferença entre a concentração inicial e a concentração em 18 horas.

Tabela 10. Planejamento experimental  $2^4$  com pontos axiais para otimização das condições experimentais para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.

<b>Experimento</b>	<b>A (g/L)</b>	<b>B (g/L)</b>	<b>C (°C)</b>	<b>D (rpm)</b>	<b>Crescimento (g/L)</b>
1	(-1) 4,0	(-1) 0,6	(-1) 22	(-1) 160	3,61
2	(1) 8,0	(-1) 0,6	(-1) 22	(-1) 160	2,29
3	(-1) 4,0	(1) 1,4	(-1) 22	(-1) 160	4,17
4	(1) 8,0	(1) 1,4	(-1) 22	(-1) 160	4,27
5	(-1) 4,0	(-1) 0,6	(1) 26	(-1) 160	3,51
6	(1) 8,0	(-1) 0,6	(1) 26	(-1) 160	3,06
7	(-1) 4,0	(1) 1,4	(1) 26	(-1) 160	3,37
8	(1) 8,0	(1) 1,4	(1) 26	(-1) 160	2,32
9	(-1) 4,0	(-1) 0,6	(-1) 22	(1) 220	1,60
10	(1) 8,0	(-1) 0,6	(-1) 22	(1) 220	3,16
11	(-1) 4,0	(1) 1,4	(-1) 22	(1) 220	1,75
12	(1) 8,0	(1) 1,4	(-1) 22	(1) 220	3,66
13	(-1) 4,0	(-1) 0,6	(1) 26	(1) 220	3,29
14	(1) 8,0	(-1) 0,6	(1) 26	(1) 220	3,65
15	(-1) 4,0	(1) 1,4	(1) 26	(1) 220	2,89
16	(1) 8,0	(1) 1,4	(1) 26	(1) 220	2,13
17	(-2) 2,0	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	2,17
18	(2) 10	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	3,95
19	(0) 6,0	(-2) 0,2	(0) 24	(0) 190	3,07
20	(0) 6,0	(2) 1,8	(0) 24	(0) 190	4,82
21	(0) 6,0	(0) 1,0	(-2) 20	(0) 190	2,51
22	(0) 6,0	(0) 1,0	(2) 28	(0) 190	3,58
23	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(-2) 130	3,66
24	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(2) 250	3,83
25	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	5,27
26	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	5,08
27	(0) 6,0	(0) 1,0	(0) 24	(0) 190	4,77

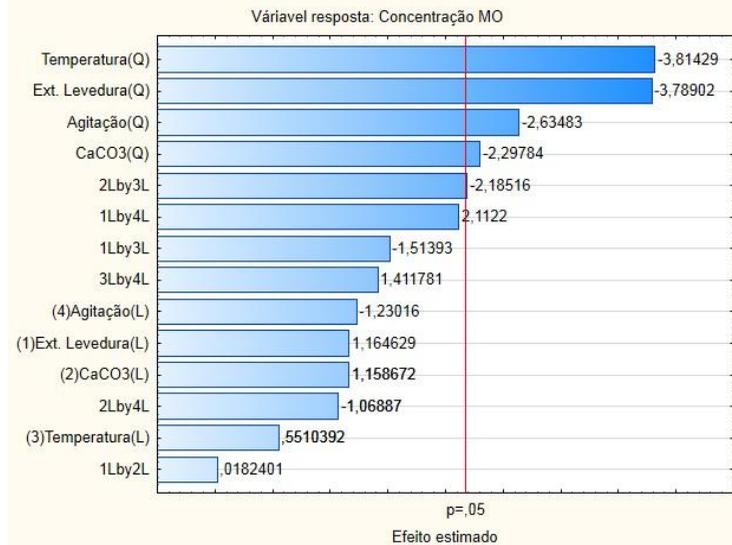
Analisando-se as Tabelas 11 e 12, juntamente com a Figura 17 (Gráfico de Pareto), verifica-se que os termos quadráticos da concentração de extrato de levedura,  $\text{CaCO}_3$ , temperatura e agitação e a interação entre os dois termos lineares (2) e (3) são significativos, como confirmado pelos índices estatísticos apresentados.

Tabela 11. Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para otimização.

	Efeito	Erro Padrão	Teste t de Student	Nível P
<b>Média/Interações</b>	<b>5,04</b>	<b>0,395</b>	<b>12,73</b>	<b>0,000</b>
(1) Ext. Levedura (L)	0,33	0,279	1,16	0,266
<b>Ext. Levedura (Q)</b>	<b>-1,12</b>	<b>0,296</b>	<b>-3,79</b>	<b>0,002</b>
(2) $\text{CaCO}_3$ (L)	0,32	0,279	1,16	0,269
<b><math>\text{CaCO}_3</math> (Q)</b>	<b>-0,68</b>	<b>0,296</b>	<b>-2,29</b>	<b>0,040</b>
(3) Temperatura (L)	0,15	0,279	0,55	0,591
<b>Temperatura (Q)</b>	<b>-1,13</b>	<b>0,296</b>	<b>-3,81</b>	<b>0,002</b>
(4) Agitação (L)	-0,34	0,279	-1,23	0,242
<b>Agitação (Q)</b>	<b>-0,78</b>	<b>0,296</b>	<b>-2,63</b>	<b>0,021</b>
<b>Interação (2L) e (3L)</b>	<b>-0,75</b>	<b>0,342</b>	<b>-2,18</b>	<b>0,049</b>

Tabela 12. Cálculo dos coeficientes e respectivos índices estatísticos.

	Coefficiente	Erro Padrão	-95% Limite de Confiança	95% Limite de Confiança
<b>Média/Interações</b>	<b>5,040</b>	<b>0,395</b>	<b>4,177</b>	<b>5,902</b>
(1) Ext. Levedura (L)	0,162	0,139	-0,141	0,467
<b>Ext. Levedura (Q)</b>	<b>-0,562</b>	<b>0,148</b>	<b>-0,885</b>	<b>-0,238</b>
(2) $\text{CaCO}_3$ (L)	0,162	0,139	-0,142	0,466
<b><math>\text{CaCO}_3</math> (Q)</b>	<b>-0,340</b>	<b>0,148</b>	<b>-0,664</b>	<b>-0,017</b>
(3) Temperatura (L)	0,077	0,139	-0,227	0,381
<b>Temperatura (Q)</b>	<b>-0,565</b>	<b>0,148</b>	<b>-0,889</b>	<b>-0,242</b>
(4) Agitação (L)	-0,172	0,139	-0,476	0,132
<b>Agitação (Q)</b>	<b>-0,390</b>	<b>0,148</b>	<b>-0,714</b>	<b>-0,067</b>
<b>Interação (2L) e (3L)</b>	<b>-0,374</b>	<b>0,171</b>	<b>-0,747</b>	<b>-0,001</b>

Figura 17. Gráfico de Pareto, em função dos valores estatísticos do teste  $t$ .

O modelo para a o crescimento do *Rhodococcus erythropolis* é representado pela Equação 2:

$$C_{R.e.} = 5,040 - 0,562 A^2 - 0,341 B^2 - 0,566 C^2 - 0,391 D^2 - 0,374 BC \quad (2)$$

onde:

$C_{R.e.}$  = Concentração final de *Rhodococcus erythropolis* ( $\text{g.L}^{-1}$ );

$A$  = Concentração Extrato de levedura ( $\text{g.L}^{-1}$ );

$B$  = Concentração de  $\text{CaCO}_3$  ( $\text{g.L}^{-1}$ );

$C$  = Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ );

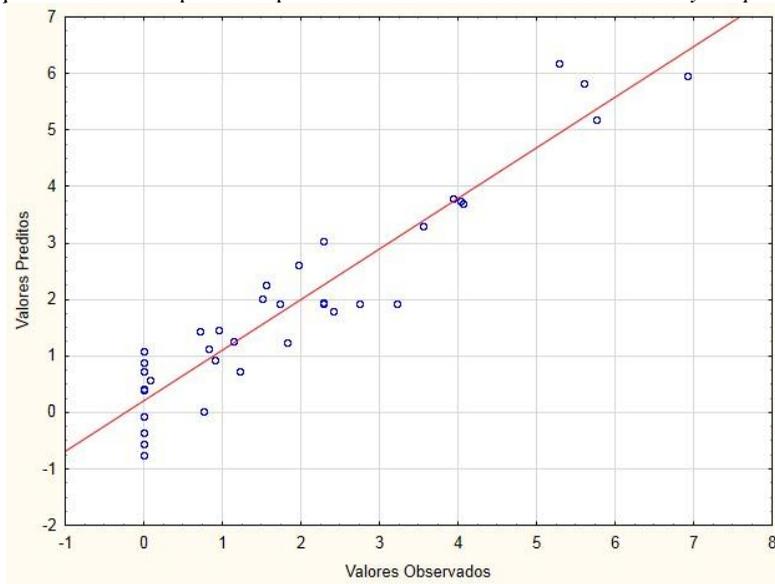
$D$  = Agitação (rpm).

Foram determinados os pontos críticos ou estacionários, onde se tem o máximo de crescimento,  $5,10 \text{ g.L}^{-1}$ , que correspondem à concentração de extrato de levedura de  $6,15 \text{ g.L}^{-1}$  (valor codificado 0,076), concentração de  $\text{CaCO}_3$   $1,16 \text{ g.L}^{-1}$  (valor codificado 0,413),

temperatura de 23,7 °C (valor codificado -0,156) e agitação de 180 rpm (valor codificado -0,330).

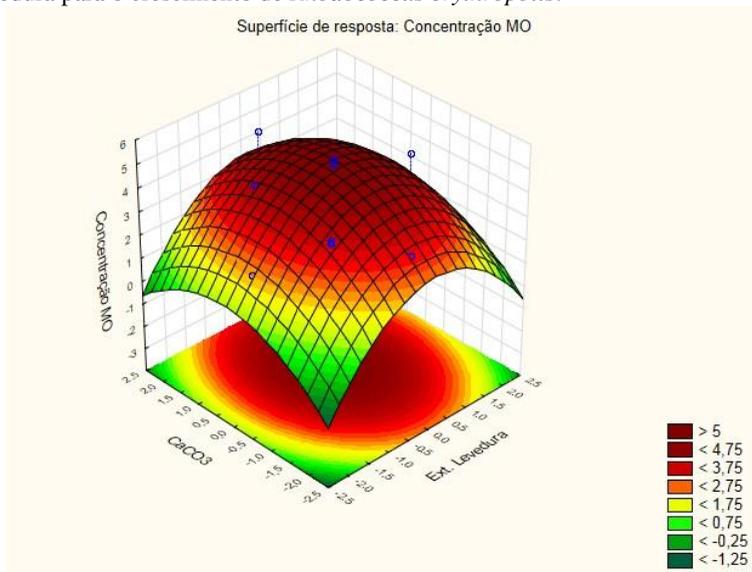
A Figura 18 apresenta os valores previstos versus observados, confirmando que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais, visto que os pontos caem próximo à linha reta onde a variação explicada foi de 77,6% para uma variação máxima explicável de 95%.

Figura 18. Valores preditos pelo modelo polinomial versus observados experimentalmente para a resposta do crescimento do *Rhodococcus erythropolis*.



A Figura 19 apresenta a região de máximo crescimento celular. Essa região ótima é definida no intervalo de concentração de  $\text{CaCO}_3$  de 0,8 a 1,2  $\text{g.L}^{-1}$  (níveis - 0,5 a 0,5) e concentração de extrato de levedura de 5 a 7  $\text{g.L}^{-1}$  (níveis 0,5 a 0,5).

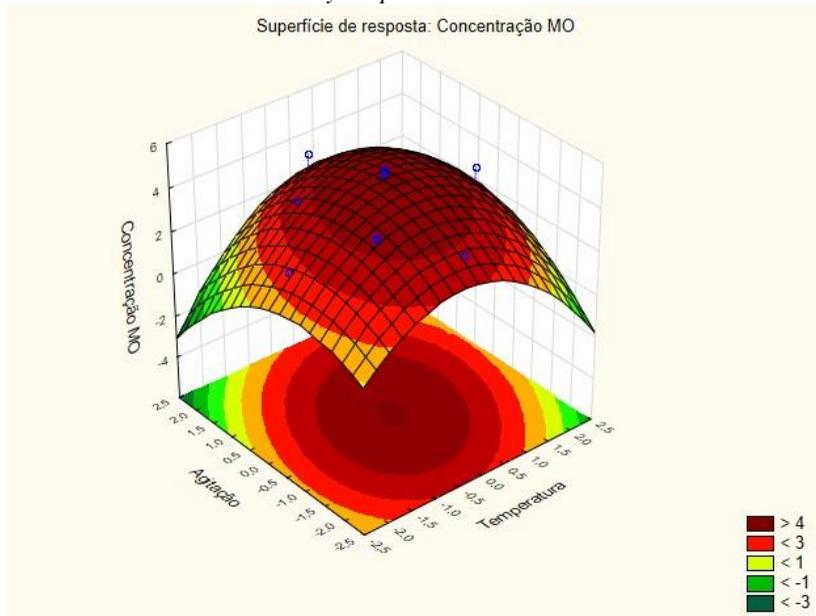
Figura 19. Superfície de resposta da concentração de  $\text{CaCO}_3$  versus extrato de levedura para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.



Conforme mostra a Figura 20, verifica-se que a região ótima de crescimento encontra-se num nível máximo com agitação de 160 a 190 rpm (níveis -1,0 a 0) e temperatura de 23,0 a 25,0 °C (níveis -0,5 a 0,5).

Outro fato que pode ser mais bem observado nas curvas de nível das Figuras 19 e 20, é a maior sensibilidade para o crescimento do *Rhodococcus erythropolis* para a concentração de extrato de levedura e  $\text{CaCO}_3$  do que em relação à temperatura e agitação, fato que também pode ser visto pelo maior coeficiente dos mesmos.

Figura 20. Superfície de resposta da agitação versus temperatura para o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.



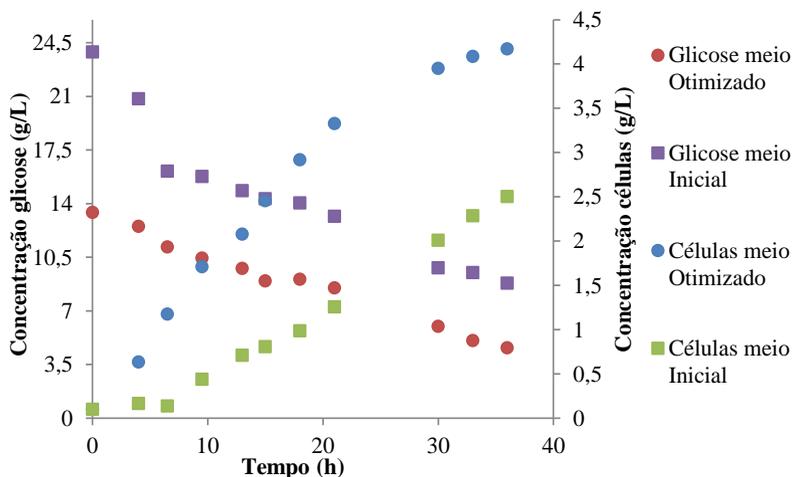
Com os resultados obtidos optou-se em utilizar o ponto crítico como meio de crescimento. A Tabela 13 apresenta um comparativo entre o meio inicial e o meio otimizado para o crescimento do micro-organismo.

Tabela 13. Comparativo dos meios de crescimento antes e depois da otimização.

	Meio Normal	Meio Otimizado
Glicose	4,0 g L <sup>-1</sup>	2,0 g L <sup>-1</sup>
Extrato de Malte	10 g L <sup>-1</sup>	5,0 g L <sup>-1</sup>
Extrato de Levedura	4,0 g L <sup>-1</sup>	6,15 g L <sup>-1</sup>
CaCO <sub>3</sub>	2,0 g L <sup>-1</sup>	1,1 g L <sup>-1</sup>
Temperatura	28,0 °C	23,7 °C
Agitação	150 rpm	180 rpm
Concentração Celular	0,98 g L <sup>-1</sup>	2,91 g L <sup>-1</sup>

Na Figura 21 pode-se visualizar a diferença no crescimento do *Rhodococcus erythropolis* utilizando os dois meios (inicial e otimizado). Observa-se que o meio otimizado possui uma fase lag menor e uma fase exponencial maior, conduzindo, desta forma, a uma quantidade maior de células. Uma das maiores alterações vistas quando acompanhadas as duas cinéticas é que mesmo com a redução pela metade da concentração de açúcares (glicose e extrato de malte) o micro-organismo se adaptou rapidamente e teve uma alta taxa de crescimento.

Figura 21. Comparativo das cinéticas de crescimento do *Rhodococcus erythropolis* utilizando o meio inicial e o meio otimizado.



Com os resultados obtidos na otimização foi possível aumentar a eficiência do micro-organismo em relação ao crescimento celular e a quantidade de substrato presente no meio.

O excesso de  $\text{CaCO}_3$ , faz com que o micro-organismo não se desenvolva, já que sua adição faz com que se tenha uma elevação no pH, conforme descrito por Maass (2011), o *R. erythropolis* se desenvolve em pH entre 6,5 e 7,5.

Já a quantidade de oxigênio dissolvida tende a aumentar com diminuição da temperatura e o aumento da agitação. Segundo Pinotti

(2000), devido à baixa solubilidade do oxigênio na água é essencial à transferência contínua deste para o meio líquido de crescimento, visto que é um importante substrato em fermentações aeróbicas.

#### DESNITROGENAÇÃO DO GASÓLEO PESADO EM REATOR DESCONTÍNUO PELO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277

Na Tabela 14 são apresentadas as concentrações de nitrogênio após 30 h de reação bem como a comparação entre os resultados obtidos nos reatores contendo diferentes frações água/óleo (m/m) de gasóleo pesado.

Os resultados obtidos demonstram o grande potencial que o *Rhodococcus erythropolis* possui na remoção de compostos nitrogenados, potencial que pode ser ampliado tendo em vista que os mesmos permaneceram apenas 30 horas em contato com o *R. erythropolis*. Dentre os resultados destaca-se que os experimentos com o meio otimizado apresentam uma menor variação no percentual de remoção, enquanto os percentuais do meio normal variam desde 20% para o meio com 40% de gasóleo pesado até 50% com 90% de gasóleo pesado. Na Figura 22 pode-se observar que para as frações menores de gasóleo pesado o meio otimizado conduziu a maiores níveis de remoção em relação ao meio inicial.

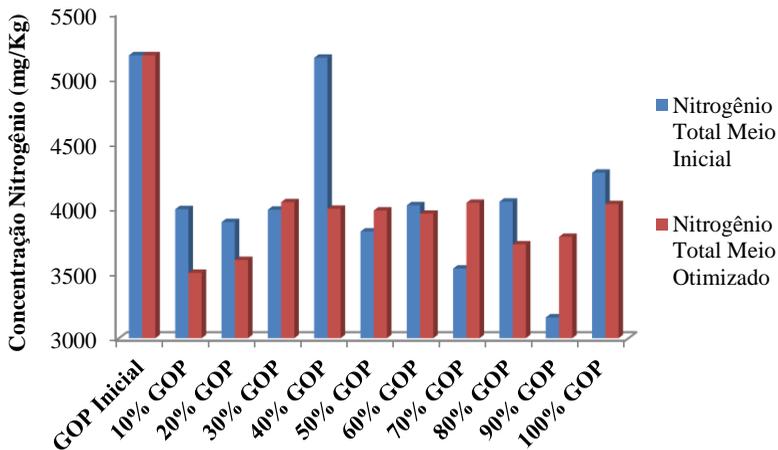
O ensaio que apresentou resultados mais promissores foi o realizado com concentração de 90% GOP, o que corresponde a uma massa de 215 mg, e promoveu a remoção de 51,74% do nitrogênio total. Em contrapartida, o experimento com 10% de GOP, equivalente a uma massa de 25,26 mg, obteve uma remoção de apenas 39%, aproximadamente 9 vezes menor em massa.

Tabela 14. Comparativo na remoção de nitrogênio nos dois tipos de meio de crescimento, inicial e otimizado, para diferentes concentrações de gasóleo pesado.

Amostra	Meio Normal		Meio Otimizado	
	Nitrogênio Total	Percentual de redução	Nitrogênio Total	Percentual de redução
GOP Inicial	6549 ± 58	-	6549 ± 58	-
10% GOP	3993 ± 276	39,02%	3503 ± 61	46,51%
20% GOP	3894 ± 31	40,54%	3602 ± 60	44,99%
30% GOP	3989 ± 69	39,08%	4047 ± 50	38,20%
40% GOP	5159 ± 136	21,22%	3996 ± 96	38,98%
50% GOP	3821 ± 92	41,65%	3983 ± 62	39,18%
60% GOP	4023 ± 5	38,57%	3958 ± 37	39,56%
70% GOP	3536 ± 3	46,00%	4042 ± 48	38,28%
80% GOP	4051 ± 32	38,14%	3722 ± 30	43,16%
90% GOP	3160 ± 41	51,74%	3780 ± 30	42,28%
100% GOP	4274 ± 74	34,73%	4032 ± 28	38,43%

A elevada remoção de nitrogênio vem ao encontro dos resultados obtidos no planejamento experimental, onde o mesmo mostrou a necessidade de se adicionar extrato de levedura (fonte de nitrogênio) no meio de crescimento, e assim fazer com que o *R. erythropolis* se desenvolvesse mais.

Figura 22. Remoção de nitrogênio total nas diversas condições experimentais estudadas.



Segundo FERNANDES e SILVA (1996) os micro-organismos necessitam de carbono, como fonte de energia, e de nitrogênio para síntese de proteínas. É por esta razão que a relação C/N é considerada como o fator que melhor caracteriza o equilíbrio dos substratos. Teoricamente, a relação C/N inicial ótima do substrato deve se situar em torno de 30. Na realidade, constata-se que ela pode variar de 20 a 70 de acordo com a maior ou menor biodegradabilidade do substrato. Tanto a falta de nitrogênio quanto a falta de carbono limita a atividade microbiológica.

#### 4.4 DESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO EM REATOR DESCONTÍNUO PELO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277

A Tabela 15 apresenta as concentrações de enxofre após 30 s de reação bem como a comparação entre os resultados obtidos nos reatores contendo diferentes frações água/óleo (m/m) de gasóleo pesado.

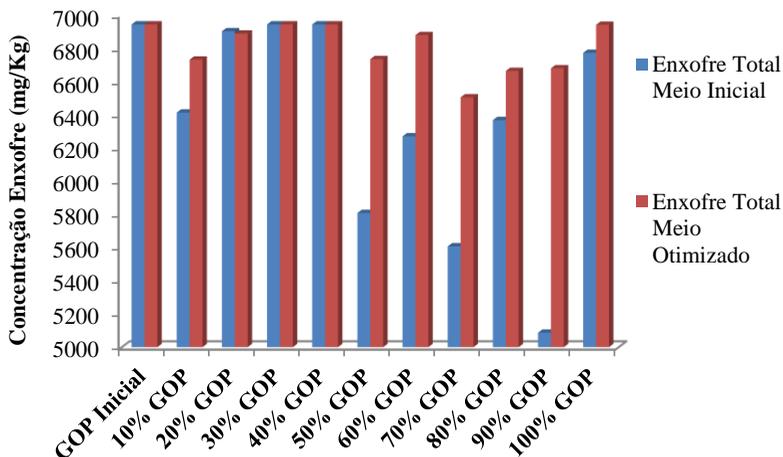
Os resultados obtidos comprovam a capacidade do *Rhodococcus erythropolis* de remover compostos sulfurados. Na Figura 23 observa-se que para frações menores de gasóleo pesado o meio otimizado apresentou

remoção superior ao meio normal. Quando levada em consideração a temperatura, verifica-se que a sua redução de 28,0 °C para 23,7 °C (no meio otimizado) gera uma menor remoção de compostos sulfurados, diferente do que acontece para a remoção dos compostos nitrogenados.

Tabela 15. Comparativo na remoção de enxofre nos dois tipos de meio de crescimento, inicial e otimizado, para diferentes concentrações de gásóleo pesado.

Amostra	Meio Normal		Meio Otimizado	
	Enxofre Total	Percentual de remoção	Enxofre Total	Percentual de remoção
GOP Inicial	6944 ± 68	-	6944 ± 68	-
10% GOP	6413 ± 32	7,64%	6732 ± 82	3,05%
20% GOP	6903 ± 28	0,59%	6889 ± 134	0,79%
30% GOP	6944 ± 63	-	6944 ± 104	-
40% GOP	6944 ± 260	-	6944 ± 130	-
50% GOP	5808 ± 176	16,36%	6735 ± 73	3,00%
60% GOP	6270 ± 25	9,70%	6880 ± 88	0,92%
70% GOP	5607 ± 31	19,25%	6505 ± 92	6,32%
80% GOP	6368 ± 114	8,29%	6664 ± 111	4,03%
90% GOP	5087 ± 96	26,74%	6680 ± 84	3,80%
100% GOP	6773 ± 25	2,46%	6942 ± 123	-

Figura 23. Remoção de enxofre total nas diversas condições estudadas.



O ensaio que apresentou resultados mais promissores foi o realizado com concentração de 90% GOP, o que corresponde a uma massa de 167,1 mg, e promoveu a remoção de 26,7% do enxofre total. Em contrapartida, o experimento com 10% de GOP, equivalente a uma massa de 5,31 mg, obteve uma remoção de apenas 7%, aproximadamente 32 vezes menor em massa.

Esses resultados não são próximos aos encontrados por Li *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2007), Ma *et al.* (2006), Maghsoudi *et al.* (2001) e Folsom *et al.* (1999), que obtiveram um percentual de degradação de enxofre de 86% (em reator contendo 20% (v/v) de óleo diesel), 97% (em reator contendo 15% (v/v) de óleo diesel), 78% (em reator contendo 10% (v/v) de óleo diesel), 23,7% (em reator contendo 25% (v/v) de óleo diesel) e 67% (em reator contendo 15% (v/v) de óleo diesel), respectivamente. D'Addario *et al.* (1996) alcançaram um percentual de dessulfurização do óleo diesel inferior aos demais autores, entre 14 e 18% (em reator contendo 50% (v/v) de óleo diesel).

Todos os autores destacaram que esse percentual foi obtido sem a adição de nenhum surfactante e/ou emulsificante que ampliasse o contato entre as células (fase aquosa) e a fase orgânica, bem como o presente trabalho. Entretanto, cabe ressaltar que este estudo foi realizado

utilizando gasóleo pesado (aproximadamente 7000 mg/kg de enxofre) e, portanto em percentuais mássicos, devido a alta viscosidade do mesmo.

Levando em consideração que o *Rhodococcus erythropolis* não foi adaptado a compostos nitrogenados, sulfurados e ao meio com elevado percentual de óleo, os resultados encontrados neste trabalho são considerados satisfatórios.

Destacam-se como fatores positivos a utilização deste processo antes da produção de óleo diesel ou lubrificante, a preferência pela remoção de enxofre e nitrogênio nos meios com maiores concentrações de gasóleo e a elevada capacidade de adaptação ao meio de crescimento pelo micro-organismo, como mostra a Figura 24, na qual se supõem a produção de biossurfactante o que facilitaria o acesso do *R. erythropolis* à fase orgânica.

Figura 24. Diferença nas emulsões 50 e 10% de GOP.





## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

### 5.1 CONCLUSÕES

Neste trabalho realizou-se o estudo da influência de fatores como temperatura, agitação e concentrações dos compostos: extrato de levedura,  $\text{CaCO}_3$ , malte e glicose, além do gasóleo pesado no crescimento do micro-organismo; o percentual de dessulfurização e desnitração do gasóleo pesado pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277.

Foi possível determinar que a variação na concentração de gasóleo pesado (CIM) não interferiu no crescimento do *Rhodococcus erythropolis*, em alguns casos o crescimento foi maior que o obtido em meio puro. Quando testado o crescimento do *Rhodococcus erythropolis* em sistema aerado o mesmo mostrou ter um crescimento celular mais acentuado.

Quando realizado o planejamento experimental preliminar obteve-se que a concentração de glicose e malte não apresentaram efeito estatístico significativo, assim suas concentrações foram reduzidas respectivamente de 4,0 e 10,0  $\text{g L}^{-1}$  para 2,0 e 5,0  $\text{g L}^{-1}$ .

Os valores encontrados para a concentração de extrato de levedura e  $\text{CaCO}_3$  apresentaram uma maior influência no crescimento do *Rhodococcus erythropolis* quando comparados com a temperatura e agitação. Com a otimização do meio de crescimento foi possível reduzir a fase lag que era de 8 a 10 horas para 3 a 4 horas.

O *Rhodococcus erythropolis* mostrou-se eficaz na remoção de compostos sulfurados e nitrogenados, mas teve uma eficiência maior para a temperatura de 28 °C quando comparado com a temperatura ótima de crescimento que é de 23,7 °C.

O *Rhodococcus erythropolis* foi mais eficiente na remoção de nitrogênio com uma remoção de 51,7% para a fração de 90% de GOP e uma remoção de 26,7% para o enxofre para a mesma fração.

O presente estudo demonstrou a elevada capacidade de adaptação do *Rhodococcus erythropolis* e de sua eficiência na remoção de compostos sulfurados e nitrogenados presentes no gasóleo pesado. Ainda existem muitos desafios devido à alta complexidade em se trabalhar em sistemas água/óleo. Sendo assim a cepa nacional mostra-se como uma

bactéria eficiente em tratamento de derivados de petróleo em um processo de biorremediação, desta forma podendo vir a ser aplicado em escala industrial.

## 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudar a viabilidade da substituição dos compostos do meio de crescimento por resíduos industriais;
- ✓ Avaliar a utilização de reator air-lift no processo de crescimento e com gásóleo pesado;
- ✓ Verificar quais dos compostos nitrogenados e sulfurosos é consumido em maior quantidade pelo *R. erythropolis*;
- ✓ Estudar o comportamento cinético para as várias frações de gásóleo pesado;
- ✓ Adaptar o *R. erythropolis* ATCC 4277 aos compostos sulfurosos e nitrogenados presentes no gásóleo pesado.

## 6. REFERÊNCIAS

ABADIE, E. **Processos de refino. Módulo a indústria de petróleo e energia.** Curitiba: 2002. 76p.

AFFERDEN, V., SCHACHT, S., KLEIN, J., TRÜPER, H. G. **Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp.** *Archive Microbiologic*, p. 324 - 328, 1990.

ALVES, L., MESQUITA, E., GÍRIO, F. M. **Dessulfurização bacteriana de combustíveis fósseis.** *Biotechnologia Ambiental*, n. 62, p. 3-8, 1999.

ANNWEILLER, E.; MICHAELIS, W., MECKENSTOCK, R. U. **Anaerobic cometabolic conversion of benzothiophene by a sulfate-reducing enrichment culture and in a tar-oil-contaminated aquifer.** *American Society for Microbiology*, v. 67, n.11, p. 5077–5083, 2001.

BRITISH PETROLEUM, 2013. *On line.* Disponível em: <<http://www.bp.com/>>. Acesso: novembro de 2013.

CARVALHO, C. C. C. R.; da FONSECA, M. M. R. **Solvent toxicity in organic-aqueous systems analysed by multivariate analysis.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 26, p. 361-375, 2004.

CARVALHO, C. C. C. R.; da FONSECA, M. M. R. **The remarkable *Rhodococcus erythropolis*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, p. 715-726, 2005(c).

CARVALHO, C. C. C. R.; PARREÑO-MARCHANTE, B.; NEUMANN, G.; da FONSECA, M. M. R.; HEIPIEPER, H. J. **Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on n-alkanes, alcohols and terpenes.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, p. 383-388, 2005(a).

CARVALHO, C. C. C. R.; PORETTI, A.; da FONSECA, M. M. R. **Cell adaptation to solvent, substrate and product: a successful strategy to**

**overcome product inhibition in a bioconversion system.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 69, p. 268-275, 2005(b).

CARVALHO, C. C. C. R.; WICK, L. Y.; HEIPIEPER, H. J. **Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 83, p. 311-320, 2009.

CASTORENA, G.; SUAREZ, C.; VALDEZ, I.; AMADOR, G.; FERNANDEZ, L. **Sulfur selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus* sp. Strains.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 215, p. 157–161, 2002.

CAVALCA, L.; COLOMBO, M. LARCHER, S.; GIGLIOTTI, C.; COLLINA, E.; ANDREONI, V. **Survival and naphthalene-degrading activity of *Rhodococcus* sp. Strain IBN in soil microcosm.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 1058-1065, 2002.

CIAPINA, E. M. P.; **Produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em biorreator de bancada e avaliação do seu efeito na biodegradação de borra oleosa da indústria do petróleo.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

DEZOTTI, M.; SANT'ANNA JUNIOR, G. L.; BASSIN, J. P. **Processos biológicos avançados para tratamento de efluentes e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana.** Rio de Janeiro. Interciência, 2011.

DUTEAU, N. M.; ROGERS, J. D.; BARTHOLOMAY, C.T; REARDON, K. F. **Species-Specific Oligonucleotides for Enumeration of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia* sp. Strain JS150, and *Bacillus subtilis* ATCC 7003 in Biodegradation Experiments.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 4994-4999, 1998.

D'ADDARIO, E.; FASCETTI, E.; GIANNA, R.; SERBOLISCA, L., ROBERTIELLO, A. **Selective microbial desulfurization of petroleum fractions.** *Non-Catalytic Technology Advances*, v. 17, p. 936-938, 1996.

FARAH, M.A. **Petróleo e seus derivados: definição, constituição, aplicação, especificações, características de qualidade.** Rio de Janeiro. LTC, 2012.

FERNANDES, F.; SILVA, S. M. C. P. **Manual prático para compostagem de biossólidos.** Londrina, 1996.

FOLSOM, B. R.; SCHIECHE, D. R.; DiGRAZIA, P. M., WERNER, J., PALMER, S. **Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 4967–4972, 1999.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulose activities.** *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.

GRAY, K. A., RHEE, S., CHANG, J. H., CHANG, Y. K., CHANG, H. N. **Biochemical characterization of the biodesulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 – potential role in fossil fuel desulfurization.** *Abstract Paper American Chemical Society*, v. 212, p. 54, 1996.

GUCHHAIT, S.; BISWAS, D.; BHATTACHARYA, P.; CHOWDHURY, R. **Bio-desulfurization of model organo-sulfur compounds and hydrotreated diesel—Experiments and modeling.** *Chemical Engineering Journal*, v. 112, p. 145–151, 2005.

GUPTA, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; DEB, J. K. **Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 356–366, 2005.

HEIPIEPER, H. J.; NEUMANN, G.; CORNELISSEN, S., MEINHARDT, F. **Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 71, p. 961-973, 2007.

IWABUCHI, N.; SUNAIRI, M.; URAI, M.; ITOH, C.; ANZAI, H.; NAKAJIMA, M.; HARAYAMA, S. **Extracellular polysaccharides *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 2337–2343, 2002.

IZUMI, Y.; OHSHIRU, T.; OGINO, H., HINE, Y., SHIMAO, M. **Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 223-226, 1994.

IZUMI, Y.; OHSHIRU, T. **Purification and characterization of enzymes involved in desulfurization of dibenzothiophene in fossil fuels.** *Journal of Molecular Catalysis*, p. 1061–1064, 2001.

KEULEN, F. V.,CORREIA, C. N., Da FONSECA, M. M. R. **Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*.** *Journal of Molecular Catalysis*, p. 295–299, 1997.

KIRIMURA, K., FURUYA, T., SATO, R., ISHII, Y., KINO, K, USAMI, S. **Biodesulfurization of naphthothiophene and benzothiophene through selective cleavage of carbon-sulfur bonds by *Rhodococcus* sp. strain WU-K2R.** *American Society for Microbiology*, v. 68, n. 8, p. 3867–3872, 2002.

KIRIMURA, K.; FURUYA, T., NISHII, Y., ISHII, Y., KINO, K, USAMI, S. **Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 3, p. 262 - 266, 2000.

KIRIMURA, K.; FURUYA, T., NISHII, Y., ISHII, Y., KINO, K, USAMI, S. **Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 3, p. 262-266, 2001.

LAFAY, J. S. **Análise energética de sistemas de aquecimento de água com energia solar e gás.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

LI, F. L.; XU, P.; et al. **Deep desulfurization of hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 223, p.301-307, 2003.

LI, F.; XU, P.; MA, C. Q., LUO, L. L., WANG, X. S. **Microbial desulfurization of gasoline in a *Mycobacterium goodii*X7b immobilized-cell system.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 276–281, 2005.

LI, G. Q., LI, S. S., QU, S. W., MA, T., ZHU, L., LIANG, F. L., LIU, R. L. **Improved biodesulfurization of hydrodesulfurized diesel oil using *Rhodococcus erythropolis* and *Gordonia* sp.** *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 1759–1764, 2008.

LI, Y. G.; XING, J. M.; XIONG, X. C., LI, W. L., GAO, H. S., LIU, H. Z. **Improvement of biodesulfurization activity of alginate immobilized cells in biphasic systems.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 145–150, 2008.

MA, C.; FENG, J.; ZENG, Y., CAI, X., SUN, B., ZHANG, Z., BLANKESPOOR, H. D., XU, P. **Methods for the preparation of a biodesulfurization biocatalyst using *Rhodococcus* sp.** *Chemosphere*, v. 65, p. 165–169, 2006.

MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino de petróleo.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

McFARLAND, B.L. **Biodesulfurization.** *Ecology and Industrial Microbiology*, p. 257-264, 2000.

MAGHSOUDI, S. KHEIROLOMOOM, A., VOSSOUGH, S., TANAKA, E., KATOH, S. **Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium* sp. strain P32C1.** *Biochemical Engineering Journal*, p. 11-16, 1999.

MAGHSOUDI, S.; VOSSOUGH, S; KHEIROLOMOOM, A., TANAKA, E., KATOH, S. **Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 8, p. 151-156, 2001.

MAASS, D.; **Dessulfurização do DBT e do óleo diesel em sistema bifásico pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em reator descontínuo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 2011.** Max feffer, Rio de Janeiro, 2011.

MONTICELLO, D. J. **Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 540-546, 2000.

MORITZ, D. E. **Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas.** Dissertação de Mestrado. Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 1998.

MÜHLEN, C. V. **Caracterização química de compostos nitrogenados do petróleo brasileiro e de óleos voláteis de plantas brasileiras usando cromatografia gasosa bidimensional abrangente.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto alegre. 2007.

NEIVA, J. **Conheça o Petróleo / Prefácio de Ozires Silva.** 5a ed., Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1986.

THOMAS, J. E.(org.) **Fundamentos de engenharia de petróleo.** Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

OLDFIELD, C.; WOOD, N. T.; GILBERT, S. C., MURRAY, F. D., FAURE, F. R. **Desulphurization of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genes *Rhodococcus*, and related tax.** *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 74, p. 119-132, 1998.

OYAMA, S.T.; ZHAO, H., GOTT, T., ZHAO, H., LEE, Y. **Transition metal phosphide hydroprocessing catalysts: a review.** *Catalysis Today*, v. 143, p. 94-107, 2008.

PANDA, S.K; SCHRADER, W.; AL-HAJJI, A.; ANDERSON, J.T. **Distribution of polycyclic aromatic sulfur heterocycles in three Saudi Arabian crude oils as determined by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.** *Energy & fuel*, v. 21, p. 1071-1077, 2007.

PETROBRAS, 2013. *On line.* Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br>>. Acesso: novembro de 2013.

PINOTTI, L. M; SILVA, A. F. S.; SILVA, R. G.; GIORDANO, R. L. C. **Study of different media for production of penicillin G Acylase from *Bacillus magaterium* ATCC 14945.** *Appl. Biochem. Biot.*, v. 84 (6), p. 655-663, 2000.

SANCHEZ, N.; SANDOVAL, A. H.; DIAZ-CORRALES, F.; SERRANO, J. A. **Revista de la sociedade venezolana de microbiologia.** Caracas, 2004.

SANTESTEVAN, V. A. **Caracterização de frações de petróleo brasileiro por cromatografia gasosa.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.

SANT'ANNA JUNIOR, G.L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações.** Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering basic concepts.** New York. PHPTR, 2002.

TINOI, J., RAKARIYATHAM, N., DEMING, R. L. **Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate.** *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2551-2557, 2005.

VASCONCELOS, S. P. **Atividade enzimática e de biodegradação de microrganismos do petróleo da bacia de campos (pampo sul).** Tese de Doutorado. Universidade estadual de Campinas. Campinas, 2006.

WANG, P., KRAWIEC, S. **Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hidroxibifenyil by some newly isolated bacterial strains.** *Archive Microbiological*, p. 266–271, 1994.

WANG, P.; KRAWIEC, S. **Kinetic analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in batch and fed-batch cultures.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 1670–1675, 1996.

WHYTE, L. G.; SLAGMAN, S. J., PIETRANTONIO, F., BOURBONNIÈRE, L., KOVAL, S. F., LAWRENCE, J. R., INNIS, W. E., GREER, C. W. **Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 2961–2968, 1999.

YAKUBU, M. B. **Biological approach to oil spills remediation in the soil.** *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 24, p. 2735-2739, 2007.

YU, B.; MA, C., ZHOU, W., WANG, Y., CAI, X., TAO, F., ZHANG, Q., TONG, M., QU, J., XU, P. **Microbial desulfurization of gasoline by free whole-cells of *Rhodococcus erythropolis* XP.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 258, p. 284–289, 2006.

ZHANG, Q.; TONG, M. Y.; LI, Y. S.; GAO, H. J.; FANG, X. C. **Extensive desulfurization of diesel by *Rhodococcus erythropolis*.** *Biotechnology Letters*, v.29, p.123–127, 2007.

## APÊNDICE A

Figura 25A. Curva de calibração do crescimento *Rhodococcus erythropolis*.

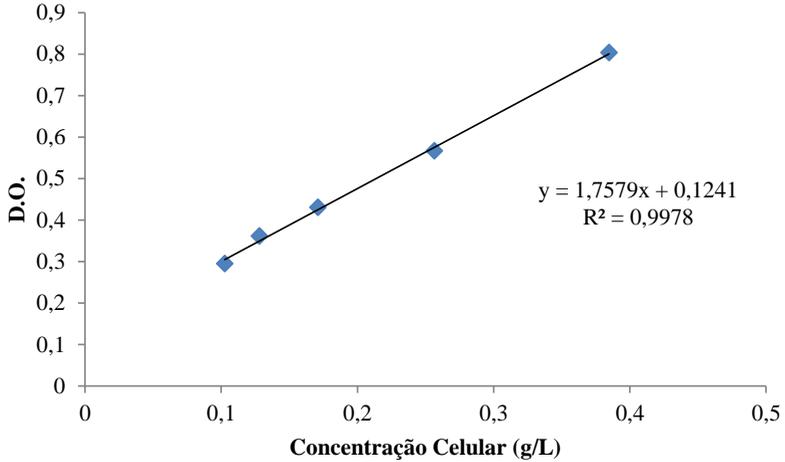


Figura 26A. Curva de calibração da concentração de glicose até 2,0 g/L.

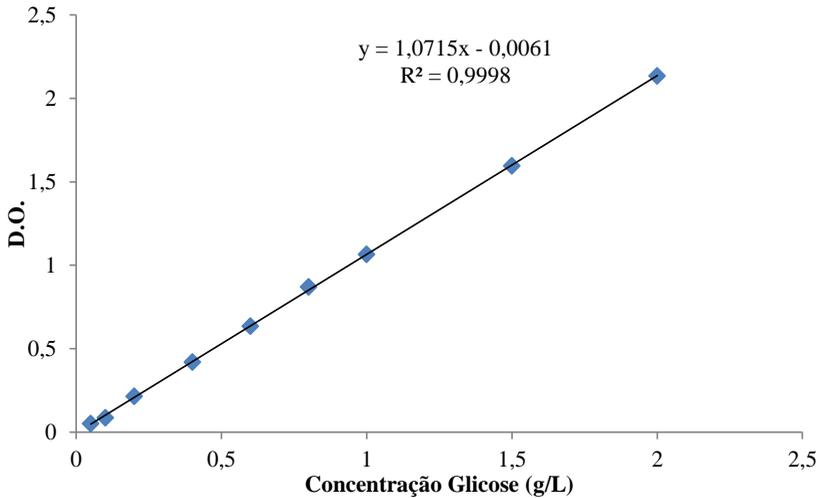
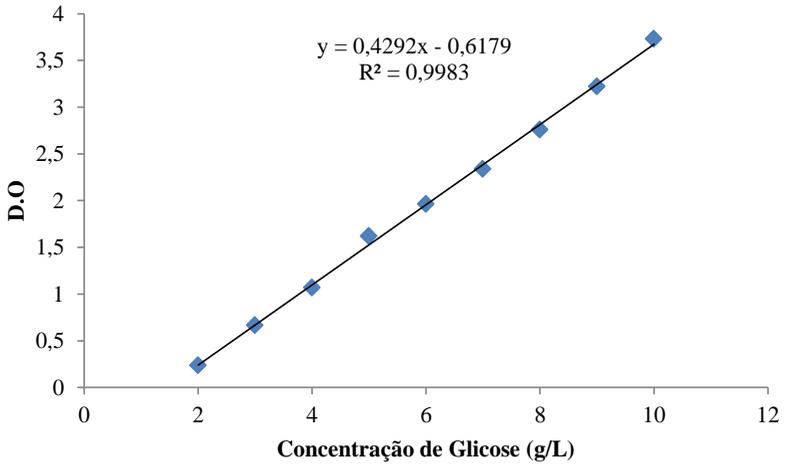


Figura 27A. Curva de calibração da concentração de glicose até 10 g/L.



## APÊNDICE B

Figura 28B. Cinéticas do Planejamento experimental.

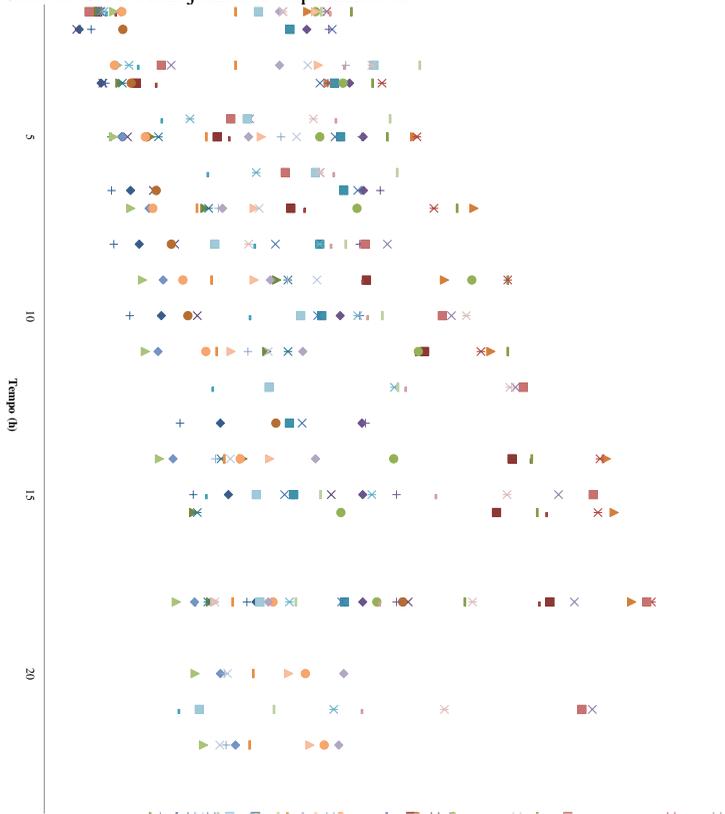


Figura 29B. Cinéticas do planejamento para otimização.

