

DANIELLE MAASS

**PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS À REMOÇÃO
DE ENXOFRE E NITROGÊNIO DO GASÓLEO PESADO E À
PRODUÇÃO DE SURFACTANTES A PARTIR DO RESÍDUO DA
EXTRAÇÃO BIFÁSICA DO AZEITE DE OLIVA**

Florianópolis
2015

Danielle Maass

**PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS À REMOÇÃO
DE ENXOFRE E NITROGÊNIO DO GASÓLEO PESADO E À
PRODUÇÃO DE SURFACTANTES A PARTIR DO RESÍDUO DA
EXTRAÇÃO BIFÁSICA DO AZEITE DE OLIVA**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção de Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza.

Coorientadoras: Prof.^a Dr.^a. Débora de Oliveira e Prof.^a Dr.^a. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza.

Florianópolis
2015

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

Maass, Danielle

Processos biotecnológicos aplicados à remoção de enxofre e nitrogênio do gasóleo pesado e à produção de surfactantes a partir do resíduo da extração bifásica do azeite de oliva / Danielle Maass ; orientador, Antônio Augusto Ulson de Souza ; coorientador, Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza. - Florianópolis, SC, 2015.

160 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Processos biotecnológicos. 3. Biodessulfurização. 4. Biodesnitrogenação. 5. Biossurfactante. I. Ulson de Souza, Antônio Augusto. II. de Arruda Guelli Ulson de Souza, Selene Maria . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Danielle Maass

**PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS À REMOÇÃO
DE ENXOFRE E NITROGÊNIO DO GASÓLEO PESADO E À
PRODUÇÃO DE SURFACTANTES A PARTIR DO RESÍDUO DA
EXTRAÇÃO BIFÁSICA DO AZEITE DE OLIVA**

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

Florianópolis, 12 de junho de 2015.

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
Coordenador do curso

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza
Orientador

Prof.^a Dr.^a Selene M. de A. Guelli Ulson de Souza
Coorientadora

Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira
Coorientadora

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Prof.^a Dr.^a Lorena Benathar Ballod Tavares

Prof. Dr. Marco di Luccio

Prof. Dr. Rogério Marcos Dal Lago

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

*Àquele que dá sentido a minha vida,
Jesus Cristo.*

*Ao meu grande amor, amigo,
conselheiro, confidente e esposo,
Gilles.*

*À minha grande incentivadora, minha
mãe, Arlete.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, os professores Antônio Augusto Ulson de Souza, Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza e Débora de Oliveira, pela confiança em mim depositada, pelas sugestões e por estarem sempre dispostos a compartilhar seus conhecimentos.

Ao professor José Vladimir de Oliveira, por suas contribuições indispensáveis à execução deste trabalho.

À professora Deisi Altmajer Vaz, por sua imprescindível contribuição na execução deste trabalho, pela oportunidade concedida, pela hospitalidade, paciência e dedicação.

Aos professores integrantes do Projeto CAPES/DGU: Lorena Benathar Ballod Tavares, Encarnación Jurado Alameda, José Alexandre Borges Valle, Rita de Cássia Siqueira Curto Valle, Elizabeth Wisbeck, Miguel García Román e Manuela Lechuga Villena, pela oportunidade outorgada e pelas orientações.

À professora Denise Esteves Moritz, pelo auxílio.

Aos professores Rogério Marco Dal Lago e Fábio Andrei Duarte, pela realização das análises de CHNS na Universidade Federal de Santa Maria.

Ao professor Pedro Luiz Manique Barreto e ao doutorando Matheus Vinicius de Oliveira Brisola Maciel, por permitirem e auxiliarem nas análises de tensão superficial.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos.

À CAPES, pelo apoio concedido através da bolsa de doutorado sanduíche vinculado ao Projeto de Cooperação Internacional –Convênio CAPES/DGU Edital n.040/2012.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFSC, pela oportunidade outorgada.

Ao colega Diego Todescato, pelo companheirismo e pela vasta contribuição na execução deste trabalho.

Às bolsistas de Iniciação Científica, Daniela Gier Della Rocca e Natália Cristina Fontão, pelo auxílio.

Aos colegas Ignacio Moya Ramírez e Darlane Wellen Freitas Soares pelo apoio, compreensão e cooperação.

A todos os colegas do grupo LABSIN/LABMASSA, em especial ao Diego Alex Mayer, Fabíola Vignola Hackbarth, Leonardo de Oliveira, Josilma Fontana e Simone Farias, pela amizade e por se mostrarem sempre prestativos.

E a todos que, embora não citados, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Tente mover o mundo – o primeiro passo é mover a si mesmo”

(Platão)

RESUMO

A crescente busca pela sustentabilidade industrial, motivada tanto por novas legislações ambientais quanto pelo aumento da consciência ambiental por parte dos consumidores finais, tem levado ao desenvolvimento de compostos de alta eficiência, com elevada biodegradabilidade e, principalmente, provenientes de fontes renováveis. Assim, a industrialização globalizada tem redirecionado a atenção para tecnologias emergentes abrindo oportunidades para diversos estudos, particularmente na área dos processos biotecnológicos. Neste contexto, buscou-se apontar alternativas para um dos principais problemas concernentes à indústria petroquímica na atualidade: a remoção ultraprofunda de poluentes como enxofre e nitrogênio dos combustíveis. Os processos de biodesnitrificação e biodessulfurização foram aplicados ao gasóleo pesado empregando *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 como biocatalisador. Os maiores percentuais de remoção do enxofre e do nitrogênio foram de 42,7 e 43,2%, respectivamente, alcançados nos experimentos contendo 40% (v/v) de gasóleo pesado. Uma vez que não se observou a diminuição da tensão superficial do meio de cultivo durante os processos de biodesnitrificação e biodessulfurização frente a diferentes condições de processo e nutrição, buscou-se encontrar outros resíduos que promovessem a formação de biossurfactantes. O resíduo sólido da extração do azeite de oliva foi o resíduo escolhido, pois dentre os testados foi o que proporcionou uma maior diminuição na tensão superficial do meio de cultivo. Assim, a capacidade da bactéria *Bacillus subtilis* DSM 3256 de produzir biossurfactante utilizando o resíduo sólido da extração do azeite de oliva como fonte de carbono foi estudada. A bactéria produziu aproximadamente 248,5 mg·L⁻¹ de surfactina após 36 h de fermentação. O biossurfactante produzido se mostrou estável frente a diferentes valores de pH e temperatura, além de apresentar a capacidade de remover óleo de motor de uma fonte arenosa. Embora o resíduo empregado possua grande concentração de compostos fenólicos, o biossurfactante produzido apresentou baixa toxicidade. Os dados obtidos representam uma evolução expressiva em relação à solução dos problemas citados, resultando em um avanço científico para uma futura aplicação industrial de ambos.

Palavras-chave: Biodesnitrificação, biodessulfurização, biossurfactante, gasóleo pesado, resíduos oleosos.

ABSTRACT

A crescent demand for industrial sustainability, motivated by new environmental regulations and an increased environmental awareness among consumers, has led to the development of high-efficiency compound, highly biodegradable and, especially, from renewable sources. Therefore, the global industrialization has redirected attention to emerging technologies opening up opportunities for several studies, particularly in the area of biotechnological processes. In this context, we sought alternative solutions to one of the major problem concerning the petrochemical industry currently: the deep ultra removal of pollutants such as sulfur and nitrogen from fuels. Bionitrogenation and biodesulfurization processes were applied to heavy gas oil using the *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 as biocatalyst. The highest percentages of sulfur and nitrogen removal were 42.7 and 43.2%, respectively, achieved in experiments containing 40% (v/v) of heavy gas oil. Since there was no decrease in the surface tension of the culture medium during the bionitrogenation and biodesulfurization processes against different process and nutrition conditions it sought to find other residues that promote the formation of biosurfactants. The two-phase olive mill waste was chosen because among those tested it was the one which provided a greater reduction in surface tension of the culture medium. Thus, the ability of *Bacillus subtilis* DSM 3256 to produce biosurfactants using the two-phase olive mill waste as a carbon source was studied. The bacterium produced approximately 248.5 mg·L⁻¹ of surfactin after 36 hours of fermentation. The biosurfactant partially purified showed a great stability against different pH and temperature values, besides, it was capable to remove motor oil from a contaminated sandy. Although the residue used exhibit a high concentration of phenolic compounds, the biosurfactant produced showed a low toxicity. These results represent a significant improvement to the solution of these problems, resulting in a scientific advancement for a future industrial application of both methodologies.

Keywords: Bionitrogenation, biodesulfurization, biosurfactant, heavy gas oil, oily waste

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema básico da produção do óleo diesel	40
Figura 2: Esquema básico de uma unidade de destilação atmosférica e a vácuo do petróleo	42
Figura 3: Unidade de craqueamento catalítico fluido do gasóleo pesado e óleo desasfaltado	43
Figura 4: Unidade genérica de hidrotratamento	45
Figura 5: Via metabólica Kodama da degradação oxidativa do dibenzotiofeno	47
Figura 6: Via metabólica “4S” da degradação do composto dibenzotiofeno	49
Figura 7: Diagrama conceitual de algumas etapas da dessulfurização de compostos Cx-DBTs	50
Figura 8: Diagrama conceitual do processo de BDS	52
Figura 9: Estrutura de compostos nitrogenados presentes no GOP. (1) quinolina; (2) isoquinolina; (3) indol; (4) 7,8-benzoquinolina; (5) 5,6-benzoquinoline; (6) carbazol e (7) 7H-dibenzo-c,g-carbazol	55
Figura 10: Vias metabólicas de degradação do carbazol	57
Figura 11: Determinação da CMI dos compostos GOP, óleo diesel A S1800, RAT e petróleo cru em relação ao <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC pelo método de difusão em ágar	67
Figura 12: Determinação da CMI pelo método de macrodiluição para diferentes concentrações de GOP	68
Figura 13: Percentual de dessulfurização e desnitração para as diferentes concentrações de GOP testadas em um reator descontínuo contendo células livres do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	69
Figura 14: Microscopia ótica das células de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 ao final dos processos de BDN e BDS em reatores contendo 40% (v/v) (a) e 100% (v/v) (b) de GOP	72
Figura 15: Principais processos de extração do azeite de oliva	90
Figura 16: Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos dos subprodutos da extração do azeite de oliva (Glc: Glicose; Rha: Ramnose)	95
Figura 17: Estruturas moleculares do SDS (A), um surfactante químico aniônico, e do Triton X-100 (B), um surfactante químico não iônico	96
Figura 18: Tensão superficial, interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante	97
Figura 19: Estrutura da principal isoforma da surfactina	102
Figura 20: Esquema experimental da lavagem de solo contaminado com óleo de motor	109

Figura 21: Evolução da (■) concentração da biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), (○) tensão superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$), (□) pH e (▲) concentração do biossurfactante ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ao longo do tempo durante toda a fermentação do RSEBAO por <i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256.....	115
Figura 22: Tensão superficial vs. logaritmo da concentração do biossurfactante parcialmente purificado.....	119
Figura 23: Espectro de FTIR do padrão de surfactina e do biossurfactante parcialmente purificado produzido pelo <i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256.....	122
Figura 24: Cromatograma do padrão de surfactina e do biossurfactante produzido	123
Figura 25: Curva de calibração da concentração de biomassa de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 versus densidade ótica	161
Figura 26: Curva de calibração da concentração de biomassa de <i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256 versus densidade ótica.....	162
Figura 27: Curva de calibração da concentração de óleo de motor versus densidade ótica.....	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frações típicas do petróleo	34
Tabela 2: Análise elementar do óleo cru típico (% em massa).....	34
Tabela 3: Análise elementar do gasóleo pesado (% em massa)	36
Tabela 4: Principais compostos ou classes de compostos aromáticos presentes no gasóleo pesado brasileiro.....	36
Tabela 5: Identificação dos compostos orgânicos sulfurados presentes no gasóleo pesado.....	39
Tabela 6: Composição do meio de manutenção YMA	59
Tabela 7: Composição do meio de biotransformação	59
Tabela 8: Construção do ensaio para a determinação da CIM	62
Tabela 9: Condições para os experimentos de dessulfurização e desnitrogenação do GOP pelas células livres de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277.....	64
Tabela 10: Variáveis e níveis testados no planejamento fatorial $2^{(7-2)}$..	65
Tabela 11: Teor de enxofre no GOP depois de submetido ao processo de BDS com <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	69
Tabela 12: Teor de nitrogênio no GOP depois de submetido ao processo de BDN com <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277.....	71
Tabela 13: Planejamento fatorial fracionado 2^{7-2} e a resposta em termos da concentração de enxofre no GOP ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	74
Tabela 14: Cálculo dos efeitos das variáveis e interações e respectivos índices estatísticos em relação à concentração de enxofre no GOP ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).....	77
Tabela 15: Planejamento fatorial fracionado 2^{7-2} e a resposta em termos da tensão superficial	79
Tabela 16: Cálculo dos efeitos das variáveis e interações e seus respectivos índices estatísticos	82
Tabela 17: Características químicas do resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva	93
Tabela 18: Trabalhos realizados sobre a produção de biossurfactantes utilizando diferentes micro-organismos	101
Tabela 19: Composição do meio de manutenção do <i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256	104
Tabela 20: Composição do meio de produção do biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256.....	106
Tabela 21: Composição do RSEBAO	112
Tabela 22: Influência das fontes de carbono na TS do meio de cultura da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256.....	113

Tabela 23: Índice de emulsificação (E_{24}) do sobrenadante isento de células em função do tempo de fermentação	118
Tabela 24: Ângulo de Contato (AC) e Tensão Interfacial (TI) do biossurfactante parcialmente purificado a 25 °C	120
Tabela 25: Estabilidade térmica do biossurfactante frente às temperaturas de 25, 45 e 65 °C ao longo do tempo	121
Tabela 26: Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes valores de pH a 25 °C	121
Tabela 27: Concentração dos compostos fenólicos no caldo de cultura e no biossurfactante produzido	124
Tabela 28: Toxicidade aguda do biossurfactante produzido para os ensaios com <i>Daphnia magna</i> e <i>Vibrio fischeri</i>	125
Tabela 29: Eficiência de lavagem (EL) obtida em testes realizados a 30°C com o biossurfactante parcialmente purificado.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-HBP	2-hidroxibifenila
AC	Ângulo de contato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BDN	Biodesnitração
BDS	Biodessulfurização
CMI	Concentração mínima inibitória
CMC	Concentração micelar crítica
CV	Coefficiente de variação
Cx-BT	Benzo-alquilados
Cx-DBT	Dibenzotiofenos
DBT	Dibenzotiofeno
DO	Densidade ótica
DQO	Demanda química de oxigênio
DSM	<i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i>
EEAO	Efluente da extração do azeite de oliva
FCC	<i>Fluid catalytic cracking</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)
GLP	Gás liquefeito de petróleo
GOL	Gasóleo leve
GOP	Gasóleo pesado
GOV	Gasóleo de vácuo
HCC	<i>Hydrocatalytic cracking</i>
HDS	Hidrodessulfurização
HDT	Hidrotratamento
MHC	<i>Mild hydrocracking</i>
NA	<i>Nutrient agar</i> (ágar nutritivo)
PPM	Partes por milhão
RAT	Resíduo atmosférico
RESVAC	Resíduo de vácuo
RPM	Rotações por minuto
RSEBAO	Resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva
RV	Resíduo de vácuo
TGS	Sulfato de triglicina
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência)
YMA	<i>Yeast malt extract agar</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

E_{24}	Índice de emulsificação	(%)
EC_{50}	<i>Half maximal effective concentration</i>	(%)
EL	Eficiência de lavagem	(%)
IC_{50}	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>	(%)
$M_{\text{membrana final}}$	Massa da membrana ao final do processo de secagem	(g)
$M_{\text{membrana inicial}}$	Massa da membrana no início do processo de secagem	(g)
O_f	Massa final do óleo de motor	(g)
O_i	Massa inicial do óleo de motor	(g)
p	Probabilidade do erro envolvido em aceitar o resultado como válido	
R^2	Coefficiente de correlação ou coeficiente de determinação	
TI	Tensão interfacial	($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)
TS	Tensão superficial	($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)
$V_{\text{alíquota}}$	Volume da alíquota	(L)
$[X]_{\text{final}}$	Concentração de biomassa final	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$[X]_{\text{inicial}}$	Concentração de biomassa inicial	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS.....	28
1.1.1 Objetivo geral.....	28
1.1.2 Objetivos específicos.....	28
1.2 ESTRUTURA DA TESE.....	29
2 DESSULFURIZAÇÃO E DESNITROGENAÇÃO DO GÁS ÓLEO PESADO EM SISTEMA BIFÁSICO POR <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ATCC 4277 EM REATOR DESCONTÍNUO ...	31
2.1 INTRODUÇÃO.....	31
2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.2.1 Constituintes do petróleo.....	33
2.2.1.1 Compostos sulfurados.....	35
2.2.2 Gasóleo pesado.....	35
2.2.2.1 Destilação.....	40
2.2.2.2 Craqueamento catalítico.....	42
2.2.2.3 Hidrocraqueamento.....	43
2.2.2.4 Hidrotratamento.....	44
2.2.3 Biodessulfurização.....	45
2.2.4 <i>Rhodococcus erythropolis</i>	49
2.2.5 Biodessulfurização: avanços e desafios.....	51
2.2.6 Bodesnitrogenação.....	54
2.2.7 Considerações sobre o estado da arte.....	57
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
2.3.1 Materiais.....	58
2.3.1.1 Micro-organismo.....	58
2.3.1.2 Meios de cultura, manutenção e de biotransformação.....	59
2.3.1.3 Gasóleo pesado - GOP.....	59
2.3.2 Métodos.....	60
2.3.2.1 Reativação das Células de <i>Rhodococcus erythropolis</i> Liofilizadas.....	60
2.3.2.2 Determinação da Concentração de Biomassa por Turbidimetria e Gravimetria.....	60
2.3.2.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	61
2.3.2.3.1 Método de Difusão em Ágar.....	61
2.3.2.3.2 Método da macrodiluição em caldo.....	62
2.3.2.4 Dessulfurização e desnitrogenação por células livres de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 em sistema reacional bifásico.....	63

2.3.2.4.1	Influência das condições de operação e das fontes dos macro-nutrientes na capacidade de dessulfurização e desnitração do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	64
2.3.2.5	<i>Análises</i>	65
2.3.2.5.1	Análise elementar- CHNS	65
2.3.2.5.2	Tensão Superficial	65
2.3.2.5.3	Análise estatística	65
2.3.2.5.4	Microscopia ótica	66
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
2.4.1	Influência da concentração de GOP no crescimento da bactéria <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	66
2.4.2	Capacidade de dessulfurização do GOP por <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	68
2.4.3	Capacidade de desnitração do GOP pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	70
2.4.4	Influência das condições de processo (pH, temperatura, agitação) e das fontes de nitrogênio e carbono no meio de cultivo	73
2.4.4.1	<i>Na capacidade de dessulfurização</i>	73
2.4.4.2	<i>Na tensão superficial do meio de cultivo</i>	78
2.5	CONCLUSÕES PARCIAIS	84
3	PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE PELO <i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256 A PARTIR DO RESÍDUO SÓLIDO DA EXTRAÇÃO BIFÁSICA DO AZEITE DE OLIVA	87
3.1	INTRODUÇÃO	87
3.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	88
3.2.1	Métodos de extração do azeite de oliva	90
3.2.1.1	<i>Prensagem descontínua</i>	91
3.2.1.2	<i>Processo contínuo trifásico</i>	91
3.2.1.3	<i>Processo contínuo bifásico</i>	92
3.2.2	Resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva	93
3.2.2.1	<i>Composição geral</i>	93
3.2.2.2	<i>Compostos fenólicos</i>	94
3.2.2.3	<i>Aplicações</i>	96
3.2.3	Biossurfactantes	96
3.2.3.1	<i>Classificação dos biossurfactantes</i>	99
3.2.3.2	<i>Produção de biossurfactantes</i>	100
3.2.4	Considerações sobre o estado da arte	103
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	103
3.3.1	Materiais	104

3.3.1.1	<i>Micro-organismo e meio de manutenção</i>	104
3.3.1.2	<i>Resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva (RSEBAO) “alperujo”</i>	104
3.3.1.3	<i>Resíduos oleosos</i>	105
3.3.2	Métodos	105
3.3.2.1	<i>Produção do biossurfactante</i>	105
3.3.2.2	<i>Determinação da concentração de biomassa</i>	106
3.3.2.3	<i>Recuperação e purificação do biossurfactante</i>	106
3.3.2.4	<i>Tensão Superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)</i>	107
3.3.2.5	<i>Tensão Interfacial e Ângulo de Contato</i>	107
3.3.2.6	<i>Estabilidade do biossurfactante</i>	107
3.3.2.7	<i>Índice de emulsificação (E_{24})</i>	108
3.3.2.8	<i>Determinação da concentração de compostos fenólicos</i>	108
3.3.2.9	<i>Teste de lavagem de solos</i>	108
3.3.2.10	<i>Ensaio de toxicidade aguda</i>	110
3.3.2.11	<i>Análises</i>	111
3.3.2.11.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	111
3.3.2.11.2	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) e espectroscopia de massa	111
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	111
3.4.1	Caracterização do RSEBAO	112
3.4.2	Efeito de diferentes fontes de carbono na tensão superficial	112
3.4.3	Produção do biossurfactante	115
3.4.4	Índice de emulsificação (E_{24})	117
3.4.5	Concentração Micelar Crítica	118
3.4.6	Ângulo de Contato e Tensão Interfacial	119
3.4.7	Avaliação da estabilidade do biossurfactante	120
3.4.8	Caracterização do biossurfactante produzido	122
3.4.9	Concentração de compostos fenólicos	123
3.4.10	Toxicidade aguda	125
3.4.11	Lavagem de solos	126
3.5	CONCLUSÕES PARCIAIS	128
4	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	129
4.1	DESSULFURIZAÇÃO E DESNITROGENAÇÃO DO GASÓLEO PESADO EM SISTEMA BIFÁSICO PELO <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ATCC 4277 EM REATOR DESCONTÍNUO	129
4.1.1	Sugestões para trabalhos futuros	130

4.2 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE PELO <i>BACILLUS SUBTILIS</i> DSM 3256 A PARTIR DO RESÍDUO SÓLIDO DA EXTRAÇÃO BIFÁSICA DO AZEITE DE OLIVA.....	130
4.2.1 Sugestões para trabalhos futuros	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
APÊNDICE A.....	161
APÊNDICE B.....	163

1 INTRODUÇÃO

Processos biotecnológicos usualmente referem-se à combinação dos conceitos inerentes à engenharia como projetar, desenvolver e analisar com os princípios e propriedades que regem os processos biológicos. Essa junção pode resultar na formação de algum composto comercialmente interessante ou na remoção de substâncias indesejáveis ou perigosas.

O uso desse tipo de tecnologia remonta à antiguidade, contudo, nas últimas décadas esta se encontra em evidência. Muito pelo recente domínio sobre a técnica de manipulação genética, mas em parte também devido ao apelo ambiental que contém. Geralmente, os processos biotecnológicos são menos poluentes, não necessitam de grandes dispêndios de energia e geram resíduos de baixa toxicidade.

A biodesnitrogenação e a biodessulfurização são processos biotecnológicos que vêm sendo desenvolvidos para suprir a deficiência tecnológica na remoção de poluentes como enxofre e nitrogênio dos combustíveis fósseis. A retirada desses poluentes até níveis ultrabaixos se encontra em voga nas últimas décadas em função das legislações cada vez mais exigentes. Esses processos possuem algumas vantagens em relação aos já utilizados pelas indústrias petroquímicas como o emprego de micro-organismos como catalisadores, condições de operação (pressão e temperatura) amenas e a capacidade de remover os poluentes dos compostos recalcitrantes. O gasóleo pesado é uma fração proveniente da etapa de destilação atmosférica e, após ser submetido a algumas outras etapas do processo de refino, é incorporado ao óleo diesel. Por isso, a retirada do enxofre e do nitrogênio deste resultaria na produção de óleo diesel com baixo teor de poluentes e evitaria alguns outros problemas no refino de petróleo, como o envenenamento dos catalisadores.

Assim, neste trabalho buscou-se estudar a remoção de enxofre e nitrogênio do gasóleo pesado pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, bem como a produção de biossurfactantes. Contudo, resultados preliminares demonstraram que a produção de biossurfactante pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 utilizando o gasóleo pesado como fonte de carbono não foi promissora. Portanto, procurou-se estudar a formação de biossurfactantes a partir de outras fontes de carbono.

Uma das fontes de carbono testadas foi o resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva. O interesse por produzir biossurfactante a partir deste resíduo provém da necessidade de se

reaproveitar a grande quantidade gerada anualmente, uma vez que a produção mundial de azeite de oliva em 2012 foi de 3,3 milhões de toneladas métricas, e do seu caráter tóxico, atribuído principalmente a alguns tipos de compostos fenólicos. Para a produção de biossurfactante utilizando o resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva foi empregada a bactéria *Bacillus subtilis* DSM 3256 que é amplamente conhecida por sua capacidade de produzir biotensoativos a partir de resíduos, em especial, com os de caráter oleoso.

Assim sendo, buscou-se propor soluções a problemas atmosféricos gerados pela presença de óxidos de enxofre e nitrogênio e a ausência de aplicações para a grande quantidade de resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva utilizando processos biotecnológicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver processos biotecnológicos visando a remoção de poluentes (enxofre e nitrogênio) do gasóleo pesado e encontrar uma aplicação para o resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de dessulfurização e desnitração pela bactéria *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 frente a diferentes concentrações de gasóleo pesado em reator batelada;
- Determinar as Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) do gasóleo pesado sobre *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277;
- Estudar a influência de fatores como pH, temperatura e agitação na capacidade de dessulfurização e desnitração do micro-organismo;
- Analisar como as fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultivo influem na capacidade de dessulfurização e desnitração pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277;
- Avaliar a formação de biossurfactantes durante os processos de biodessulfurização e biodessulfurização, bem como sua influência no processo e no produto final;
- Avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes pela bactéria *Bacillus subtilis* DSM 3256 empregando diferentes fontes de carbono ao meio de cultivo;

- Estudar a produção de biossurfactantes pelo *Bacillus subtilis* DSM 3256 a partir do resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva;
- Caracterizar o biossurfactante produzido quanto a sua estrutura química e suas propriedades superficiais (capacidade de produzir emulsões estáveis, concentração micelar crítica, tensão superficial e interfacial);
- Determinar a concentração de compostos fenólicos presentes no biossurfactante bem como sua toxicidade aguda;
- Investigar a capacidade do biossurfactante produzido em remover óleo de motor de um solo arenoso.

1.2 ESTRUTURA DA TESE

Para uma melhor compreensão das atividades desenvolvidas, esta tese foi dividida em quatro capítulos.

O Capítulo 1 contextualiza e apresenta a motivação para a realização deste trabalho, delinea a problemática em que se insere, bem como os objetivos que o cercam.

Nos Capítulos 2 e 3 são apresentados, brevemente, os principais conceitos e publicações científicas concernentes aos processos biotecnológicos estudados. São descritos também os materiais e os métodos empregados na condução dos experimentos. Além disso, os resultados mais relevantes são apontados e discutidos. E, finalmente, se enumeram as conclusões parciais.

O Capítulo 4 retrata as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

2 DESSULFURIZAÇÃO E DESNITROGENAÇÃO DO GÁS ÓLEO PESADO EM SISTEMA BIFÁSICO POR *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 EM REATOR DESCONTÍNUO

Neste capítulo é apresentado o levantamento bibliográfico dos principais trabalhos abordando os aspectos fundamentais envolvidos nos processos de dessulfurização e desnitração, bem como as características gerais do gásóleo pesado e da bactéria *Rhodococcus erythropolis*. Também são descritos os métodos empregados. Os principais resultados obtidos são apontados e discutidos, e são expostas as conclusões parciais referentes a essa etapa do trabalho.

2.1 INTRODUÇÃO

A queima de combustíveis fósseis gera poluentes como dióxidos de nitrogênio e enxofre (NO_2 , SO_2). Estes compostos são prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Assim, as regulamentações ambientais em todo o mundo têm exigido uma redução nos teores de enxofre e nitrogênio dos combustíveis fósseis, especialmente do enxofre, requerendo concentrações inferiores a $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (OYAMA et al., 2008). A obtenção de combustíveis com teores ultrabaixos de compostos poluentes está se tornando um problema para a indústria petroquímica, uma vez que os processos de hidrogenação catalítica existentes não alcançam os níveis de remoção necessários, principalmente porque não são capazes de remover completamente os compostos recalcitrantes de enxofre e nitrogênio (ALVES; MESQUITA; GÍRIO, 1999; DINAMARCA et al., 2014; ONAKA et al., 2001; OYAMA et al., 2008; SONG, 2003; STANISLAU; MARAFI; RANA, 2010). Outro problema é que a maior parte do petróleo bruto extraído a nível mundial está exibindo, progressivamente, maiores níveis de teor de enxofre e valores de densidade superiores (DINAMARCA et al., 2014).

A biodessulfurização vem sendo desenvolvida nas últimas décadas para substituir e/ou complementar o processo convencional. Na BDS, a degradação do enxofre ocorre pela ação de um micro-organismo que atua como um catalisador removendo seletivamente o enxofre dos compostos heterocíclicos sob condições amenas de pressão e temperatura (DINAMARCA et al., 2014; GUPTA; ROYCHOUDHURY; DEB, 2004; LE BORGNE; QUINTERO, 2003).

A aplicação industrial da BDS depende ainda de vários fatores, um deles é a seleção de cepas microbianas com a capacidade de remover o enxofre dos combustíveis fósseis, sem diminuir a capacidade energética, e que seja, ao mesmo tempo, industrial e ambientalmente estável. Vários micro-organismos pertencentes a diferentes gêneros demonstraram ser capazes de remover o enxofre presente em compostos heterocíclicos, tais como: *Brevibacterium sp.* (AFFERDEN et al., 1990), *Corynebacterium sp.* (MAGHSOUDI et al., 1999), *Rhodococcus sp.* (MAGHSOUDI et al., 2001), *Paenibacillus sp.* (IZUMI; OHSHIRU, 2001), *Pseudomonas sp.* (KEULEN; CORREIA; DA FONSECA, 1997), *Gordonia sp.* (CHANG et al., 2000) e *Bacillus sp.* (KIRIMURA et al., 2001). Contudo, os produtos obtidos ao final do processo de BDS não são sempre os mesmos e quase nenhum chega a ser economicamente vantajoso (MCFARLAND, 1999; SETTI; LANZARINI; PIFFERI, 1997).

O gênero *Rhodococcus sp.* tem sido amplamente aplicado no processo de BDS porque remove o enxofre dos compostos heterocíclicos, transformando-o em sulfato, sem quebrar os anéis aromáticos, mantendo assim a capacidade energética dos combustíveis (GRAY et al., 1996; GUPTA; ROYCHOUDHURY; DEB, 2004; KILLBANE, 2006). Outra grande vantagem desta bactéria são suas características hidrofóbicas, que aumentam o contato entre a célula e os compostos sulfurosos dos combustíveis (MONTICELLO, 2000). Quando comparado a outras cepas, a bactéria *Rhodococcus sp.*, apresenta maior velocidade específica de degradação e estabilidade durante o processo de BDS (FOLSOM et al., 1999; GUCHHAIT et al., 2005; LI et al., 2008; MAGHSOUDI et al., 2001; MAASS et al., 2014; MCFARLAND, 1999; NAITO et al., 2001; YU et al., 2006; ZHANG et al., 2007).

Analogamente, a biodesnitrogenação (BDN) é um processo em que o nitrogênio é removido dos compostos heterocíclicos, pela ação de micro-organismos. No entanto, o desenvolvimento deste processo não tem tido grandes avanços nos últimos anos porque os micro-organismos capazes de retirar o nitrogênio utilizam uma via metabólica em que este é liberado somente após a degradação completa dos substratos (LE BORGNE; QUINTERO, 2003).

Para fins práticos, o desenvolvimento da BDS e BDN requer o uso de produtos e subprodutos reais da destilação do petróleo, tais como o diesel, a gasolina e gasóleo (CASTORENA et al., 2002; DINAMARCA et al., 201; GUCHHAIT et al., 2005; LI et al., 2008; MAGHSOUDI et al., 2001; MAASS et al., 2014; YANG et al., 2007;

ZHANG et al., 2007). O gasóleo pesado (GOP) é uma fração intermediária, obtida a partir da destilação a vácuo, empregada na produção de diesel e alguns lubrificantes. A dessulfurização e desnitração desta fração poderia resultar na redução de processos de tratamento subsequentes, aumentando a viabilidade industrial e econômica da BDS e BDN (OTSUKI et al., 2000).

Com base nestes aspectos, esta etapa do trabalho visa, de maneira geral, avaliar a capacidade de dessulfurização e desnitração do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em um reator de batelada.

2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item é apresentado o levantamento bibliográfico das principais publicações a respeito dos aspectos fundamentais envolvidos nos processos de biodessulfurização e biodesnitração, bem como das características gerais do gasóleo pesado e *Rhodococcus erythropolis*.

2.2.1 Constituintes do petróleo

Segundo Thomas (2004), o petróleo, do latim *petra* (pedra) e *oleum* (óleo), é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e cor variando entre o negro e o castanho-claro. É formado a partir da decomposição de plantas e animais marinhos, sendo resultado da transformação destes por meio das mudanças de calor e pressão sob a superfície da terra (FATORELLI, 2005).

O petróleo contém centenas de compostos químicos, no entanto, é separado em frações de acordo com a faixa de ebulição dos compostos (THOMAS, 2004). A Tabela 1 apresenta as frações típicas que são obtidas do petróleo.

Tabela 1: Frações típicas do petróleo

Fração	Temperatura de ebulição (°C)	Composição aproximada	Usos
Gás residual	----	C ₁ – C ₂	gás combustível.
Gás liquefeito de petróleo – GLP	Até 40	C ₃ – C ₄	gás engarrafado, uso doméstico e industrial.
Gasolina	40 – 175	C ₅ – C ₁₀	combustível de automóveis, solvente.
Querosene	175 – 235	C ₁₁ – C ₁₂	iluminação, combustível de aviões a jato.
Gasóleo leve	235 – 305	C ₁₃ – C ₁₇	diesel, fornos.
Gasóleo pesado	305 – 400	C ₁₈ – C ₂₅	combustível, matéria-prima para lubrificantes.
Lubrificantes	400 – 510	C ₂₆ – C ₃₈	óleos lubrificantes.
Resíduo	Acima de 510	C ₃₈₊	asfalto, piche, impermeabilizantes.

Fonte: Thomas (2004).

Apesar dos óleos obtidos de diferentes reservatórios possuírem características distintas, a maioria é composta principalmente por hidrogênio e carbono (hidrocarbonetos), na razão de 2:1 aproximadamente. No entanto, encontra-se ainda uma quantidade muito pequena de outros elementos, como enxofre, nitrogênio e oxigênio, bem como de metais, principalmente níquel e vanádio (FATORELLI, 2005). Na Tabela 2 tem-se o resultado de uma análise elementar do óleo cru típico.

Tabela 2: Análise elementar do óleo cru típico (% em massa)

Elemento	Percentual em massa (%)
Hidrogênio	11 – 14
Carbono	83 – 87
Enxofre	0,06 – 8
Nitrogênio	0,11 – 1,7
Oxigênio	0,1 – 2
Metais	até 0,3

Fonte: Thomas (2004).

Todavia, nas refinarias, submete-se o petróleo a diversos processos pelos quais se obtêm grande diversidade de derivados, tais como o gás liquefeito de petróleo (GLP), gasolina, naftas, óleo diesel, gasóleos, querosenes de aviação e de iluminação, óleo combustível, asfalto, lubrificantes, solventes, parafinas, coque de petróleo e resíduos. As parcelas dos derivados produzidos em determinada refinaria variam de acordo com o tipo de óleo cru processado (THOMAS, 2004).

2.2.1.1 Compostos sulfurados

O enxofre é o terceiro elemento mais abundante encontrado no petróleo, apresentando uma concentração na faixa de 0,06 e 8,0%, sendo considerada como concentração média 0,65% em massa. Normalmente, encontra-se esse elemento 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.

Além disso, são tóxicos e produzem SO_2 e SO_3 por combustão, gases extremamente poluentes da atmosfera, os quais formam H_2SO_3 e H_2SO_4 (ácido sulfúrico) quando em contato com a umidade do ar (THOMAS, 2004).

2.2.2 Gasóleo pesado

Por se tratar de uma complexa mistura de compostos orgânicos e inorgânicos - em que predominam os hidrocarbonetos - o petróleo bruto, no estado em que é extraído do solo, possui pouquíssimas aplicações. Visando o pleno aproveitamento de seu potencial energético, bem como sua utilização como fonte de matérias-primas, se faz necessário o seu desmembramento em frações, com padrões pré-estabelecidos para determinados objetivos. O refino do petróleo consiste, portanto, em uma série de beneficiamentos para a obtenção de diferentes frações, estas sim

de grande interesse comercial (ABADIE et al., 2002; MARIANO, 2005; SPEIGHT, 1998).

Os gasóleos são frações intermediárias, obtidas principalmente a partir do processo de destilação e, geralmente, são classificados em dois tipos: gasóleo leve (GOL) e gasóleo pesado (GOP) (MARIANO, 2005).

O GOP ou gasóleo de vácuo (GOV) é um subproduto do processo de destilação a vácuo e sua composição química é bastante complexa, por isso há poucos estudos reportando a análise desses componentes. Os resultados da caracterização química do GOP são extremamente importantes para a indústria petroquímica, uma vez que proporcionam o acesso a informações sobre a natureza, composição química e aplicabilidade dessa fração (FARAH, 2012; ÁVILA et al., 2011).

Nas Tabela 3 e 4 encontram-se descritas a composição elementar do GOP e os principais compostos aromáticos ou classes de compostos aromáticos identificados a partir de amostras de petróleo brasileiro, respectivamente.

Tabela 3: Análise elementar do gasóleo pesado (% em massa)

Elemento	Percentual em massa (%)
Hidrogênio	12,00
Carbono	85,27
Enxofre	2,45
Nitrogênio	0,17

Fonte: Ma; Sakanishi; Mochida (1996).

Tabela 4: Principais compostos ou classes de compostos aromáticos presentes no gasóleo pesado brasileiro

Nome do composto ou classe	Fórmula molecular
C3-Alquilbenzenos	C_9H_{12}
C4-Alquilbenzenos	$C_{10}H_{14}$
C5-Alquilbenzenos	$C_{11}H_{16}$
Naftalenos	$C_{10}H_8$
C1-Alquilnaftalenos	$C_{11}H_{10}$
C2-Alquilnaftalenos	$C_{12}H_{12}$
C3-Alquilnaftalenos	$C_{13}H_{14}$
Fenantreno	$C_{14}H_{10}$
C1-Alquilfenantrenos	$C_{15}H_{12}$
C2-Alquilfenantrenos	$C_{16}H_{14}$
C3-Alquilfenantrenos	$C_{17}H_{16}$
C4-Alquilfenantrenos	$C_{18}H_{18}$

Continuação **Tabela 4**

Nome do composto ou classe	Fórmula molecular
C5-Alquilfenantrenos	C ₁₉ H ₂₀
C6-Alquilfenantrenos	C ₂₀ H ₂₂
C6-Alquilfenantrenos	C ₂₁ H ₂₄
Pireno	C ₁₆ H ₁₀
C1-Alquilpirenos	C ₁₇ H ₁₂
C2-Alquilpirenos	C ₁₈ H ₁₄
C3-Alquilpirenos	C ₁₉ H ₁₆
C4-Alquilpirenos	C ₂₀ H ₁₈
C5-Alquilpirenos	C ₂₁ H ₂₀
C6-Alquilpirenos	C ₂₂ H ₂₂
C7-Alquilpirenos	C ₂₃ H ₂₄
C8-Alquilpirenos	C ₂₄ H ₂₆
Benzo[a]antraceno	C ₁₈ H ₁₂
Criseno	C ₁₈ H ₁₂
C1-Alquilcrisenos	C ₁₉ H ₁₄
C2-Alquilcrisenos	C ₂₀ H ₁₆
C3-Alquilcrisenos	C ₂₁ H ₁₈
C4-Alquilcrisenos	C ₂₂ H ₂₀
C5-Alquilcrisenos	C ₂₃ H ₂₂
Benzo[k]fluoretano	C ₂₀ H ₁₂
Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂
C1-Alquilbenzo[k]fluoretanos	C ₂₁ H ₁₄
C2-Alquilbenzo[k]fluoretanos	C ₂₂ H ₁₆
C3-Alquilbenzo[k]fluoretanos	C ₂₃ H ₁₈
C4-Alquilbenzo[k]fluoretanos	C ₂₄ H ₂₀
C5-Alquilbenzo[k]fluoretanos	C ₂₅ H ₂₂
Dibenzo[a,h]antraceno	C ₂₂ H ₁₄
C1-Alquildibenzo[a,h]antracenos	C ₂₃ H ₁₆
C2-Alquildibenzo[a,h]antracenos	C ₂₄ H ₁₈
C3-Alquildibenzo[a,h]antracenos	C ₂₅ H ₂₀
Benzo[g,h,i]perileno	C ₂₂ H ₁₂
C1-Alquilbenzo[g,h,i]perilenos	C ₂₃ H ₁₄
C2-Alquilbenzo[g,h,i]perilenos	C ₂₄ H ₁₆
Benzonaftotiofenos	C ₁₆ H ₁₀ S
C1-Alquilbenzonaftotiofenos	C ₁₇ H ₁₂ S
C2-Alquilbenzonaftotiofenos	C ₁₈ H ₁₄ S
C3-Alquilbenzonaftotiofenos	C ₁₉ H ₁₆ S
Tetrahidrocriseno-C21	C ₂₁ H ₂₂

Continuação **Tabela 4**

Nome do composto ou classe	Fórmula molecular
Tetrahidrocriseno-C22	$C_{22}H_{24}$
Tetra-aromático triterpenóide-C23	$C_{23}H_{20}$
Tetra-aromático triterpenóide-C24	$C_{24}H_{22}$
Tetra-aromático triterpenóide-C25	$C_{25}H_{24}$
Triaromáticoesteróide-C19	$C_{19}H_{18}$
Triaromático esteróide-C20	$C_{20}H_{20}$
Triaromático esteróide-C21	$C_{21}H_{22}$
Triaromático esteróide-C22	$C_{22}H_{24}$
Triaromático esteróide-C23	$C_{23}H_{26}$
Triaromático esteróide-C24	$C_{24}H_{28}$
Triaromático esteróide-C25	$C_{25}H_{30}$
Triaromático esteróide-C26	$C_{26}H_{32}$
Triaromático esteróide-C27	$C_{27}H_{34}$
Triaromático esteróide-C28	$C_{28}H_{36}$
Metil-triaromático esteróide-C20	$C_{20}H_{20}$
Metil-triaromático esteróide-C21	$C_{21}H_{22}$
Metil-triaromático esteróide-C22	$C_{22}H_{24}$
Metil-triaromático esteróide-C23	$C_{23}H_{26}$
Metil-triaromático esteróide-C24	$C_{24}H_{28}$
Metil-triaromático esteróide-C25	$C_{25}H_{30}$
Metil-triaromático esteróide-C26	$C_{26}H_{32}$
Metil-triaromático esteróide-C27	$C_{27}H_{34}$
Metil-triaromático esteróide-C28	$C_{28}H_{36}$
Metil-triaromático esteróide-C29	$C_{29}H_{38}$

Fonte: Ávila et al. (2011).

Com relação aos compostos sulfurosos, podem existir variações quanto à classificação e concentração de acordo com a origem do petróleo bruto. No entanto, há alguns estudos no sentido de identificar os principais compostos sulfurosos presentes no gasóleo pesado (MA; SAKANISHI; MOCHIDA, 1996). Na Tabela 5 têm-se os principais compostos encontrados no GOP brasileiro.

Tabela 5: Identificação dos compostos orgânicos sulfurados presentes no gasóleo pesado

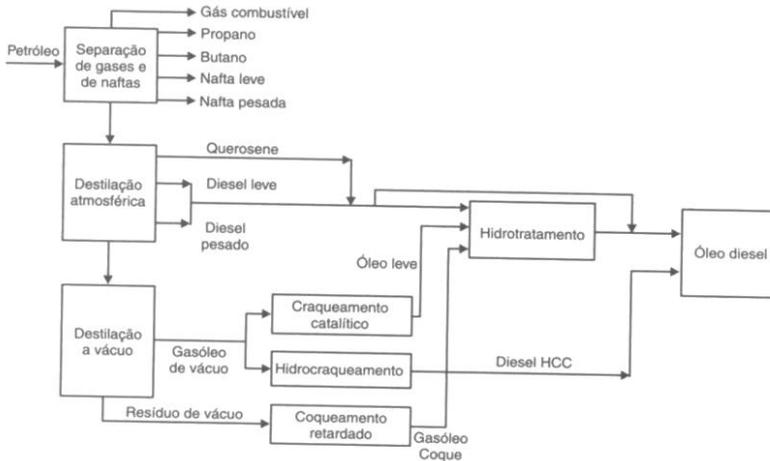
Classe	Subclasse	Fórmula molecular
Benzotiofeno	C0-BT	C_8H_6S
	C1-BT	C_9H_8S
	C2-BT	$C_{10}H_{10}S$
	C3-BT	$C_{11}H_{12}S$
	C4-BT	$C_{12}H_{14}S$
	C5-BT	$C_{14}H_{12}S$
Dibenzotiofeno ou Naftotiofeno	C0-DBT	$C_{12}H_8S$
	C1-DBT	$C_{13}H_{10}S$
	C2-DBT	$C_{14}H_{12}S$
	C2-NT	$C_{14}H_{12}S$
	C3-DBT	$C_{15}H_{14}S$
Dihidrodibenzotiofeno	C0-DHDBT	$C_{12}H_{10}S$
	C1-DHDBT	$C_{13}H_{14}S$
Benzonaftotiofeno	BNT	$C_{16}H_{14}S$
	C1-DHBNT	$C_{17}H_{14}S$
	C1-THBNT	$C_{17}H_{16}S$
	C1-BNT	$C_{17}H_{12}S$
	C2-DHBNT	$C_{18}H_{16}S$
Dinaftotiofeno	C0-DNT	$C_{20}H_{12}S$
	DHDNT	$C_{20}H_{14}S$
Difenilpropenetiol		$C_{15}H_{14}S$
		$C_{16}H_{12}S$

Fonte: Machado (2013).

O GOP é uma importante fração no processo de refino do petróleo, pois após ser submetido aos processos de craqueamento catalítico, hidrocraqueamento e hidrotreatamento, é incorporado ao óleo diesel. Na Figura 1 ilustram-se todos os processos ao qual o GOP é

submetido, abrangendo sua obtenção, tratamento e adição ao diesel. Discorrer-se-á mais detalhadamente sobre esses processos a seguir (FARAH, 2012).

Figura 1: Esquema básico da produção do óleo diesel



Fonte: Farah (2012).

2.2.2.1 Destilação

A destilação é um processo de separação dos componentes de uma mistura de líquidos miscíveis, baseado na diferença das temperaturas de ebulição de seus componentes individuais (ABADIE et al., 2002). A fim de se aproveitar efetivamente o potencial energético do petróleo cru, este deve ser submetido à destilação. Portanto, nas unidades de destilação as frações de petróleo são separadas em função da diferença em suas faixas de ponto de ebulição (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2013).

O processo de destilação pode ser feito em várias etapas e em diferentes níveis de pressão, conforme o objetivo desejado. Assim, quando se trata de uma unidade de destilação de petróleo bruto, pode-se ter a destilação atmosférica, destilação a vácuo, o pré-fracionamento e a desbutanização (ABADIE et al., 2002).

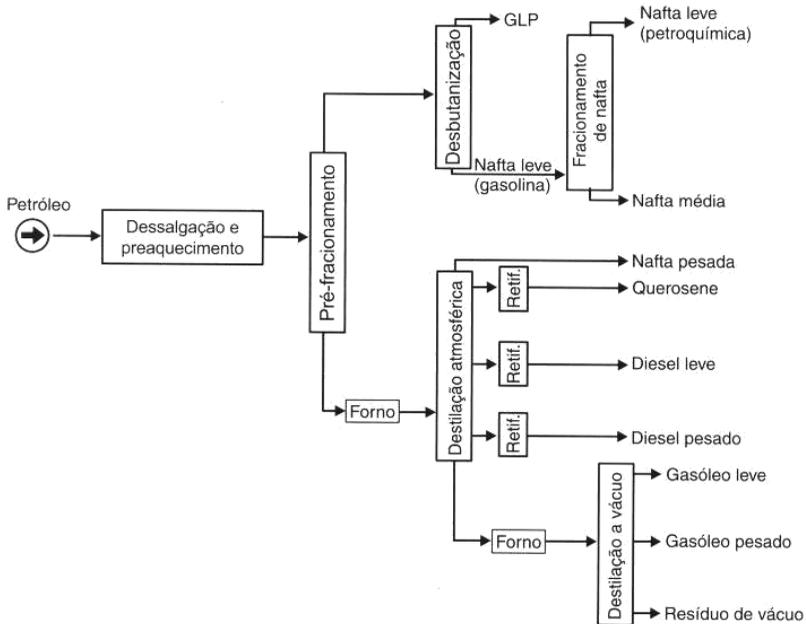
Conforme aumentam as massas molares dos hidrocarbonetos presentes na mistura do petróleo aumentam também seus pontos de ebulição, por isso, ao se variarem as condições de aquecimento do

petróleo, pela destilação atmosférica, é possível vaporizar compostos leves, intermediários e pesados que, ao se condensarem, podem ser separados. Neste processo, ocorre também a formação de um resíduo bastante pesado que, nas condições de temperatura e pressão da destilação atmosférica, não se vaporiza. Por isso há a necessidade de se submeter este resíduo ao processo de destilação a vácuo (MARIANO, 2005).

O processo básico de uma refinaria de petróleo se inicia com a operação de preaquecimento e dessalinização, no qual a maior parte da água emulsionada e os sais nela dissolvidos são removidos (ABADIE et. al., 2002, MARIANO, 2005). Concluída a dessalinização, separam-se o gás combustível, o GLP e a nafta leve, que constituem a parte leve do petróleo, na torre de pré-fracionamento. Esses produtos seguem para a torre desbutanizadora, onde são separados, sendo que a nafta pode ser fracionada em duas ou mais frações.

O produto de fundo da torre de pré-fracionamento é aquecido a uma temperatura mais elevada, com o propósito de se separar a nafta pesada, o querosene e os gasóleos atmosféricos leves e pesados, também denominados diesel, com cerca de 400 °C de ponto final de ebulição. Os cortes de querosene e de gasóleos atmosféricos são retificados para acerto do ponto de fulgor. O resíduo dessa torre, denominado resíduo atmosférico (RAT) segue, então, para a torre de vácuo para permitir a separação das frações pesadas, gasóleo leve (GOL) e pesado (GOP) de vácuo, tendo-se como produto fundo o resíduo de vácuo, RV ou RESVAC. Esse processo básico de destilação encontra-se ilustrado na Figura 2 (FARAH, 2012).

Figura 2: Esquema básico de uma unidade de destilação atmosférica e a vácuo do petróleo



Fonte: Farah (2012).

2.2.2.2 Craqueamento catalítico

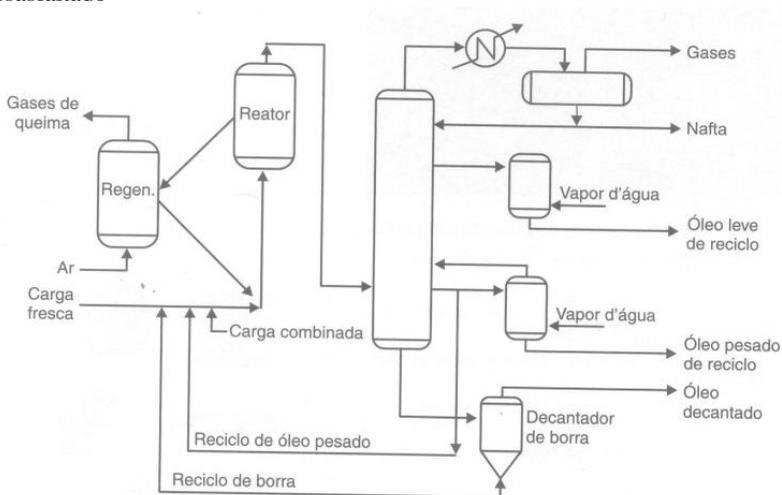
O craqueamento catalítico é um processo de quebra molecular, que visa fragmentar grandes moléculas de hidrocarbonetos em moléculas menores e mais leves. Sua carga é uma mistura de GOP e óleo desasfaltado, que, na presença de um catalisador e sob condições bastante severas, é transformada em várias outras frações mais leves, produzindo gás combustível, gás liquefeito de petróleo (GLP), nafta, gasóleo leve (diesel de craqueamento) e gasóleo pesado de craqueamento (óleo combustível). Esse processo produz também o coque, que se deposita no catalisador e é queimado na regeneração deste.

O processo de craqueamento catalítico, também conhecido como FCC (“*fluid catalytic cracking*”), substituiu amplamente o craqueamento térmico, pois utilizando condições operacionais consideravelmente mais brandas, possibilita a produção de uma maior quantidade de nafta de alta

octanagem, bem como menores quantidades de óleos combustíveis pesados e de gases leves (ABADIE et al., 2002, MARIANO, 2005).

No FCC a carga recebe a adição de um catalisador a elevada temperatura no *riser*, tubulação onde ocorrem as reações e que transporta o óleo para um reator-separador, no qual o catalisador é separado da carga craqueada nos ciclones. A pressão de operação é baixa e a temperatura de reação se situa na faixa de 500 a 540 °C. O catalisador gasto segue para o regenerador. A carga craqueada, que está na fase vapor, segue para a fracionadora, onde é separada em várias frações. A unidade de craqueamento catalítico é composta pelas seções de reação ou conversão, de fracionamento, de recuperação de gases, onde são separados o gás combustível, GLP e nafta, e, ainda, pela seção de tratamentos, onde são tratadas as correntes de gás combustível, GLP e nafta, a fim de remover seus contaminantes (FARAH, 2012). Esse processo básico de craqueamento catalítico é ilustrado pela Figura 3.

Figura 3: Unidade de craqueamento catalítico fluido do gasóleo pesado e óleo desasfaltado



Fonte: Farah (2012).

2.2.2.3 Hidrocraqueamento

O hidrocraqueamento catalítico, também conhecido como HCC (*hydrocatalytic cracking*), é um processo que consiste na quebra de moléculas existentes na carga de gasóleo por ação conjugada do catalisador, altas temperaturas e pressões, e presença de grandes

volumes de hidrogênio. Simultaneamente à ocorrência das quebras, acontecem as reações de hidrogenação do material produzido (ABADIE et al., 2002).

A finalidade da presença de hidrogênio no hidrocraqueamento é reduzir a deposição de coque sobre o catalisador, facilitar a decomposição dos compostos aromáticos polinucleados hydrogenando-os, aumentar a estabilidade química dos produtos finais pela hidrogenação das olefinas e diolefinas formadas no processo de craqueamento (ABADIE et al., 2002; MARIANO, 2005).

Há ainda o hidrocraqueamento catalítico brando, também conhecido como MHC (*mild hydrocracking*), uma variação do HCC, que opera em condições bem mais brandas que o anterior, principalmente em termos de pressão.

Sua grande vantagem é que, a partir de uma carga de gásóleo convencional, é possível produzir grandes volumes de óleos diesel de excelente qualidade, sem gerar grandes quantidades de gasolina (ABADIE et al., 2002).

2.2.2.4 Hidrotratamento

Hidrotratamento (HDT) são processos similares empregados na remoção de impurezas, tais como: enxofre, nitrogênio, oxigênio, haletos e traços de metais, que podem desativar os catalisadores empregados em outras etapas do processo de refino (MARIANO, 2005).

A remoção dessas impurezas vem ocupando uma posição de destaque devido às especificações cada vez mais rigorosas de qualidade dos derivados, com reduções sucessivas do teor de enxofre e aumento dos requisitos de estabilidade química e térmica da gasolina e do óleo diesel (FARAH, 2012).

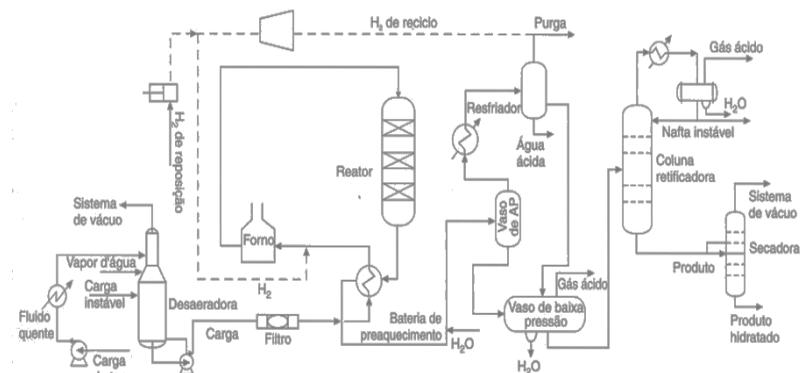
O HDT utiliza catalisadores na presença de substanciais quantidades de hidrogênio sob condições de altas pressões e temperaturas, para que possam ocorrer as reações (hidrodessulfurização, hidrodensnitração, hidrodessoxigenação, saturação de olefinas ou hidrodessaromatização) entre a carga e este gás (MARIANO, 2005; FARAH, 2012).

A carga e o hidrogênio são aquecidos e enviados ao reator, cujo efluente é encaminhado à seção de separação do excesso de hidrogênio e dos gases formados. A seguir, o produto líquido segue para a seção de retificação.

Dependendo das condições operacionais do HDT, adicionalmente à redução do teor de enxofre e nitrogênio, podem ocorrer a saturação

dos hidrocarbonetos oleofínicos e dioleofínicos, a abertura e a saturação de anéis, levando à produção de frações mais leves do que a carga, porém em pequena quantidade. O gasóleo de coqueamento é a carga mais suscetível a melhorar sua qualidade de ignição, devido ao elevado conteúdo de contaminantes e hidrocarbonetos oleofínicos e dioleofínicos que são removidos. A Figura 4 ilustra o esquema de uma unidade genérica de hidrotratamento (FARAH, 2012).

Figura 4: Unidade genérica de hidrotratamento



Fonte: Farah (2012).

2.2.3 Biodessulfurização

As recentes regulamentações que limitam a concentração máxima de enxofre presente nas frações de combustíveis e o constante declínio na qualidade das reservas de petróleo, fazem com que a remoção do enxofre seja uma das principais preocupações das refinarias.

Alguns níveis de tolerância exigidos pela legislação chegam a representar uma remoção de aproximadamente 99% do enxofre contido em um óleo cru típico, para tal, as indústrias têm se utilizado dos processos chamados de hidrodessulfurização profunda e hidrodessulfurização ultraprofunda. Como os processos de hidrogenação catalítica existentes não são capazes de atender os níveis de remoção exigidos, inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos 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 hidrodessulfurização (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).

Há aproximadamente quatro décadas se desenvolveu o conceito de utilizar micro-organismos na remoção do enxofre de combustíveis fósseis. Isso se deve à descoberta de 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 apresentou um desenvolvimento significativo.

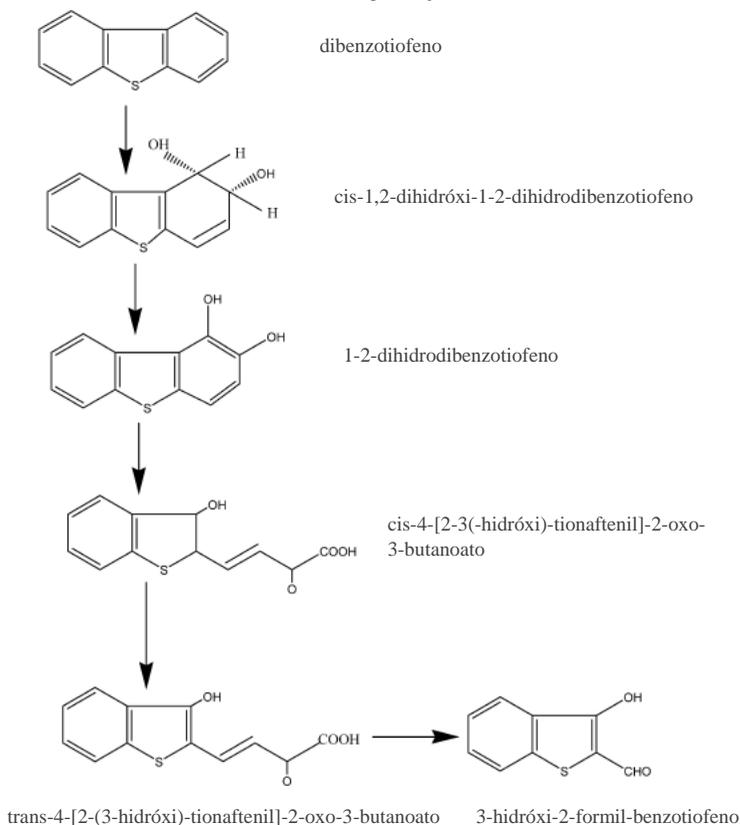
Inicialmente, focou-se na utilização do dibenzotiofeno (DBT) como um composto modelo nos processos de dessulfurização, em virtude de que o DBT e os seus derivados representam a maior proporção de enxofre tiofênico no petróleo e seus destilados, e de que os DBTs alquil-substituídos são os de remoção mais complexa 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, as diferentes vias metabólicas utilizadas por cada um deles no processo de BDS, dentre as quais se destacam três: Kodama, Van der Afferden e a 4S.

Na via de Kodama, apresentada na Figura 5, o ataque ao anel benzênico ocorre nas posições 2 e 3 do DBT, culmina na quebra de um dos anéis benzênicos fazendo com que o potencial energético desse composto diminua. Além disso, o produto final do DBT ainda contém o átomo de enxofre, apresentando níveis de toxicidade biológica semelhantes ao substrato inicial (ALVES et al., 1999; GALLAGHER et al., 1993; GUPTA et al., 2005).

Figura 5: Via metabólica Kodama da degradação oxidativa do dibenzotiofeno



Fonte: Adaptado de Gupta et al. (2005).

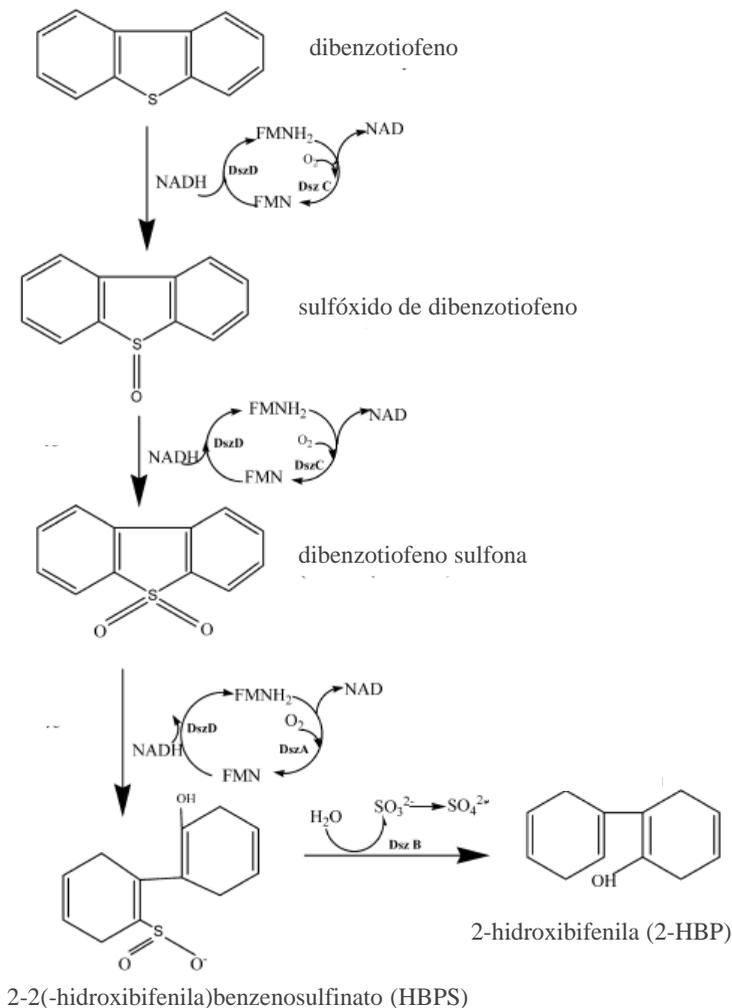
Em 1990, Van Afferden propôs uma via metabólica diferente (utilizando a bactéria *Brevibacterium sp.*), na qual o DBT é convertido a benzoato e sulfito, que por sua vez é oxidado a sulfato, por oxidação abiótica. Então, o benzoato é totalmente mineralizado a dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O). Assim, o DBT é utilizado como nutriente pela bactéria como fontes de carbono e enxofre (AFFERDEN et al., 1990). Contudo, esta via de degradação do DBT não se mostra 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).

Uma terceira via metabólica, que está representada na Figura 6 é a via sulfóxido-sulfona-sulfonato-sulfato, mais conhecida como “4S”, foi apresentada pela primeira vez por Killbane (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 mono-oxigenase que oxida o DBT a 5,5'-dióxido de DBT em dois passos; a segunda enzima é também uma mono-oxigenase 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 via têm sido extensivamente estudadas a fim de se obter uma ferramenta biológica de fundamental importância no emprego da BDS em larga escala (WANG; KRAWIEC, 1994).

Figura 6: Via metabólica “4S” da degradação do composto dibenzotiofeno



Fonte: Adaptado de Gupta et al. (2005).

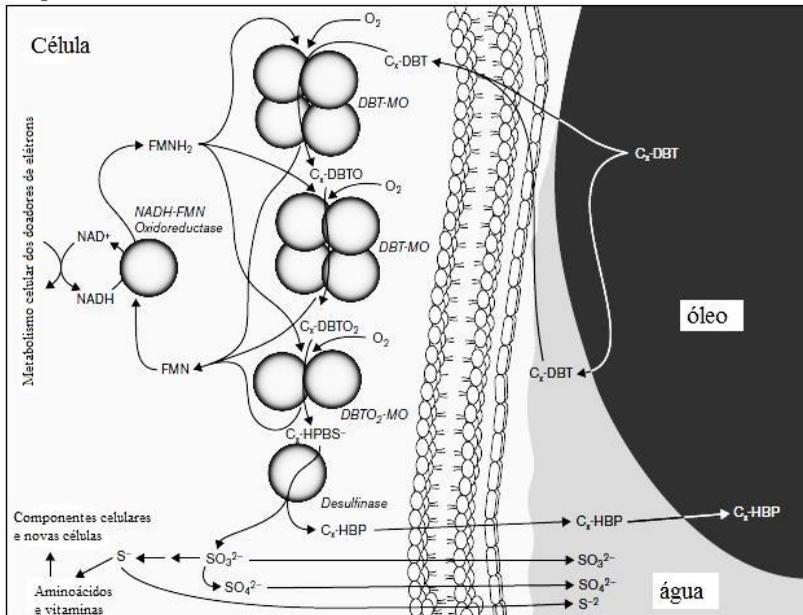
2.2.4 *Rhodococcus erythropolis*

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. Essa espécie parece ser a mais apropriada ao metabolismo de compostos organossulfurados. Folsom et al. (1999), por exemplo, consolidam em seu trabalho a capacidade de *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 de ser capaz 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 *Pseudomonas sp.* 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 (MONTICELLO, 2000). 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.

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



Fonte: Adaptado de Monticello (2000).

A produção de biossurfactantes por parte das linhagens de *Rhodococcus* é outro fator que também auxilia no aumento da área de contato entre o óleo e as células. Os biossurfactantes são compostos produzidos pelos micro-organismos, tanto diretamente por suas células livres quanto por secreções extracelulares. São fundamentalmente distinguidos por suas características anfífilas e anfipáticas e por sua capacidade de diminuir a tensão interfacial de superfície e dos líquidos. Tais compostos elevam a área superficial do óleo, o que aumenta a mobilidade e a solubilidade de hidrocarbonetos e favorece a degradação microbiana (PACHECO et al., 2010). Pesquisadores como Bicca, Fleck e Ayub (1999), Ciapina et al. (2006), Feng, Swift e Singhal (2013), Gogotov e Khodakov (2008), Liu e Liu (2012), Melo (2005), Pacheco et al. (2010), Pal et al. (2009) e Peng et al. (2007) relatam que os biossurfactantes produzidos pelo gênero *Rhodococcus* são glicolipídeos com propriedades tensoativas e descrevem sua influência na degradação de derivados do petróleo.

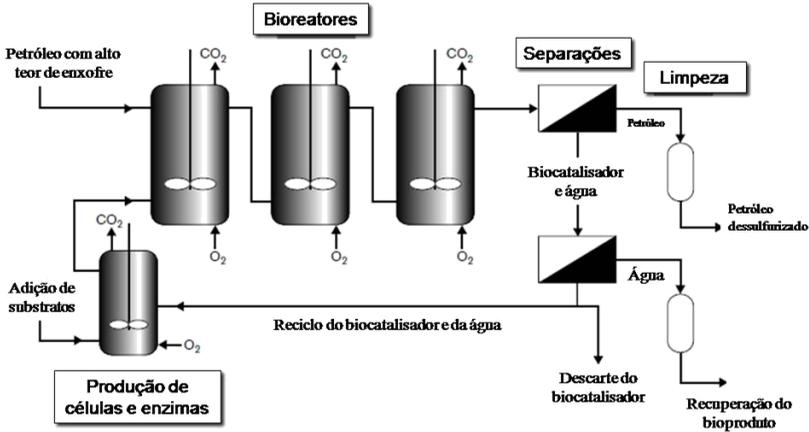
Outra característica interessante das linhagens de *Rhodococcus* é a sua capacidade de sobreviver aos efeitos tóxicos de muitos solventes, adaptando sua membrana celular a fim de manter funções biológicas essenciais. Mudanças na composição dos ácidos graxos da membrana, com vistas em manter a mesma fluidez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

2.2.5 Biodessulfurização: avanços e desafios

De acordo com Monticello (2000), o esquema representado na Figura 8 seria um diagrama conceitual do processo de BDS. Ele destaca que três biorreatores seriam necessários para que se atingissem as baixas concentrações de enxofre requeridas pelas novas legislações, uma vez que as velocidades específicas de degradação e produtividade dos micro-organismos estudados até o momento ainda são muito baixas. Além disso, nesse cenário, as células cresceriam e seriam “revitalizadas” durante o processo, um passo necessário para se atingir o longo tempo de residência do biocatalisador requerido para um processo viável comercialmente. Com relação, aos processos de separação, Monticello (2000) acredita que eles serão realizados somente por hidrociclones ou

combinando os mesmos com outros processos de decantação de baixo custo e sistemas de centrifugação.

Figura 8: Diagrama conceitual do processo de BDS



Fonte: Adaptado de Monticello (2000).

Segundo Monticello (2000) a comercialização dessa tecnologia, vai depender, portanto, da solução de inúmeros problemas críticos. Isso inclui a solução dos problemas de transferência de massa por mudanças no próprio processo de BDS e na atividade enzimática dos micro-organismos. Faz-se necessário ainda um melhor entendimento sobre os problemas relacionados ao metabolismo celular de maneira a transformar essa interessante via metabólica microbiológica em um processo comercial.

McFarland (1999) destaca que a maioria dos processos petroquímicos ocorre a altas temperaturas e pressões, e a necessidade de resfriar uma corrente do processo a fim de submetê-la a BDS, nem sempre pode ser muito prático. Portanto, deve-se estudar mais profundamente a termoestabilidade das enzimas concernentes ao processo de dessulfurização. Além disso, é necessário que os biocatalisadores sejam capazes de se adaptar perfeitamente às altas concentrações de hidrocarbonetos, e que possuam uma alta tolerância a solventes, principalmente para a BDS da gasolina.

Os processos de separação entre a mistura combustível, fase aquosa e micro-organismo ainda não se encontram bem definidos, o que

gera certa insegurança com relação ao percentual de recuperação do combustível (MCFARLAND, 1999).

Vários pesquisadores como Bhatia e Sharma (2010), Calzada et al.(2009), Kamali et al. (2010), Konishi et al. (2005) e Nakayama et al.(2009) dedicaram-se a entender melhor a genética e as enzimas pertinentes ao processo de BDS, desvendando o que as inibe, favorece, o que induz à sua formação, etc. Tais estudos vêm resultando em modificações genéticas nos micro-organismos que, por conseguinte, vêm alcançando maiores percentuais de dessulfurização e maior estabilidade nos processos de BDS.

Pesquisadores como Bouchez-Naitali et al. (2004), Caro et al. (2008), De Carvalho et al. (2004, 2005a, 2005b, 2005c, 2009), Tao et al. (2006) se dedicaram a entender os mecanismos que regem e aumentam a resistência da parede celular dos micro-organismos na presença de compostos extremamente tóxicos. Isso vem ajudando outros pesquisadores a adotar melhores estratégias de adaptação para os micro-organismos utilizados na BDS.

Kirimura et al. (2001), Konishi et al. (1997), Li et al. (2003) utilizaram micro-organismos termofílicos como *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium* no processo de BDS alcançando resultados promissores. Tais estudos podem impulsionar outros pesquisadores a aprimorar a capacidade de dessulfurização desses micro-organismos.

Folsom et al. (1999), Guchhait et al. (2005), Li et al. (2008a), Maghsoudi et al. (2001), Yu et al. (2006a) e Zhang et al. (2007) utilizaram diesel ou gasolina como fase orgânica nos ensaios em sistema bifásico de BDS. Os resultados obtidos foram extremamente promissores, principalmente em relação ao diesel, provando assim que existem micro-organismos capazes de resistir à toxicidade desses compostos, e de serem metabolicamente seletivos aos compostos sulfurados presentes nesses combustíveis.

Boltes et al. (2008), Kaufman et al. (1997), Noda et al. (2008) e Yang et al. (2007) implementaram com relativo sucesso o processo de BDS em reatores contínuos de diferentes tipos, visando a obtenção de um processo mais próximo ao da realidade das indústrias petroquímicas, uma vez que o sistema batelada é inviável para esse tipo de indústria.

Uma das soluções para o problema de separação da mistura óleo/células/água é imobilizar as células dos micro-organismos, uma vez que as células imobilizadas são separadas mais facilmente e há ainda um menor risco de contaminação. Li et al. (2005, 2008a, 2008b) e Naito et al. (2001) realizaram o processo de BDS com os micro-organismos imobilizados, obtendo uma fácil separação ao final do processo. Nestes

casos o percentual de degradação foi expressivamente inferior com relação aos obtidos com células livres, devido principalmente a maior resistência à transferência de massa. Recentemente, Derikvand, Etemadifar e Biria (2014), Dinamarca et al. (2010, 2014) foram capazes de obter uma alta taxa de dessulfurização utilizando células de *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri* e *Rhodococcus rhodochrous* imobilizadas em suportes como alginato, inorgânicos biomodificados, e em alumina e sílica, respectivamente. Contudo, cabe ainda desenvolver um suporte de baixo custo que possua resistência suficiente para ser reutilizado várias vezes no processo industrial.

Outro nicho explorado por autores como Derikvand, Etemadifar e Biria (2014), Dinamarca et al. (2014) e Hu et al. (2014) é o de inserir surfactantes ao meio reacional. Esses agentes tensoativos têm como objetivo diminuir a tensão superficial entre as fases aquosa e oleosa, visando estabelecer um maior contato entre a biomassa (que se encontra na fase aquosa) e os compostos poluentes (presentes na fase oleosa), aumentando assim a velocidade específica de remoção.

Segundo os cálculos de McFarland (1999), o capital necessário para se instalar uma unidade de BDS são 50% inferiores aos da instalação de uma unidade de hidrodessulfurização (HDS). E os custos de operação da BDS são 15% menores do que os da HDS. No entanto, a HDS remove em um mesmo processo os compostos sulfurados, nitrogenados e metálicos. Portanto, com os recentes avanços na atividade catalítica dos micro-organismos, a viabilidade econômica da BDS está se tornando cada vez mais competitiva com a da HDS e outras tecnologias emergentes de dessulfurização.

De acordo Boniek et al. (2015), não se espera que a biodessulfurização completa dos combustíveis fósseis ocorra em um futuro próximo. Assim, o estudo multidisciplinar (tais como a biotecnologia, engenharia e bioquímica microbiana) incidindo sobre este processo pode fazer com que a BDS passe de uma tecnologia complementar e alternativa para uma biotecnologia promissora capaz de diminuir os impactos ambientais, problemas de saúde e mesmo mudar a direção da indústria do petróleo.

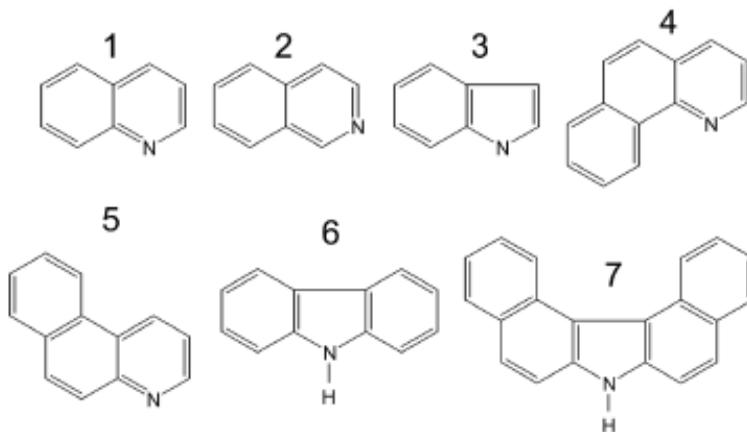
2.2.6 Bidesnitrogenação

Compostos nitrogenados são ubíquos em combustíveis fósseis e a especificação destes compostos é ainda em grande parte desconhecida. O teor de nitrogênio total em cerca de 90% dos petróleos crus é inferior a 2%, e encontra-se distribuído em uma complexa mistura de

compostos, tornando seu estudo muito difícil (MÜHLEN et al., 2007). Estes compostos foram classificados em dois grupos diferentes: pirrólico neutro e piridínico básico. As espécies neutras de nitrogênio compreendem usualmente pirrol, indol, carbazol e os seus análogos alquilados e benzilados. Enquanto isso, as espécies de nitrogênio básico incluem geralmente piridinas, quinolinas, benzoquinolinas e seus derivados alquilados (MÜHLEN et al., 2007).

Segundo Mühlen et al. (2007), os principais compostos nitrogenados presentes no GOP são o indol, carbazol, quinolina, isoquinolina, 5,6-benzoquinolina, 7,8-benzoquinolina e 7-H-dibenzo-c, g-carbazol. Suas estruturas químicas são ilustradas na Figura 9.

Figura 9: Estrutura de compostos nitrogenados presentes no GOP. (1) quinolina; (2) isoquinolina; (3) indol; (4) 7,8-benzoquinolina; (5) 5,6-benzoquinoline; (6) carbazol e (7) 7H-dibenzo-c,g-carbazol



Fonte: Mühlen et al. (2007).

Grande parte dos compostos nitrogenados, em especial, os aza heterocíclicos, as aminas aromáticas primárias e os dibenzocarbazóis apresentam propriedades tóxicas e têm sido citados como cancerígenos. Além disso, a presença de compostos organonitrogenados no petróleo acabam envenenando os catalisadores empregados nos processos de refino, isso faz com que a sua remoção seja desejável, mas não a ponto de se tornar objeto de regulação ambiental (MARIANO, 2005).

A remoção do nitrogênio dos compostos organonitrogenados, sem que haja perda significativa do poder calorífico, requer uma separação seletiva das ligações carbono-nitrogênio. A clivagem seletiva

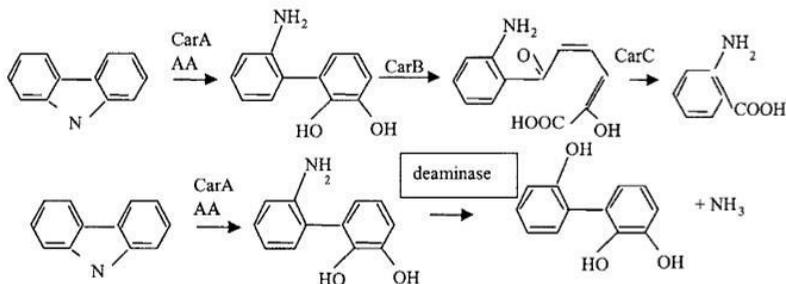
das ligações carbono-enxofre no petróleo bruto utilizando biocatalisadores tem sido demonstrada por vários autores, portanto, a possibilidade de se cindir seletivamente as ligações carbono-nitrogênio utilizando biocatalisadores desenvolvidos a partir de micro-organismos capazes de metabolizar compostos como a quinolina e o carbazol é bastante plausível. A quebra das ligações carbono-nitrogênio resultando na conversão da quinolina-hidroxicumarina em amônia já foi demonstrada, bem como os genes que codificam as enzimas que participam da via de degradação da quinolina foram identificados e sequenciados. Nesse sentido, um dos únicos micro-organismos que tem apresentado capacidade de degradar a quinolina é a bactéria *Pseudomonas ayucida* IGTN9. No entanto, devido à baixa concentração de quinolina em relação a outros compostos organonitrogenados presentes no petróleo bruto há a necessidade de se desenvolver biocatalisadores capazes de remover o nitrogênio proveniente de outros compostos tipicamente encontrados no petróleo, tais como o carbazol. O carbazol é um composto modelo capaz de representar grande parte dos compostos contendo nitrogênio em muitas frações do petróleo (KILLBANE II; LE BORGNE, 2004; YU et al., 2006b).

O desenvolvimento de um novo processo biológico para a remoção do nitrogênio do petróleo se mostra extremamente necessário uma vez que nenhuma das culturas carbazol-degradantes conhecidas atualmente são particularmente adequadas porque o nitrogênio não é completamente degradado. Uma variedade de micro-organismos que degradam o carbazol tem sido relatada na literatura, incluindo espécies de *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Xanthomonas* e *Ralstonia*. À medida que se investigaram as vias de biodegradação do carbazol destes micro-organismos ficou evidente que todos seguiam uma via semelhante que começa com a clivagem oxidativa do nitrogênio heterocíclico presente no anel de carbazol para formar 2-aminobifenil-2,3- diol, em seguida, este composto é oxidado formando o 2-hidroxi-6-hexa-2,4- dienoato. Os próximos passos da via metabólica resultam na degradação de um dos anéis aromáticos, liberando dióxido de carbono. Isto significa que, nas vias existentes, o nitrogênio é liberado do carbazol somente após a degradação do carbono substancial (KILLBANE II; LE BORGNE, 2004).

A Figura 10 ilustra a forma de degradação do carbazol conhecida atualmente, bem como uma via potencial para a remoção seletiva do nitrogênio. Essa última pode ser criada utilizando técnicas de engenharia metabólica, combinando a enzima CarA de micro-organismos que

degradam o carbazol, tais como *Sphingomonas sp.* GTIN 11, com uma desaminase adequada (KILLBANE II; LE BORGNE, 2004).

Figura 10: Vias metabólicas de degradação do carbazol



Fonte: Adaptado de Killbane II; Borgne, 2004.

Há relatos de culturas mistas de bactérias termófilas que reduzem seletivamente o teor de nitrogênio do petróleo bruto em 45% (SINGH et al., 2011). No entanto, outros investigadores não têm alcançado esses resultados e a identidade das espécies de micro-organismos responsáveis por essa clivagem da ligação carbono-nitrogênio é desconhecida. Por conseguinte, nada se sabe sobre a bioquímica ou a genética deste fenômeno de remoção do nitrogênio por culturas mistas, dificultando assim o reforço e o melhoramento deste processo.

Embora a remoção seletiva do nitrogênio a partir do petróleo bruto venha sendo estudada e as informações sobre a degradação da quinolina e do carbazol se encontrem disponíveis, há ainda um longo caminho a ser percorrido antes que um processo comercialmente viável para a biodesnitrificação do petróleo possa ser considerado (BENEDIK et al., 1998; KILLBANE II, 2006; XU et al., 2006).

2.2.7 Considerações sobre o estado da arte

Diante da problemática descrita ao longo deste capítulo, a partir do levantamento de produções relevantes sobre os processos de biodessulfurização e biodesnitrificação, nota-se o potencial de aplicação destes métodos. Contudo, não se observou trabalhos relativos à aplicação concomitante das duas técnicas. Assim, o presente estudo aborda a biodessulfurização e a biodesnitrificação do gasóleo pesado pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 visando contribuir com o

avanço dessas tecnologias para uma futura aplicação industrial, pelo esclarecimento de fatores que apresentam influência direta sobre a eficiência de remoção dos compostos poluentes.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item serão descritos os materiais e equipamentos utilizados no desenvolvimento dos ensaios laboratoriais realizados, bem como as principais metodologias empregadas.

Os procedimentos para a biodessulfurização e biodesnitrogenação do GOP envolveram, de maneira geral, as etapas de inoculação e crescimento do micro-organismo; fermentação em reatores descontínuos contendo concentrações de GOP de 10 a 100% (v/v) e análises do teor de enxofre e nitrogênio no GOP após submetido ao processo de BDN e BDS. Além disso, foi realizado um estudo das condições de operação e do meio de cultura visando determinar a influência de cada fator na dessulfurização, desnitrogenação e na produção de biossurfactantes.

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), exceto as análises de CHNS que foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); e as análises de Tensão Superficial no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.3.1 Materiais

2.3.1.1 *Micro-organismo*

A partir de estudos realizados por Boshagh, Mokhtarani e Mortaheb (2014), De Carvalho et al. (2005a), Derikvand, Etemadifar e Biria (2014); Izumi et al. (1994), Li et al. (2008a); Maghsoudi et al. (2001) e Yu et al. (2006b) optou-se pela utilização da bactéria *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 para a realização dos ensaios de dessulfurização e desnitrogenação, uma vez que tais autores destacam a capacidade desta em remover significativas quantidades de enxofre e nitrogênio 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.

2.3.1.2 Meios de cultura, manutenção e de biotransformação

Meio de manutenção e meio de cultura

Por recomendação do fornecedor o meio *Yeast Malt Agar* (YMA) foi empregado como meio de manutenção. A composição do meio YMA é descrita a seguir na Tabela 6. Para o inóculo e o meio de cultura foi utilizado o meio YMA sem ágar (YM) (MAASS et al., 2015).

Tabela 6: Composição do meio de manutenção YMA

Componente	Concentração (g·L ⁻¹)
Ágar	20,0
CaCO ₃	2,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Glicose	10,0
Peptona bacteriológica	5,0

Meio de biotransformação

O meio de cultivo utilizado para os processos de BDN e BDS era composto segundo apresentado na

Tabela 7 (MA et al., 2006; MAASS et al., 2014).

Tabela 7: Composição do meio de biotransformação

Componente	Concentração (g·L ⁻¹)
CaCO ₃	2,0
Extrato de levedura	4,0
Extrato de malte	10,0
Glicose	4,0

2.3.1.3 Gasóleo pesado - GOP

O gasóleo pesado foi cedido pela plataforma Marlim Sul P-56, localizada no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

2.3.2 Métodos

2.3.2.1 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 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 mL de meio YM obtendo-se assim uma suspensão das células que permaneceram no tubo por aproximadamente 15 minutos para se reidratarem.

Uma vez reidratadas, as células foram incubadas em meio YM por 24 horas 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. Após 48 h, as placas de Petri foram armazenadas em geladeira a 4 °C.

2.3.2.2 Determinação da Concentração de Biomassa por Turbidimetria e Gravimetria

Inocularam-se duas alçadas de células da cultura estoque em um frasco erlenmeyer contendo meio de manutenção YM previamente esterilizado a 121 °C por 20 minutos, este permaneceu em uma 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. E este permaneceu em incubadora a 28 °C e 150 rpm por 48 h.

Decorrido esse tempo, utilizou-se uma alíquota do meio de crescimento (diluída 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 efetuar as leituras. O comprimento de onda onde se obteve o maior valor de densidade ótica foi de 600 nm.

Uma vez determinado o comprimento de onda a ser utilizado, fizeram-se algumas diluições (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10) do meio de crescimento contendo as células de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 para que com seus respectivos valores de densidade ótica fosse possível construir uma curva de calibração (MORITZ, 1998).

Como a turbidimetria é um método indireto para a determinação da concentração celular faz-se necessária a utilização de um método direto como a gravimetria para que a construção de uma curva de calibração densidade ótica *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 supracitado e filtradas a vácuo através de uma membrana de acetato de celulose (com poros de 0,45 µm) previamente secas em micro-ondas por aproximadamente 15 minutos. Após a filtragem, as membranas contendo as células foram novamente secas em micro-ondas por aproximadamente 15 minutos (até atingirem uma massa constante). A concentração de biomassa é obtida pela diferença entre a massa das membranas dividida pelo volume da alíquota, conforme Equação (1) (MORITZ, 1998).

$$[X]_{\frac{g}{L}} = \frac{M_{membranafinal} (g) - M_{membranainicial} (g)}{V_{aliquota} (L)} \quad (1)$$

Com isso a curva de calibração que correlaciona a absorvância com a concentração celular pôde ser construída. A curva obtida apresentou bons limites de linearidade obtendo um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,997 e encontra-se no Apêndice A. Todas as concentrações de biomassa apresentadas neste trabalho foram determinadas utilizando-se essa curva de calibração.

2.3.2.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

2.3.2.3.1 Método de Difusão em Ágar

Testes preliminares de difusão em ágar foram realizados a fim de se avaliar a sensibilidade da bactéria *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 a certos compostos, conforme metodologia descrita por Otrsky et al. (2008). Esses testes foram executados em placas de Petri contendo

meio de manutenção YMA, previamente inoculadas com uma suspensão microbiana de concentração $4,0 \pm 0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Confeccionaram-se poços de 1,0 cm de diâmetro ao longo do meio de manutenção e estes foram preenchidos com o GOP e outros compostos a serem testados (como o óleo diesel A S1800, RAT e petróleo cru), em seguida, as placas foram incubadas por 48 h a 28 °C. A CMI foi considerada aquela concentração e/ou composto puro capaz de desenvolver halo de inibição do crescimento microbiano maior ou igual a 1,4 cm de diâmetro.

2.3.2.3.2 Método da macrodiluição em caldo

O método de macrodiluição em caldo considera a relação entre o crescimento do micro-organismo no meio líquido e a concentração da substância testada. A avaliação é efetuada por comparação do crescimento microbiano para cada concentração testada contra um padrão biológico (MAASS et al., 2015).

Os ensaios foram conduzidos em frascos contendo diferentes concentrações de meio YM e GOP totalizando um volume de 100 mL, conforme apresentado na Tabela 8. Em seguida, adicionou-se 5 mL de uma pré-cultura de *R. erythropolis* ATCC 4277 com uma densidade ótica de 0,75 a 600 nm (DO_{600}). Os frascos permaneceram num agitador orbital durante 24 h a 28 °C e 200 rpm.

Tabela 8: Construção do ensaio para a determinação da CIM

Concentração de GOP % (v/v)	YM (L)	GOP (L)
0 (controle)	0,10	0
10	0,09	0,01
20	0,08	0,02
30	0,07	0,03
40	0,06	0,04
50	0,05	0,05
60	0,04	0,06
70	0,03	0,07
80	0,02	0,08
90	0,01	0,09
100	0	0,10

A CIM foi calculada usando a Equação (2), na qual a concentração celular final em cada frasco, medida por turbidimetria a 600 nm (DO_{600}), é comparada a um padrão de concentração de células

(experimento sem adição de GOP) (ANDREWS, 2001; MAASS et al., 2015).

$$\% \text{ crescimento celular} = \frac{[X]_{\text{final}} - [X]_{\text{inicial}}}{[X]_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde $[X]_{\text{final}}$ é a concentração de biomassa final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e $[X]_{\text{inicial}}$ é a concentração de biomassa inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

2.3.2.4 Dessulfurização e desnitração por células livres de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em sistema reacional bifásico

Uma pré-cultura de *R. erythropolis* foi realizada transferindo duas alçadas da placa de manutenção para um frasco de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura YM previamente esterilizado. Esse frasco permaneceu em uma incubadora a 28 °C e 150 rpm durante 24 h. Transferiu-se 5% (v/v) da pré-cultura para um outro erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura YM esterilizado e este permaneceu durante 18 h em um agitador orbital a 28 °C e 150 rpm. O meio de cultura foi centrifugado a 5000 *xg* durante 10 min, descartou-se o sobrenadante e lavaram-se as células com uma solução 0,1M de tampão fosfato (pH 7,0). As células devidamente lavadas foram transferidas em assepsia para o frasco contendo sistema de biotransformação.

O sistema de biocatálise era composto por duas fases: uma aquosa (o meio fermentativo YM) e outra orgânica (GOP), apresentando um volume total de 200 mL. Testaram-se dez concentrações distintas da fase orgânica: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% (v/v), conforme apresentado na Tabela 9. Esse sistema permanecia na incubadora por 24 h a 28 °C e 200 rpm. Ao final da fermentação centrifugava-se o conteúdo do erlenmeyer a 5000 *xg* durante 10 minutos a fim de se obter uma separação das duas fases e encaminhar cada uma delas para suas respectivas análises.

Tabela 9: Condições para os experimentos de dessulfurização e desnitração do GOP pelas células livres de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

Concentração de GOP % (v/v)	YM (L)	GOP (L)
0 (padrão)	0,2	0
10	0,18	0,02
20	0,16	0,04
30	0,14	0,06
40	0,12	0,08
50	0,10	0,10
60	0,08	0,12
70	0,06	0,14
80	0,04	0,16
90	0,02	0,18
100	0	0,20

2.3.2.4.1 Influência das condições de operação e das fontes dos macro-nutrientes na capacidade de dessulfurização e desnitração do *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

Um planejamento fatorial $2^{(7-2)}$ com 32 experimentos e 8 réplicas do ponto central foi realizado variando a concentração de biomassa inicial, as condições de operação (agitação, temperatura e pH) e os macro-nutrientes (extrato de levedura e glicose) a fim de se avaliar a influência dos mesmos na capacidade de remoção de enxofre e nitrogênio, bem como na produção de biossurfactante pelo *R. erythropolis* ATCC 4277. As variáveis e os níveis testados são os apresentados na Tabela 10. O planejamento fatorial fracionado foi estruturado utilizando como pontos centrais as concentrações do meio nutricional e as condições operacionais recomendados pelo fornecedor do micro-organismo.

Tabela 10: Variáveis e níveis testados no planejamento fatorial $2^{(7-2)}$

Variáveis	Níveis		
	+1	0	-1
Agitação (rpm)	120	150	180
Concentração de células inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	2,0	3,0	4,0
Concentração de GOP % (v/v)	10	20	30
Extrato de levedura ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	20,0	30,0	40,0
Glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	10,0	15,0	20,0
pH	5,0	6,5	8,0
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	24	30	36

2.3.2.5 Análises

2.3.2.5.1 Análise elementar- CHNS

A análise elementar CHNS foi realizada nas amostras de GOP após expostas ao processo fermentativo na presença de *Rhodococcus erythropolis* utilizando um equipamento da marca Analytic Jena (Alemanha), modelo multiEA 5000. O volume de amostra/padrão injetado foi 20 μL ; as vazões de gases de combustão empregadas foram de 100 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o argônio, de 300 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o O_2 , e de 100 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o O_2 (2ª combustão); e se utilizaram 90 s como tempo de combustão. Essa análise foi executada no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

2.3.2.5.2 Tensão Superficial

A tensão superficial (TS) do meio fermentativo foi determinada a 25 $^{\circ}\text{C}$ em um tensiômetro de gota pendente modelo OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha), acoplado a um sistema processador de imagem de alta resolução *Data Physics Instruments*.

2.3.2.5.3 Análise estatística

O *software* STATISTICA® 10.0 foi utilizado para realizar as análises estatísticas do planejamento fatorial fracionado para um nível de significância de 5%.

2.3.2.5.4 Microscopia ótica

Ao final dos processos BDN e BDS foram recolhidas amostras dos meios de reacionais contendo 40 e 100% (v/v) de GOP e analisadas em um microscópio (modelo Bioval) aumentando 400 vezes a extensão da lente objetiva (Olympus, modelo EA40) e ocular (Olympus, modelo PL100/1.25).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

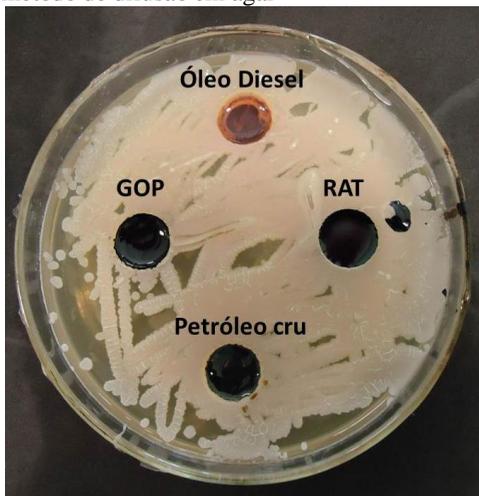
A seguir serão apresentados e discutidos os resultados experimentais concernentes ao estudo da capacidade de dessulfurização e desnitrogenação do GOP, e da produção de biossurfactante pela bactéria *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. A discussão se dará em torno dos resultados referentes à influência de fatores como diferentes concentrações do GOP, temperatura, agitação e composição do meio de cultura do micro-organismo na remoção dos compostos sulfurosos e nitrogenados e na produção de biossurfactante.

2.4.1 Influência da concentração de GOP no crescimento da bactéria *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

Os ensaios de CIM pelo método de difusão serviram para determinar qualitativamente a capacidade de crescimento de *R. erythropolis* ATCC 4277 na presença de GOP, petróleo e outras frações (óleo diesel ASI800 e resíduo atmosférico - RAT). Quando testados pelo método de difusão, nenhum halo de inibição foi observado para qualquer um dos compostos, conforme observado na Figura 11.

A adaptabilidade do *R. erythropolis* a altas concentrações e/ou GOP puro se deve ao fato destas bactérias modularem a viscosidade de lípidos da membrana celular, para manter ou aumentar a fluidez desta, pela redução do grau de saturação, aumento da razão cis/trans de ácidos graxos e aumento da quantidade relativa de ácidos graxos ramificados (HEIPIEPER et al., 2007; WHYTE et al., 1999).

Figura 11: Determinação da CMI dos compostos GOP, óleo diesel A S1800, RAT e petróleo cru em relação ao *Rhodococcus erythropolis* ATCC pelo método de difusão em ágar



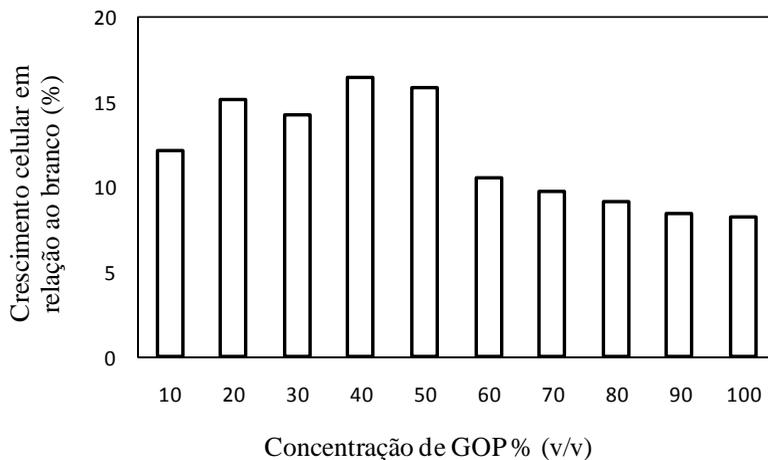
Fonte: Maass et al. (2015).

Os testes de CIM pelo método da macrodiluição tiveram como objetivo determinar quantitativamente a concentração de GOP que inibe o crescimento da bactéria *R. erythropolis*. Os resultados mostrados na Figura 12 confirmam os dados obtidos pelo método de difusão, demonstrando que o crescimento de *R. erythropolis* não sofre nenhuma inibição na presença do GOP. Ao contrário, a presença de GOP no meio de cultura promove uma elevação na concentração de biomassa, especialmente para concentrações de GOP de 10 a 50% (v/v) (Figura 12).

Outros autores também obtiveram uma boa adaptação celular quando utilizaram aproximadamente 20% (v/v) de fase orgânica (IZUMI et al., 2001; KIRIMURA et al., 2001; LI et al., 2008a; NAITO et al., 2001). A presença de hidrocarbonetos em abundância, assim como de compostos de nitrogênio e enxofre, contribui para uma melhor qualidade de nutrição do micro-organismo, uma vez que estes compostos atuam como substrato e co-substratos. Uma ligeira diminuição na concentração de células para concentrações mais elevadas de GOP se deve à diminuição da resistência do micro-organismo com o aumento da toxicidade do sistema, fazendo com que a viabilidade celular se torne muito menor sob essas condições mais severas (ALVES, MESQUITA &

GÍRIO, 1999; DE CARVALHO et al., 2004; DE CARVALHO et al., 2005b).

Figura 12: Determinação da CMI pelo método de macrodiluição para diferentes concentrações de GOP



Fonte: Maass et al. (2015).

2.4.2 Capacidade de dessulfurização do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

Amostras de GOP, depois de submetidas ao processo de BDS, foram analisadas por CHNS. Os resultados desta análise elementar são apresentados na Tabela 11.

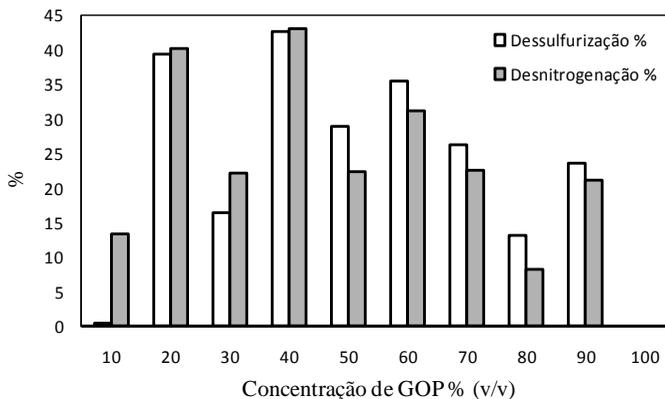
Tabela 11: Teor de enxofre no GOP depois de submetido ao processo de BDS com *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

Concentração de GOP (% v/v)	Concentração de S ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Massa de S removida (μg)
Padrão	6245 \pm 23	---
10	6224 \pm 32	21 \pm 2
20	3783 \pm 28	2462 \pm 29
30	5216 \pm 63	1029 \pm 91
40	3581 \pm 26	2664 \pm 95
50	4438 \pm 18	1807 \pm 90
60	4031 \pm 25	2214 \pm 27
70	4609 \pm 31	1636 \pm 32
80	5423 \pm 11	822 \pm 15
90	4776 \pm 96	1469 \pm 19
100	6255 \pm 25	0

Fonte: Maass et al. (2015).

Os melhores resultados foram obtidos para concentrações de GOP de 20, 40 e 60% (v/v), onde a massa de enxofre removida por grama de GOP foram de 2462 \pm 29, 2664 \pm 95 e 2214 \pm 27 μg , a velocidade específica de dessulfurização de 137, 148 e 123 mg de enxofre $\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, e percentagens de remoção de 39,4; 42,7 e 35,5% (Figura 13), respectivamente.

Figura 13: Percentual de dessulfurização e desnitrificação para as diferentes concentrações de GOP testadas em um reator descontínuo contendo células livres do *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277



Fonte: Maass et al. (2015).

Como o GOP contém vários compostos facilmente dessulfurizáveis, tais como tióis e sulfetos, além de compostos recalcitrantes como DBT (CHANG et al., 2000), a massa de enxofre removida e a velocidade específica de dessulfurização obtida são superiores às relatadas por outros autores, para a mesma relação de fase orgânica no processo de BDS (FOLSOM et al., 1999; GUCHHAIT et al., 2005; LI et al., 2008b, MA et al., 2006; MAASS et al., 2014; MAGHSOUDI et al., 2001; ZHANG et al., 2007). Nestas pesquisas, se utilizavam combustível sintético contendo apenas DBT ou óleos com baixo teor de enxofre diminuindo assim a oferta de enxofre. Outros autores que trabalharam com gasóleo leve ou gasóleo pesado também observaram um aumento na atividade de dessulfurização quando comparado com óleos modelo (CHANG et al., 2000; DINAMARCA et al., 2010; DINAMARCA et al., 2014).

Embora o *R. erythropolis* possua uma característica hidrofóbica que aumenta o contato entre as células e os compostos sulfurosos, a alta viscosidade do GOP pode ter dificultado o acesso a estes compostos levando, desta forma, a um menor percentual de remoção (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2005; FOLSOM et al., 1999; KIRIMURA et al., 2001). Segundo Dinamarca et al. (2014), uma maneira de aumentar o contato entre estas duas fases é a adição de tensoativos durante o processo de BDS.

2.4.3 Capacidade de desnitração do GOP pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

A Tabela 12 apresenta os resultados da análise realizada por CHNS para as amostras de GOP após serem submetidas ao processo de BDN.

À semelhança do que ocorreu com os compostos de enxofre, os melhores resultados para a remoção de nitrogênio foram alcançados nos sistemas bifásicos que continham 20, 40 e 60% (v/v) de GOP, nos quais as massas de nitrogênio reduzidas foram 1510 ± 26 , 1624 ± 19 e 1171 ± 17 μg e as porcentagens de redução foram de 40,2; 43,2 e 31,2% (Figura 13), respectivamente.

Tabela 12: Teor de nitrogênio no GOP depois de submetido ao processo de BDN com *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

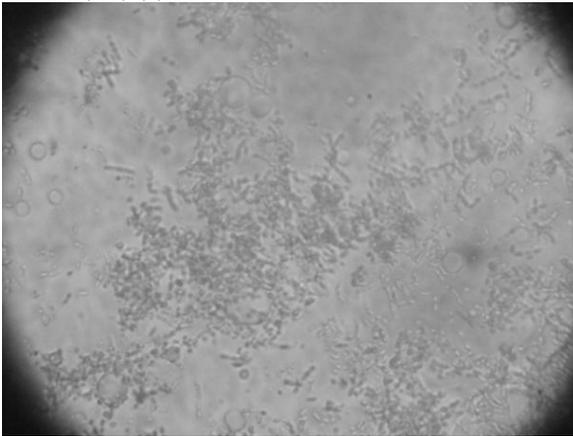
Concentração de GOP (% v/v)	Concentração de N ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Massa de N removida (μg)
Padrão	3758 \pm 19	---
10	3253 \pm 26	505 \pm 03
20	2248 \pm 16	1510 \pm 26
30	2928 \pm 69	830 \pm 12
40	2134 \pm 31	1624 \pm 19
50	2920 \pm 92	838 \pm 31
60	2587 \pm 05	1171 \pm 17
70	2907 \pm 03	851 \pm 14
80	3450 \pm 32	308 \pm 39
90	2967 \pm 41	791 \pm 87
100	4263 \pm 74	0

Fonte: Maass et al. (2015).

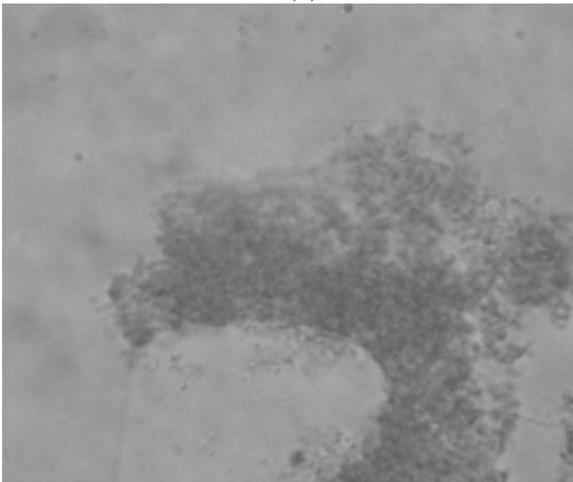
Estes resultados são semelhantes aos obtidos por outras técnicas de remoção de nitrogênio, como desnitrificação oxidativa (OTSUKI et al., 2000). No entanto, a remoção ocorreu simplesmente por células livres de *R. erythropolis*, sem a necessidade da adição de outros reagentes químicos ou catalisadores.

A fim de compreender o que levou as células de *R. erythropolis* a remover mais enxofre e nitrogênio nos experimentos contendo 40% (v/v) do GOP, e por que as mesmas não foram capazes de remover qualquer quantidade de enxofre e nitrogênio nos testes com 100% (v/v) de GOP, os dois meios reacionais foram analisados por microscopia ótica (Figura 14).

Figura 14: Microscopia ótica das células de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 ao final dos processos de BDN e BDS em reatores contendo 40% (v/v) (a) e 100% (v/v) (b) de GOP



(a)



(b)

Fonte: Maass et al. (2015).

A partir da Figura 14(a), se observa a presença de uma quantidade considerável de células refringentes, o que é uma indicação de que as células de *R. erythropolis* ATCC 4277 foram capazes de se adaptar bem ao meio de reacional contendo 40% (v/v). Além disso, as células se encontram dispersas no meio de cultura, o que é também um indicativo de que o meio oferece condições favoráveis para o micro-

organismo. Uma boa adaptação das células a esse meio reacional em particular também é observada nos resultados do teste de CIM pelo método da macrodiluição (Figura 12) (DE CARVALHO; PORETTI; DA FONSECA, 2004; DE CARVALHO et al., 2005; DE CARVALHO; WICK; HEIPIEPER, 2009; HEIPIEPER et al., 2007).

Uma condição de crescimento com privação nutricional aumenta a hidrofobicidade da superfície celular, que atua como uma fonte de ignição para uma junção célula-célula ou biogranulação. A adesão ocorre quando a repulsão eletrostática é superada pelas forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (DE CARVALHO; WICK; HEIPIEPER, 2009). Com isso, as células formam um agregado para se protegerem contra a toxicidade dos compostos hidrofílicos, uma vez que a resistência deste micro-organismo diminui com o aumento da toxicidade do sistema, restringindo as células a manterem sua viabilidade sob condições severas. Portanto, a toxicidade do sistema e uma situação de privação nutricional são fatores que podem ter influenciado na capacidade de dessulfurização e desnitração do *R. erythropolis* ATCC 4277 para o ensaio contendo 100% (v/v) de GOP (DE CARVALHO et al., 2005; DE CARVALHO; PORETTI; DA FONSECA, 2004; DE CARVALHO; WICK; HEIPIEPER, 2009; HEIPIEPER et al., 2007). O fenômeno de biogranulação é evidenciado na Figura 14 (b), onde também é possível observar que não há a presença de células refringentes.

2.4.4 Influência das condições de processo (pH, temperatura, agitação) e das fontes de nitrogênio e carbono no meio de cultivo

A fim de se estudar a influência das condições de processo e substratos sobre a capacidade de dessulfurização e tensão superficial do meio de cultura de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, realizou-se um estudo por planejamento fatorial fracionado 2^{7-2} . As variáveis avaliadas foram: (A) concentração de GOP (% v/v), (B) temperatura (°C), (C) agitação (rpm), (D) glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), (E) pH, (F) concentração do extrato de levedura ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), e (G) concentração inicial de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

2.4.4.1 Na capacidade de dessulfurização

A capacidade de dessulfurização do GOP pelo *R. erythropolis* ATCC 4277 foi testada para diferentes condições de processo e de nutrição por meio de um planejamento fatorial fracionado. Na Tabela 13

são apresentados os níveis estudados para cada fator, a matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{7-2} e a resposta obtida para cada ensaio em termos da concentração de enxofre ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Tabela 13: Planejamento fatorial fracionado 2^{7-2} e a resposta em termos da concentração de enxofre no GOP ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

	A	B	C	D	E	F	G	Conc. de
	(% v/v)	(°C)	(rpm)	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	pH	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	enxofre ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ^a
1	(-1) 10	(-1) 24	(-1) 120	(-1) 6,0	(-1) 5	(1) 4,0	(1) 0,4	7796±108
2	(1) 30	(-1) 24	(-1) 120	(-1) 6,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(-1) 0,2	8035 ± 107
3	(-1) 10	(1) 36	(-1) 120	(-1) 6,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(-1) 0,2	8520 ± 378
4	(1) 30	(1) 36	(-1) 120	(-1) 6,0	(-1) 5	(1) 4,0	(1) 0,4	7770 ± 12
5	(-1) 10	(-1) 24	(1) 180	(-1) 6,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(1) 0,4	8044 ± 109
6	(1) 30	(-1) 24	(1) 180	(-1) 6,0	(-1) 5	(1) 4,0	(-1) 0,2	7716 ± 291
7	(-1) 10	(1) 36	(1) 180	(-1) 6,0	(-1) 5	(1) 4,0	(-1) 0,2	7216 ± 149
8	(1) 30	(1) 36	(1) 180	(-1) 6,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(1) 0,4	7106 ± 10
9	(-1) 10	(-1) 24	(-1) 120	(1) 12,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(-1) 0,2	7616 ± 94
10	(1) 30	(-1) 24	(-1) 120	(1) 12,0	(-1) 5	(1) 4,0	(1) 0,4	6870 ± 172
11	(-1) 10	(1) 36	(-1) 120	(1) 12,0	(-1) 5	(1) 4,0	(1) 0,4	6337 ± 211

Continuação da **Tabela 13**

	A	B	C	D	E	F	G	Conc. de
	(% v/v)	(°C)	(rpm)	(g·L ⁻¹)	pH	(g·L ⁻¹)	(g·L ⁻¹)	enxofre (mg·kg ⁻¹) ^a
12	(1) 30	(1) 36	(-1) 120	(1) 12,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(-1) 0,2	7695 ± 77
13	(-1) 10	(-1) 24	(1) 180	(1) 12,0	(-1) 5	(1) 4,0	(-1) 0,2	6733 ± 144
14	(1) 30	(-1) 24	(1) 180	(1) 12,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(1) 0,4	8072 ± 432
15	(-1) 10	(-1) 36	(-1) 180	(-1) 12,0	(1) 5	(1) 2,0	(-1) 0,4	7962 ± 156
16	(1) 30	(1) 36	(1) 180	(1) 12,0	(-1) 5	(1) 4,0	(-1) 0,2	6631 ± 260
17	(-1) 10	(-1) 24	(-1) 120	(-1) 6,0	(1) 8	(1) 4,0	(-1) 0,2	6542 ± 15
18	(1) 30	(-1) 24	(-1) 120	(-1) 6,0	(1) 8	(-1) 2,0	(1) 0,4	7734 ± 225
19	(-1) 10	(1) 36	(-1) 120	(-1) 6,0	(1) 8	(-1) 2,0	(1) 0,4	8095 ± 164
20	(1) 30	(1) 36	(-1) 120	(-1) 6,0	(1) 8	(1) 4,0	(-1) 0,2	6773 ± 271
21	(-1) 10	(-1) 24	(1) 180	(-1) 6,0	(1) 8	(-1) 2,0	(-1) 0,2	7800 ± 16
22	(1) 30	(-1) 24	(1) 180	(-1) 6,0	(1) 8	(1) 4,0	(1) 0,4	7313 ± 80
23	(-1) 10	(1) 36	(1) 180	(-1) 6,0	(1) 8	(1) 4,0	(1) 0,4	8096 ± 119
24	(1) 30	(1) 36	(1) 180	(-1) 6,0	(1) 8	(-1) 2,0	(-1) 0,2	7357 ± 26
25	(-1) 10	(-1) 24	(-1) 120	(1) 12,0	(1) 8	(-1) 2,0	(1) 0,4	7876 ± 211
26	(1) 30	(-1) 24	(-1) 120	(1) 12,0	(1) 8	(1) 4,0	(-1) 0,2	7002 ± 21
27	(-1) 10	(1) 36	(-1) 120	(1) 12,0	(1) 8	(1) 4,0	(-1) 0,2	7805 ± 40

Continuação da **Tabela 13**

	A	B	C	D	E	F	G	Conc. de
	(% v/v)	(°C)	(rpm)	(g·L ⁻¹)	pH	(g·L ⁻¹)	(g·L ⁻¹)	enxofre (mg·kg ⁻¹) ^a
28	(1) 30	(1) 36	(-1) 120	(1) 12,0	(1) 8	(-1) 2,0	(1) 0,4	6886 ± 268
29	(-1) 10	(-1) 24	(1) 180	(1) 12,0	(1) 8	(1) 4,0	(1) 0,4	7831 ± 167
30	(1) 30	(-1) 24	(1) 180	(1) 12,0	(1) 8	(-1) 2,0	(-1) 0,2	7232 ± 225
31	(-1) 10	(1) 36	(1) 180	(1) 12,0	(1) 8	(-1) 2,0	(-1) 0,2	7062 ± 124
32	(1) 30	(1) 36	(1) 180	(1) 12,0	(1) 8	(1) 4,0	(1) 0,4	7892 ± 12
33	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	7703 ± 23
34	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	7769 ± 108
35	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	7802 ± 105
36	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	7759 ± 502
37	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	7734 ± 11
38	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	7973 ± 485
39	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	6616 ± 195
40	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	7386 ± 121

^a representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes

Visando obter uma melhor compreensão da interferência causada por cada um dos parâmetros e/ou interações sobre a concentração de enxofre no GOP realizou-se uma análise estatística.

Na Tabela 14 encontram-se os valores obtidos para os efeitos referentes às variáveis estudadas e seus respectivos índices estatísticos.

Tabela 14: Cálculo dos efeitos das variáveis e interações e respectivos índices estatísticos em relação à concentração de enxofre no GOP ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

	Efeitos	Erro Padrão	Teste <i>t</i> de <i>student</i>	Nível <i>p</i> ($\times 10^3$)
Médias/Interações	7503,93	67,51	111,16	0,00
(1) Conc. GOP	-202,94	150,95	-1,34	220,75
(2) Temperatura	-63,06	150,95	-0,42	688,63
(3) Agitação	44,44	150,95	0,29	777,00
(4) Conc. Glicose	-275,69	150,95	-1,83	110,53
(5) pH	-51,44	150,95	-0,34	743,28
(6) Conc. ext. de levedura	-423,06	150,95	-2,80	26,42
(7) Conc. inicial de biomassa	246,56	150,95	1,63	146,40
(1) e (2)	-169,94	150,95	-1,13	297,36
(1) e (3)	24,81	150,95	0,16	874,08
(1) e (4)	85,19	150,95	0,56	590,13
(1) e (5)	-161,81	150,95	-1,07	319,29
(1) e (6)	154,31	150,95	1,02	340,67
(1) e (7)	-96,31	150,95	-0,64	543,74
(2) e (3)	-114,31	150,95	-0,76	473,59
(2) e (4)	-57,19	150,95	-0,38	716,02
(2) e (5)	142,56	150,95	0,94	376,39
(2) e (6)	152,69	150,95	1,01	345,44
(2) e (7)	-110,94	150,95	-0,73	486,26
(3) e (4)	121,56	150,95	0,81	447,12
(3) e (5)	189,31	150,95	1,25	250,04
(3) e (6)	272,19	150,95	1,80	114,35
(3) e (7)	324,56	150,95	2,15	68,60
(4) e (5)	260,19	150,95	1,72	128,42
(4) e (6)	10,56	150,95	0,07	946,17
(4) e (7)	-2,81	150,95	-0,02	985,65

Conforme se observa na Tabela 14 o único parâmetro e/ou interação que apresentou efeito significativo sobre a concentração de enxofre foi a concentração do extrato de levedura, que se encontra destacada em negrito. De acordo com Huang et al. (2008) a taxa e o percentual de degradação do enxofre no petróleo e em seus subprodutos são, em geral, limitados pela disponibilidade de nitrogênio e fósforo. Assim, uma forma prática de se aumentar a biodegradação de enxofre é a adição de nitrogênio e fósforo inorgânicos. Além disso, constataram

que a concentração de extrato de levedura influencia positivamente na biorremediação de águas marinhas contaminadas com petróleo. Tais observações corroboram os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que a concentração de extrato de levedura também apresentou um efeito positivo sobre a remoção do enxofre contido no GOP.

Embora a análise estatística do planejamento fatorial fracionado tenha demonstrado que somente a concentração do extrato de levedura afete a concentração de enxofre, sabe-se pelos resultados discutidos anteriormente que a concentração de GOP também influencia a capacidade de dessulfurização da bactéria *R. erythropolis* ATCC 4277. Portanto, acredita-se que o desenvolvimento de um novo planejamento experimental utilizando as concentrações de GOP nos quais se obtiveram os melhores resultados preliminares possa proporcionar uma análise mais precisa do processo, bem como uma maior remoção de enxofre.

2.4.4.2 Na tensão superficial do meio de cultivo

A Tabela 15 apresenta os níveis estudados para cada variável, a matriz de planejamento fatorial fracionado 2^{7-2} e a resposta obtida para cada ensaio em termos da tensão superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

De acordo com o que se observa na Tabela 15, somente nos experimentos 9, 18, 24 e 25 houve uma diminuição no valor da TS para 48,2; 47,6; 48,4 e 46,3 ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$), respectivamente. Embora, esses valores sejam inferiores ao da TS do meio de cultura padrão ($69,9 \pm 1,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), não são indicativos de formação de biossurfactante. Segundo Cooper et al. (1986), para que uma cultura seja considerada promissora para a produção de biossurfactantes a TS do meio líquido deve ser reduzida a valores iguais ou inferiores a $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Contudo, como houve uma minoração, há a possibilidade da formação de biossurfactante, ainda que em quantidades não muito expressivas.

Tabela 15: Planejamento fatorial fracionado 2^{7-2} e a resposta em termos da tensão superficial

	A	B	C	D	E	F	G	TS
	(% v/v)	(°C)	(rpm)	(g·L ⁻¹)	pH	(g·L ⁻¹)	(g·L ⁻¹)	(mN·m ⁻¹) ^a
1	(-1) 10	(-1) 24	(-1) 120	(-1) 6,0	(-1) 5	(1) 4,0	(1) 0,4	64,2 ± 0,3
2	(1) 30	(-1) 24	(-1) 120	(-1) 6,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(-1) 0,2	68,4 ± 0,1
3	(-1) 10	(1) 36	(-1) 120	(-1) 6,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(-1) 0,2	65,1 ± 0,4
4	(1) 30	(1) 36	(-1) 120	(-1) 6,0	(-1) 5	(1) 4,0	(1) 0,4	67,9 ± 0,1
5	(-1) 10	(-1) 24	(1) 180	(-1) 6,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(1) 0,4	68,1 ± 0,3
6	(1) 30	(-1) 24	(1) 180	(-1) 6,0	(-1) 5	(1) 4,0	(-1) 0,2	68,3 ± 0,2
7	(-1) 10	(1) 36	(1) 180	(-1) 6,0	(-1) 5	(1) 4,0	(-1) 0,2	68,2 ± 0,1
8	(1) 30	(1) 36	(1) 180	(-1) 6,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(1) 0,4	64,5 ± 0,1
9	(-1) 10	(-1) 24	(-1) 120	(1) 12,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(-1) 0,2	48,2 ± 1,2
10	(1) 30	(-1) 24	(-1) 120	(1) 12,0	(-1) 5	(1) 4,0	(1) 0,4	63,9 ± 0,2
11	(-1) 10	(1) 36	(-1) 120	(1) 12,0	(-1) 5	(1) 4,0	(1) 0,4	67,5 ± 0,1
12	(1) 30	(1) 36	(-1) 120	(1) 12,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(-1) 0,2	65,3 ± 0,1
13	(-1) 10	(-1) 24	(1) 180	(1) 12,0	(-1) 5	(1) 4,0	(-1) 0,2	60,4 ± 1,7
14	(1) 30	(-1) 24	(1) 180	(1) 12,0	(-1) 5	(-1) 2,0	(1) 0,4	64,2 ± 0,5
15	(-1) 10	(-1) 36	(-1) 180	(-1) 12,0	(1) 5	(1) 2,0	(-1) 0,4	63,6 ± 0,5
16	(1) 30	(1) 36	(1) 180	(1) 12,0	(-1) 5	(1) 4,0	(-1) 0,2	68,3 ± 0,1

Continuação Tabela 15

	A	B	C	D	E	F	G	TS
	(% v/v)	(°C)	(rpm)	(g·L ⁻¹)	pH	(g·L ⁻¹)	(g·L ⁻¹)	(mN·m ⁻¹) ^a
17	(-1) 10	(-1) 24	(-1) 120	(-1) 6,0	(1) 8	(1) 4,0	(-1) 0,2	66,6 ± 0,3
18	(1) 30	(-1) 24	(-1) 120	(-1) 6,0	(1) 8	(-1) 2,0	(1) 0,4	47,6 ± 1,0
19	(-1) 10	(1) 36	(-1) 120	(-1) 6,0	(1) 8	(-1) 2,0	(1) 0,4	66,8 ± 0,1
20	(1) 30	(1) 36	(-1) 120	(-1) 6,0	(1) 8	(1) 4,0	(-1) 0,2	68,1 ± 0,3
21	(-1) 10	(-1) 24	(1) 180	(-1) 6,0	(1) 8	(-1) 2,0	(-1) 0,2	66,6 ± 0,4
22	(1) 30	(-1) 24	(1) 180	(-1) 6,0	(1) 8	(1) 4,0	(1) 0,4	65,1 ± 0,1
23	(-1) 10	(1) 36	(1) 180	(-1) 6,0	(1) 8	(1) 4,0	(1) 0,4	67,0 ± 0,3
24	(1) 30	(1) 36	(1) 180	(-1) 6,0	(1) 8	(-1) 2,0	(-1) 0,2	48,4 ± 1,0
25	(-1) 10	(-1) 24	(-1) 120	(1) 12,0	(1) 8	(-1) 2,0	(1) 0,4	46,3 ± 0,6
26	(1) 30	(-1) 24	(-1) 120	(1) 12,0	(1) 8	(1) 4,0	(-1) 0,2	64,6 ± 0,1
27	(-1) 10	(1) 36	(-1) 120	(1) 12,0	(1) 8	(1) 4,0	(-1) 0,2	67,7 ± 0,6
28	(1) 30	(1) 36	(-1) 120	(1) 12,0	(1) 8	(-1) 2,0	(1) 0,4	64,9 ± 0,1
29	(-1) 10	(-1) 24	(1) 180	(1) 12,0	(1) 8	(1) 4,0	(1) 0,4	62,6 ± 1,2
30	(1) 30	(-1) 24	(1) 180	(1) 12,0	(1) 8	(-1) 2,0	(-1) 0,2	65,3 ± 0,1
31	(-1) 10	(1) 36	(1) 180	(1) 12,0	(1) 8	(-1) 2,0	(-1) 0,2	64,6 ± 0,6
32	(1) 30	(1) 36	(1) 180	(1) 12,0	(1) 8	(1) 4,0	(1) 0,4	67,4 ± 0,5

Continuação **Tabela 15**

	A	B	C	D	E	F	G	TS
	(% v/v)	(°C)	(rpm)	(g·L ⁻¹)	pH	(g·L ⁻¹)	(g·L ⁻¹)	(mN·m ⁻¹) ^a
33	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	66,4 ± 0,1
34	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	67,4 ± 0,1
35	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	64,6 ± 0,1
36	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	65,0 ± 0,6
37	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	65,3 ± 0,1
38	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	65,8 ± 0,4
39	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	67,4 ± 0,5
40	(0) 20	(0) 30	(0) 150	(0) 9,0	(0) 7	(0) 3,0	(0) 0,3	66,4 ± 2,0

^arepresentam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes

A compreensão das variáveis e/ou das interações que tiveram influência sobre a TS é de extrema importância para que, posteriormente, possam ser explorados no sentido de aumentar a produção de biossurfactante por *R. erythropolis* ATCC 4277 utilizando o GOP como fonte de carbono. Na Tabela 16 apresentam-se os valores obtidos para os efeitos referentes às variáveis estudadas e seus respectivos índices estatísticos.

Tabela 16: Cálculo dos efeitos das variáveis e interações e seus respectivos índices estatísticos

	Efeitos	Erro Padrão	Teste <i>t</i> de <i>student</i>	Nível <i>p</i> (x10 ³)
Médias/Interações	64,10	0,17	387,37	0,00
(1) Conc. GOP	0,57	0,37	1,53	170,04
(2) Temperatura	3,45	0,37	9,31	0,03
(3) Agitação	1,82	0,37	4,92	1,71
(4) Conc. Glicose	-1,64	0,37	-4,44	3,01
(5) pH	-2,29	0,37	-6,18	0,45
(6) Conc. ext. de levedura	5,00	0,37	13,51	0,00
(7) Conc. inicial de biomassa	-0,78	0,37	-2,12	72,15
(1) e (2)	-2,51	0,37	-6,77	0,26
(1) e (3)	-1,74	0,37	-4,70	2,20
(1) e (4)	4,84	0,37	13,08	0,00
(1) e (5)	-2,64	0,37	-7,13	0,19
(1) e (6)	0,65	0,37	1,75	124,00
(1) e (7)	-0,62	0,37	-1,68	137,48
(2) e (3)	-4,50	0,37	-12,16	0,01
(2) e (4)	3,30	0,37	8,92	0,05
(2) e (5)	0,32	0,37	0,87	413,46
(2) e (6)	-0,14	0,37	-0,37	720,37
(2) e (7)	2,51	0,37	6,79	0,26
(3) e (4)	1,68	0,37	4,53	2,69
(3) e (5)	-0,03	0,37	-0,09	931,60
(3) e (6)	-2,23	0,37	-6,03	0,53
(3) e (7)	2,36	0,37	6,37	0,38
(4) e (5)	2,52	0,37	6,82	0,25
(4) e (6)	0,03	0,37	0,08	940,24
(4) e (7)	0,28	0,37	0,75	476,43

As variáveis e interações que se encontram destacadas em negrito na Tabela 16 são os que possuem efeito significativo sobre a TS. Observa-se, portanto, que a concentração do extrato de levedura, e as interações entre a concentração de GOP/concentração de glicose e agitação/temperatura foram os que apresentaram maior influência sobre a TS.

A fonte de carbono é muito importante na produção do biossurfactante, sendo que, alguns micro-organismos só o produzem na presença de fontes hidrofóbicas (como hidrocarbonetos), e outros apenas na presença de fontes miscíveis (como glicose) (KIM et al., 1997).

Segundo Khan et al. (2011), a natureza do substrato que fornece carbono ao micro-organismo influencia tanto na qualidade quanto na quantidade de biossurfactante produzido. Portanto, o efeito expressivo causado pela interação entre as concentrações de GOP e glicose (ambas atuam como fonte de carbono), não é surpreendente. Joshi, Bharucha e Desai (2008) foram capazes de produzir biossurfactantes empregando tanto fontes de carbono miscíveis quanto imiscíveis utilizando uma mesma bactéria (*Bacillus subtilis* B20) para ambos os casos. O resultado obtido com *R. erythropolis* ATCC 4277 vem ao encontro dos descritos por Joshi, Bharucha e Desai et al. (2008), isso significa que essa bactéria apresenta o mesmo comportamento de *Bacillus subtilis* B20, sendo capaz de produzir biossurfactantes a partir de fontes de carbono miscíveis e imiscíveis.

A importância da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactantes é análoga à da fonte de carbono. Segundo Pacheco (2008) a porta de entrada para o nitrogênio no metabolismo do carbono é o glutamato, o qual é formado pela aaminação redutiva do acetoglutarato. Esta reação pode ocorrer por intermédio de dois tipos de mecanismos bioquímicos: 1) por uma reação catalisada pela glutamato desidrogenase, que é efetiva em ambientes onde há amônia em abundância; 2) no qual a glutamina é um intermediário, utilizada em condições nas quais a concentração de amônia é baixa. Neste segundo mecanismo as células utilizam a energia livre através da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP), fazendo com que a glutamina sintetase possa assimilar a amônia presente no ambiente. Além disso, como a produção de biossurfactantes por si só auxilia na assimilação da fonte de carbono em condições nas quais o nitrogênio é limitante, a via da enzima glutamina sintetase é ativada, requerendo, conseqüentemente, uma grande produção de ATP. Desta maneira, um amplo consumo da fonte de carbono se faz necessário para suportar esta nova demanda de energia, levando a um ciclo que estimula a síntese de biossurfactantes. Por isso, muitos estudos têm sido realizados a fim de se determinar a relação carbono/nitrogênio que resulte em uma maior produção de biossurfactante (LIN; CHEN, 2007; PACHECO, 2008; SANTOS et al., 2002; WU et al., 2008). As justificativas infracitadas explicam porque as fontes de carbono (GOP/glicose) e de nitrogênio (extrato de levedura) apresentaram efeitos em relação à TS.

Pacheco (2008) estudou a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de biossurfactante por *R. erythropolis* ATCC 4277 e observou que o extrato de levedura foi a que mais favoreceu na

produção do biossurfactante e no decréscimo da TS. Tais dados vão ao encontro do obtido nesse estudo, onde a concentração de extrato de levedura também contribuiu para a diminuição da TS, conforme evidenciado na Tabela 16.

Outra interação que mostrou grande influência sobre a TS foi entre a agitação e temperatura. Bicca, Fleck e Ayub (1999) e Pacheco et al. (2010) obtiveram uma maior produção de biossurfactante pelo *R. erythropolis* quando utilizaram agitação e temperatura mais elevadas (37 °C e 200 rpm). Por isso, acredita-se que para este trabalho o emprego dos fatores agitação e temperatura em seus níveis superiores seja o mais adequado para se atingir valores de TS inferiores.

Embora os resultados concernentes à produção de biossurfactantes não tenham sido favoráveis, os dos processos de BDN e BDS se mostraram bastante promissores.

Parte dessas metodologias e dados apresentados anteriormente foi publicada nos artigos científicos infracitados:

- MAASS, D.; OLIVEIRA, D.; SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Biodesulfurization of a system containing synthetic fuel using *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 174, p. 2079-2085, 2014;

- MAASS, D.; TODESCATO, D.; MORITZ, D. E.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; DE SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Desulfurization and denitrogenation of heavy gas oil by *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2015.

2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

A cepa *R. erythropolis* ATCC 4277 foi capaz de crescer em todas as concentrações de GOP testadas, não apresentando inibição em nenhuma delas.

Diferentes concentrações de GOP no processo biocatalítico afetaram a massa de enxofre removida, a velocidade específica de dessulfurização, e o percentual de remoção. O melhor resultado foi alcançado para o processo de dessulfurização contendo 40% (v/v) de GOP, onde a massa de enxofre removida por grama de GOP foi de $2664 \pm 95 \mu\text{g}$, a velocidade específica de dessulfurização de $148 \text{ mg de enxofre} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, e a porcentagem de remoção foi de 42,7%.

Analogamente, os melhores resultados para processo de BDN foram obtidos para o sistema que utilizou 40% (v/v) de GOP, onde a

massa de nitrogênio removida para esta condição de processo foi de 1624 ± 19 μg e o percentual de redução foi de 43,2%.

A análise estatística realizada a partir do planejamento fatorial fracionado $2^{(7-2)}$ demonstrou que a concentração do extrato de levedura, quando utilizada em seu nível superior ($4,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), apresenta efeito positivo na remoção do enxofre presente no GOP.

O *R. erythropolis* ATCC 4277 apresentou a capacidade de eliminar esta quantidade expressiva de poluentes a partir de uma fração real do petróleo (gasóleo pesado), na presença de uma concentração elevada do mesmo. Tais resultados representam um avanço no desenvolvimento dos processos de BDN e BDS, a fim de torná-los econômico, ambiental e industrialmente viáveis.

Embora a tensão superficial do meio de cultivo do *R. erythropolis* ATCC 4277 tenha diminuído para algumas condições experimentais, os resultados não se mostraram promissores com relação à produção de biossurfactante utilizando o GOP como substrato limitante. Isso pode ser atribuído à dificuldade apresentada pelo *R. erythropolis* em produzir biossurfactantes, em especial, na presença de fontes de carbono imiscíveis. Assim, o emprego de um micro-organismo com uma capacidade superior de produzir biossurfactantes, ou a utilização de uma fonte de carbono em que os nutrientes estejam mais disponíveis ao metabolismo celular, se faz necessário.

3 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE PELO *Bacillus subtilis* DSM 3256 A PARTIR DO RESÍDUO SÓLIDO DA EXTRAÇÃO BIFÁSICA DO AZEITE DE OLIVA

Neste capítulo é apresentado o levantamento bibliográfico dos principais trabalhos abordando os aspectos fundamentais envolvidos no processo de produção de biossurfactantes, bem como a problemática dos resíduos oleosos. Serão retratados os principais materiais e métodos empregados nesta etapa. Discutir-se-ão também os resultados obtidos e serão expostas as conclusões parciais referentes a essa etapa do trabalho.

3.1 INTRODUÇÃO

O azeite de oliva é um dos principais componentes da dieta mediterrânea. Sua produção global foi de 3,3 milhões de toneladas métricas em 2012 (FAOSTAT, 2012), e seu uso está aumentando em todo o mundo (DEMERCHE et al., 2013). A Espanha é o maior produtor mundial de azeite de oliva com 1,8 milhões de toneladas métricas em 2013 (MAGRAMA, 2015). Atualmente, neste país, o método predominante para a extração do azeite de oliva é uma centrifugação em duas fases, com a qual se obtém o azeite e se gera o resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva (RSEBAO), também conhecido como "*alperujo*". O RSEBAO é composto pela água de vegetação da azeitona, pelas cascas e caroços e, dependendo do rendimento da extração, por uma pequena quantidade de azeite. Somente a casca e o caroço já representam 48% da azeitona, e ao final do processo cerca de 80% das azeitonas processadas é descartado como rejeito (SAMPEDRO et al., 2007), por conseguinte, a extração do azeite implica em uma grande produção de resíduos.

O RSEBAO apresenta uma concentração de matéria orgânica elevada (848,9 - 976,0 g·kg⁻¹ da sua massa seca) e teor de umidade (55,6-74,5%), o seu teor de lipídios varia entre 0,03 e 4,25% dependendo do rendimento da extração (ALBUQUERQUE et al., 2004). Esse resíduo também é rico em compostos fenólicos com uma grande variedade de atividades biológicas (MCNARAMA et al., 2008; ROIG; CAYUELA; SÁNCHEZ-MONEDERO, 2006). Assim, inúmeros estudos têm se focado na extração desses compostos fenólicos para aplicações farmacêuticas, cosmetológicas e alimentícias (BOUCID et al., 2012; FERNANDEZ-BOLAÑOS et al., 2002). Outros usos potenciais do RSEBAO são como fertilizante (SAVIOZZI et al., 2001), como material adsorvente de metais pesados (PAGNANELLI; TORO;

VEGLIO, 2002), como combustível (VITOLLO; PETARCA; BRESCI, 1999), entre outros. No entanto, a geração de enormes quantidades desse resíduo, sobretudo na Espanha, juntamente ao seu potencial como matéria-prima, exige o desenvolvimento de novas aplicações mais atraentes para o mesmo (ALBUQUERQUE et al., 2004). Nesse sentido, a produção de biossurfactante constitui uma abordagem promissora para a valorização do RSEBAO.

Biossurfactantes são compostos anfífilos produzidos por uma grande variedade de micro-organismos (MULLIGAN, 2005). De acordo com a sua estrutura química, podem ser classificados como glicolípídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolípidos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e tensoativos de particulados (DESAI; BANAT, 1997). As aplicações dos biossurfactantes são similares as dos tensoativos sintéticos (MARCHANT; BANAT, 2012; HENKEL et al., 2012), mas, devido à sua segurança ambiental e biológica, são mais adequados para aplicações ambientais, tal como a biorremediação de solos contaminados com petróleo (RAHMAN et al., 2003). No entanto, uma das principais desvantagens nos biossurfactantes são o seu baixo rendimento e altos custos operacionais que impedem a sua viabilidade econômica. Nesse sentido, resíduos agroindustriais vêm desempenhando um papel importante como fonte de carbono na produção de biossurfactantes (NITSCHKE et al., 2005). Nitschke et al. (2005), por exemplo, obtiveram ramnolípídeos a partir de resíduos de sementes de algodão, babaçu, milho, soja e palma, contudo, não há relatos sobre a produção de biossurfactantes usando o RSEBAO.

O principal propósito desta etapa do trabalho foi avaliar o potencial do RSEBAO como a principal fonte de carbono na produção de biossurfactantes pelo *Bacillus subtilis* DSM 3256.

3.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item são apresentadas as principais publicações científicas a respeito dos aspectos fundamentais envolvidos na produção de biossurfactante, bem como das características gerais do resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva e da surfactina.

A degradação ambiental decorrente das atividades industriais e urbanas vem atingindo níveis insustentáveis, sendo necessário o desenvolvimento de novas perspectivas de reaproveitamento e reprocessamento de produtos e resíduos. O reaproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais representa o uso de matérias-primas de baixo custo para a obtenção de produtos de elevado valor agregado.

Os óleos vegetais figuram entre os resíduos que apresentam maior risco de poluição ambiental, principalmente, devido à sua utilização em processos de fritura por imersão (COSTA NETO et al., 2000). Diariamente, óleos comestíveis residuais de residências, indústrias e estabelecimentos comerciais são descartados indevidamente nos sistemas de esgoto, causando transtornos na rede de saneamento e poluição dos recursos hídricos (BESEN; STRASSBURG, 2011; PITTA JUNIOR et al., 2009). Cada litro de óleo despejado na rede de saneamento pode poluir cerca de um milhão de litros de água, encarecendo o processo de tratamento de água em até 45% (FERREIRA; FERNANDES, 2011). Quando presente de forma inadequada no sistema aquífero, o óleo permanece na superfície, criando uma barreira que dificulta a entrada de luz e a oxigenação, comprometendo assim, a base da cadeia alimentar aquática (ALAMINI; NUNES; BARBADO, 2009).

Os resíduos oleosos são tanto aqueles derivados dos processos de fritura quanto do processo de extração. Embora existam inúmeras resoluções que regulamentam as condições e padrões de emissões de efluentes, onde são permitidos os lançamentos de até 50 mg/L de óleos vegetais e gorduras animais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011), estima-se que no Brasil sejam despejados inadequadamente mais de 3 bilhões de litros de resíduos de óleos vegetais por ano (BILCK et al., 2009).

Os óleos vegetais são obtidos, predominantemente, a partir de sementes de diversas espécies vegetais, sendo que o Brasil possui grande diversidade de espécies vegetais oleaginosas das quais é possível extrair óleos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011). No Brasil, o consumo anual de óleos vegetais está em torno de 3,72 milhões de toneladas. O óleo de soja é o que possui um consumo mais amplo, chegando à 3,2 milhões de toneladas ou 86% do total consumido. Em seguida, na segunda posição, aparece o óleo de algodão, com 255 mil toneladas (DESER, 2015). Embora o azeite de oliva ocupe a 6ª posição, seu consumo vem se popularizando, principalmente devido aos efeitos benéficos à saúde associados a sua ingestão diária (DESER, 2015, EPAMIG, 2012). Além disso, nos últimos anos há uma crescente iniciativa para a produção nacional de azeite de oliva, principalmente no estado do Rio Grande do Sul, devido às condições climáticas favoráveis (EPAMIG, 2012).

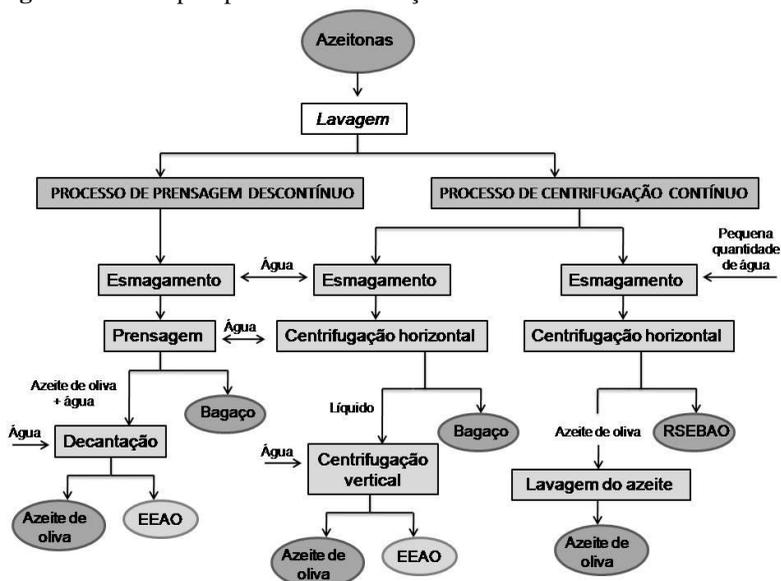
A maior parte da produção de azeite de oliva no mundo, 3,3 milhões de toneladas métricas em 2012 (FAOSTAT, 2012), baseia-se nos países do sul da Europa, Oriente Médio e Norte da África, onde o

cultivo da oliveira (*Olea europaea* L.) é uma tradição secular, especialmente para a extração de azeite. A Espanha é o maior produtor mundial de azeite de oliva, com uma produção de 1,8 milhões de toneladas métricas em 2013 (MAGRAMA, 2012). Como somente a casca e o caroço da azeitona representam 48% do peso total, e os dois componentes principais (água e azeite) estão concentrados principalmente na polpa e no caroço, a extração do azeite implica em uma grande produção de resíduos (SAMPEDRO et al., 2007).

3.2.1 Métodos de extração do azeite de oliva

A extração do azeite de oliva é realizada por processos descontínuo (pressionando) ou contínuo (centrifugação) em moinhos tradicionais ou em unidades modernas (Figura 15). A água é usada em algumas destas etapas, durante a prensagem da azeitona, visando obter maior quantidade de azeite. Após a prensagem da azeitona, a pasta resultante é misturada e esfregada para aumentar a percentagem de óleo disponível e ajudar as pequenas gotículas de óleo a coalescer e aglomerar, facilitando assim a separação das fases oleosa e aquosa (DERMECHE et al., 2013).

Figura 15: Principais processos de extração do azeite de oliva



Fonte: Adaptada de Dermeche et al. (2013).

3.2.1.1 Prensagem descontínua

O processo de prensagem descontínua é o método mais antigo e difundido para o processamento da azeitona para obter azeite de oliva. Após a trituração, a pasta de azeitona é espalhada sobre discos de fibras que são empilhados em cima uns dos outros e, em seguida, colocados na prensa. Uma pressão é aplicada sobre os discos para compactar a fase sólida da pasta de azeitona e para percolar as fases líquida (óleo e água de vegetação). Uma pequena quantidade de água é adicionada para separar facilmente o óleo das outras fases. O subprocesso de extração por prensagem produz uma fração sólida chamada bagaço de azeitona (bolo de oliva) contendo polpa de azeitona, pele, caroço e água. Esta mistura é separada por decantação por meio da qual se obtém o azeite de oliva e o efluente da extração do azeite de oliva (EEAO). Este método oferece vantagens, tais como baixos custos com equipamentos e simplicidade técnica. Além disso, devido à pouca quantidade de água acrescentada durante o processo, produz um pequeno volume de EEAO (40 a 60 L/100 kg de azeitona). No entanto, este processo também apresenta desvantagens, como a própria descontinuidade do processo e elevados custos de mão-de-obra. Além disso, o EEAO produzido possui uma maior demanda química de oxigênio (DQO) em comparação com o EEAO gerado por outros processos (DERMECHE et al., 2013; GIOVACCHINO; SESTILI; VINCENZO, 2002; SÁNCHEZ-MORAL; RUIZ-MÉNDEZ, 2006).

3.2.1.2 Processo contínuo trifásico

O tradicional processo descontínuo de prensagem inicialmente deu lugar ao processo contínuo, que utiliza um sistema trifásico, e posteriormente um sistema bifásico (DERMECHE et al., 2013).

O processo contínuo de extração do azeite de oliva utiliza um decantador industrial para separar todas as fases por centrifugação. Ele baseia-se nas diferenças de densidade entre os componentes da pasta de azeitona (azeite, água e sólidos insolúveis). Decantadores, com pequenas modificações, podem funcionar quer como sistemas trifásicos ou bifásicos. No processo de decantação trifásico contínuo, se adiciona água morna na etapa de centrifugação (1,25-1,75 vezes mais em comparação com a extração por prensagem), produzindo uma quantidade superior de EEAO (80-120 L/100 kg de azeitonas) (ALBUQUERQUE et al., 2004).

O sistema trifásico gera basicamente três frações: um resíduo sólido (bolo de azeitona) e duas fases líquidas (azeite e EEAO). Este sistema possui inúmeras vantagens, tais como a automação completa, melhor qualidade do azeite e uma menor área requerida, mas também apresenta desvantagens como níveis mais elevados de consumo de água e energia, uma maior geração de EEAO, e um custo de instalação superior (DERMECHE et al., 2013; ROIG; CAYUELA; SÁNCHEZ-MONEDERO, 2006).

Atualmente, o sistema trifásico, não obstante o seu elevado consumo de água, é ainda o método mais amplamente utilizado para a produção de azeite de oliva virgem, especialmente nos países que produzem grandes quantidades de azeitonas em um curto período de tempo (BENITEZ et al., 1997). Esse fenômeno, combinado com a crescente demanda por azeite de oliva, pode explicar o recente aumento dos problemas ambientais associados à sua produção (DERMECHE et al., 2013).

3.2.1.3 Processo contínuo bifásico

O processo de extração bifásico desenvolvido durante a década de 1990, tinha como objetivo minimizar o volume de EEAO e, por conseguinte, reduzir o fenol “lavado”. Neste processo, a pasta de azeitona é separada em duas fases: azeite de oliva e bagaço úmido. O bagaço úmido gerado é um subproduto semi-sólido (uma combinação da casca de azeitona e EEAO), conhecido como de resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva (RSEBAO), que pode ser reprocessado para extrair ainda mais o óleo e aumentar o rendimento.

Na verdade, existem dois tipos de extração do azeite a partir do bagaço de azeitona: (i) com solventes (tradicionais), e (ii) pela extração física ou centrifugação (segunda centrifugação). Os sistemas bifásicos têm sido apelidados de decantadores “ecológicos”, devido à redução no consumo de água (BENITEZ et al., 1997; DERMECHE et al., 2013; KAPELLAKIS; TSAGARAKIS; CROWTHER, 2008; ROIG; CAYUELA; SÁNCHEZ-MONEDERO, 2006). No entanto, o RSEBAO resultante (10 L/100 kg de azeitonas) é difícil de gerir, em virtude da sua carga poluente ser mais concentrada (DERMECHE et al., 2013; MCNAMARA et al., 2008).

3.2.2 Resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva

3.2.2.1 Composição geral

O RSEBAO possui características muito distintas em relação aos demais resíduos sólidos produzidos pelos sistemas de extração tradicionais (prensagem e trifásico), conforme apresentado na

Tabela 17. Trata-se de um lodo espesso que contém pedaços de caroço, casca e água de vegetação da azeitona (ALBUQUERQUE et al., 2004). O seu teor em umidade se encontra entre 65-75%, e o teor de cinzas fica entre 1,42-4%. Na análise mineral o potássio, seguido do cálcio e do sódio são apontados como os principais elementos do RSEBAO. Note-se que a água é também um fator decisivo nos teores de fenóis totais e açúcares solúveis (DERMECHE et al., 2013).

Tabela 17: Características químicas do resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva

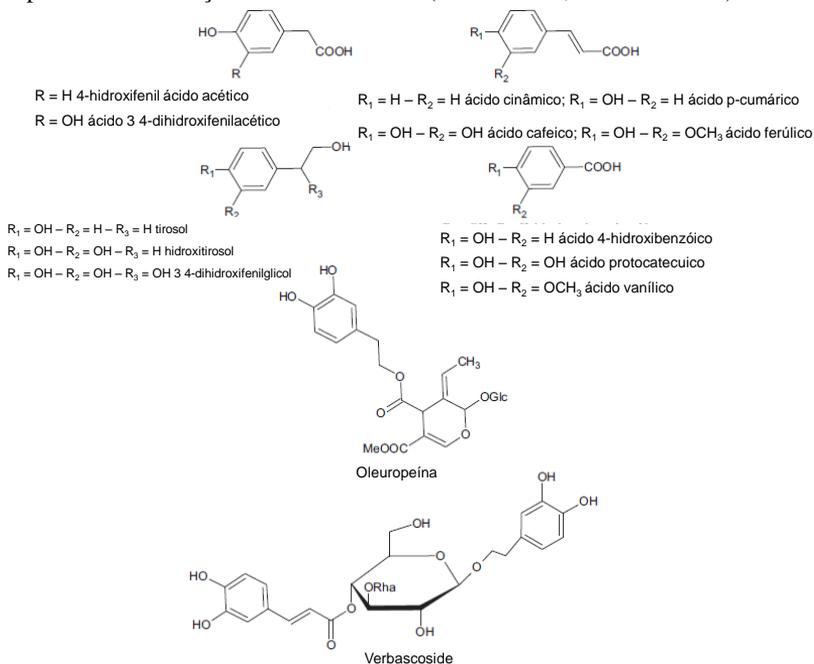
Parâmetro	Teores
Polpa (%)	10-15
Caroço (%)	12-18
Teor de cinzas (%)	1,42-4
pH	4,9-6,8
Condutividade elétrica (dS/m)	1,78-5,24
Carbono total (%)	25,37
Matéria orgânica (%)	60,3-98,5
Nitrogênio total (%)	0,25-1,85
P (%)	0,03-0,14
K (%)	0,63-2,9
Na (%)	0,02-0,1
Ca (%)	0,23-1,2
Mg (%)	0,05-0,17
Fe (%)	0,0526-0,26
Cu (%)	0,0013-0,0138
Mn (%)	0,0013-0,0067
Zn (%)	0,0010-0,0027
Lipídeos (%)	3,76-18,0
Fenóis totais (%)	0,4-2,43
Açúcares totais (%)	0,83-19,3
Proteínas totais (%)	2,87-7,2
Celulose (%)	14,54
Hemicelulose (%)	6,63
Lignina (%)	8,54

Fonte: Adaptada de Dermeche et al. (2013).

3.2.2.2 *Compostos fenólicos*

Os compostos fenólicos são substâncias orgânicas que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila substituídos e uma cadeia lateral funcional. Os compostos fenólicos naturais incluem moléculas simples, tais como os ácidos fenólicos e os compostos altamente polimerizados, tais como taninos. As formas mais comuns de compostos fenólicos são os conjugados com vários açúcares (mono-, di- ou oligossacáridos), ácidos orgânicos e lípidos, ou mesmo com outros fenóis ligados a grupos hidroxila ou, menos frequentemente, a átomos de carbono aromáticos (BRAVO, 1998). As diferenças entre estas estruturas químicas conjugadas representam as diferentes classificações químicas e variabilidade nos seus modos de ação. Os compostos fenólicos podem ser agrupados em classes de acordo com as características estruturais das suas cadeias carbônicas. As principais classes são os ácidos fenólicos e aldeídos, flavonoides, estilbenos, taninos e lenhinas (SHAHIDI; NACZK, 2003). Além disso, os fenóis são quantitativa e qualitativamente abundantes nos subprodutos da extração do azeite de oliva (DERMECHE et al., 2013). Na Figura 16 estão ilustrados os principais compostos fenólicos descritos na literatura, bem como suas estruturas químicas.

Figura 16: Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos dos subprodutos da extração do azeite de oliva (Glc: Glicose; Rha: Ramnose)



Fonte: Adaptada de Dermeche et al. (2013).

Os compostos fenólicos mais abundantes no RSEBAO são o tirosol e hidroxitirosol (FERNÁNDEZ-BOLANOS et al., 2002), em conjunto com *p*-cumárico e, em menor grau, ácido vanílico (LESAGE-MEESSEN et al., 2001). Outros compostos minoritários identificados incluem verbascosídeo, rutina, ácido cafeoilquínico, luteolina-4'-O-glicosídeo, 11-metilholosídeo, hidroxitirosol-10-b-glucosídeo, luteolina-7-rutinosídeo, e oleosídeo (DERMECHE et al., 2013).

As características especiais dos resíduos da extração do azeite de oliva são devidas, principalmente, ao alto e variado conteúdo de compostos fenólicos de baixo peso molecular e a cor preta recalcitrante, causada por um polímero proveniente da lignina. Os efeitos fitotóxico e antibacteriano (TUNÇEL; NERGIZ, 1993) destes resíduos têm sido atribuídos ao conteúdo fenólico. Estes aspectos indesejáveis dos resíduos dificultam a reutilização de seu rico conteúdo orgânico e inorgânico (PÉREZ et al., 1992).

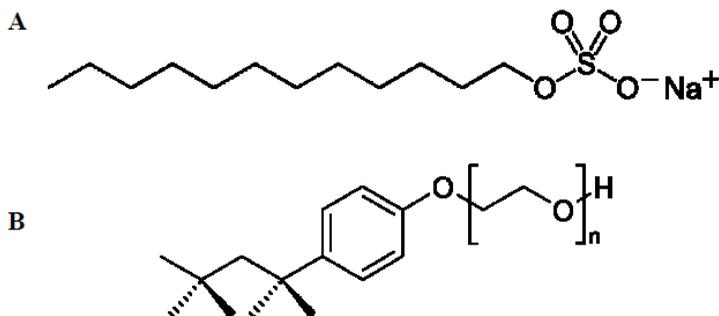
3.2.2.3 Aplicações

O RSEBAO contém nutrientes que podem ser bioprocessados paralelamente à sua eliminação. Atualmente, os resíduos da extração do azeite de oliva possuem vários tipos de aplicações como: na produção de bioetanol, biohidrogênio, biodiesel, biometano, biopolímeros e enzimas; na agronomia para a produção de fungos comestíveis, como alimentos para animais e na compostagem; na recuperação de compostos de alto valor agregado como polissacarídeos e biofenóis; e ainda na indústria têxtil e cosmética. No entanto, a maioria destas aplicações não é eficaz e suas descrições na literatura científica são inexploradas. Este pode ser um nicho para o desenvolvimento de novas tecnologias e aplicações que apresentem melhor rentabilidade e eficiência (DERMECHE et al., 2013).

3.2.3 Biossurfactantes

Os surfactantes ou tensoativos são agentes de superfície com capacidade de serem adsorvidos na interface entre uma fase polar e outra apolar, por exemplo, água/óleo, reduzindo dessa forma a tensão interfacial. Estruturalmente, os surfactantes são moléculas anfifílicas constituídas de uma porção hidrofóbica, normalmente uma cadeia carbonada, e uma porção hidrofílica, que pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não aniônica ou anfotérica, conforme ilustrado na Figura 17 (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Figura 17: Estruturas moleculares do SDS (A), um surfactante químico aniônico, e do Triton X-100 (B), um surfactante químico não iônico

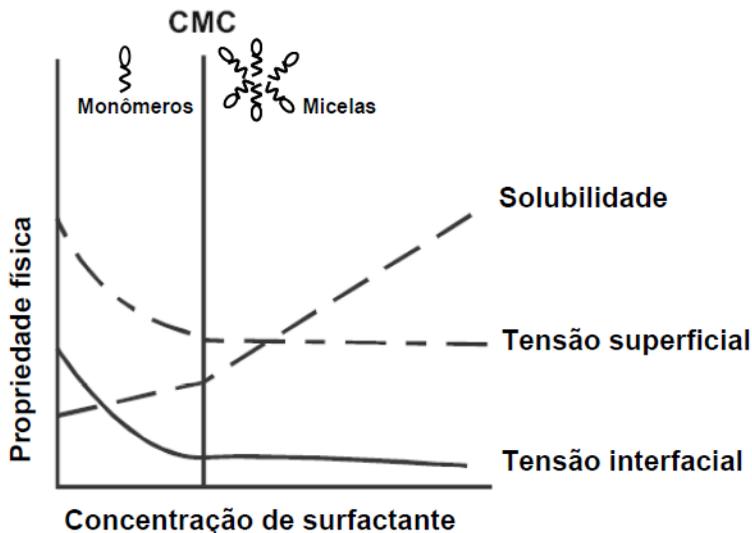


Fonte: Pacheco (2008).

A tensão superficial é definida como a medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície. Devido à presença de surfactantes, uma menor energia é requerida para trazer uma molécula até a superfície e a tensão superficial é reduzida. Portanto, a eficácia de um surfactante costuma ser determinada por sua capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial dos sistemas (PACHECO, 2008).

A concentração do surfactante se correlaciona com as tensões superficial e interfacial até o instante em que a concentração micelar crítica (CMC) é atingida (Figura 18). A CMC é definida como a concentração mínima de surfactante necessária para atingir valores mais baixos de tensão superficial e interfacial. Com a adição de surfactantes acima da CMC ocorre a associação das moléculas, resultando na formação de micelas, sem afetar a tensão superficial (PACHECO, 2008).

Figura 18: Tensão superficial, interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante



Fonte: Pacheco (2008).

Os surfactantes possuem inúmeras aplicações, envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, formação de espuma, umectabilidade, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE;

PASTORE, 2002). São empregados em diversos segmentos industriais, como cosmetologia, alimentícia, farmacêutica, entre outros. A produção mundial de surfactantes excede os três milhões de toneladas por ano, sendo a maior parte desta, destinada à produção de produtos de limpeza (sabões e detergentes) de uso industrial e doméstico (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Apesar da ampla utilização deste tipo de composto, a maioria dos tensoativos comerciais é sintetizada quimicamente a partir de fontes petroquímicas ou oleoquímicas, sendo que, alguns deles apresentam características recalcitrantes (DESAI; BANAT, 1997).

A busca crescente pela sustentabilidade industrial, motivada por novas legislações ambientais e pelo aumento da consciência ambiental por parte dos consumidores finais, tem levado ao desenvolvimento de compostos de alta eficiência, com elevada biodegradabilidade e, principalmente, provenientes de fontes renováveis. Nesse contexto, a industrialização globalizada tem redirecionado a atenção para tecnologias emergentes abrindo oportunidades para diversos estudos, particularmente na área de biotecnologia, onde a produção comercial de biocompostos é crescente (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Os biossurfactantes são compostos biológicos anfífilos produzidos extracelularmente ou como parte de membranas celulares de uma variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (RAHMAN; GAKPE, 2008).

Embora exista uma grande diversidade de composição química e propriedades entre os biossurfactantes, algumas características são comuns à maioria deles. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfactantes químicos convencionais (PACHECO, 2008):

- Atividade superficial e interfacial – Tensão superficial e interfacial inferiores são alcançadas com menores concentrações de biossurfactante, uma vez que os biossurfactantes são mais efetivos e eficientes que muitos surfactantes químicos (COOPER; PADDOCK, 1984);
- Baixa toxicidade – A baixa toxicidade dos biossurfactantes permite sua utilização em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Além disso, apresentam menos efeitos alérgicos do que os tensoativos artificiais (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998);
- Biodegradabilidade – Os biossurfactantes são facilmente degradáveis tanto na água quanto no solo, o que os torna

adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (PACHECO, 2008);

- Produção a partir de substratos renováveis – Estima-se que os custos com matéria-prima para produtos biotecnológicos estejam entre 10 e 30% do custo total. Assim, um dos fatores que diminuem os custos do processo produtivo é a utilização de matérias-primas de mais baixo custo. Os biossurfactantes podem ser produzidos a partir do uso de substratos renováveis como óleos vegetais, efluentes agroindustriais e subprodutos das indústrias petroquímica e alimentícia (DESAI; BANAT, 1997);
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica – Diversos biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e frente a diferentes valores de pH, o que lhes permite ser aplicados em condições ambientais variadas (BOGNOLO, 1999).

3.2.3.1 Classificação dos biossurfactantes

Inúmeros micro-organismos são capazes de produzir uma ampla diversidade de biossurfactantes, tanto de alto quanto de baixa massa molecular. Normalmente, os biossurfactantes de baixa massa molecular são glicolipídeos e lipopeptídeos, e são muito efetivos na redução das tensões superficial e interfacial. Já os de alto peso molecular são geralmente polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas, caracterizando-se como importantes formadores de emulsões (PACHECO, 2008). Grande parte destes compostos é aniônica ou neutra. Não obstante, alguns são catiônicos, como aqueles que apresentam um grupamento amino. A porção hidrofóbica da molécula é constituída de uma longa cadeia de ácidos graxos, enquanto a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool (BANAT, 1995; MULLIGAN, 2005). A presença de diferentes porções hidrofílicas faz com que os biossurfactantes sejam agrupados em diferentes classes, de acordo com sua composição (PACHECO, 2008):

- Ácidos graxos e lipídeos neutros – Ácido corinomicólico, ácidos lipoteicóicos (algumas vezes classificados como glicolipídeos), e proteínas hidrofóbicas (BOGNOLO, 1999);
- Fosfolipídeos – O exemplo mais importante seria o biossurfactante produzido por *Corynebacterium lepus*, uma vez que existem poucos exemplos de sua produção extracelular (PACHECO, 2008);

- Glicolipídeos – Tratam-se dos lipídios ligados a açúcares, como os trealoselipídeos, raminolipídeos, soforolipídeos (PACHECO, 2008);
- Lipopeptídeos – Usualmente são os produzidos pelo *Bacillus subtilis*, por exemplo, viscosina, surfactina e subtilisina (PACHECO, 2008);
- Lipopolissacarídeos – Moléculas de alta massa molecular e emulsificantes extracelulares solúveis produzidos por bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, como *Acinetobacter calcoaceticus* e algumas cepas de *Rhodococcus sp.* (PACHECO, 2008).

3.2.3.2 Produção de biossurfactantes

Inicialmente, o desenvolvimento da produção de biossurfactantes visava à obtenção de agentes antibióticos. Posteriormente, ao se observar que muitas das culturas haviam desenvolvido um comportamento tensoativo ao final do processo de crescimento, a produção de biossurfactantes passou a ser o foco de muitos trabalhos científicos (BOGNOLO, 1999; PACHECO, 2008). Diante disso, notou-se um crescente interesse por parte das indústrias químicas, principalmente pela possibilidade desses agentes tensoativos serem produzidos utilizando procedimentos e substratos relativamente simples e de baixo custo (KOSARIC, 1992; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Não obstante, a produção de biossurfactantes em grande escala é ainda escassa, especialmente pelos elevados custos das matérias-primas utilizadas e das etapas de extração e/ou purificação, fazendo com que, na maioria dos casos, o processo de produção seja inviável economicamente. Neste sentido, inúmeras pesquisas têm se centrado na minoração dos custos de produção empregando diversos tipos de resíduos.

Frequentemente, resíduos gordurosos, tais como ácidos graxos, óleo de fritura, resíduos da produção de azeite de oliva, subprodutos do refino de óleo, resíduos da indústria de leite, entre outros, têm sido aproveitados como substratos com produtividades interessantes e cuja utilização representa um importante ganho ambiental (AMARAL et al., 2008; HENKEL et al., 2012).

A busca por micro-organismos capazes de produzir biossurfactantes com propriedades diferenciadas e que atendam a demandas específicas tem sido crescente nas últimas décadas. Embora

as bactérias tenham sido os micro-organismos que demonstraram maior capacidade de produção de biossurfactantes, há referências que indicam a produção por leveduras e fungos (SHEPHERD et al., 1995). Na Tabela 18 encontram-se descritos alguns dos principais trabalhos a respeito da produção de biossurfactantes utilizando diferentes micro-organismos e substratos empregados.

Tabela 18: Trabalhos realizados sobre a produção de biossurfactantes utilizando diferentes micro-organismos

Micro-organismo	Referências
<i>Bacillus</i> sp.	Al-Bahry et al., 2013; Davis; Lynch; Varley, 1999; Faria et al., 2011; Ghojavand et al., 2008; Nitschke; Pastore, 2004; Nitschke; Pastore, 2006; Pereira et al., 2013; Verdaraman; Venkatesh, 2011
<i>Candida</i> sp.	Bednarski et al., 2004; Casas; Garcia-Ochoa, 1999; Deshpande; Daniels, 1995; Felse et al., 2007; Rufino et al., 2011; Shah;Jurjevic; Badia, 2007
<i>Pleurotus</i> sp.	Arun et al., 2008; Hearst et al., 2009; Nikiforova et al., 2009
<i>Pseudomonas</i> sp.	Abalos et al., 2001; Benincasa et al., 2002; Benincasa et al., 2004; Costa et al., 2010; Costa; Nitschke; Contiero, 2008; De Lima; Contiero, 2009; Haba et al., 2000; Haba et al., 2003;Nitschke et al., 2005; Raza et al., 2006; Raza et al., 2007; Thavasi et al., 2011; Wadekar et al., 2012
<i>Rhodococcus</i> sp.	Bicca; Fleck; Ayub, 1999; Ciapina et al., 2006; Gogotov; Kodakov; 2008; Pacheco et al., 2010; Peng et al.; 2007; White; Hird; Ali; 2013

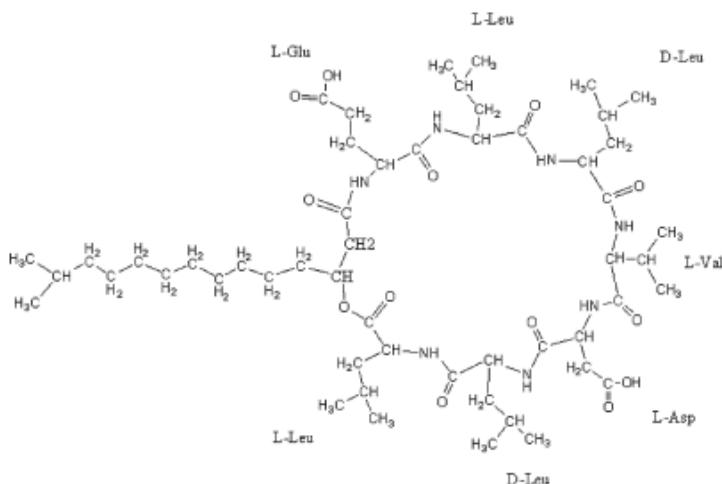
3.2.3.3 Surfactina

Somente a partir da década de 1980 a surfactina começou a se tornar uma alternativa atraente para substituir os surfactantes sintéticos, os quais podem ser mais danosos ao ambiente. Diferentes linhagens de *Bacillus subtilis* são capazes de produzir surfactina através de processos menos agressivos sob o ponto de vista ambiental (BARROS et al., 2007).

A surfactina é conhecida por apresentar uma atividade superficial excelente, reduzindo a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ em concentrações inferiores a 20 μM , além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 para valores menores que 1 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). Quando comparada a outros biossurfactantes e a alguns surfactantes sintéticos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de trimetil amônio (BTA), possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e exibe valores de CMC inferiores (BARROS et al., 2007).

Na Figura 19 tem-se a estrutura geral da surfactina, que é a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, sendo que esta cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros. O principal ácido graxo conjugado é o ácido 3-hidroxi-13-metil-tetradecanóico ligado por ligação lactona, tal como os demais (BARROS et al., 2007; KOWALL et al., 1998; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). No entanto, a surfactina natural é uma mistura de isoformas que se diferenciam ligeiramente em suas propriedades físico-químicas devido a variações no tamanho da cadeia, à ligação do seu componente hidróxi no ácido graxo e a substituições dos aminoácidos componentes do anel. Estas variações dependem da linhagem e das condições nutricionais e ambientais, mais do que de determinação genética (BARROS et al., 2007; KOWALL et al., 1998).

Figura 19: Estrutura da principal isoforma da surfactina



Fonte: Barros et al. (2007).

As aplicações da surfactina são bastante diversificadas, podendo atuar como antibiótico, agente antiviral e anticarcinogênico, imunomodulador ou inibidor de enzimas e toxinas. Essas funções caracterizam a surfactina como molécula biologicamente ativa. Apesar dos mecanismos de ação da surfactina não estarem plenamente elucidados, presume-se que essas características sejam uma consequência direta da interação membranal da mesma e a alteração das propriedades de bicamada. Mais especificamente, parece claro que essas propriedades da surfactina estão principalmente relacionadas à sua capacidade de alterar a integridade membranal, como consequência do estabelecimento de fortes interações com os constituintes fosfolipídicos da membrana celular (BARROS et al., 2007; HUSSAIN et al., 2004).

A surfactina também apresenta efeitos expressivos na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, remoção de óleo de areia contaminada, formação de emulsões estáveis em óleo, bem como na degradação do pesticida endossulfane na biorremediação de solos altamente contaminados por zinco e cádmio (BARROS et al., 2007).

3.2.4 Considerações sobre o estado da arte

Por meio de um levantamento bibliográfico dos trabalhos científicos mais relevantes sobre produção de biossurfactantes a partir de resíduos industriais, atentou-se para o potencial de aplicação desta técnica. Contudo, não se observou produções relativas ao uso do resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva como fonte de carbono. Assim, o presente estudo aborda a produção de biossurfactante pelo *Bacillus subtilis* DSM 3256 utilizando o resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva como substrato limitante, visando contribuir com o avanço dessa tecnologia para uma futura aplicação industrial e para dar um destino mais rentável e ecológico para um resíduo tão problemático.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item serão descritos os materiais e equipamentos empregados no desenvolvimento dos ensaios laboratoriais realizados, bem como os principais métodos utilizados.

De maneira geral, os procedimentos para a produção do biossurfactante pelo *Bacillus subtilis* DSM 3256 a partir do resíduo

sólido da extração bifásica do azeite de oliva envolveram as etapas de inoculação e fermentação em reatores descontínuos; extração, purificação, caracterização e aplicação do biossurfactante.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tensoativos, Enzimas e Emulsões do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Granada (UGR), Espanha.

3.3.1 Materiais

3.3.1.1 Micro-organismo e meio de manutenção

A bactéria *Bacillus subtilis* DSM 3256 foi adquirida a partir da Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células do Instituto Leibniz, Brunsvique, Alemanha. A cepa foi armazenada a -18 °C em um meio nutriente descrito na Tabela 19. Sempre que necessário, os estoques congelados de *B. subtilis* DSM 3256 foram repicados em placas de Petri contendo o meio Ágar Nutritivo (NA) e incubadas por 24 horas a 30 °C. Depois disso, as placas foram armazenadas a 4 °C durante um período máximo de 2 semanas.

Tabela 19: Composição do meio de manutenção do *Bacillus subtilis* DSM 3256

Componente	Concentração (g·L ⁻¹)
Cloreto de sódio	5,0
Extrato de carne	1,0
Extrato de levedura	2,0
Glicerol	20% (v/v)
Peptona bacteriológica	5,0

3.3.1.2 Resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva (RSEBAO) “alperujo”

O RSEBAO foi cedido pela Cooperativa *La Unión* (Montilla, Espanha). O teor de umidade foi determinado por secagem até massa seca constante em estufa a 105 °C.

Tal resíduo foi caracterizado por análise elementar (C, H e N) e por determinação do teor de óleo e de proteína.

3.3.1.3 Resíduos oleosos

Os óleos usados foram obtidos de uma cafeteria localizada na cidade de Granada, Espanha, que os utilizava no processo de fritura dos alimentos.

O óleo lubrificante de motor usado foi cedido por uma oficina mecânica localizada na cidade de Florianópolis, Santa Catarina.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Produção do biossurfactante

A pré-cultura do *B. subtilis* DSM 3256 foi preparada transferindo três alçadas da cultura estoque em placa de Petri para 50 mL do meio de manutenção (Tabela 19). A pré-cultura foi mantida em incubadora com agitação orbital durante 24 h a 30 °C e 160 rpm.

A produção de biossurfactante foi realizada a 30 °C, em erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de um meio nutritivo descrito na Tabela 20 (VERDARAMAN & VENKATESH, 2011). O pH do meio foi ajustado para 7,2 antes da esterilização a 121 °C durante 15 min. A pré-cultura, a qual foi previamente normalizada ajustando sua absorbância a 600 nm em 0,85, foi adicionada ao meio de cultura numa concentração de 5% (v/v). Em seguida, os frascos foram incubados em um agitador rotativo a 160 rpm durante 120 h. Testes de controle (padrão) foram realizados utilizando o meio nutritivo supracitado, mas sem a presença do RSEBAO.

Outros resíduos oleosos como chorume, óleo de peixe, óleo lubrificante de motor residual, mistura de óleos vegetais residuais, resíduo de indústria metal mecânica, óleo de soja virgem, mistura dos azeite de oliva e óleo de girassol (80:20 e 20:80 v/v) residuais, mistura dos azeite de oliva e óleo de soja (80:20 e 20:80 v/v) residuais, óleos de girassol e milho (80:20 e 20:80 v/v) residuais, também foram testados como possíveis fontes de carbono na formação de biossurfactante. Para esses ensaios foi utilizado o mesmo procedimento empregado nos experimentos com RSEBAO.

Tabela 20: Composição do meio de produção do biossurfactante por *Bacillus subtilis* DSM 3256

Composto	Concentração (g·L ⁻¹)
CaCl ₂	0,1
Extrato de levedura	5,0
Fonte de Carbono	50,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
NaCl	0,1
Peptona bacteriológica	0,7

3.3.2.2 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por gravimetria conforme descrito no item 2.3.2.2, utilizando-se uma curva de calibração previamente construída (Apêndice A). Vale ressaltar que na retirada das amostras do meio de cultura durante e ao final da fermentação, teve-se o cuidado de evitar a remoção de partículas sólidas do RSEBAO.

3.3.2.3 Recuperação e purificação do biossurfactante

A extração do biossurfactante foi realizada por centrifugação do conteúdo de cada frasco a 9000 *xg*, durante 20 min, a 4 °C para eliminar os sólidos (células e partículas sólidas do RSEBAO). O sobrenadante livre de células teve seu pH ajustado para 2,0 com HCl 4M e permaneceu de um dia para o outro sob refrigeração a 4 °C. O biossurfactante precipitado foi recuperado por centrifugação (9000 *xg*, durante 15 min, a 4 °C), lavado duas vezes com água acidificada (pH 2,0) e ressuspensão em uma pequena quantidade de água destilada. O pH desta solução foi ajustado para 7,0 com NaOH 1M.

O biossurfactante extraído foi parcialmente purificado por diálise contra água desmineralizada, durante 48 h, a 4°C em uma membrana de diálise Spectra/Por® (*Spectrum Laboratories Inc.*, Houston, EUA) com massa molar de corte entre 6000-8000 Da. Finalmente, o biossurfactante parcialmente purificado foi liofilizado, pesado e armazenado a -18 °C para posterior utilização.

3.3.2.4 *Tensão Superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)*

A tensão superficial (TS) tanto do sobrenadante isento de células quanto do biossurfactante parcialmente purificado foi medida a 25 °C pelo método de placa de Wilhelmy em um tensiômetro KRUSS K11 (KRÜSS GmbH, Hamburgo, Alemanha). Para determinar a TS do biossurfactante parcialmente purificado dissolveu-se o biossurfactante liofilizado em água deionizada e se ajustou o pH para 8,0.

A Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante parcialmente purificado foi calculada a partir do ponto de ruptura entre as curvas da tensão superficial *versus* a do log da concentração do biossurfactante.

3.3.2.5 *Tensão Interfacial e Ângulo de Contato*

A tensão interfacial (TI) entre a solução aquosa do biossurfactante parcialmente purificado e o óleo de motor (Repsol 50501 TDI) foi medida a 25 °C para três concentrações diferentes de biossurfactante: 12,5; 24,9 e 74,7 mg·L⁻¹ (MOYA-RAMÍREZ et al., 2014).

O ângulo de contato (AC) da solução do biossurfactante foi determinado em folhas Parafilm® a 25 °C com as mesmas concentrações do biossurfactante supracitadas. Um ensaio de controle foi realizado com água desmineralizada.

Ambas as medidas de tensão interfacial e ângulo de contato foram conduzidas em um tensiômetro de gota pendente (KSV CAM 200, KSV Instruments Ltd., Finlândia). Todas as medições foram realizadas em triplicata.

3.3.2.6 *Estabilidade do biossurfactante*

O efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade do biossurfactante parcialmente purificado foi estudada avaliando-se o efeito de ambas as variáveis sobre a capacidade do biossurfactante em reduzir a tensão superficial.

Para o efeito da temperatura, a solução de biossurfactante foi incubada a 45 e 65 °C e a pH neutro, onde a tensão superficial foi medida a cada 24 h durante 5 dias.

Para avaliar o efeito do pH, a tensão superficial foi medida logo após se ajustar o pH da solução de biossurfactante para o valor de pH

desejado (2 a 10), onde a tensão superficial foi medida a cada 24 h durante 5 dias.

3.3.2.7 Índice de emulsificação (E_{24})

O índice de emulsificação (E_{24}) do sobrenadante isento de células foi determinado conforme descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Resumidamente, 2 mL de n-dodecano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o mesmo volume de sobrenadante foram adicionados a um tubo de ensaio. Cada tubo de ensaio foi agitado em vórtex durante 2 min e mantido a 25 °C durante 24 h. O E_{24} foi calculado como a altura da camada emulsionada (mm) dividido pela altura total da coluna de líquido (mm) no final deste período. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.3.2.8 Determinação da concentração de compostos fenólicos

A concentração de compostos fenólicos foi determinada no caldo de cultura antes e após 5 dias de fermentação, e em uma solução de 10 g·L⁻¹ de biossurfactante parcialmente purificado utilizando o Teste Spectroquant® Fenol (Merck, Darmstadt, Alemanha), no qual o fenol e seus compostos orto e meta substituídos reagem na presença de um oxidante com 4-aminoantipirina resultando em uma solução avermelhada que tem sua intensidade determinada fotometricamente.

O procedimento do Teste Spectroquant® Fenol é análogo aos descritos em EPA 420.1, APHA 5530 e ISO 6439.

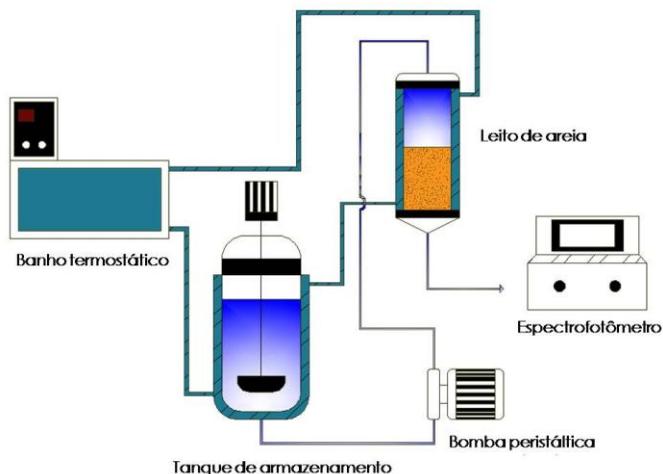
3.3.2.9 Teste de lavagem de solos

A fim de se avaliar a aplicação do biossurfactante produzido em descontaminação de solos foram realizados testes de lavagem. Uma mistura 5:1 (m/m) de areia de mar lavada (Panreac, Barcelona, Espanha) e de óleo de motor (Repsol 50501 TDI 5W40). A chamada "areia contaminada" foi deixada em repouso durante 24 h a 25 °C antes de se iniciar o ensaio de lavagem. Uma pequena quantidade (0,08% m/m) de um pigmento solúvel em gordura, Sudan III, foi adicionada à mistura visando uma melhor detecção e quantificação do óleo de motor (JURADO et al., 2007).

Os experimentos de lavagem de solo foram realizados em três etapas: 1) misturando-se muito bem a areia, o óleo de motor e o pigmento; 2) fazendo-se circular uma solução de biossurfactante através

de uma coluna preenchida com a areia contaminada, conforme apresentado na Figura 20; 3) analisando-se o óleo de motor remanescente no leito de areia ao final do ensaio, segundo descrito por Moya-Ramírez et al. (2014).

Figura 20: Esquema experimental da lavagem de solo contaminado com óleo de motor



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

Para determinar a concentração de óleo restante, amostras de 1 g da areia do leito da coluna foram secas em estufa a 65 °C durante 24 h e, posteriormente, extraiu-se o óleo de motor remanescente utilizando iso-octano como solvente. Cada amostra de óleo de motor removido foi analisada em espectrofotômetro modelo Cary Bio 100 UV/Vis (Agilent Technologies, Santa Clara-CA, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm. O valor da absorbância obtido foi comparado ao da curva de calibração previamente construída com concentrações conhecidas da mistura de óleo de motor e Sudan III (Apêndice B).

A eficiência de lavagem (EL, %) foi calculada como a relação entre a massa de óleo de motor remanescente no final do processo de lavagem e a presente inicialmente na “areia contaminada”, de acordo com a Equação (3).

$$EL(\%) = \frac{O_i - O_f}{O_i} \cdot 100 \quad (3)$$

Sendo O_i a massa (g) do óleo de motor presente inicialmente na “areia contaminada” e O_f a massa (g) de óleo de motor que permanece na areia após o processo de lavagem.

Os ensaios de lavagem de solo foram realizados de acordo com um planejamento fatorial completo tendo a temperatura (25, 45 e 65 °C) e a concentração biossurfactante (12,5; 24,9 e 74,7 mg·L⁻¹) como os fatores, e a eficiência de lavagem como a resposta. A concentração do biossurfactante foi normalizada em relação à sua CMC para permitir a comparação com outros agentes tensoativos.

Todas as análises estatísticas foram conduzidas com o pacote de software Modded 6.0 (Umetrics AB, Umea, Suécia).

3.3.2.10 Ensaio de toxicidade aguda

Dois testes de toxicidade aguda foram realizados com o biossurfactante parcialmente purificado: o ensaio de imobilização em 24 h com *Daphnia magna* e o teste LUMISTox® 300 com a bactéria *Vibrio fischeri*. Ambos os ensaios foram realizados de acordo com o método descrito por Jurado et al. (2012).

Resumidamente, os experimentos de toxicidade aguda com *D. magna* foram realizados em recipientes de poliestireno de 100 mL, contendo 50 mL de solução com concentrações do biossurfactante produzido variando entre 800 e 25 mg·L⁻¹. Como essa técnica se baseia na morte ou imobilização dos microcrustáceos *Daphnia magna* como consequência da exposição à substância tóxica por 24 h, vinte recém-nascidos (<24 h) foram transferidos para os recipientes e após 24 h a inibição da mobilidade de 50% da população *D. magna* (IC₅₀) foi determinada.

Nos ensaios com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* a emissão de luz é medida, em condições padronizadas, antes e depois da exposição da bactéria a várias concentrações da amostra, por um período de 15 a 30 min, sendo que a redução da emissão de luz entre a primeira e a segunda medição é proporcional à toxicidade da amostra testada. Por isso, uma cepa de *Vibrio fischeri*, previamente reativada, foi exposta a soluções de biossurfactante parcialmente purificado, com as concentrações variando entre 800 e 5 mg·L⁻¹, durante um determinado período de tempo. A intensidade luminosa da bactéria foi medida pelo sistema LUMISTox® 300 após 30 min de exposição. Com esses dados foi possível determinar a concentração de biossurfactante que inibe 50% (EC₅₀) da população de *Vibrio fischeri*.

3.3.2.11 Análises

3.3.2.11.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O biossurfactante parcialmente purificado foi caracterizado por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram gravados de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, com uma resolução de 2 cm^{-1} em um espectrômetro JASCO FTIR-6200 (JASCO Analytical Instruments, Tokyo, Japão), utilizando um detector de sulfato de triglicina (TGS). As amostras foram preparadas por dispersão do biossurfactante parcialmente purificado em uma matriz de brometo de potássio.

3.3.2.11.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) e espectroscopia de massa

A estrutura química do biossurfactante produzido pelo *B. subtilis* DSM 3256 foi determinada por espectrometria de massa, e comparada com a de surfactina padrão (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$). Além disso, as concentrações do biossurfactante durante seu processo de produção foram mensuradas em um cromatógrafo UPLC Waters Acquity H-Class (Waters Corporation, Milford-MA, EUA), equipado com uma coluna C-18 (Waters UPLC BEH) e acoplado a um espectrômetro de massa (Waters Xevo-TG-S). A fase móvel era constituída por uma mistura de 20:80 de água:acetonitrila, contendo ainda uma solução de 0,1% m/m de ácido fórmico. A vazão volumétrica da fase móvel e o volume de injeção de amostra foram de $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $3,0\text{ }\mu\text{L}$, respectivamente. A espectrometria de massa foi realizada no modo positivo (ES+), sob as seguintes condições: tensão do capilar de 3 kV, temperatura da fonte de íons de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura de dessolvatação de $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, e vazão do gás de dessolvatação de $800\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. As medições foram conduzidas com os massas molares previamente detectadas na análise de surfactina padrão.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados experimentais concernentes ao estudo da produção de biossurfactante pela bactéria *Bacillus subtilis* DSM 3256. A discussão se dará em torno da produção de biossurfactante utilizando diferentes fontes de carbono,

bem como da extração, purificação, caracterização e aplicação do biossurfactante produzido a partir do RSEBAO.

3.4.1 Caracterização do RSEBAO

O RSEBAO foi caracterizado por análise elementar de CHNS, conforme apresentado na Tabela 21. Ao se comparar os valores obtidos nesta tabela com os da Tabela 17, publicados por Dermeche et al. (2013), o teor de carbono (%) encontrado no presente trabalho foi bastante superior. No entanto, os teores de nitrogênio e proteínas (%) se encontram dentro da faixa descrita por Dermeche et al. (2013), e o teor de lipídeos (%) abaixo.

Tabela 21: Composição do RSEBAO

		Teor (%)
Umidade		62,37
Lipídeos		1,39
Proteínas		7,10
Análise elementar	Carbono	48,15
	Nitrogênio	1,18
	Hidrogênio	7,14

3.4.2 Efeito de diferentes fontes de carbono na tensão superficial

Como a presença de biossurfactante reduz a tensão superficial do meio em que os micro-organismos crescem, a produção do biossurfactante foi determinada pela medida da TS do meio de cultura isento de células (CARRILLO et al., 1996; JOSHI; BHARUCHA; DESAI et al., 2008). A diminuição da TS foi observada em todas as fontes de carbono utilizadas, mas as reduções mais expressivas ocorreram nos meios de cultura que empregavam RSEBAO e óleo de soja virgem (Tabela 22).

Tabela 22: Influência das fontes de carbono na TS do meio de cultura da bactéria *Bacillus subtilis* DSM 3256

Fonte de carbono	Tensão superficial (mN·m ⁻¹)
Padrão	59,6 ^a ± 0,2 ^b
Chorume	57,7 ± 0,7
Mistura dos azeite de oliva e óleo de soja residuais (80:20 v/v)	55,1 ± 0,2
Mistura dos azeite de oliva e óleo de soja residuais (80:20 v/v)	55,8 ± 0,2
Mistura dos azeite de oliva e óleo de girassol residuais (80:20 v/v)	37,5 ± 1,6
Mistura de óleos vegetais residuais	34,0 ± 0,6
Mistura dos óleos de girassol e milho residuais (80:20 v/v)	55,7 ± 0,5
Mistura dos óleos de milho e girassol residuais (80:20 v/v)	45,3 ± 0,7
Óleo de soja virgem	30,9 ± 1,3
Óleo lubrificante de motor residual	44,1 ± 1,8
Resíduo de indústria metal mecânica	57,1 ± 0,7
RSEBAO	29,7 ± 1,1

^a indica a TS do caldo sem qualquer fonte de carbono oleosa

^b representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes

A produção de biossurfactante utilizando óleo de soja virgem e residual tem sido amplamente estudada (DE LIMA; CONTIERO; 2009; NITSCHKE et al., 2005; XIA et al., 2012). Contudo, os melhores resultados foram obtidos com o óleo de soja virgem (DE LIMA et al., 2009; HENKEL et al., 2012). De acordo com De Lima et al. (2009) e Tyagi e Vasishta (1996) essa diferença na produção de biossurfactante poderia ser explicada pela ocorrência de modificações físico-químicas

nos resíduos de óleos comestíveis. Essas mudanças acontecem durante o processo de fritura, quando o óleo interage com componentes do alimento que está sendo frito, com o ar e com a água presente no alimento, provocando uma série de reações químicas que podem afetar tanto a qualidade nutricional do mesmo quanto desencadear a produção de substâncias potencialmente tóxicas.

Alguns autores mostraram que é possível produzir biossurfactante a partir de óleo lubrificante de motor residual e petróleo bruto (CHANDANKERE et al., 2014; THAVASI et al., 2011). Neste caso, o *B. subtilis* DSM 3256 não foi capaz de produzir biossurfactante, uma vez que a TS alcançada foi $44,1 \pm 1,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. A alta complexidade dos compostos hidrocarbônicos presentes no óleo lubrificante de motor residual e sua toxicidade podem causar a inibição da produção de biossurfactantes (DAVIS; VARLEY, 1999; CHANDANKERE et al., 2014; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Apesar da sua composição e toxicidade desconhecidas, a mistura de óleos vegetais residuais favoreceu a produção de biossurfactante pelo *B. subtilis* DSM 3256 (SHAH; JURJEVIC; BADIA, 2007; ZHENG et al., 2012), reduzindo a TS para $34,0 \pm 0,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

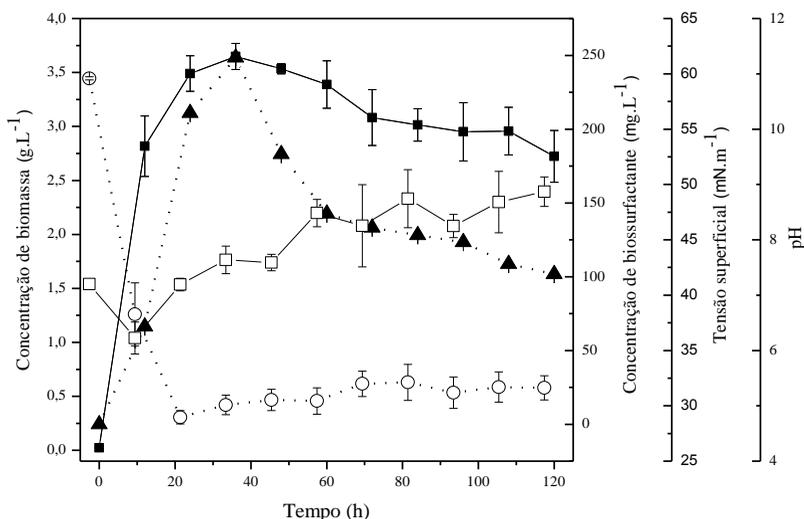
A TS de $37,5 \pm 1,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ obtida a partir da mistura dos óleos residuais de oliva: girassol (80:20 v/v) é semelhante aos $32,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ relatados por Haba et al. (2003). Esses autores também empregaram como fonte de carbono uma mistura de óleos de oliva e girassol residuais para a produção de biossurfactante pela *Pseudomonas aeruginosa*, embora a proporção da mistura fosse de 50:50 (v/v). Outros pesquisadores como Haba et al. (2000), Verdaraman e Venkatesh (2011), Wadekar et al. (2012) e Xia et al. (2012) também aplicaram o óleo de oliva residual ou o óleo de girassol residual como fontes de carbono, sendo que os melhores resultados obtidos foram daqueles que utilizaram o óleo de girassol residual. Tais resultados demonstram que uma maior quantidade de óleo de girassol residual culmina em uma produção de biossurfactante superior.

O RSEBAO foi a fonte de carbono que propiciou o menor valor de TS, $29,7 \pm 1,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Khan et al. (2011) definem que aproximadamente 37% do carbono presente no meio de cultura são incorporados ao biossurfactante, e que uma baixa produção está associada a uma deficiência na fonte de carbono e de açúcares no meio de cultivo. Por isso, atribui-se o bom resultado obtido com o RSEBAO ao fato de que o mesmo contém cerca de 25,4% de carbono total e 0,83-19,3% de açúcares totais (DERMECHE et al., 2013).

3.4.3 Produção do biossurfactante

A concentração do biossurfactante foi monitorada ao longo da fermentação medindo a massa do biossurfactante bruto em diferentes intervalos de tempo. Os resultados estão representados graficamente na Figura 21 concomitantemente aos do pH, da TS do sobrenadante isento de células e da concentração de biomassa.

Figura 21: Evolução da (■) concentração da biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), (○) tensão superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$), (□) pH e (▲) concentração do biossurfactante ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ao longo do tempo durante toda a fermentação do RSEBAO por *Bacillus subtilis* DSM 3256



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

As concentrações máximas de biomassa e de biossurfactante foram alcançados em 36 h de fermentação. Depois disso, a concentração de biossurfactante diminuiu, primeiro de forma abrupta, entre 36 e 48 h, e depois de forma mais gradual a partir deste momento. Estes resultados sugerem que a produção do biossurfactante está associada à fase exponencial de crescimento. Altmajer-Vaz et al. (2012) e Ghojvand et al. (2008) também observaram uma produção mais elevada nesta fase do crescimento microbiano. Além disso, a velocidade específica de produção, calculada a partir dos dados apresentados na Figura 21 ($0,068 \text{ g}_{\text{biossurfactante}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$) é semelhante à relatada por Verdaraman e

Venkatesh (2011) quando trabalharam com óleo de farelo de arroz residual.

A redução da concentração do biossurfactante de 36 h em diante pode ser atribuída à degradação deste pela própria bactéria. Este comportamento também foi observado por Pastore e Nitschke (2004). O consumo do biossurfactante pelo micro-organismo pode ocorrer para satisfazer às necessidades energéticas das células bacterianas, ou para suprir algum nutriente essencial que esgotou no meio de cultivo. Em qualquer caso, para evitar o consumo do biossurfactante pelas células, a fermentação deve ser interrompida em 36 h.

No que se refere ao pH, este variou ao longo do processo, de neutro (pH = 7,2 no início da fermentação) a alcalino (pH = 9,1 após 120 h). É geralmente aceito que a solubilidade dos lipopeptídeos do *Bacillus sp.* em meio aquoso é particularmente afetada pelo pH, sendo que a solubilidade máxima é atingida em um pH neutro (AL-BAHRY et al., 2013; NITSCHKE; PASTORE, 2006). Assim, parece razoável esperar que uma parte do biossurfactante se torne insolúvel conforme a fermentação progride, devido ao aumento do pH do meio de cultivo (ALTMAYER-VAZ et al., 2012). No entanto, este efeito não é capaz de descrever a diminuição da concentração do biossurfactante observada após 36 h de fermentação, uma vez que a solubilidade do biossurfactante é maior em pH alcalino do que em pH ácido.

A TS manteve-se praticamente constante a partir das 24 h de fermentação, apesar da diminuição abrupta na concentração do biossurfactante, o que indica claramente que a CMC já foi atingida neste momento. Com efeito, verificou-se por diluições sucessivas do sobrenadante isento de células que a concentração do biossurfactante foi de, aproximadamente, dez vezes a sua CMC em 36 h de fermentação (o resultado da determinação da CMC se encontra descrito no item 3.4.5). Vários autores como Batista et al. (2006), Boudour e Miller-Maier (1998) e Ghosavand et al. (2008) também alcançaram concentrações de biossurfactante entre cinco e vinte vezes a CMC no caldo de cultura. Os valores de TS encontrados neste trabalho são semelhantes aos reportados por Das e Mukherjee (2007), Nitschke e Pastore (2006) e Noah et al. (2002) que utilizaram *Bacillus sp.* para produzir lipopeptídeos a partir de matérias-primas de baixo custo. A redução da TS do meio de cultura causada pela produção do biossurfactante (49,5%) é também comparável a encontrada na literatura.

Também deve ser mencionado que a menor TS alcançada, $29,7 \pm 1,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ após 24 h de fermentação, indica claramente a produção de biossurfactante, uma vez que uma cultura é considerada promissora para

a produção de biossurfactante quando reduz a TS de um meio líquido a $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ou menos (COOPER et al., 1986). Além disso, em ensaios de controle realizados com o mesmo meio de cultivo, mas na ausência de RSEBAO, não foram detectadas evidências de produção de biossurfactante. Assim, os resultados demonstram que o *B. subtilis* DSM 3256 cultivado em meio utilizando o RSEBAO como a fonte de carbono principal é capaz de produzir biossurfactante. Até onde se tem conhecimento, esta é a primeira vez que o resíduo do processo de extração bifásica do azeite de oliva foi empregado na produção de biossurfactantes (MERCADÉ et al., 1993).

O RSEBAO é produzido em grandes quantidades na Espanha e em outros países do Mediterrâneo, a sua utilização para a produção de surfactantes naturais poderá incrementar a rentabilidade da indústria de alimentos nesses países, bem como diminuir o impacto ambiental gerado, pois o RSEBAO é rico em compostos fenólicos de difícil tratamento (DERMECHE et al., 2013; KHAYER MD et al., 2013).

3.4.4 Índice de emulsificação (E_{24})

A estabilização do óleo em uma emulsão de água é comumente utilizada como um indicador de atividade de superfície. A Tabela 23 mostra o índice de emulsificação (E_{24}) do sobrenadante livre de células ao longo do processo de fermentação. Estes resultados foram obtidos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ usando dodecano como fase oleosa. O valor máximo E_{24} verificado foi de $35 \pm 2\%$ após 36 h de fermentação, que corresponde à concentração máxima de biossurfactante. Este valor está de acordo com outros estudos realizados com lipopeptídeos. Por exemplo, Al-Wahaibi et al. (2014) que, ao estudarem a produção de biossurfactante pelo *B. subtilis* B30, obtiveram valores de E_{24} entre 20–55%, em temperatura ambiente, utilizando o sobrenadante isento de células e vários hidrocarbonetos como fase oleosa (tais como tridecano, tetradecano, pentadecano, hexadecano, entre outros). Altmajer-Vaz et al. (2012) também determinaram os valores de E_{24} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ usando soluções com diferentes concentrações de biossurfactante (100 a $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) produzido por *Bacillus sp.* e hexadecano como fase oleosa; os valores de E_{24} variaram de 36,6 a 59,4%.

Tabela 23: Índice de emulsificação (E_{24}) do sobrenadante isento de células em função do tempo de fermentação

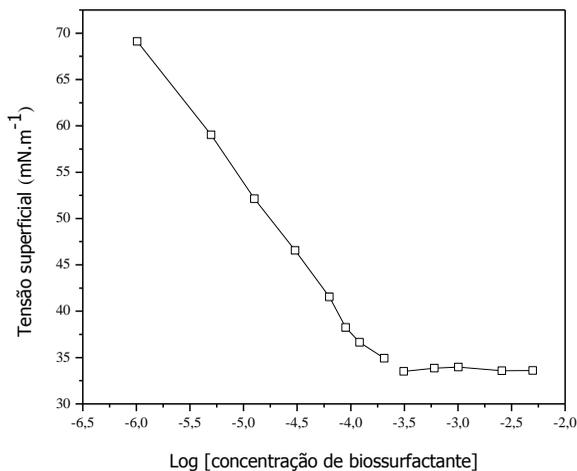
Tempo de fermentação (h)	E_{24} (%) ^a
12	0 ± 0
24	10 ± 3
36	35 ± 2
48	28 ± 5
60	31 ± 1
72	28 ± 5
84	25 ± 4
96	27 ± 6
108	25 ± 4
120	28 ± 6

^arepresentam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes

3.4.5 Concentração Micelar Crítica

A Concentração Micelar Crítica (CMC) é a concentração do tensoativo na qual a formação de micelas é iniciada. Assim sendo, a sua determinação dá informações importantes sobre a atividade de superfície de um determinado tensoativo. O gráfico formado pela TS vs. logaritmo da concentração do biossurfactante parcialmente purificado é apresentado na Figura 22. Pode se observar que a CMC do biossurfactante parcialmente purificado é de 24,9 mg·L⁻¹ (correspondente a um valor de *log* [concentração do biossurfactante produzido] de -3,69) a 25 °C, o que corresponde a uma TS de 33,75 mN·m⁻¹. O valor da CMC, bem como a TS correspondente obtidas neste trabalho são similares as encontradas na literatura (LIU et al., 2015; ZEIRAK; NITSCHKE, 2012), embora a pureza e a distribuição dos biossurfactantes homólogos podem diferir de um estudo para outro.

Figura 22: Tensão superficial vs. logaritmo da concentração do biossurfactante parcialmente purificado



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

3.4.6 Ângulo de Contato e Tensão Interfacial

Os resultados das medidas do Ângulo de Contato (AC) e Tensão Interfacial (TI) conduzidos em três concentrações diferentes do biossurfactante parcialmente purificado e aqueles de um ensaio de controle sem biossurfactante estão retratados na Tabela 24. Como se observa, a concentração de biossurfactante afeta significativamente o AC. A maior molhabilidade da superfície hidrofóbica (na qual o AC foi inferior a 90 °) foi alcançada na concentração de biossurfactante de 74,7 mg·L⁻¹, o que corresponde a três vezes a sua CMC. Os valores dos AC obtidos são semelhantes e até mesmo superiores aos relatados por Freitas de Oliveira (2014), que estudou o efeito da concentração da surfactina na molhabilidade em folhas de Parafilm®.

Tabela 24: Ângulo de Contato (AC) e Tensão Interfacial (TI) do biossurfactante parcialmente purificado a 25 °C

Concentração do biossurfactante (mg·L ⁻¹)	AC (°) ^a	TI (mN·m ⁻¹) ^a
0 (água desmineralizada)	104 ± 1	20 ± 0
12,5 (1/2 CMC)	105 ± 3	22 ± 1
24,9 (CMC)	99 ± 2	12 ± 0
74,7 (3 CMC)	77 ± 4	7 ± 0

^a representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes

De acordo com os dados apresentados na Tabela 24, analogamente ao observado no estudo do AC, a tensão interfacial foi reduzida com o aumento da concentração de biossurfactante. Os valores de TI obtidos são semelhantes aos relatados por Al-Wahaibi et al. (2014), Freitas de Oliveira (2014) e Deleu et al. (1999). Por exemplo, Deleu et al. (1999) encontraram valores de TI em torno de 5 mN·m⁻¹ com soluções de surfactina (100 mg·L⁻¹) e dodecano.

3.4.7 Avaliação da estabilidade do biossurfactante

Os dados referentes ao estudo da estabilidade do biossurfactante parcialmente purificado frente às temperaturas de 25, 45 e 65 °C se encontram descritos na Tabela 25. De acordo com os resultados, o biossurfactante parcialmente purificado foi submetido apenas a uma leve desestabilização térmica (refletido em um aumento da tensão superficial em aproximadamente 5 mN·m⁻¹) quando incubado a 45 ou 65 °C durante 5 dias. Resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores (AL-BAHRY et al., 2013; COOPER, 1986), que relataram uma estabilidade térmica muito boa dos lipopeptídeos, mesmo para temperaturas superiores a 100 °C.

Tabela 25: Estabilidade térmica do biossurfactante frente às temperaturas de 25, 45 e 65 °C ao longo do tempo

Tempo (h)	Temperatura (°C)		
	25	45	65
	Tensão superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) ^a		
0	35 ± 0	35 ± 0	35 ± 0
24	41 ± 1	37 ± 0	39 ± 2
48	47 ± 2	39 ± 2	40 ± 0
72	48 ± 2	39 ± 2	40 ± 1
120	48 ± 2	39 ± 2	42 ± 3

^a representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes

Pode-se verificar na Tabela 26, que a TS em função do pH atinge um valor mínimo para um pH neutro (7,0). Tal comportamento também foi reportado por Al-Bahry et al. (2013), os quais verificaram que o biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* B20 alcançava a máxima atividade em pH 7,0.

Tabela 26: Estabilidade do biossurfactante frente a diferentes valores de pH a 25 °C.

pH	Tensão superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) ^a
2	44 ± 1
4	44 ± 1
6	39 ± 1
7	35 ± 1
8	37 ± 0
10	46 ± 0

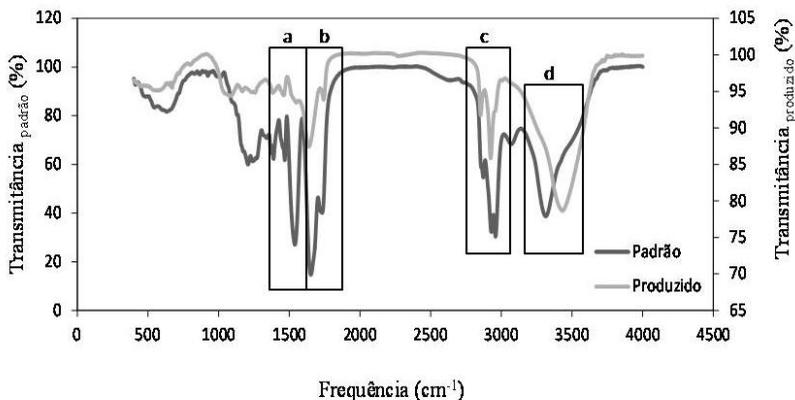
^a representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes

A TS aumentou tanto para pH alcalinos quanto para ácidos, esta última devido à precipitação do biossurfactante sob condições ácidas. Esses fenômenos vêm ao encontro do relatado por autores como Abdel-Mawgoud et al. (2008) e Al-Wahaibi et al. (2014).

3.4.8 Caracterização do biossurfactante produzido

O *B. subtilis* DSM 3256 é um produtor de surfactina amplamente conhecido (WILLENBACHER et al., 2014). No entanto, a fim de corroborar que o biossurfactante parcialmente purificado se trata de surfactina, o seu espectro de absorção no infravermelho foi comparado com a do padrão de surfactina, conforme ilustrado na Figura 23. A presença das bandas características de peptídeos em 3433 cm^{-1} (ligação NH – região d) e em 1638 cm^{-1} (ligação CO-N – região b), e as bandas das cadeias alifáticas (-CH₃, -CH₂-) em 2924 cm^{-1} (região c) e 1550 cm^{-1} (região a), indicam que o biossurfactante produzido pelo *B. subtilis* DSM 3256 é surfactina (JOSHI; BHARUCHA; DESAI, 2008).

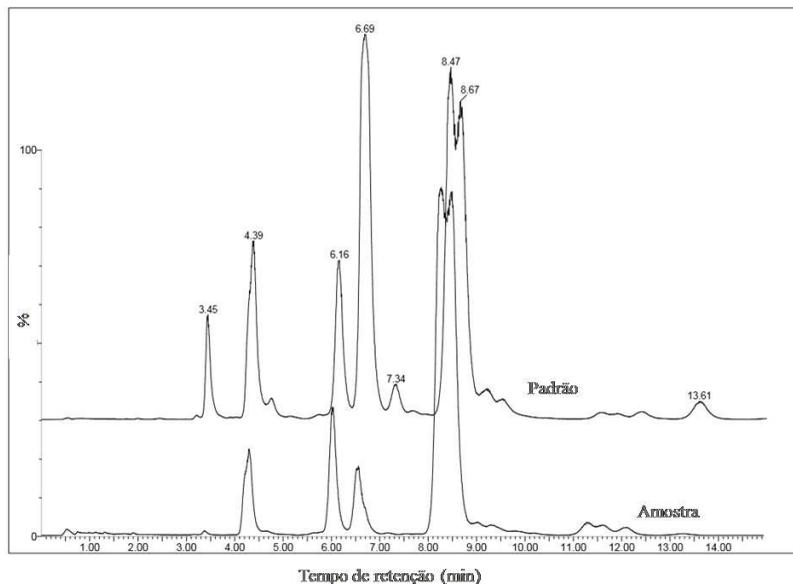
Figura 23: Espectro de FTIR do padrão de surfactina e do biossurfactante parcialmente purificado produzido pelo *Bacillus subtilis* DSM 3256



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

A identidade do biossurfactante produzido foi confirmada pelo cromatograma (Figura 24), sendo identificado como surfactina. A pureza do biossurfactante produzido foi calculada a partir de um padrão de surfactina pela cromatografia de massas e o valor encontrado foi de 3,1%.

Figura 24: Cromatograma do padrão de surfactina e do biossurfactante produzido



Fonte: Elaborada pela autora (2015).

3.4.9 Concentração de compostos fenólicos

O RSEBAO é considerado uma fonte rica em compostos fenólicos, os quais exibem atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva e anticarcinogênica (BOUCID et al., 2005; LESAGE-MEESSEN et al., 2002; ROIG; CAYUELA; SÁNCHEZ-MONEDERO, 2006). Segundo Demerche et al. (2013), os compostos fenólicos presentes em maior abundância no RSEBAO são o tirosol e hidroxitirosol, juntamente com os ácidos p-cumárico e vanílico. Uma vez que se utilizou o RSEBAO como fonte de carbono para a produção de biossurfactante, a concentração de compostos fenólicos foi determinada tanto no caldo de cultura (no início da fermentação e após 120 h) quanto no biossurfactante parcialmente purificado, conforme apresentado na Tabela 27.

Uma pequena redução na concentração dos compostos fenólicos após a fermentação (cerca de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foi constatada, isso demonstra que o *B. subtilis* DSM 3256 não é capaz de metabolizar tais compostos,

como é o caso de outras bactérias ou fungos (DAÂSSI et al., 2014; GONÇALVES et al., 2009; NTOUGIAS et al., 2012; ÖNGEN; GÜNGÖR; KANBEROGLU, 2007). Isto não é surpreendente, já que a toxicidade e a atividade antibacteriana de certos compostos fenólicos dificultam a aplicação de processos biológicos tradicionais no tratamento dos efluentes provenientes da extração do azeite de oliva (CARLOS-RUIZ et al., 2002).

Tabela 27: Concentração dos compostos fenólicos no caldo de cultura e no biossurfactante produzido

Amostras	Concentração dos compostos fenólicos (mg·L ⁻¹) ^a
Meio de cultivo ^b	38,3 ± 0,6
Meio de cultivo após fermentação ^c	33,8 ± 0,8
Biossurfactante parcialmente purificado (solução de 10 g·L ⁻¹)	90,2 ± 0,8

^a representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes

^b indica o caldo livre de células no início da fermentação (tempo 0 h)

^c denota o caldo isento de células após cinco dias de fermentação (tempo 120 h)

A concentração de compostos fenólicos na solução de 10 g·L⁻¹ do biossurfactante parcialmente purificado foi de 90,2 ± 0,8 mg·L⁻¹ (Tabela 27), indicando que uma parte deles foram removidos juntamente com o biossurfactante do meio de cultura na etapa de purificação/extração. A presença de tensoativos pode facilitar a remoção dos compostos fenólicos dos efluentes provenientes da extração do azeite de oliva, conforme observado por Gortzi et al. (2008) e Katsoyannos et al. (2005). Na verdade, o processo de extração de compostos fenólicos à base de surfactante (YAZDI, 2011) é semelhante ao utilizado neste trabalho para a recuperação biossurfactante.

A presença de compostos fenólicos no biossurfactante parcialmente purificado pode ser vantajosa para certas aplicações, em particular no setor farmacêutico, uma vez que o mesmo pode se beneficiar da combinação de ambos os compostos no mesmo produto.

3.4.10 Toxicidade aguda

Novas legislações ambientais têm sido desenvolvidas em relação ao manuseio e descarte de efluentes e resíduos inerentes à produção de azeite de oliva. Compostos de alto peso molecular presentes nesses resíduos são responsáveis tanto por sua coloração marrom como por suas características recalcitrantes. Efeitos fitotóxicos, bem como a atividade antibacteriana têm sido associados aos compostos fenólicos monocíclicos e taninos (DAÁSSI et al., 2014; D'ANNIBALE et al., 1998; ÖNGEN; GÜNGÖR; KANBEROGLU, 2007). Como o biossurfactante foi produzido a partir do RSEBAO, a toxicidade aguda do mesmo foi determinada em dois níveis, utilizando para isso uma espécie de microcrustáceo (*Daphnia magna*) e de bactéria (*Vibrio fischeri*). Os resultados destes ensaios de toxicidade aguda são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28: Toxicidade aguda do biossurfactante produzido para os ensaios com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*

	<i>Daphnia magna</i> IC ₅₀	<i>Vibrio fischeri</i> EC ₅₀
	(mg·L ⁻¹)	(mg·L ⁻¹)
Biossurfactante produzido	391,7 ± 2 ^a	87,3 ± 2

^a representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes

Através dos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna* foi possível determinar que a concentração do biossurfactante produzido que provoca a imobilização de 50% dos microcrustáceos (IC₅₀) é de 391,7 ± 2 mg·L⁻¹ (Tabela 28). Segundo Tonkes, De Graaf e Graansma (1999), este biossurfactante é classificado como não-tóxico, uma vez que o valor de IC₅₀ encontrado é superior a 100 mg·L⁻¹.

Os testes com as bactérias luminescentes *Vibrio fischeri* mostrou que a toxicidade aguda (EC₅₀) foi de 87,3 ± 2 mg·L⁻¹. Esta concentração classificou o biossurfactante produzido como ligeiramente tóxico, uma vez que o valor obtido se encontra na faixa de 10-100 mg·L⁻¹ (TONKES; DE GRAAF; GRAANSMA, 1999).

A variabilidade na sensibilidade entre as diferentes espécies de micro-organismos foi observada por outros autores como Jurado et al. (2012), Steber et al. (1995), Uppgard, Sjöström e Wold (2000), nos quais a bactéria *Vibrio fischeri* também se mostrou mais sensível aos surfactantes testados do que o microcrustáceo *Daphnia magna*.

3.4.11 Lavagem de solos

O potencial do biossurfactante produzido para emprego na remediação de solos foi investigada por um planejamento fatorial completo, com a temperatura e a concentração de biossurfactante (normalizada em relação à sua CMC) como fatores e a eficiência de lavagem como a resposta. A matriz experimental é apresentada na Tabela 29 juntamente com as eficiências de lavagem observadas. Estes resultados foram ajustados a um modelo matemático que inclui o efeito dos fatores individuais, bem como os termos de interação no processo.

Tabela 29: Eficiência de lavagem (EL) obtida em testes realizados a 30°C com o biossurfactante parcialmente purificado

Concentração normalizada do biossurfactante ^a	Temperatura (°C)	EL-observado (%)	EL-predito (%)
0,5	25	63,0	63,2
1,0	25	64,1	63,6
3,0	25	64,4	64,8
0,5	45	70,1	70,0
1,0	45	69,1	70,3
3,0	45	71,5	71,6
0,5	65	76,1	76,8
1,0	65	76,9	77,1
3,0	65	79,1	78,4
1,0	45	71,1	70,3
1,0	45	69,1	70,3
1,0	45	71,5	70,3

^aCMC do biossurfactante produzido é 24,9 mg·L⁻¹.

De acordo com a análise de variância dos resultados e com o teste da falta de ajuste (*lack-of-fit*), o modelo linear é adequado para representar os dados experimentais e para fazer previsões dentro da região experimental. Tanto a temperatura quanto a concentração do biossurfactante exercem um efeito significativo na eficiência da lavagem, no entanto, o termo de interação não se mostrou significativo ($p > 0,05$). Por isso, o termo interativo foi excluído e o modelo foi refeito. O modelo final é retratado pela Equação 4, onde n representa a relação entre a concentração do biossurfactante e a sua CMC e T representa a temperatura ($^{\circ}\text{C}$). As eficiências de lavagem previstas pela Equação 4 também se encontram descritos na Tabela 29.

$$EL(\%) = 54,465 + 0,6290 \cdot n + 0,3387 \cdot T (R^2 = 0,974) \quad (4)$$

A eficiência de lavagem máxima (cerca de 80%) foi obtida para as concentrações mais elevadas de biossurfactante e temperatura testadas. O efeito positivo da temperatura sobre a remoção de óleo pode ser explicado tanto pela redução da viscosidade deste, quanto pela diminuição da tensão interfacial (AL-BAHRY et al., 2013).

As eficiências de lavagem alcançadas são comparáveis às relatadas em estudos realizados em batelada com surfactantes lipopeptídicos em solos contaminados com óleo bruto (LAI et al., 2009; LIU et al., 2015; SINGH; CAMEOTRA, 2013). Por exemplo, Liu et al. (2015) reportaram eficiências de lavagem de solo contaminado com óleo entre $69 \pm 3,9\%$ e $88,5 \pm 1,59\%$ ao avaliar o desempenho da surfactina ($30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), produzida pelo *Bacillus subtilis* BS-37. Um aumento contínuo da eficiência de lavagem utilizando concentrações de surfactina superiores a sua CMC também foi constatado por Singh e Cameotra (2013) e Lai et al. (2009).

Provavelmente, as concentrações de biossurfactante testadas não foram altas o suficiente para permitir que uma quantidade expressiva de óleo fosse solubilizada no interior das micelas. Além disso, o tempo de contato entre a solução do agente tensoativo e a areia contaminada é muito curto (cerca de 3 s), e a solução de lavagem flui em condições laminares ao longo do leito da coluna. Por isso, é improvável que o processo de lavagem sob as condições experimentais utilizadas possibilitasse resultados de solubilização maiores.

Finalmente, vale destacar que, como não houve formação de emulsão ao longo do processo de lavagem, a separação do óleo a partir das soluções aquosas foi facilitada, o que simplifica as operações a jusante e reduz os seus custos (VREYSEN; MAES, 2005).

3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

A bactéria *Bacillus subtilis* DSM 3256 foi capaz de produzir compostos tensoativos, mais precisamente surfactina, utilizando o resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva (RSEBAO) como fonte de carbono. O biossurfactante produzido a partir do RSEBAO foi capaz de reduzir a tensão superficial consideravelmente, mantendo-se estável em diferentes valores de pH e temperaturas. A maior concentração de biossurfactante ($248,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foi alcançada em 36 h de fermentação.

Testes preliminares demonstraram que o biossurfactante produzido pode ser aplicado na remediação de solos arenosos contaminados com óleo do motor.

Verificou-se que uma parte dos compostos fenólicos presentes no RSEBAO foi extraído juntamente com o biossurfactante do meio de cultura. A combinação de compostos fenólicos e biossurfactante no mesmo produto pode ser vantajosa para certas aplicações, em particular no setor farmacêutico.

Os ensaios de toxicidade aguda com o biossurfactante produzido revelaram que este é classificado como não-tóxico para o microcrustáceo *Daphnia magna*, e como ligeiramente tóxico para a bactéria *Vibrio fischeri*.

4 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

4.1 DESSULFURIZAÇÃO E DESNITROGENAÇÃO DO GASÓLEO PESADO EM SISTEMA BIFÁSICO PELO *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 EM REATOR DESCONTÍNUO

A cepa *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 não apresentou inibição do crescimento em nenhuma das concentrações de GOP testadas.

A maior massa de enxofre removida ($2664 \pm 95 \mu\text{g}$), velocidade específica de dessulfurização ($148 \text{ mg de enxofre} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), e percentual de remoção (42,7%) foram alcançadas no processo de BDS contendo 40% (v/v) de GOP.

O melhor resultado para o processo de BDN foi obtido para o sistema utilizando 40% (v/v) de GOP. Sendo que a massa de nitrogênio removida foi de $1624 \pm 19 \mu\text{g}$ e o percentual de redução foi de 43,2%.

A análise estatística realizada a partir do planejamento fatorial fracionado $2^{(7-2)}$ demonstrou que a concentração do extrato de levedura, quando utilizada em seu nível superior ($4,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), apresenta efeito positivo na remoção do enxofre presente no GOP.

Os resultados supracitados representam um grande avanço no desenvolvimento dos processos de BDN e BDS, uma vez que 42,7% do enxofre e 43,2% do nitrogênio foram removidos de uma fração real do petróleo (GOP) sem a necessidade da adição de surfactantes sintéticos ou qualquer outro tipo de reagente. Além disso, foi possível avaliar a influência de importantes parâmetros nutritivos e de processo. Assim sendo, o presente trabalho contribuiu para tornar os métodos de BDN e BDS mais viáveis sob os aspectos econômico, ambiental e industrial.

A tensão superficial do meio de cultivo do *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 foi minorada para alguns experimentos do planejamento fatorial fracionado $2^{(7-2)}$. A concentração de extrato de levedura e as interações entre concentração de glicose/concentração de GOP e agitação/temperatura foram os que apresentaram os efeitos mais expressivos sobre a tensão superficial. A concentração de extrato de levedura deve ser aplicada em seu nível inferior ($4,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Já as concentrações de glicose e GOP devem ser empregadas uma em seu nível superior e a outra no inferior (30% (v/v) de GOP e $6,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose, ou 10% (v/v) de GOP e $12,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose). E, finalmente, a interação entre agitação/temperatura mostrou-se mais efetiva quando utilizada em seu nível superior (180 rpm e $36 \text{ }^\circ\text{C}$).

Embora a tensão superficial do meio de cultivo do *R. erythropolis* ATCC 4277 tenha diminuído para alguns experimentos do planejamento

fatorial fracionado $2^{(7-2)}$, os resultados não se mostraram promissores com relação à formação de biossurfactante utilizando o GOP como substrato limitante. Isso pode ser atribuído à dificuldade apresentada pelo *R. erythropolis* em produzir biossurfactantes, em especial, na presença de fontes de carbono imiscíveis. Assim, o emprego de um micro-organismo com uma capacidade superior de produzir biossurfactantes, ou a utilização de uma fonte de carbono em que os nutrientes estejam mais disponíveis ao metabolismo celular, se faz necessário.

4.1.1 Sugestões para trabalhos futuros

- Otimizar a remoção de enxofre e nitrogênio do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 por meio de ferramentas estatísticas;
- Determinar os parâmetros cinéticos que regem esses fenômenos;
- Realizar experimentos com o micro-organismo imobilizado ou em reator contínuo;
- Otimizar a produção de biossurfactantes utilizando o GOP como fonte de carbono limitante;
- Encontrar as condições nutricionais e de processo em que os processos de remoção de poluentes e de produção de biossurfactantes sejam concomitantes e máximos;
- Estudar a capacidade de dessulfurização e desnitração de outras frações do petróleo e outros combustíveis por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277.

4.2 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PELO *Bacillus subtilis* DSM 3256 A PARTIR DO RESÍDUO SÓLIDO DA EXTRAÇÃO BIFÁSICA DO AZEITE DE OLIVA

A bactéria *Bacillus subtilis* DSM 3256 foi capaz de produzir compostos tensoativos, mais precisamente surfactina, utilizando o resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva (RSEBAO) como fonte de carbono. O biossurfactante produzido a partir do RSEBAO foi capaz de reduzir a tensão superficial consideravelmente, mantendo-se estável em diferentes valores de pH e temperaturas. A maior

concentração de biossurfactante ($248,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foi alcançada em 36 h de fermentação.

Testes preliminares demonstraram que o biossurfactante produzido pode ser aplicado na remediação de solos arenosos contaminados com óleo do motor.

Verificou-se que uma parte dos compostos fenólicos presentes no RSEBAO foi extraído juntamente com o biossurfactante do meio de cultura. A combinação de compostos fenólicos e biossurfactante no mesmo produto pode ser vantajosa para certas aplicações, em particular no setor farmacêutico.

Os ensaios de toxicidade aguda com o biossurfactante produzido revelaram que este é classificado como não-tóxico para o microcrustáceo *Daphnia magna*, e como ligeiramente tóxico para a bactéria *Vibrio fischeri*.

A produção de um composto de alto valor agregado como a surfactina a partir de um resíduo tão abundante e poluente quanto o RSEBAO representa um ganho não só econômico quanto ambiental, uma vez que foi possível atender a duas necessidades tecnológicas concomitantemente: a primeira de reduzir os dispêndios da produção de biossurfactantes empregando matérias-primas de baixo custo, e a segunda, dar um destino rentável e sustentável aos resíduos da extração do azeite de oliva.

4.2.1 Sugestões para trabalhos futuros

- Otimizar a produção da surfactina pelo *Bacillus subtilis* DSM 3256;
- Avaliar os parâmetros cinéticos que envolvem esse fenômeno;
- Determinar a toxicidade aguda do biossurfactante produzido para outras espécies de organismos;
- Estudar a aplicação dos compostos fenólicos presentes no RSEBAO para outros fins como cosméticos, farmacêuticos e alimentícios;
- Estudar a reutilização do efluente do processo de produção do biossurfactante;
- Determinar a concentração do biossurfactante produzido que leve a uma maior remediação de solos contaminados com materiais oleosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWafa, M. M.; HASSOUNA, N. A. H. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 150, p. 289–303, 2008.

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

ALAMINI, B. A. U. S.; NUNES, V.; BARBADO, N. Promovendo atitudes responsáveis na coleta e destinação do óleo de fritura usado. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE SUSTENTABILIDADE, 2, 2009, Foz do Iguaçu. **Anais do Congresso Internacional de Sustentabilidade**. Foz do Iguaçu: União Dinâmica de Faculdades Cataratas, 2009, p. 12.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHMARI, H. S.; AL-SULAIMANI, H. S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141–146, 2013.

ALBUQUERQUE, J. A.; GONZALES, J.; GARCÍA, D.; CEGARRA, J. Agrochemical characterization of alpeorujo, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 195–200, 2004.

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

ALVES, M. V. **Estabilidade e filtrabilidade de óleo diesel**. 2008. 211f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

ALTMAJER-VAZ, D.; GUDIÑA, E. J.; ALAMEDA, E. J.; TEIXEIRA, J. Á.; RODRIGUES, L. R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces**, v. 89, p. 167–174, 2012.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ABDULKADIR-ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B Biointerfaces**, v. 114, p. 324–333, 2014.

AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. **Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application**. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Ramkrishna: Sen. Landes Bioscience, 2008. v. 672, p. 236-249.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.

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.

ARUN, A.; RAJA, P. P.; ARTHI, R.; ANANTHI, M.; KUMAR, K. S.; EYINI, S. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Biodegradation by *Basidiomycetes* fungi, *Pseudomonas* isolate, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 132 – 142, 2008.

ÁVILA, B. M. F.; PEREIRA, R.; GOMES, A. O.; AZEVEDO, D. A. Chemical characterization of aromatic compounds in extra heavy gas oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p.3208-3216, 2011.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresources Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BARCZA, M. V. **Petróleo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena 2012. v.1, p.13.

BARROS, F. F. C.; DE QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, p. 409 – 414, 2007.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TÓTILA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 868–875, 2006.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PLASZVZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 15–18, 2004.

BENEDIK, M. J.; GIBBS, P. R.; RIDDLE, R. R.; WILSON, R. C. Microbial denitrogenation of fossil fuels. **Tibtech**, v. 161, p. 390-396, 1998.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soap stock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283–288, 2002.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soap stock. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1–8, 2004.

BENITEZ, J.; BELTRAN-HEREDIA, J.; TORREGROSA, J.; ACERO J. L.; CERCAS, V. Aerobic degradation of olive mill wastewaters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 185 – 188, 1997.

BESEN, A. G.; STRASSBURG, R. C. Coleta e reciclagem do óleo de cozinha residual proveniente de frituras para a produção de biodiesel. In:

CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA E SUSTENTABILIDADE AMBIENTAL, 2011, Foz do Iguaçu. **Anais do Congresso Latino Americano de Suinocultura e Sustentabilidade Ambiental**. Foz do Iguaçu, 2011, p. 27.

BHATIA, S.; SHARMA, D.K. Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain *Pantoea agglomerans* D23W3. **Biochemical Engineering Journal**, v.50, p.104–109, 2010.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de microbiologia**, v.30, p.231-236, 1999.

BILCK, A. P. et al. Aproveitamento de subprodutos: restaurantes de Londrina. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 87-104, 2009.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BOLTES, K.; CARO, A.; LETON, P., RODRIGUEZ, A., GARCIA-CALVO, E. Gas–liquid mass transfer in oil–water emulsions with an airlift bioreactor. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, p. 2408–2412, 2008.

BONIEK, D.; FIGUEIREDO, D.; SANTOS, A. F. B.; STOIANOFF, M. A. R. Biodesulfurization: a mini review about the immediate search for the future technology. **Clean Technology and Environmental Policy**, v. 17, p. 29 – 37, 2015.

BOSHAGH, F.; MOKHTARANI, B.; MORTAHEB, H. R. Effect of electrokinetics on biodesulfurization of the model oil by *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 and *Bacillus subtilis* DSMZ 3256. **Journal of Hazardous Materials**, v. 280, p. 780 – 787, 2014.

BOUCHEZ-NAÏTALI, M.; ABBAD-ANDALOUSSI, S.; WARZYODA, M., MONOT, F. Relation between bacterial strain resistance to solvents and biodesulfurization activity in organic medium. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65,p. 440–445, 2004.

BOUCID, O.; NAVARRO, D.; ROCHE, M.; ASTHER, M.; HAON, M.; DELATTRE, M.; LORQUIN, J.; LABAT, M.; ASTHE, M.; LESAGE-MEESSEN, L. Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1855–1862, 2005.

BOUDOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 283–280, 1998.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317 – 333, 1998.

CALZADA, J.; HERAS, S.; ALCON, A., SANTOS, V. E., GARCIA-OCHOA, F. Biodesulfurization of dibenzothiophene (DBT) using *Pseudomonas putida* CECT 5279: a biocatalyst formulation comparison. **Energy Fuels**, v.23, p. 5491–5495, 2009.

CARLOS-RUIZ, J.; RUBAI, T.; PEREZ, J.; MARTINEZ-LOPEZ, J. Effect of olive mill wastewater on extracellular ligninolytic enzyme produced by *Phanerochaete flavido-alba*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 41–45, 2002.

CARO, A.; BOLTES, K.; LÉTON, P., GARCÍA-CALVO, E. Description of by-product inhibition effects on biodesulfurization of dibenzothiophene in biphasic media. **Biodegradation**, v.19, p.599–611, 2008.

CARRILLO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.I.; GIULIETT, A.M. Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 62-64, 1996.

CASAS, J. A.; GARCÍA-OCHOA, F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 488 – 494, 1999.

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.

CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CAI, M.; MASAKORALA, K.; JAIN, A. K.; CHOI, M. M. F. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTB. **Fuel**, v. 122,p. 140–148, 2014.

- CHANG, J. H.; CHANG, Y. K.; RYU, H. W.; CHANG, H. N. Desulfurization of light gas oil in immobilized-cell systems of *Gordona sp.* CYKS1 and *Nocardia sp.* CYKS2. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p. 309-312, 2000.
- CIAPINA, E. M. P.; MELO, W. C.; SANTA ANNA, L. M. M.; SANTOS, A. S.; FREIRE, D. M. G.; JUNIOR, N. P. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.129, p. 880-886, 2006.
- COOPER, D. G. Biosurfactants. **Microbiological Science**, v.3, p. 145–149, 1986.
- COOPER, D. G., GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.
- COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, p. 173-176, 1984.
- COSTA, S. G. V. A. O.; DE SOUZA, S. R.; NITSCHKE, M.; FRANCHETTI, S. M. M.; JAFELICCI JR, M.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J. Wettability of aqueous rhamnolipids solutions produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 12, p. 125 – 130, 2009.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28,p. 34-38, 2008.
- COSTA NETO, P. R. et al. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através datransesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.
- DAÂSSI, D.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; BORRÁS-LINARES, I.; BELBAHRI, L.; WOODWARD, S.; ZOUARI-MECHICHI, H.; MECHICHI, T.; NASRI, M.; SEGURA-CARRETERO, A. Olive oil mill wastewaters: phenolic content characterization during degradation by *Coriolopsis gallica*. **Chemosphere**, v. 113, p. 62–70, 2014.

- 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.
- D'ANNIBALE, A.; CRESTINI, C.; VINCIGUERRA, V.; SERMANNI, G. G. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. **Journal of Biotechnology**, v. 61, p. 209-218, 1998.
- DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1191-1199, 2007.
- DAVIS, D. A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 322 - 329, 1999.
- DAVOODI-DEHAGHANI, F.; VOSOUGHI, M.; ZIAEE, A. A. Biotransformation of dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. **Bioresource Technology**, v. 101, p.1102-1105, 2010.
- DEBABOV, V. G. Microbial desulfurization of motor fuel. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 733-738, 2010.
- DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. Solvent toxicity in organic-aqueous systems analysed by multivariate analysis. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 26, p. 361-375, 2004.
- DE CARVALHO, C. C. C. R.; DA FONSECA, M. M. R. The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 715-726, 2005(a).
- DE 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 Biotechnology**, v. 67, p. 383-388, 2005(b).

DE 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 Biotechnology**, v. 69, p. 268-275, 2005(c).

DE 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 Biotechnology**, v. 83, p. 311-320, 2009.

DELEU, M.; RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEAU, Y.; JACQUES, P.; THONART, P.; PAQUOT, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids Surfaces A Physicochemical**, v. 152, p. 3–10, 1999.

DE LIMA, C. J. B.; CONTIERO, J. Use of soybean oil fry waste for economical biosurfactant production by isolated *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 3, p. 162 – 171; 2009.

DE LIMA, C. J. B.; RIBEIRO, E. J.; SÉRVULO, E. F. C.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 156–168, 2009.

DEMERCHE, S.; NADOUR, M. M.; LARROCHE, C.; MOULTI-MATI, F.; MICHAUD, P. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1532–1552, 2013.

DENOME, S. A.; OLDFIELD, C., NASH, L. J., YOUNG, K. D. Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus sp.* strain IGTS8. **Journal Bacteriological**, p. 6706 – 6716, 1994.

DENOME, S. A.; OLSON, E. S., YOUNG, K. D. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus sp.* strain IGTS8. **Environmental Microbiology**, p. 2837 – 2843, 1993.

DERIKVAND, P.; ETEMADIFAR, Z.; BIRIA, D. Taguchi optimization of dibenzothiophene biodesulfurization by *Rhodococcus erythropolis* R1 immobilized cells in a biphasic system. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 343 – 348, 2014.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology & Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47–64, 1997.

DESER. Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil.

Departamento de Estudos Socio-Econômicos e Rurais. Disponível em: <<http://www.deser.org.br>>. Acesso em: 27 março 2015.

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 143 – 150, 1995.

DINAMARCA, M. A.; IBACACHE-QUIROGA, C.; BAEZA, P.; GALVEZ, S.; VILLARROEL, M.; OLIVERO, P.; OJEDA, J. Biotransformation of gas oil using inorganic supports biomodified with metabolically active cells immobilized by adsorption. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2375-2378, 2010.

DINAMARCA, M. A.; ROJAS A.; BAEZA P.; ESPINOZA, G.; IBACACHE-QUIROGA, C.; OJEDA, J. Optimizing the biotransformation of gas oil by adding surfactants to immobilized cell systems. **Fuel**, v. 116, p. 237-241, 2014.

EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Disponível em: <www.epamig.br>. Acesso em: 18 setembro 2012.

FAOSTAT. Food and Agricultural Organization of the United Nations Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso: 11 novembro de 2012.

FARAH, M. A. **Petróleo e seus derivados: definição, constituição, especificações, características de qualidade.** Rio de Janeiro: LTC, 2012. 282 p.

FARIA, A. F.; TEODORO-MARTINEZ, D. S.; BARBOSA, G. N. O.; VAZ, B. G.; SILVA, I. S.; GARCIA, J. S.; TÓTOLA, M. R.; EBERLIN, M. N.; GROSSMAN M, ALVES OL AND DURRANT, LR, Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1951–1957, 2011.

- FATORELLI, L. **Proposta de avaliação de risco ecológico para contaminações de petróleo e derivados – estudo de caso.** 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.
- FELSE, P. A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K. J.; GROSS, R. A. Sphorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 316–323, 2007.
- FENG, W.; SWIFT, S.; SINGHAL, N. Effects of surfactants on cell surface tension parameters and hydrophobicity of *Pseudomonas putida* 852 and *Rhodococcus erythropolis* 3586. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p.43-50, 2013.
- FERNANDEZ-BOLAÑOS, J.; RODRIGUEZ, G.; RODRIGUEZ, R.; HEREDIA, A.; GUILLÉN, R.; JIMÉNEZ, A. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of the two-phase olive oil processing or “alperujo”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6804–6811, 2002.
- FERREIRA, L. C.; FERNANDES, G. Etanolise do óleo residual de fritura para produção debiodiesel utilizando diferentes catalisadores. **FAZU em Revista**, n. 8, p. 95-99, 2011.
- 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.
- FREITAS DE OLIVEIRA, D. **Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus sp.* isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais.** 2014. 202 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2014.
- GALLANGHER, J. R., OLSON, E. S., STANLEY, D. C. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. **FEMS Microbiology Letters**, v. 107, p. 31 - 36, 1993.
- GARY, J. H.; HANDWERK, G. E. **Petroleum refining technology and economics.** 4. ed. Nova Iorque: Marcel Decker, 2001.

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

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A. K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloids Interface Science**, v. 324, p. 171–176, 2008.

GIOVACCHINO, L.; SESTILI, S.; VINCENZO, D. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. **European Journal of Lipid Science Technology**, v. 104, p. 587 – 601, 2002.

GOGOTOV, I. N.; KHODAKOV, R. S. Surfactant production by the *Rhodococcus erythropolis* SH-5 bacterium grown on various carbon sources. **Applied Biochemistry e Microbiology**, v.44, p. 186-191, 2008.

GONÇALVES, C.; LOPES, M.; FERREIRA, J. P.; BELO, I. Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3759–3763, 2009.

GORTZI, O.; LALAS, S.; CHATZILAZAROU, A.; KATSOYANNOS, E.; PAPACONSTANDINO, S.; DOURTOGLOU, E. Recovery of natural antioxidants from olive mill wastewater using Genapol-X080. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 85, p. 133–140, 2008.

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.

GROSSMAN, M. J., LEE, M. K., PRINCE, R. C., MINAK-BERNERO, V., GEORGE, G. N., PICKERING, I. J. Deep desulfurization on extensively hydrodesulfurized middle distillate oil by *Rhodococcus sp.* strain ECRD-1. **American Society for Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1949 – 1952, 2001.

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, 2004.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379–387, 2000.

HABA, E.; PINAZO, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M. J.; INFANTE, M. R., MANRESA, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIBIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, p. 316–322, 2003.

HEARST, R.; NELSON, D.; MCCOLLUM, G.; MILLAR, B. C.; MAEDA, Y.; GOLDSMITH, C. E.; ROONEY, P. J.; LOUGHREY, A.; RAO, J. R.; MOORE, J. E. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 15, p. 5–7, 2009.

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.

HELMY, Q.; KARDENA, E.; FUAMIZU, N. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for its chemically counterparts. **International Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 66–86, 2011.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207–1219, 2012.

HOU, Y.; KONG, Y.; YANG, J., ZHANG, J., SHI, D., XIN, W. Biodesulfurization of dibenzothiophene by immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* UP-1. **Fuel**, v.84, p. 1975–1979, 2005.

HU, M.; ZHAO, S.; LI, C.; WANG, B.; YAO, C.; WANG, Y. The influence of different Tween surfactants on biodesulfurization of ground tire rubber by *Sphingomonas sp.* **Polymer Degradation and Stability**, v. 107, p. 91 – 97, 2014.

HUANG, L.; MAB, T.; LI, D.; LIANG, F.; LIU, R.; LI, G. Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, p. 1714 – 1718, 2008.

HUSSAIN, A.; ARNOLD, J. J.; KHANA, M. A.; AHSAN, F. Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 94, p. 15 – 24, 2004.

ILORI, M. O.; AMOBI, A. C.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp.* isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985-992, 2005.

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.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4603–4608, 2008.

JURADO, E.; BRAVO, V.; LUZÓN, G.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; GARCÍA-ROMÁN, M.; ALTMAJER-VAZ, D.; VICARIA, J. M. Hard-surface cleaning using lipases: enzyme-surfactant interactions and washing tests. **Journal Surfactants Detergents**, v.10, p. 61–70, 2007.

JURADO, E.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; NÚÑEZ OLEA, J.; LECHUGA, M.; JIMÉNEZ, J. L.; RÍOS, F. Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and microalgae: a comparative study. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, p. 290- 295, 2012.

KAMALI, N.; TAVALLAIE, M.; BAMBALI, B., KHARKANE, A. A., MIRI, M. Site-directed mutagenesis enhances the activity of NADH-FMN oxidoreductase (DszD) of *Rhodococcus erythropolis*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 921–927, 2010.

KAPELLAKIS, I. E.; TSAGARAKIS, K. P.; CROWTHER, J. C. Olive oil history, production and by-product management. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 7, p. 1 – 26, 2008.

KATSOYANNOS, E.; CHATZILAZAROU, A.; GORTZI, O.; LALAS, S.; KONTELES, S.; TATARIDIS, P. Application of cloud point extraction using surfactants in the isolation of physical antioxidants (phenols) from olive mill wastewater. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 15, p. 1122–1125, 2005.

KAUFMAN, E. N.; HARKINS, J. B.; RODRIGUEZ, M., TSOURIS, C., SELVARAJ, P. T., MURPHY, S. E. Development of an electro-spray bioreactor for crude oil processing. **Fuel Processing Technology**, v. 52, p.127-144, 1997.

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.

KHAN, A. W.; RAHMAN, M. S.; ZOHORA, U. S.; OKANAMI, M.; ANO, T. Production of surfactin using pentose carbohydrate by *Bacillus subtilis*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23 (suplemento), p. S63 – S65, 2011.

KHAYER MD, A.; CHOWDHURY, M. B.; AKRATOS, C. S.; VAYENAS, D. V.; PAVLOU, S. Olive mill waste composting: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 108 – 119, 2013.

KILLBANE II, J. J. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. **Energy Biotechnology**, v. 17, p. 305-314, 2006.

KILLBANE II, J. J.; LE BORGNE, S. Petroleum biorefining: the selective removal of sulfur, nitrogen, and metals. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 151, p. 29-66, 2004.

KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 1, p. 41 – 46, 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, 2001.

KONISHI, M.; KISHIMOTO, M.; OMASA, T., KATAKURA, Y., SHIOYA, S., OHTAKE, H. Effect of sulfur sources on specific desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 activity in exponential fed-batch culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 259–263, 2005.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure Applied Chemistry**, v. 64, p. 1731-1737, 1992.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 204, p. 1 – 8, 1998.

LAI, C. C.; HUANG, Y. C.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 609–614, 2009.

LE BORGNE, S.; QUINTERO, R. Biotechnological processes for the refining of petroleum. **Fuel Process Technology Journal**, v. 81, p. 155-169, 2003.

LESAGE-MEESSEN, L.; NAVARRO, D.; MAUNIER, S.; SIGOILLOT, J. C.; LORQUIN, J.; DELATTRE, M.; SIMON, J. L.; ASTHER, M.; LABAT, M.; Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. **Food Chemistry**, v. 75, p. 501–507, 2001.

LI, F. L.; XU, P. 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* 7b 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(a).
- 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(b).
- LIN, E.; CHEN, Y. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2511 – 2517, 2007.
- LIU, C.; LIU, H. *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors. **Process Biochemistry**, v.46, p.202-209, 2011.
- LIU, Q.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, H.; LI, S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 31–37, 2015.
- 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.
- MA, X.; SAKANISHI, K.; MOCHIDA, I. Hydrodesulfurization reactivities of various sulfur compounds in vacuum gas oil. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 35, p. 2487-2494, 1996.
- MAASS, D. **Dessulfurização do DBT e do óleo diesel em sistema bifásico pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em reator descontínuo**. Dissertação de Mestrado. Engenharia química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

MAASS, D.; OLIVEIRA, D.; SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Biodesulfurization of a system containing synthetic fuel using *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 174, p. 2079-2085, 2014.

MAASS, D.; TODESCATO, D.; MORITZ, D. E.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; DE SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Desulfurization and denitrogenation of heavy gas oil by *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2015.

MACHADO, M. E.; BREGLES, L. P.; MENEZES, E. W.; CARAMÃO, E. B.; BENVENUTTI, E. V.; ZINI, C. A. Comparison between pre-fractionation and fractionation process of heavy gas oil for determination of sulfur compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1274, p.165-172, 2013.

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.

MAGRAMA. **Anuario Estadística**. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. Disponível em: <<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2012/default.aspx>>. Acesso em: 15 janeiro 2015.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v.1, p. 5, 2011.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A.; ROBER, M.; ESPUNY, M. J.; DE ANDRES, C.; GUINEA J. Olive oil mill effluent (OOME): new substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 43, p. 1–6, 1993.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends Biotechnology**, v. 30, p. 558–565, 2012.

MARIANO, J. B. **Impactos ambientais do refino de petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência, 2005.

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

MCNAMARA, C. J.; ANASTASIOU, C. C.; O'FLAHERTY, V.; MITCHELL, R. Bioremediation of olive mill wastewater. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 61, p. 127–134, 2008.

MELO, W. C. **Aplicação de biossurfactante de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 na remoção de hidrocarbonetos de borra oleosa da indústria do petróleo**. Dissertação de Mestrado. Tecnologia de Processos Químicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Assessoria de Gestão Estratégica. **Brasil projeções do agronegócio 2010/2011 a 2020/2021**. Brasília, 2011. 58p.

MOYA-RAMÍREZ, I.; GARCÍA-ROMÁN, M.; HENARES-JIMÉNEZ, M.; JURADO-ALAMEDA, E.; ALTMAJER-VAZ, D. Remediation of soils contaminated with motor oil by highly biodegradable surfactants. **Avances en Ciencias e Ingeniería**, v. 5, p. 21–29, 2014.

MONTICELLO, D. J. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. **Elsevier Science**, p. 540-546, 1999.

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.; DE OLIVEIRA, E. C.; MORRISON, P. D.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J. Qualitative and quantitative study of nitrogen containing compounds in heavy gas oil using comprehensive two-dimensional gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3223 – 3232, 2007.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183–198, 2005.

NAITO, M.; KAWAMOTO, T.; FUJINO, K., KOBAYASHI, M., MARUHASHI, K., TANAKA, A. Long-term repeated biodesulfurization by immobilized *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 cells. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 55, p. 374–378, 2001.

NAKAYAMA, N.; MATSUBARA, T., OHSHIRO, T., MOROTO, Y., KAWATA, Y., KOIZUMI, K., HIRAKAWA, Y., SUZUKI, M., MARUHASHI, K., IZUMI, Y., KURANE, R. A novel enzyme, 2V-hydroxybiphenyl-2-sulfinate desulfinate (DszB), from a dibenzothiophene-desulfurizing bacterium *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1: gene over expression and enzyme characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1598, p.122– 130, 2002.

NIKIFOROVA, S. V.; POZDNYAKOVA, N. N.; TURKOVSKAYA, O. V. Emulsifying agent production during paks degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* D1. **Current Microbiology**, v. 58, p. 554 – 558, 2009.

NITSCHKE, M., COSTA, S. G. V. A. O., HADDAD, R., GONÇALVES, L. A. G., EBERLIN, M.N., CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p.1562-1566, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 112, p. 163–166, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336–341, 2006.

NOAH, K. S.; FOX, S. L.; BRUHN, D. F.; THOMPSON, D. N.; BALA, G. A. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 803–813, 2002.

NODA, K., KOGURE, T.; IRISA, S., MURAKAMI, Y., SAKATA, M., KURODA, A. Enhanced dibenzothiophene biodesulfurization in a microchannel reactor. **Biotechnology Letters**, v.30, p.451–454, 2008.

NTOUGIAS, S.; BALDRIA, P.; EHALIOTIS, C.; NERUD, F.; ANTONIOU, T.; MERHAUTOVÁ, V.; ZERVAKIS, G. I. Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera *Ganoderma* and *Pleurotus*. **Chemosphere**, v.88, p. 620–626, 2012.

ODA, S.; OHTA, H. Biodesulfurization of dibenzothiophene with *Rhodococcus erythropolis* ATCC 53968 and its mutant in an interface bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 474 - 477, 2002.

OHSHIRO, T.; HIRATA, T.; HASHIMOTO, I., IZUMI, Y. Characterization of benzo thiophene desulfurization reaction by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2 in the presence of hydrocarbon. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 6, p. 610-612, 1996.

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

OLMO, C. H.; SANTOS, V. E., ALCON, A., GARCIA-OCHOA, F. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of operational conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v.22, p. 229–237, 2005.

ONAKA, T., KONISHI, J., ISHII, Y., MARUHASHI, K. Desulfurization characteristics of thermophilic *Paenibacillus sp.* strain A11-2 against asymmetrically alkylated dibenzothiophenes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n° 2, p. 193 – 196, 2001.

ÖNGEN, G.; GÜNGÖR, G.; KANBEROĞLU, B. Decolourization and dephenolisation of selected *Aspergillus* sections *Nigri* strains – *Aspergillus tubigenensis* in olive mill wastewater. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 32, p. 519–524, 2007.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p. 301-307, 2008.

OTSUKI, S.; NONAKA, T.; TAKASHIMA, N.; QIAN, W.; ISHIHARA, A.; IMAI, T.; KABE, T. Oxidative desulfurization of light gas oil and vacuum gas oil by oxidation and solvent extraction. **Energy Fuel**, v. 14, p. 1232-1239, 2000.

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.

PACHECO G. J. **Produção de biosurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos**. 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

PACHECO G. J.; CIAPINA E. M. P.; GOMES E. B.; JUNIOR N. P. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 685-693, 2010.

PAGNANELLI, F.; TORO, L.; VEGLIO, F. Olive mill solid residues as heavy metal sorbent material: a preliminary study. **Waste Management**, v. 22, p. 901–907, 2002.

PAL, M. P.; VAIDYA, B. K.; DESAI, K. M.; JOSHI, R. M.; NENE, S. N.; KULKARNI, B. D. Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.747-756, 2009.

PENG, F.; LIU, Z.; WANG, L.; SHAO, Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p.1603-1611, 2007.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–268, 2013.

PÉREZ, J.; RUBIA, T.; MORENO, J.; MARTÍNEZ, J. Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, p. 489 – 495, 1992.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 553 – 563, 1999.

PITTA JUNIOR, O. S. R.; NOGUEIRA NETO, M. S.; SACOMANO, J. B.; LIMA, J. L. A. Reciclagem de óleo de cozinha: uma contribuição para aumentar a produtividade do processo. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 2, 2009, São Paulo. **Anais do International Workshop Advances in Cleaner Production**. 2009. p. 1 – 10.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 159–168, 2003.

RAZA, Z. A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M., REHMAN, A. Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. **Biotechnology Letters**, v. 28, p.1623-1631, 2006.

RAZA, Z. A.; REHMAN, A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, v. 18, p. 115–121, 2007.

ROCHA, L. L. Isolation and characterization of phenol-degrading yeasts from an oil refinery wastewater in Brazil. **Mycopathologia**, v. 164, p. 183–188, 2007.

ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

ROIG, A.; CAYUELA, M. L.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M. A. An overview an olive mill wastes and their valorization methods. **Waste Management**, v. 26, p. 960–969, 2006.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; RODRIGUES, L. R. M.; TEIXEIRA, J. A. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5, 2011.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA JR. N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 459-467, 2002.

SAMPEDRO, I.; MARINARI, S.; D'ANNIBALE, A.; GREGO, S.; OCAMPO, J. A.; GARCIA-ROMERA, I. Organic matter evolution and partial detoxification in two-phase olive mill waste colonized by white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, p. 116–125, 2007.

SÁNCHEZ-MORAL, P.; RUIZ-MÉNDEZ, M. V. Production of pomace olive oil. **Grasas y Aceites**, v. 57, p. 47 – 55, 2006.

SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A. P. W.; VASQUEZ, G. S.; SANTA-ANNA, L. M.; PEREIRA JR., N.; FREIRE, D. M. G. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98 -100, 1025 – 1035, 2002.

SAVIOZZI, A.; LEVI-MINZI, R.; CARDELLI, R.; BIASCI, A.; RIFFALDI, R. Suitability of moist olive pomace as soil amendment. **Water Air & Soil Pollution Journal**, v. 128, p. 13–22, 2001.

SCHILLING, B. M., ALVAREZ, L. M., WANG, D. I., COONEY, C. L. Continuous desulfurization of dibenzothiophene with *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968). **American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers**, p.1207 - 1213, 2002.

SETTI, L.; LANZARINI, G.; PIFFERI, P. G. Whole cell biocatalysis for an oil desulfurization process. **Fuel Process Technology Journal**, v. 52, p. 145-153, 1997.

SHAH, V.; JURJEVIC, M.; BADIA, D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. **Biotechnology Progress**, v. 23, p.512-515, 2007.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I. W; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207–217, 1995.

SINGH, A. K.; CAMEOTRA, S. S. Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. **Environmental Science Pollution Research**, v. 20, p. 7367–7376, 2013.

SINGH, G. B.; SRIVASTAVA, A.; SAIGAL, A.; AGGARWAL, S.; BISHT, S.; GUPTA, S.; SRIVASTAVA, A.; GUPTA, N. Biodegradation of carbazole and dibenzothiophene by bacteria isolated from petroleum-contaminated sites. **Bioremediation Journal**, v.15, p. 189-195, 2011.

SONG, C. An overview of new approaches to deep desulfurization for ultra-clean gasoline, diesel fuel and jet fuel. **Catalysis Today**, v. 88, p. 211-263, 2003.

SOUZA, A. M. D. **Estudo da emissão de vapores orgânicos no carregamento de gasolina em caminhões-tanque**. Dissertação de Mestrado. Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

SPEIGHT, J. G. **The chemistry and technology of petroleum**. 3. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1998.

STANISLAUS, A.; MARAFI, A.; RANA, M. S. Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. **Catalysis Today**, v. 153, p.1-68, 2010.

STEBER, J.; GUHL, H.; STEKER, N.; SCHRÖDER, F. Alkyl poliglycosides-ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. **Tenside Surfactants Detergents**, v.32, p. 515-521,1995.

SUHAILA, N.; ARIFF, Y., ROSFARIZAN, M., LATIF, A. I., AHMAD, S. A., NORAZAH, M. N., SHUKOR, M. Y. A. Optimization of parameters for phenol degradation by *Rhodococcus* UKM-P in shake flask culture. **Proceedings of the World Congress on Engineering**, v. 1, 2010.

TAO, F.; YU, B.; XU, P.; MA, C. Q. Biodesulfurization in biphasic systems containing organic solvents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 4604–4609, 2006.

THAVASI, R.; SUBRAMANYAM NAMBARU, V. R. M.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* from renewable resources. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 30 – 36, 2011.

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

TOMIOKA, N.; UCHIYAMA, H.; YAGI, O. Cesium accumulation and growth characteristics of *Rhodococcus erythropolis* CS98 and *Rhodococcus sp.* strain CS402. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2227-2231, 1994.

TONKES, M.; DE GRAAF, P. J. F.; GRAANSMA, J. Assessment of complex industrial effluents in the Netherlands using a whole effluent toxicity (or wet) approach. **Water Science and Technology**, v. 39, p. 55 – 61, 1999.

TUNÇEL, G.; NERGIZ, C. Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, 300 – 302, 1993.

TYAGI, V. K.; VASISHTHA, A.K. Changes in the characteristics and composition of oils during deep-fat frying. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 73, p. 499 – 507, 1996.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Universitária. Técnico de Petróleo. **Processamento Primário**. Disponível em: <http://www.tecnicodepetroleo.ufpr.br/apostilas/engenheiro_do_petroleo/processamento_primario.pdf>. Acesso em: 10 junho 2013.

UPPGARD, L.; SJÖSTRÖM, M.; WOLD, S. Multivariate quantitative structure-activity relationships for the aquatic toxicity of alkyl polyglycosides. **Tenside Surfactants Detergents**, v.37, p. 131-138, 2000.

VERDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2413 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.2, p. 175–180, 2011.

VITOLO, S.; PETARCA, L.; BRESCI, B. Treatment of olive oil industry wastes. **Bioresource Technology**, v.67, p. 129–137; 1999.

VREYSEN, S.; MAES, A. Remediation of a diesel contaminated, sandy-loam soil using low concentrated surfactant solutions. **Journal of Soils Sediments**, v. 5, p. 240–244, 2005.

WADEKAR, S.; KALE, S.; LALI, A.; BHOWMICK, D.; PRATAP, A. Sophorolipid production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 89, p. 1029–1039, 2012.

WANG, P., KRAWIEC, S. Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxibiphenyl 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.

WHITE, D. A.; HIRD, L. C.; ALI, S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus sp.*, strain PML026. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 744 – 755, 2013.

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.

WILLENBACHER, J.; ZWICK, M.; MOHR, T.; SCHMID, F.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Evaluation of different *Bacillus* strains in respect of their ability to produce surfactin in a model fermentation process with integrated foam fractionation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, p. 9623–9632, 2014.

WU, J.; YEH, K.; LU, W.; LIN, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource Technology**, v. 99, 1157 – 1164, 2008.

XIA, W.; LUO, Z.; DONG, H.; YU, L.; CUI, Q.; BI, Y. Synthesis, characterization, and oil recovery application of biosurfactant produced by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 using waste vegetable oils. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 1148–1166, 2012.

XU, P.; YU, B.; LI, F. L.; CAI, X. F.; MA, C. Q. Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 399-405, 2006.

YAN, H.; KISHIMOTO, M.; OMASA, T., KATAKURA, Y., SUGA, K., OKUMURA, K., YOSHIKAWA, O. increase in desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 using ethanol feeding. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 4, p.361-366, 2000.

YANG, J.; HU, Y.; ZHAO, D., WANG, S., LAU, P. C. K., MARISON, I. W. Two-layer continuous-process design for the biodesulfurization of diesel oils under bacterial growth conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 212–218, 2007.

YAZDI, A. S. Surfactant-based extraction methods. **Trends Analytical Chemistry**, v. 30, p. 918–929, 2011.

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(a).

YU, B.; XU, P.; ZHU, S.; CAI, X.; WANG, Y.; LI, L.; LI, F.; LIU, X.; MA, C. Selective Biodegradation of S and N heterocycles by a recombinant *Rhodococcus erythropolis* strain containing carbazole dioxygenase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.2235-2238, 2006(b).

ZEIRAK, A. E.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. **Current Microbiology**, v. 61, p. 554–559, 2010.

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.

ZHENG, C.; LUO,Z.; YU, L.; HUANG,L.; BAI, X. The utilization of lipid waste for biosurfactant production and its application in enhancing oil recovery. **Petroleum Science and Technology**, v. 29, p. 282–289, 2011.

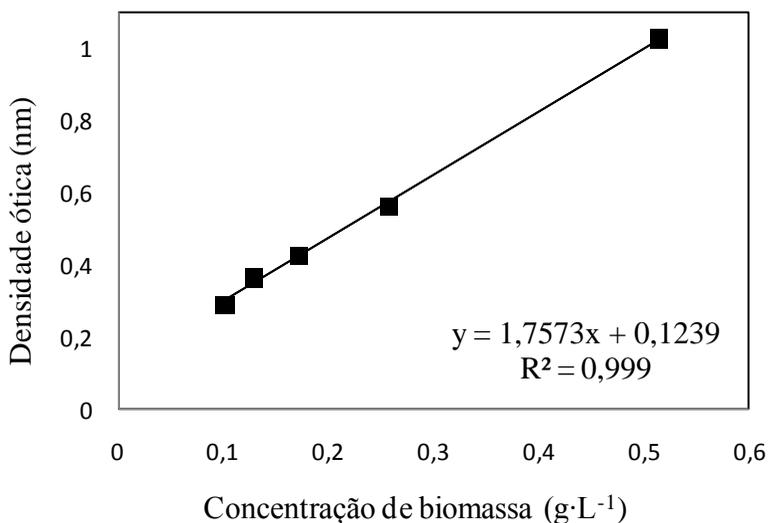
ZHU, X.; SHI, Q.; ZHANG, Y.; PAN, N.; XU, C.; CHUNG, K. H.; ZHAO, S. Characterization of nitrogen compounds in coker heavy gas oil and its subfractions by liquid chromatographic separation followed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Energy Fuels**, v. 25, p. 281- 287, 2011.

APÊNDICE A

CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

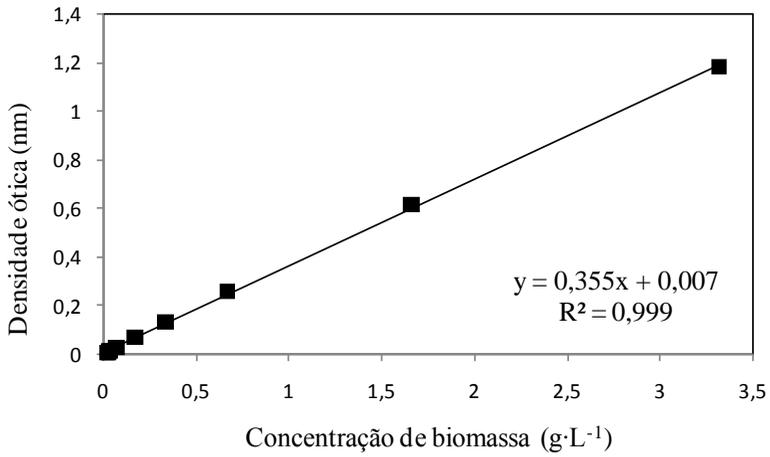
Na Figura 25 têm-se a curva de calibração que relaciona a concentração de biomassa de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 às suas respectivas densidades óticas.

Figura 25: Curva de calibração da concentração de biomassa de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 versus densidade ótica



Na Figura 26 têm-se a curva de calibração que relaciona a concentração de biomassa de *Bacillus subtilis* DSM 3256 às suas respectivas densidades óticas.

Figura 26: Curva de calibração da concentração de biomassa de *Bacillus subtilis* DSM 3256 versus densidade ótica



APÊNDICE B

CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO DE MOTOR

Na Figura 27 têm-se a curva de calibração que relaciona as concentrações de óleo de motor às suas respectivas densidades óticas.

Figura 27: Curva de calibração da concentração de óleo de motor *versus* densidade ótica

