

Bruna Porto

**BIODESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO POR
Rhodococcus erythropolis ATCC 4277 EM MEIOS DE CULTURA:
SINTÉTICO, RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E
ACELERADOR DE COMPOSTAGEM**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza.
Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza e Prof.^a Dr.^a Danielle Maass

Florianópolis
2017

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

Porto, Bruna

Biodessulfurização do gasóleo pesado por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em meios de cultura: sintético, resíduos agroindustriais e acelerador de compostagem / Bruna Porto ; orientadora, Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza ; coorientador, Antônio Augusto Ulson de Souza, coorientadora, Danielle Maass. - Florianópolis, SC, 2017.

140 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde.

Inclui referências

1. Saúde. 2. Biodessulfurização. 3. Gasóleo pesado. 4. Resíduos agroindustriais em bioprocessos. 5. Acelerador de compostagem. I. Souza, Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de. II. Souza, Antônio Augusto Ulson de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Saúde. IV. Título.

Bruna Porto

**BIODESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO POR
Rhodococcus erythropolis ATCC 4277 EM MEIOS DE CULTURA:
SINTÉTICO, RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E
ACELERADOR DE COMPOSTAGEM**

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

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2017.

Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Soares
Coordenadora do Curso

Prof^ª. Dr^ª. Selene Maria de A. Guelli Ulson de Souza
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Alexandra Valério
Universidade Federal de Santa
Catarina

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

Prof.^a, Dr.^a Regina Vasconcellos Antônio
Universidade Federal de Santa Catarina (Videoconferência)

Dedico esta dissertação a Deus por sua proteção, aos meus pais Dirce e Volnei e ao meu irmão Rodrigo, por seu apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, os professores Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza, Antônio Augusto Ulson de Souza e Danielle Maass, pela atenção e paciência em suas orientações, pela confiança em mim depositada e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos professores Débora de Oliveira e José Vladimir de Oliveira, pelo apoio, sugestões e contribuições, fundamentais à conclusão deste trabalho.

Ao professor Carlos Yamamoto, coordenador do Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUTets) da Universidade Federal do Paraná, por permitir a realização dos ensaios para a determinação do teor de enxofre, sem as quais este trabalho não seria possível. Do mesmo modo, estendo este agradecimento a todos os profissionais do LACAUTets que foram extremamente atenciosos e gentis em todo o tempo que estive no laboratório.

À professora Denise Esteves Moritz, pelas sugestões, principalmente, no período inicial deste trabalho.

Às empresas Fariman - Salezio Delfino & Cia Ltda., Kairós Cervejaria e Tecnicontrol Ind. e Com. de Produtos Biológicos Ltda., por gentilmente cederem as matérias-primas empregadas neste trabalho.

Ao grupo de pesquisa Labsin/Labmassa pela estrutura, suporte e aprendizado, através de professores, pesquisadores e alunos que integram esta equipe.

Aos colegas e amigos, pelo incentivo e compreensão, por transmitir suas vivências e experiências acadêmicas, em especial, a Aline Mara Novack, Claudio Mendes Cascaes, Janaina de Souza Lima, Maria Alice Prado Cechinel, Talita Corrêa Nazareth e Tamires Cristina Costa.

Aos doutorandos Luís Antônio Lourenço e Thamayne Valadares de Oliveira, por seu companheirismo e suas contribuições. À bolsista de Iniciação Científica, Amanda Rafaela dos Santos, pelo auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela oportunidade outorgada.

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

A mente que se abre a uma nova ideia jamais
volta ao seu tamanho original.

(Albert Einstein)

RESUMO

O petróleo apresenta em sua composição compostos sulfurosos, considerados contaminantes, que geram problemas técnicos no processo de refino, além de aumentar os custos com o tratamento das frações de petróleo. Durante a combustão dos combustíveis estes compostos são convertidos a gases tóxicos, que em contato com a umidade do ar transformam-se em ácidos, causando prejuízos ambientais como a chuva ácida e à saúde humana. A biodessulfurização (BDS) é uma biotecnologia para a remoção seletiva de compostos heterocíclicos de enxofre sob condições amenas de temperatura e pressão. E por isso vem sendo amplamente estudada como alternativa aos processos convencionais, visando atender as normas ambientais vigentes. Em estudos anteriores com a estirpe *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, observou-se que a concentração das fontes de nitrogênio e carbono, no meio de fermentação do sistema de BDS, influenciou na remoção de enxofre e nitrogênio do gasóleo pesado (GOP). Neste trabalho, então, foram otimizadas as condições nutricionais do meio sintético, o que permitiu reduzir o tempo de fermentação, alcançando uma remoção de enxofre superior a 70,0 % (em massa). Assim, atingiu-se uma elevada velocidade específica de degradação, com valores superiores a 4.500 mg de enxofre. kg de GOP⁻¹. h⁻¹. Resultados expressivos também foram alcançados através do emprego do trub e da manipueira como substitutos para o meio sintético de fermentação, assim como para o acelerador de compostagem Organti H-Biol®, estudado também como substituto para a estirpe dessulfurizante *R. erythropolis*. Com o trub atingiu-se uma remoção de enxofre do GOP de 70,0 % em apenas uma 1 h de fermentação, enquanto para a Manipueira alcançou-se uma remoção máxima de 75,0 % em 12 h. O acelerador de compostagem promoveu uma dessulfurização de até 71,8 %, sendo aplicado, neste caso, apenas 5,00 % (em massa) do produto. Deste modo, os resultados obtidos fomentam a perspectiva de ampliar a escala de estudo e representam um avanço para aplicação desta biotecnologia, uma vez que superam àqueles obtidos, anteriormente, na dessulfurização do gasóleo pesado através da biodessulfurização.

Palavras-chave: *Rhodococcus erythropolis*. Biodessulfurização. Gasóleo pesado. Compostos de enxofre. Manipueira. Trub. Acelerador de compostagem.

ABSTRACT

Petroleum presents in its composition sulfurous compounds, considered contaminants that generate technical problems in the refining process, besides increasing the costs with the treatment of petroleum fractions. During the combustion of fuels these compounds are converted to toxic gases, which in contact with the humidity of the air transform into acids, causing environmental damages such as acid rain and human health. Biodesulfurization (BDS) is a biotechnology for the selective removal of heterocyclic sulfur compounds under mild conditions of temperature and pressure. Therefore, it has been widely studied as an alternative to conventional processes, in order to meet current environmental standards. In previous studies with the *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 strain, it was observed that the concentration of nitrogen and carbon sources in the fermentation medium of the BDS system influenced the removal of sulfur and nitrogen from heavy gas oil (HGO). In this work, the nutritional conditions of the synthetic medium were optimized, which allowed to reduce the fermentation time, reaching a sulfur removal of more than 70.0% (in mass). Thus, a high rate of degradation was reached, with values higher than 4,500 mg of sulfur. kg HGO⁻¹. h⁻¹. Expressive results were also obtained through the use of trub and manipueira as substitutes for the synthetic medium of fermentation, as well as for the Organti H-Biol® composting accelerator, also studied as a substitute for the *R. erythropolis* desulfurizing strain. With the trub a sulfur removal of 70.0% HGO was achieved in only 1 h of fermentation, while for Manipueira a maximum removal of 75.0% was achieved in 12 h. The compost accelerator promoted desulfurization of up to 71.8%, in which case only 5.00% (in mass) of the product was applied. Thus, the results obtained encourage the prospect of expanding the scale of study and represent a step forward in the application of this biotechnology, since they exceed those previously obtained in the desulfurization of heavy gas oil through biodesulfurization.

Keywords: *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. Biodesulfurization. Heavy gas oil. Sulfur compounds. *Manipueira*. *Trub*. Organti H-Biol® compost accelerator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução dos limites impostos pela ANP na concentração de enxofre na gasolina automotiva.	38
Figura 2 – Esquema de refino de petróleo simplificado.....	42
Figura 3 – Unidade de destilação em três estágios.	43
Figura 4 – Via 4S de dessulfurização do DBT.....	48
Figura 5 – Esquema básico das etapas de dessulfurização de um óleo pela via 4S por <i>Rhodococcus spp.</i>	50
Figura 6 – Sistema convencional de biodessulfurização.....	51
Figura 7 – Diagrama de fluxo do processo multi-estágio de BDS.....	53
Figura 8 – Fluxograma de ensaios de BDS por <i>Rhodococcus erythropolis ATCC 4277</i> do gasóleo pesado.	65
Figura 9 – Velocidade específica de dessulfurização para a máxima remoção de enxofre nos ensaios preliminares de BDS.....	75
Figura 10 – Avaliação do efeito do tempo (h) e da concentração de glicose (g/L) na remoção de enxofre (mg/kg) e na velocidade específica de dessulfurização (mg/kg.h) nos ensaios preliminares de BDS através do perfil para valores preditos e desejabilidade.....	77
Figura 11 – Curvas de nível do teor de enxofre removido em mg de enxofre/kg GOP (■ 4500; ■ 4250; ■ 4000; ■ 3750; ■ 3500; ■ 3250; ■ 3000; ■ 2750; ■ 2500 e ■ 2250) para os fatores tempo e variação na concentração de glicose nos ensaios preliminares de BDS.....	78
Figura 12 – Avaliação do efeito do tempo (h) e da concentração de extrato de levedura (g/L) na remoção de enxofre (mg/kg) e na velocidade específica de dessulfurização (mg/kg.h) nos ensaios preliminares de BDS através do perfil para valores preditos e desejabilidade.....	79
Figura 13 – Curvas de nível do teor de enxofre removido em mg de enxofre/kg GOP (■ 5000; ■ 4800; ■ 4600; ■ 4400; ■ 4200; ■ 4000; ■ 3800; ■ 3600 e ■ 3400) para os fatores tempo e variação na concentração de extrato de levedura nos ensaios preliminares de BDS.	80
Figura 14 – Perfil para valores preditos e desejabilidade em 12 h de fermentação dos ensaios de BDS, oriundos do planejamento compostos central com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.	83
Figura 15 – Gráficos das curvas de nível do teor de enxofre removido em mg de enxofre/kg GOP referente aos ensaios de BDS em condições otimizadas para as variáveis (a) glicose e extrato de levedura (■ 5400; ■ 5000; ■ 4600; ■ 4200 e ■ 3800), (b) extrato de malte e glicose (■ 4500; ■ 4000; ■ 3500; ■ 3000 e ■ 2500) e (c) extrato de levedura e extrato de malte (■ 5400; ■ 5000; ■ 4600; ■ 4200; ■ 3800; ■ 3400 e ■ 3000).	84
Figura 16 – Média das velocidade específica de dessulfurização para remoção de enxofre ao longo dos ensaios de BDS em meio de nutricional otimizado (1,21 g/L de glicose, 4,52 g/L de extrato de malte, 12,39 g/L de extrato de levedura e 2,00 g/L carbonato de cálcio).	86

Figura 17 – Cinéticas de concentração celular para os 8 ensaios preliminares de BDS, com variação na concentração de glicose e de extrato de levedura, conforme descrito na Tabela 12, item 3.2.2.1.....	89
Figura 18 – Cinéticas de concentração celular para os 8 ensaios controle dos estudos preliminares de BDS, com variação na concentração de glicose e de extrato de levedura, conforme descrito na Tabela 12, item 3.2.2.1.	89
Figura 19 – Concentração celular máxima medida para os 8 ensaios de BDS e de controles dos estudos preliminares de BDS, em paralelo com a concentração de glicose e extrato de levedura empregada.	90
Figura 20 – Cinéticas de concentração celular para os 17 ensaios de BDS nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.2.1, com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.	91
Figura 21 – Cinéticas de concentração celular para os 17 ensaios de controle nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.2.1, com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.	92
Figura 22 – Concentração celular máxima medida para os 17 ensaios de BDS e de controle nas condições do planejamento experimental, em paralelo com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte. ...	93
Figura 23 – Cinéticas de concentração celular média nos para o ensaio em condições otimizadas, determinadas através do perfil de desejabilidade, conforme descrito no item 4.1.1.2 e respectivo controle.....	94
Figura 24 – Cinéticas de consumo de ART para os 8 ensaios preliminares de BDS, com variação na concentração de glicose e de extrato de levedura, conforme descrito na Tabela 12, item 3.2.2.1.....	95
Figura 25 – Cinéticas de consumo de ART para os 8 ensaios controle dos estudos preliminares de BDS, com variação na concentração de glicose e de extrato de levedura, conforme descrito na Tabela 12, item 3.2.2.1.	96
Figura 26 – Cinéticas de consumo de ART para os 17 ensaios de BDS nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.2.1, com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.	97
Figura 27 – Cinéticas de consumo de ART para os 17 ensaios de controle nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.2.1, com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.	98
Figura 28 – Cinéticas de consumo de ART, crescimento de <i>R. erythropolis</i> e de dessulfurização para o ensaio de BDS em condições ótimas.....	99
Figura 29 Cinética de dessulfurização do GOP por <i>R. erythropolis</i> para ensaio com meio de fermentação substituído por trub.....	102
Figura 30– Cinética de consumo de ART no teste com trub como meio de fermentação para o processo de BDS do gasóleo pesado e respectivo controle.	103

Figura 31 – Cinética de dessulfurização do GOP por <i>R. erythropolis</i> para ensaio com meio de fermentação substituído por manipueira.....	106
Figura 32 – Cinética de consumo de ART no teste com a manipueira como meio de fermentação para o processo de BDS do gasóleo pesado e respectivo controle.....	107
Figura 33– Remoção percentual máxima de enxofre (massa %) do GOP por Organti H-Biol® nos 7 ensaios de BDS nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.3.	109
Figura 34 – Cinéticas de dessulfurização do GOP por Organti H-Biol® para os 7 de BDS nas condições do planejamento experimental, com variação na concentração Organti H-Biol® (% massa) e na temperatura (°C), conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.3.	110
Figura 35 – Avaliação do efeito da concentração de Organti H-Biol® (massa %) e da temperatura (°C) na remoção de enxofre (mg/kg) e na velocidade específica de dessulfurização (mg/kg.h) em 6 h de fermentação dos ensaios de BDS por Organti H-Biol®, oriundos do planejamento fatorial 2 ² , através do perfil para valores preditos e desejabilidade.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise elementar do óleo cru típico (% em peso).....	32
Tabela 2 – Frações típicas do petróleo.....	32
Tabela 3 – Especificação de Óleos Combustíveis.....	36
Tabela 4 – Especificação do óleo diesel de uso rodoviário.....	37
Tabela 5 – Especificações das gasolinas Comum e Premium.....	38
Tabela 6 – Concentração ($\mu\text{g/g}$) dos componentes identificados das amostras de gasóleo pesado.....	40
Tabela 7 – Identificação que compostos orgânicos de enxofre em gasóleo pesado.....	40
Tabela 8 – Comparação entre as Tecnologias de Hidro e Biodessulfurização.....	46
Tabela 9 – Composição média da manipueira.....	56
Tabela 10 – Composição do meio de manutenção SM.....	62
Tabela 11 – Composição do meio de cultura otimizado (OSM.....	62
Tabela 12 – Composição do meio de fermentação dos ensaios de BDS iniciais.....	66
Tabela 13 – Matriz do planejamento experimental obtida através do STATISTICA® 7.0 para testes com meio sintético.....	67
Tabela 14 – Matriz do planejamento experimental obtido no STATISTICA® 7.0 para os testes com acelerador de compostagem Organti H-Biol®.....	69
Tabela 15 – Matriz do planejamento experimental obtido no STATISTICA® 7.0 para os testes adicionais com acelerador de compostagem Organti H-Biol®.....	69
Tabela 16 – Máxima remoção de enxofre nos ensaios preliminares de BDS do GOP por <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277.....	74
Tabela 17 – Efeitos estimados para os ensaios de BDS de 1 a 4 com respectivos índices estatísticos.....	76
Tabela 18 – Efeitos estimados para os ensaios de BDS de 5 a 8 com respectivos índices estatísticos.....	76
Tabela 19 – Resultados para remoção de enxofre nos ensaios oriundos do planejamento experimental.....	81
Tabela 20 – Efeitos estimados e respectivos índices estatísticos para otimização do processo de BDS.....	82
Tabela 21 – Cinéticas de BDS do GOP por <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 em meio de nutricional otimizado (1,21 g/L de glicose, 4,52 g/L de extrato de malte, 12,39 g/L de extrato de levedura e 2,00 g/L carbonato de cálcio).....	85
Tabela 22 – Composição dos meios de fermentação e cultura.....	87
Tabela 23 – Caracterização físico-química do trub.....	100
Tabela 24 – Cinética da BDS do GOP por <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 em meio aquoso composto por trub.....	101
Tabela 25 – Caracterização média da Manipueira.....	104
Tabela 26 – Cinética de BDS do GOP por <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 em meio substituído por manipueira.....	105

Tabela 27 – Efeitos estimados dos fatores estudados e da constante do modelo de regressão com respectivos índices estatísticos para os ensaios com Organti HBiol®.....	111
Tabela 28 – Resultados dos ensaios extras de BDS do GOP por acelerador de compostagem Organti H-Biol®.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- [X_{máx}] – Concentração Celular Máxima
® – Registrado
ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ABNT – Agência Brasileira de Normas Técnicas
ART – Açúcares redutores totais.
ASTM – *American Society for Testing and Materials*
ATCC – *American Type Culture Collection*
BDS – Biodessulfurização
boed – barris de óleo equivalente por dia
CI – Carbono Inorgânico
Cia – Companhia
CNP – Conselho Nacional do Petróleo
COT – Carbono orgânico total
CT – Carbono Total
Cx-DBT – Dibenzotiofenos
Cx-HPBS – Hidroxibifenilas
DBT – Dibenzotiofeno
IGT – Instituto de Tecnologia de Gás
DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico
Dsz - desulfinaze
FCC – *Fluid catalytic cracking*
FMN – Mononucleótido de flavina
GC×GC – *Comprehensive two-dimensional gas chromatography*
GLP – Gás Liquefeito de Petróleo
GOP – Gasóleo pesado
HPB – Hidroxibifenila
LEMA – Laboratório de Energia e Meio Ambiente
LTBR – Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos
LTDA – Limitada
M – Molar [mol/L]
ME – Malt Extract
NBR – Norma Brasileira
Nível p – Significância estatística
NT – Nitrogênio Total
ODS – Dessulfurização oxidativa
OSM – *Optimized Streptomyces medium*
pH – Potencial hidrogeniônico
PROCONVE – Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores

PROEF – Programa de Aumento da Eficiência Operacional
RAT – Resíduo atmosférico
SM – *Streptomyces medium*
TOFMS - *Time-of-flight mass spectrometry*
UFPR – Universidade Federal do Paraná
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
LACAUTes – Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos
UV-Vis– espectroscopia no ultravioleta visível
YE – *Yeast Extract*
 α – Nível de significância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 OBJETIVOS	28
1.1.1 Objetivo Geral	28
1.1.2 Objetivos Específicos.....	29
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 PETRÓLEO E DERIVADOS	31
2.1.1 História e perspectivas de mercado	33
2.1.2 Compostos sulfurados	34
2.1.3 Teor de Enxofre: Legislação.....	35
2.2 GASÓLEO PESADO.....	39
2.2.1 Constituintes aromáticos e sulfurosos	39
2.2.2 Produção e aplicação.....	41
2.3 TRATAMENTO DE COMPOSTOS ORGANOSSULFURADOS EM DERIVADOS DE PETRÓLEO	44
2.3.1 Hidrodessulfurização	44
2.3.2 Dessulfurização biocatalítica	45
2.3.2.1 Bactérias redutoras de sulfato: <i>Rhodococcus erythropolis</i>	47
2.3.2.2 Perspectivas e desafios	50
2.4 EMPREGO DE RESÍDUOS COMO MEIO DE CULTURA.....	54
2.4.1 Manipueira.....	55
2.4.2 Trub.....	57
2.5 ACELERADOR DE COMPOSTAGEM ORGANTI H-BIOL®	58
2.6 ESTADO DA ARTE.....	59
3 MATERIAS E MÉTODOS	61
3.1 MATERIAIS UTILIZADOS	61

3.1.1 Micro-organismo.....	61
3.1.2 Meio de Manutenção.....	62
3.1.3 Meio de Cultura	62
3.1.4 Meio de Fermentação.....	62
3.1.5 Acelerador de Compostagem Organti H-Biol®	63
3.1.6 Gasóleo Pesado	63
3.1.7 Reagente Ácido Dinitrossalicílico (DNS).....	63
3.2 MÉTODOS	64
3.2.1 Reativação das Células de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277 Liofilizadas.....	64
3.2.2 Dessulfurização do Gasóleo Pesado por Células Livres de <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277.....	64
3.2.2.1 Dessulfurização em Meio de Fermentação Sintético	66
3.2.2.2 Dessulfurização em Meio de Fermentação Composto por Trub e Manipueira	68
3.2.3 Dessulfurização do Gasóleo Pesado por Acelerador de Compostagem Organti HBiol®.....	68
3.2.4 Ensaio Analítico	70
3.2.4.1 Caracterização do Trub e da Manipueira	70
3.2.4.2 Determinação da Concentração de Biomassa por Turbidimetria	70
3.2.4.3 Determinação da Concentração de Açúcares no Caldo Fermentativo pelo Método DNS	70
3.2.4.4 Determinação da Concentração de Enxofre Total pelo método ASTM D-4294	71
3.2.5 Planejamento Experimental e Análise Estatística.....	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 DESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO EM MEIO SINTÉTICO POR CÉLULAS LIVRES DE RHODOCOCUS ERYTHROPOLIS ATCC4277	73

4.1.1 Influência da composição do meio nutricional na capacidade de dessulfurização	73
4.1.1.1 Planejamento Experimental para Otimização do Meio de Fermentação	81
4.1.1.2 Ensaio de BDS nas condições ótimas	84
4.1.2 Influência dos parâmetros nutricionais e do gásóleo pesado no crescimento celular da estirpe <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	87
4.1.2.1 Avaliação do crescimento celular nas condições do planejamento experimental, apresentado na Tabela 13	91
4.1.2.2 Avaliação da concentração de biomassa para os ensaios de dessulfurização em condição nutricional otimizada.....	93
4.1.3 Consumo de Açúcares Redutores Totais no Caldo Fermentativo.....	94
4.2 DESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO POR CÉLULAS LIVRES DE <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ATCC 4277 EM MEIOS NUTRICIONAIS ALTERNATIVOS.....	99
4.2.1 Trub.....	100
4.2.1.1 Capacidade de Biodessulfurização	100
4.2.1.2 Consumo de Açúcares Redutores.....	102
4.2.2 Manipueira.....	104
4.2.2.1 Capacidade de Biodessulfurização	105
4.2.2.2 Consumo de Açúcares Redutores.....	106
4.3 DESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO POR ACELERADOR DE COMPOSTAGEM ORGANTI HBIOL®	108
4.4.1 Planejamento Experimental Fatorial 2²	108
4.4.2 Ensaio Pontuais Extras.....	112
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	115
5.1 CONCLUSÕES.....	115
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	116

REFERÊNCIAS.....	119
APÊNDICE A – Curva de calibração da concentração de açúcares reductores totais (ART).....	133
APÊNDICE B – Resultados cinéticos de BDS	135
ANEXO A – Laudo do Laboratório Biocontrol para a caracterização da manipueira.....	139
ANEXO B – Curva de calibração da concentração de biomassa..	143

1 INTRODUÇÃO

Durante a queima dos combustíveis derivados de petróleo, os compostos sulfurosos são convertidos a dióxido e trióxido de enxofre, gases poluentes da atmosfera, que podem ainda reagir com a umidade do ar, formando ácido sulfúrico e sulfídrico, responsáveis pela chuva ácida. Como agravante, o aumento da demanda de combustíveis e com o declínio das reservas de petróleo, o óleo bruto que vem sendo extraído tem apresentado níveis ainda mais elevados de contaminantes, sendo o enxofre o principal deles (DOBLE; KUMAR, 2005; THOMAS, 2001).

Deste modo, em diversos países, governos e órgãos ambientais, através de normas e legislações específicas, tem intensificado as restrições sobre os níveis aceitáveis de contaminantes presentes nos combustíveis, buscando reduzir a poluição atmosférica, que gera efeitos nocivos ao meio ambiente e a saúde humana (AGUIAR et al., 2007).

Por outro lado, as tecnologias atualmente empregadas nas refinarias de petróleo, como o processo de hidrodessulfurização (HDS), são dispendiosas e não são capazes de promover a dessulfurização das frações de petróleo aos níveis atualmente exigidos, uma vez que 70,0 % do enxofre se encontra na forma de compostos heterocíclicos, recalcitrantes (DOBLE; KUMAR, 2005; LE BORGNE; QUINTERO, 2003).

Neste contexto, a biodessulfurização (BDS) vem sendo amplamente estudada, uma vez que através desta técnica biotecnológica, micro-organismos atuam como biocatalisadores e o enxofre é degradado e removido seletivamente da fração orgânica (DINAMARCA et al., 2014). Entre outras vantagens, em comparação com a HDS, não são formados subprodutos tóxicos e não há redução da capacidade calorífica dos combustíveis, além de implicar em menores custos (DOBLE; KUMAR, 2005).

No entanto, para que a aplicação da BDS em larga escala seja viável, os pesquisadores têm voltado seus esforços para otimizar as condições de processo, melhorar as técnicas de recuperação e separação das fases, reduzir os custos com o meio para o crescimento da estirpe bacteriana empregada, além de aumentar a sua atividade. As estirpes como *Rhodococcus sp* são empregadas em diversos estudo de BDS, por realizarem a remoção do enxofre de maneira estável, sem quebrar os anéis aromáticos das frações de petróleo, mantendo assim a capacidade energética (GRAY et al., 1996; GUPTA et al., 2004; MONTICELLO, 2000).

Em trabalhos anteriores com o gasóleo pesado (GOP), um subproduto da destilação à vácuo do petróleo, estudou-se o processo de BDS por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, uma estirpe bacteriana nacional (MAASS, 2015; TODESCATO, 2014). Os autores verificaram que a composição do meio nutricional em relação às fontes de carbono e nitrogênio, influencia na eficiência do processo de dessulfurização. Deste modo, buscou-se, neste estudo, otimizar estes parâmetros, a fim de determinar as proporções ótimas a serem empregadas, visando reduzir os custos com o meio de fermentação e ainda, aumentar a eficiência de processo, maximizando a remoção de enxofre do GOP e a velocidade específica de dessulfurização. Além disso, também foi avaliada a aplicação de resíduos agroindustriais (trub e manípueira) como potenciais substituintes para o meio de fermentação sintético, sendo esta uma segunda alternativa para reduzir os custos com o meio de cultura. Estes materiais apresentam elevada concentração de nutrientes, que podem ser aproveitados como insumo para nutrição dos micro-organismos, reduzindo assim sua carga poluidora. Deste modo, além de minimizar os danos ambientais que estes poderiam causar, estamos agregando valor aos mesmos;

E por fim, empregou-se também como biocatalisador e meio nutritivo para a biodessulfurização do GOP, um produto comercial designado como acelerador de compostagem Organti H-Biol®, uma vez que este produto é composto por uma seleção de micro-organismos termofílicos estabilizadas em seu próprio meio, capazes de degradar moléculas orgânicas complexas. Além disso, os aceleradores de compostagem possuem baixo valor comercial e ao utilizá-lo na BDS do gasóleo pesado, não foi necessário realizar a obtenção do caldo fermentativo e tomar certos cuidados com a manutenção da esterilidade do sistema, etapas que incrementam os custos de processo e muitas inviabilizam a sua aplicação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a capacidade de dessulfurização do gasóleo pesado pela estirpe *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 e por meio de uma seleção de micro-organismos presentes no acelerador de compostagem Organti H-Biol®

1.1.2 Objetivos Específicos

Maximizar a remoção de compostos de enxofre através da manipulação das condições nutricionais do meio fermentativo.

Avaliar a influência da composição do meio fermentativo na dessulfurização do gasóleo pesado e no crescimento celular.

Examinar o emprego de resíduos agropecuários como meio de cultura no processo de remoção do enxofre.

Otimizar as condições de processo do sistema de BDS com o acelerador de compostagem Organti H-Biol®.

Minimizar os custos associados ao meio nutricional que impedem a aplicação da BDS em escala industrial.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A estrutura desta dissertação é apresentada a seguir, visando contribuir para uma melhor compreensão do leitor.

No capítulo dois é feito um levantamento bibliográfico sobre as características gerais do petróleo e do gasóleo pesado, assim como do processo de refino do petróleo, dando ênfase aos processos de tratamento para os contaminantes sulfurosos. Deste modo, serão avaliadas questões pertinentes para a aplicação da biodessulfurização e alternativas para redução do custo de processo. Além disso, explana-se sobre a capacidade do acelerador de compostagem Organti H-Biol® de degradar moléculas orgânicas complexas e sobre o emprego de resíduos agroindustriais, como o trub e a manpueira, em processos biotecnológicos.

No capítulo seguinte são descritos os materiais empregados e as metodologias analíticas e de estudo do processo de dessulfurização do gasóleo pesado por *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 e por Organti H-Biol®. Os ensaios de BDS foram obtidos e analisados estatisticamente através do *software* STATISTICA ® 7.0, conforme exposto, ainda no capítulo três.

No capítulo quatro os resultados obtidos para a remoção de enxofre do gasóleo pesado, bem como os dados estatísticos são discutidos cuidadosamente. Além disso, são apresentadas as curvas

cinéticas de processo, em relação ao crescimento celular, ao consumo de açúcares e de dessulfurização.

Com isso, no capítulo cinco são apresentadas as conclusões obtidas e as sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

Nos Apêndices podemos visualizar a curva de calibração para o consumo de açúcares redutores totais, obtida e empregada no presente estudo e as tabelas com os resultados completos para as cinéticas de BDS por *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em meio sintético e por Organti H-Biol®.

Enquanto nos Anexos visualizamos o laudo de caracterização da manipueira, cedido pela Empresa Fariman e a curva de calibração para o crescimento celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentado o levantamento bibliográfico feito para a contextualização de aspectos relevantes a este estudo. Deste modo, inicialmente, discorre-se sobre as características do petróleo e processo de refino até a obtenção do gasóleo pesado (GOP). Além disso, serão abordadas questões legislativas e históricas para a compreensão da atual situação da indústria petroquímica em relação ao consumo de combustíveis e a necessidade de desenvolver novas técnicas para remoção de contaminantes. Com isso, analisam-se as técnicas de tratamento de compostos sulfurosos, desde os processos convencionais até a evolução do processo de dessulfurização microbiana, a biodessulfurização (BDS). Neste contexto, destacam-se alguns trabalhos sobre as vias metabólicas de degradação dos compostos heterocíclicos de enxofre em derivados de petróleo e sobre as características da bactéria dessulfurizante *Rhodococcus erythropolis*. E em relação ao GOP ressalta-se ainda, as vantagens ao processo de refino ao promover o tratamento do mesmo através da técnica de biodessulfurização.

2.1 PETRÓLEO E DERIVADOS

A palavra petróleo vem do latim e é formada pela junção de *petra* (pedra) e *oleum* (óleo). O petróleo é uma substância oleosa no estado líquido, inflamável, com densidade inferior a da água, odor característico e cor entre o negro e o castanho-claro, resultante da decomposição de matéria orgânica ao longo de milhões de anos (THOMAS, 2001).

A composição do petróleo difere-se conforme a sua origem, produzindo produtos em maiores ou menores concentrações dependendo do poço ou da região de onde é extraído (BASTOS, 2009). No entanto, a composição elementar típica do óleo cru mantém-se semelhante, como mostra a Tabela 1. O petróleo é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, além de apresentar em menores concentrações compostos orgânicos, contendo átomos de enxofre, nitrogênio e oxigênio, metais como sais de ácidos orgânicos e compostos inorgânicos (BASTOS, 2009; THOMAS, 2001).

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

Elemento	Percentual em peso (%)
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 (2001).

Para melhor aproveitar o potencial energético e utilizá-lo como fonte de matéria-prima, o petróleo é separado em frações com padrões pré-estabelecidos, de acordo com o ponto de ebulição dos compostos (ABADIE, 2002; THOMAS, 2001), como se pode observar na Tabela 2.

Tabela 2 – 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 (2001).

O rendimento e qualidade das frações são definidos pela composição de cada óleo bruto extraído. Deste modo, as características do petróleo irão determinar as técnicas que devem ser implementadas no processo de refino para obtenção de produtos com maior qualidade (ABADIE, 2002).

2.1.1 História e perspectivas de mercado

Nos tempos bíblicos o petróleo já era utilizado por diversas civilizações, como os gregos, egípcios, fenícios e romanos em construções e até mesmo para embalsamar os mortos. Antigas civilizações indígenas, como os maias, os incas e índios pré-colombianos também faziam uso do petróleo, na impermeabilização dos potes cerâmicos, entre outras distintas aplicações (THOMAS, 2001).

Na sociedade moderna a exploração comercial do petróleo começou nos Estados Unidos, onde foi descoberto que a destilação do mesmo resultava em produtos que poderiam substituir de modo eficiente a querosene oriunda de carvão e o óleo de baleia, empregado na iluminação das cidades e casas. Posteriormente, a gasolina e o diesel tornaram-se combustíveis de motores, agregando expressivos lucros para a indústria do petróleo (THOMAS, 2001). A crescente demanda durante a Primeira Guerra Mundial e a disponibilidade de combustíveis fósseis e outros derivados do petróleo motivaram a expansão do setor. Durante a Segunda Guerra Mundial, volumes ainda maiores foram produzidos para aplicação em produtos químicos de uso militar e combustíveis (BASTOS, 2009).

Os maiores produtores e consumidores de produtos petroquímicos se concentravam nos países economicamente desenvolvidos e não onde havia as maiores reservas de petróleo. No entanto, na década de 70, alguns fatores culminaram na crise do Petróleo nos Estados Unidos, tais como o aumento dos preços com o declínio da oferta, o recesso econômico e o aumento da competição do setor, com novas unidades sendo implantadas na Europa e no Japão. Desse modo, com o aumento da participação dos países em desenvolvimento (no Oriente Médio e Extremo e em menor proporção, na América Latina) e das empresas estatais, diversas mudanças ocorreram. Contudo, essas mudanças geopolíticas também foram responsáveis por diversas crises e conflitos (BASTOS, 2009).

No Brasil, apesar das buscas pelo petróleo serem datadas do mesmo período em que se começou a explorá-lo nos Estados Unidos, somente em 1939 a primeira jazida foi encontrada (DIAS, J. L. M.; QUAGLINO, 1993; MORAIS, 2013).

De acordo com Morais (2013), a Petrobras foi criada em 1953 com o objetivo de buscar a autossuficiência brasileira em petróleo. Em seu período inicial a empresa descobriu importantes campos de petróleo no Nordeste, porém em volumes insuficientes. Com isso, a exploração voltou-se para o campo marítimo, com perfurações de poços no litoral

nordestino. Até que em 2006 descobriram-se as gigantes reservas de petróleo na camada geológica do Pré-sal, que permitiram suprimir a demanda nacional, e ainda, ampliar as exportações de petróleo com o aperfeiçoamento dos sistemas de produção.

De acordo com o site da Petrobras (2016), a exploração do petróleo no Pré-Sal em águas profundas já é uma realidade consolidada e assim a empresa espera alcançar uma produção de óleo e gás de 3,41 milhões de barris de óleo equivalente por dia (boed), com um investimento de US\$ 60,6 bilhões até 2021. Para isso, novas plataformas entraram em operação e outras estão sendo recuperadas, reduzindo o declínio de produção anual, através do Programa de Aumento da Eficiência Operacional (PROEF).

No mundo foram produzidos 91,7 milhões de barris de petróleo/dia em 2015, o que representa um aumento de 3,2 % em relação a 2014. Entre os maiores produtores, os Estados Unidos ficaram em primeiro lugar, seguido pela Arábia Saudita e pela Rússia, enquanto o Brasil ficou em 12º lugar. O Brasil é o quinto maior mercado consumidor, o que representa cerca de 3,3% do total mundial. Já em relação à capacidade efetiva de refino, o Brasil produziu 2,3 milhões de barris/dia, um aumento de 1,8%, colocando-se em 8º no ranking de 2015 (ANP, 2016b).

O mercado petroquímico e, conseqüentemente, a exploração do petróleo vem se expandido ao longo do tempo. Com isso, enquanto as técnicas de exploração e refino do material seguem em constante evolução, busca-se nos dias atuais tecnologias mais limpas e que permitam produzir combustíveis com menor teor de contaminantes, bem como explorar de modo eficiente o petróleo em águas profundas.

2.1.2 Compostos sulfurados

O enxofre é o terceiro elemento em maior concentração presente no petróleo bruto, sendo considerado um teor médio de 0,65 % (em massa) (THOMAS, 2001). Além disso, tem-se observado um aumento na carga deste contaminante presente no petróleo bruto, o que implica um grave problema ao setor. O teor de enxofre orgânico no óleo cru é variável e pode chegar até 30.000 ppm, enquanto que no óleo diesel, por exemplo, está na ordem de 5.000 ppm, excedendo os limites aceitáveis para comercialização (DOBLE; KUMAR, 2005).

Este elemento pode estar presente no petróleo na forma de sulfeto, polissulfetos, benzotiofenos e seus derivados, como em moléculas policíclicas com átomos de nitrogênio e oxigênio, ou ainda,

como gás sulfídrico, dissulfeto de carbono, sulfeto de carbonila e na forma elementar (THOMAS, 2001).

A presença do enxofre no petróleo causa problemas de processamento, redução da qualidade dos produtos e gera prejuízos ambientais. Entre os efeitos indesejáveis, pode-se destacar o aumento da estabilidade das emulsões e da corrosividade dos produtos, envenenamento dos catalisadores empregados e a produção de gases tóxicos (SO_2 e SO_3), além de determinar a cor e o odor dos produtos finais (THOMAS, 2001).

Ainda em relação à questão ambiental, a combustão dos produtos derivados do petróleo para obtenção de energia produz óxidos de enxofre, que em contato com a umidade do ar, transformam-se em ácidos (H_2SO_4 e H_2SO_3), responsáveis pela ocorrência da chuva ácida (DOBLE; KUMAR, 2005; THOMAS, 2001). Os gases ácidos também são nocivos à saúde humana, o H_2S pode causar desde queimaduras, tonturas, asfixias e até mesmo levar a morte, dependendo da concentração e tempo de exposição (AMOS; MOHAMMED; YARO, 2010; GUPTA; IBRAHIM; AL SHOAIBI, 2016; KOHL; NIELSEN, 1997).

Para tentar solucionar estes problemas, diversos países têm tomado medidas para controlar a emissão de óxidos de enxofre, como limitar através de rigorosas normas impostas pelas agências regulamentadoras as emissões de enxofre nas centrais elétricas e aumentar as restrições quanto aos níveis de enxofre presentes nos combustíveis, (DOBLE; KUMAR, 2005; MONTICELLO, 2000)

2.1.3 Teor de Enxofre: Legislação

O nível de enxofre permitido nos combustíveis vem caindo drasticamente nas últimas décadas, assim em 2009 alguns países como Estados Unidos, Japão e a União Europeia já admitiam uma concentração máxima entre 10 e 15 ppm (BONIEK et al., 2014; MARCELIS, 2002; QUIAN, 2008; SONG, 2003).

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) é responsável por regulamentar as atividades que integram as indústrias de petróleo, gás natural e de biocombustíveis no Brasil. Entre as suas atribuições, a ANP estabelece as especificações quanto ao controle de qualidade dos produtos derivados de petróleo no território nacional.

Deste modo, a agência tem implementado normas mais rígidas quanto aos níveis aceitáveis de enxofre e outros contaminantes presentes

nos combustíveis fósseis, devido aos impactos ambientais causados pela emissão de gases poluentes na atmosfera.

A Resolução ANP nº 3 de 27 de janeiro de 2016 define os limites de qualidade para a comercialização de óleo combustível. Na Tabela 3 observam-se as formas de comercialização do óleo combustível, bem como os métodos de ensaio para análise deste parâmetro. O óleo combustível é classificado em OCA e OCB em relação aos limites para o teor de enxofre e os índices um e dois, referem-se ao limite de viscosidade, onde OCA1 e OCB1 são menos viscosos do que OCA2 e OCB2. A Resolução ANP nº 3 diz ainda que o teor máximo de 3,0 % em massa será permitido desde que atendam aos limites estabelecidos pelo órgão ambiental da jurisdição. No entanto, em regiões metropolitanas é obrigatória a comercialização de óleo combustível com no máximo 1% em massa de enxofre.

Tabela 3 – Especificação de Óleos Combustíveis.

Características	Unidade	Tipo				Método	
		OCB1	OCA1	OCB2	OCA2	ABNT	ASTM
Teor de Enxofre, máx.	% massa	1,0	2,0	1,0	2,0	NBR 15546	D1552 D2622 D4294 D5453

Fonte: ANP (2016a).

Já as especificações para o óleo diesel de uso rodoviário estão contidas no Regulamento Técnico da ANP nº 4/2013, e são definidas pela Resolução nº 50 de 23 de dezembro de 2013, modificada pela Resolução nº 69 de 23 de dezembro de 2014, buscando atender ao Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores – PROCONVE.

Sendo assim na Tabela 4 observa-se a classificação do óleo diesel de uso rodoviário quanto a concentração máxima de enxofre permitida, bem como os métodos de ensaio para este parâmetro.

Tabela 4 – Especificação do óleo diesel de uso rodoviário.

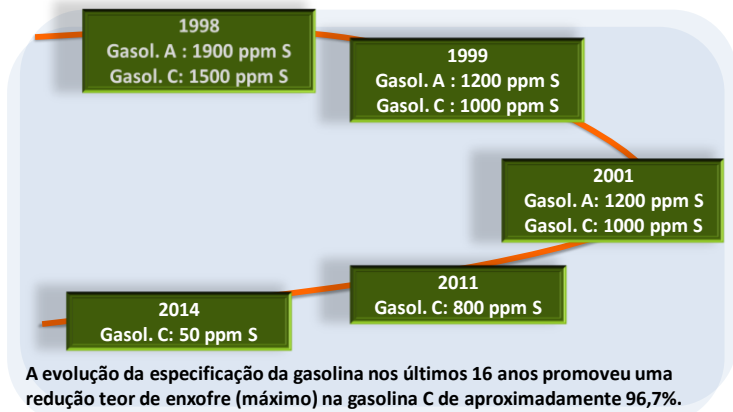
Característica	Unidade	Limite		Método		
		Tipo A e B	S10	500	ABNT/NBR	ASTM/EN
		S10				
Enxofre total máx.	mg/kg	10,0	-	-	D2622 D5453 D7039 D7212 D7220	
		-	500	14533	D2622 D4294 D5453 D7039 D7220	

Fonte: ANP (2014).

Segundo o Art. 4º da Resolução ANP nº 50 de 23 de dezembro de 2013 é obrigatório a comercialização dos óleos diesel A e B com teor de enxofre de até 500 mg/kg em todo território nacional, sendo que estes se diferem quanto a adição ou não de biodiesel. Contudo, nas frotas cativas de ônibus urbanos e nos municípios de Belém, Fortaleza e Recife e suas regiões metropolitanas é obrigatório a comercialização do óleo diesel B S10. Ressalta-se ainda, que houve uma evolução gradativa nos limites impostos quanto à concentração de contaminantes como o enxofre, no óleo diesel. Em 1955 este limite era de 10.000 ppm, por exemplo, segundo a Resolução CNP nº 5, elaborada pelo Conselho Nacional do Petróleo (CNP), órgão responsável pelo setor naquele momento.

Já as especificações para as gasolinas de uso automotivo estão contidas no Regulamento Técnico da ANP nº 3/2013 e são regulamentadas pela Resolução ANP nº 30 de 29 de junho de 2015, que altera a Resolução ANP nº 40 de 25 de dezembro de 2013. Anteriormente a publicação desta, a gasolina deveria atender à tabela de especificação contida no Regulamento Técnico 7/2011, parte integrante da Resolução ANP nº 57, de 20 de outubro de 2011. Na Figura 1 pode-se observar a evolução do limite máximo permitido para o teor de enxofre na gasolina desde 1998, conforme especificações da ANP.

Figura 1 – Evolução dos limites impostos pela ANP na concentração de enxofre na gasolina automotiva.



Fonte: Portal Brasil (2016).

A Tabela 5 traz então, as especificações para o teor de enxofre máximo permitido para a gasolina, assim como os métodos de ensaio para este parâmetro, conforme a Resolução ANP Nº 30 de 29 de junho de 2015.

Tabela 5 – Especificações das gasolinas Comum e Premium.

Característica	Unidade	Limite				Método
		Gasolina Comum		Gasolina Premium		
		A	C	A	C	ASTM
Teor de Enxofre, máx.	mg/kg	-	50	-	50	D2622
		-	50	-	50	D3120
		-	50	-	50	D5453
		-	50	-	50	D6920
		-	50	-	50	D7039
		-	50	-	50	D7220

Fonte: ANP (2015).

A gasolina Premium apresenta maior octanagem em relação a comum e, por isso, melhora o desempenho dos motores automotivos. Enquanto que a diferença entre a gasolina tipo A e a gasolina do tipo C, está na ausência ou não de etanol anidro. O novo limite máximo de 50 miligramas por quilograma (mg/kg) de enxofre total na gasolina,

assemelha-se àquela que é comercializada nos Estados Unidos, Canadá e Europa. O intuito da ANP é reduzir a emissão de enxofre na atmosfera em 94% e a emissão de poluentes em até 59%, visando melhorar a qualidade do ar e, conseqüentemente, diminuir os casos de doenças respiratórias (PORTAL BRASIL, 2013).

2.2 GASÓLEO PESADO

A composição dos derivados de petróleo varia dos mais leves aos pesados, uma vez que a relação carbono e hidrogênio no petróleo também não é constante. Quando o petróleo é dito leve significa que ele produz em maior proporção hidrocarbonetos com menor peso molecular como gás liquefeito de petróleo (GLP), nafta, querosene e diesel. Por outro lado, os petróleos pesados produzem frações pesadas em maior quantidade como gasóleos de vácuo e resíduos de vácuo (MORAIS, 2013).

O gasóleo é uma fração intermediária de hidrocarboneto obtida na unidade destilação vácuo (gasóleo de vácuo) e na etapa de coqueamento retardado (gasóleo de coqueamento). Ambos são empregados para conversão em frações mais leves e com maior valor agregado como o GLP e de gasolina (ANP, 2016). O gasóleo leve é um pouco mais pesado que o óleo diesel, deste modo, em certas condições ele pode até ser incorporado ao mesmo (ANP, 2016; MARIANO, 2001).

2.2.1 Constituintes aromáticos e sulfurosos

Para a indústria petroquímica é essencial conhecer a composição química do gasóleo pesado para definir sua aplicabilidade. No entanto, esta é uma tarefa árdua, devido a complexidade de compostos individuais presentes (ÁVILA et al., 2011). Deste modo, Ávila e colaboradores (2011) estudaram três amostras brasileiras de gasóleo pesado (nomeadas RO-59, RO-82 e AL-35) e os resultados quantitativos obtidos para os compostos aromáticos sulfurosos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração ($\mu\text{g/g}$) dos componentes identificados das amostras de gásóleo pesado.

Nome do composto ou classe	Composição	Concentração ($\mu\text{g/g}$)		
		AL-35	RO-59	RO-82
Benzonaftatiofenos	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{S}$	121,9	62,6	119,8
C1-Alquilbenzonaftatioafenos	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{S}$	450,9	1,8	732,4
C2-Alquilbenzonaftatioafenos	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{S}$	346,1	451,9	759,5
C3-Alquilbenzonaftatioafenosenes	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{S}$	116,4	215,4	445,5
Tetrahidrocriseno-C21	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}$	212	163	440,4

Fonte: Ávila et al (2011).

As amostras foram quantificadas por cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente, acoplada a um detector por espectrometria de tempo-de-voe de massa ($\text{GC}\times\text{GC}\text{-TOFMS}$).

A mesma técnica foi empregada para identificar os compostos orgânicos de enxofre em uma amostra de GOP oriunda do processo de pré-fracionamento, conforme apresentado na Tabela 7 (MACHADO et al., 2013).

Tabela 7 – Identificação que compostos orgânicos de enxofre em gásóleo pesado.

(continua)

Classe	Subclasse	Fórmula molecular
	C0-BT	$\text{C}_8\text{H}_6\text{S}$
	C1-BT	$\text{C}_9\text{H}_8\text{S}$
	C2-BT	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{S}$
C3-alkilbenzenos	C3-BT	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{S}$
C4-alkilbenzenos	C4-BT	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{S}$
C5-alkilbenzenos naftaleno	C5-BT	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{S}$
C1-alkilnaftalenos	C0-DBT	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{S}$
	C1-DBT	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{S}$
C2-alkilnaftalenos	C2-DBT	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{S}$
C3-alkilnaftalenosfenantreno	C2-NT	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{S}$
C1-Alquilfenantreno	C3-DBT	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{S}$
C2-Alquilfenantreno	C4-DBT	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{S}$
C3-Alquilfenantreno		

(conclusão)

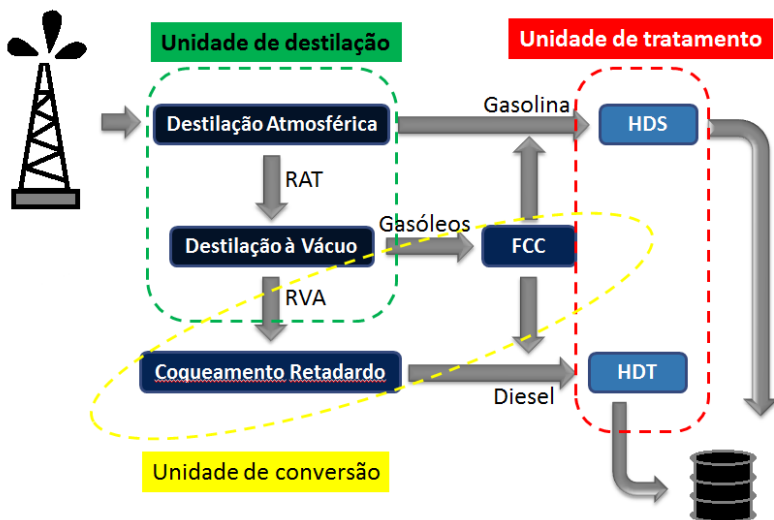
Classe	Subclasse	Fórmula molecular
C4-Alquilfenantreno	C0-DHDBT	$C_{12}H_{10}S$
C5-Alquilfenantreno	C1-DHDBT	$C_{13}H_{14}S$
C6-Alquilfenantreno	BNT	$C_{16}H_{14}S$
C7-Alquilfenantrenopireno	C1-DHBNT	$C_{17}H_{14}S$
C1-Alquilpirenos	C1-THBNT	$C_{17}H_{16}S$
C2-Alquilpirenos	C1-BNT	$C_{17}H_{12}S$
	C2-DHBNT	$C_{18}H_{16}S$
C3-Alquilpirenos	C0-DNT	$C_{20}H_{12}S$
C4-Alquilpirenos	DHDNT	$C_{20}H_{14}S$
C5-Alquilpirenos		$C_{15}H_{14}S$
C6-Alquilpirenos		$C_{16}H_{12}S$

Fonte: Machado et al. (2013).

2.2.2 Produção e aplicação

O refino do petróleo consiste em um conjunto de processos físicos e químicos aplicados ao petróleo bruto para transformá-lo em seus derivados de valor comercial, sendo estes processos classificados em: separação, conversão, tratamento e auxiliares (ABADIE, 2002; D'AGOSTO, 2015). Na Figura 2 apresenta-se um esquema com a configuração básica das unidades de processo presentes em uma refinaria.

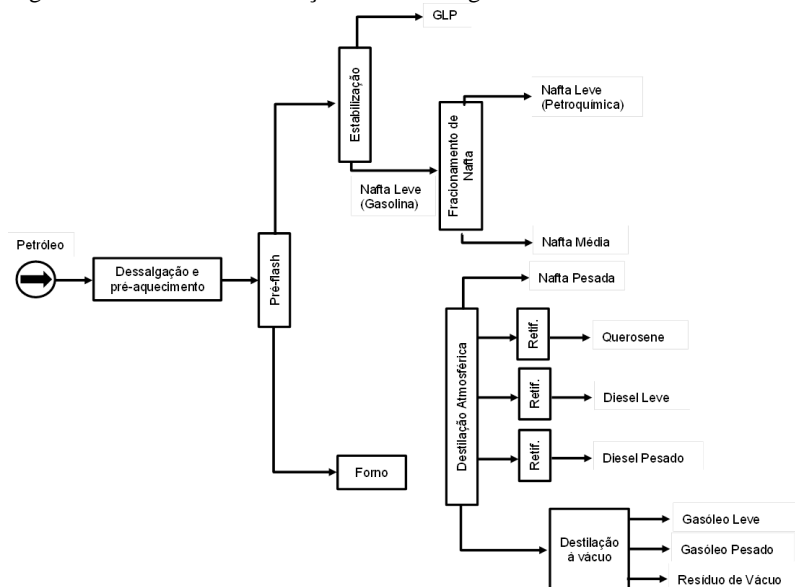
Figura 2 – Esquema de refino de petróleo simplificado.



Fonte: Autora (2017).

A destilação atmosférica e a destilação a vácuo são os principais processos de separação, sendo que a unidade de destilação é essencial para qualquer esquema de refino. Nesta unidade, ilustrada através da Figura 3, ocorre o desmembramento das frações básicas do petróleo de acordo com as faixas de temperatura de ebulição de cada composto (D'AGOSTO, 2015; MORAIS, 2013). A separação primária ocorre em uma coluna de destilação atmosférica, obtendo assim entre outras frações o gasóleo leve (240 a 300 °C) e o gasóleo pesado (300 a 360 °C). O resíduo de fundo (Resíduo Atmosférico - RAT) gerado nesta etapa, não se vaporiza devido ao seu elevado peso molecular, deste modo, por meio da destilação a vácuo, que opera a menores pressões, obtêm-se frações mais leves a partir do RAT, como os gasóleos e o resíduo de vácuo (MORAIS, 2013).

Figura 3 – Unidade de destilação em três estágios.



Fonte: Adaptado de Abadie (2002).

Os processos de conversão se dividem em dois grandes grupos: o craqueamento térmico e o catalítico e, normalmente, são operados em condições severas de pressão e temperatura, no caso deste último, ocorre apenas na presença de um catalisador (MORAIS, 2013). O craqueamento promove reações de quebra, reagrupamento e reestruturação das moléculas, devido a sua natureza química (D'AGOSTO, 2015).

Os gasóleos são empregados como carga dos processos de conversão, como por exemplo, no craqueamento catalítico, também conhecido como FCC (*Fluid catalytic cracking*), para obtenção de frações mais leves como GLP, óleos lubrificantes, óleo Diesel e outros. O gasóleo leve pode ainda ser agregado ao óleo Diesel, desde que seu ponto de ebulição não seja muito elevado (ABADIE, 2002; MORAIS, 2013). Entre os processos térmicos de craqueamento, o coqueamento retardo permite craquear resíduos para produzir uma quantidade ainda maior de gasóleo (ABADIE, 2002).

Já os processos de tratamento visam remover os contaminantes presentes nos derivados obtidos, atendendo os padrões de qualidade exigidos para comercialização dos produtos finais. O Hidrotratamento

ou Hidroacabamento estão entre os processos convencionais empregados para promover a remoção de impurezas de combustíveis e de frações pesadas (MORAIS, 2013).

2.3 TRATAMENTO DE COMPOSTOS ORGANOSSULFURADOS EM DERIVADOS DE PETRÓLEO

As frações retiradas ao longo dos estágios da coluna de destilação atmosférica, bem como aquelas provenientes dos processos de conversão nem sempre se enquadram nas especificações requeridas. Deste modo, os processos de tratamento têm como finalidade atender os requisitos quanto à qualidade ambiental dos combustíveis e produtos derivados de petróleo, eliminando os efeitos indesejáveis dos compostos contaminantes (ABADIE, 2002; D'AGOSTO, 2015; MORAIS, 2013).

Através da hidrogenação dos fluxos provenientes da etapa de conversão, por exemplo, promove-se a remoção de contaminantes, melhorando a estabilidade dos produtos, evitando a formação de gomas e alterações na cor, além de minimizar a emissão de gases tóxicos na atmosfera, que se formam durante a combustão dos combustíveis fósseis (BONIEK et al., 2014; MORAIS, 2013).

No entanto, as especificações de enxofre estão cada vez mais rigorosas, tornando necessário que as empresas petroquímicas desenvolvam tecnologias capazes de promover a dessulfurização profunda. Entre as tecnologias de remoção de enxofre, empregadas atualmente, pode-se citar: hidrodessulfurização (HDS), dessulfurização oxidativa (ODS), dessulfurização biocatalítica (BDS), extração de amina e dessulfurização de gases de combustão (GUPTA; IBRAHIM; AL SHOAIABI, 2016).

2.3.1 Hidrodessulfurização

A hidrodessulfurização (HDS) emprega processos químicos catalíticos para redução do teor de enxofre no gás natural e em produtos refinados de petróleo. A HDS também é capaz de promover a remoção de nitrogênio e impurezas metálicas (CHANDRA SRIVASTAVA, 2012; GUPTA; IBRAHIM; AL SHOAIABI, 2016; MORAIS, 2013; YANG et al., 2007). No entanto, a tecnologia promove o tratamento catalítico através da quebra da cadeia carbônica, na presença de hidrogênio e em condições severas de pressão (150 a 250 psi) e temperatura (200 a 425 °C), e com isso, os compostos sulfurosos são reduzidos a sulfeto, possibilitando a sua remoção (DOBLE; KUMAR,

2005; ERDOĞAN et al., 2014; IZUMI et al., 1994; SOLEIMANI; BASSI; MARGARITIS, 2007; YANG et al., 2007).

As condições de processo necessárias são diretamente afetadas pelo tipo de hidrocarboneto e pela eficiência de dessulfurização requerida. Contudo, a HDS não é eficiente para a remoção de certas moléculas de enxofre, presentes, principalmente, em frações mais pesadas, como os gasóleos. Cerca de 70% do enxofre se encontra na forma de compostos poliaromáticos heterocíclicos, como dibenzotiofeno (DBT) e seus derivados alquilados, recalcitrantes para HDS (CHEN et al., 2009; DOBLE; KUMAR, 2005; LE BORGNE; QUINTERO, 2003; MONTICELLO, 2000; SOLEIMANI; BASSI; MARGARITIS, 2007; YANG et al., 2007).

Além disso, durante a HDS a exposição às elevadas temperaturas e pressões e a ocorrência da reação de hidrogenação dos compostos oleofínicos, resulta na redução do poder calorífico dos combustíveis. Deste modo, os combustíveis tratados são submetidos a um novo fluido catalítico para compensar essa perda, o que gera um aumento no custo de processo. Durante o tratamento, ocorre ainda, a formação de H_2S , o que reduz a vida útil dos equipamentos (BONIEK et al., 2014; HERNÁNDEZ - MALDONADO; YANG, 2004; MONTICELLO, 1995).

E por fim, estas unidades possuem elevado custo de implantação e operação. Dessa maneira, para atender as novas regulamentações quanto ao teor de enxofre, estima-se que o setor deve investir 37 bilhões de dólares em novos equipamentos, com um custo operacional extra de 10 bilhões de dólares anuais (DOBLE; KUMAR, 2005).

Neste contexto, o uso da biodessulfurização (BDS) tem despertado o interesse da indústria e de pesquisadores, uma vez que esta técnica possui menores custos e é menos poluente, podendo assim complementar ou até mesmo vir a substituir a HDS (BONIEK et al., 2014; GUPTA; ROYCHOUDHURY; DEB, 2005; KILBANE; STARK, 2016).

2.3.2 Dessulfurização biocatalítica

O processo de dessulfurização biocatalítica, também chamado de biodessulfurização (BDS) é composto por um sistema bifásico. Na fase aquosa encontram-se as células que atuam como biocatalisadores, interagindo com a fase orgânica para promover a clivagem enzimática da ligação carbono-enxofre nos hidrocarbonetos de petróleo. Os micro-

organismos empregados sintetizam enzimas altamente seletivas e específicas, capazes de metabolizar o enxofre presente nos compostos heterocíclico através de uma via metabólica específica (BONIEK et al., 2014; DAVOODI-DEHAGHANI; VOSOUGHI; ZIAEE, 2010; KILBANE, 2006; KILBANE; STARK, 2016; TAKADA et al., 2005).

As pesquisas nessa área buscam isolar e caracterizar estas bactérias, identificar a via metabólica adotada e os genes de dessulfurização presentes nestes micro-organismos. Os estudos visam ainda aumentar a tolerância aos solventes e promover melhorias genéticas, a fim de maximizar a remoção de compostos sulfurosos e a velocidade específica de degradação (DOBLE; KUMAR, 2005).

Na Tabela 8, pode-se observar um quadro comparativo entre os processos de hidro e biodessulfurização (DOBLE; KUMAR, 2005).

Tabela 8 – Comparação entre as Tecnologias de Hidro e Biodessulfurização.

Hidrodessulfurização	Biodessulfurização
Maior custo de produção.	Menor custo de produção e capital (cerca de 50 %)
Elevado consumo de energia.	Economia de energia.
Condições severas de temperatura e pressão.	Temperatura e pressão ambiente requerida.
Necessita de uma planta de geração de hidrogênio. O hidrogênio é requerido para redução de enxofre.	Não necessita planta de hidrogênio.
Gera subprodutos tóxicos.	Não produz subprodutos tóxicos.
Aumenta a quantidade de olefinas saturadas, reduzindo a octanagem.	Não ocorre saturação de olefinas, então a qualidade do produto final não é reduzida.

Fonte: Doble e Kumar (2005).

As características citadas mostram que a biodessulfurização é uma técnica interessante de tratamento das frações de petróleo do ponto de vista ambiental e econômico. No entanto, para a aplicabilidade do processo deve-se garantir a qualidade do produto final, oferecer um ambiente seguro para o operador do biorreator e o sistema de recuperação das fases deve ser adequado e econômico (DOBLE; KUMAR, 2005).

2.3.2.1 Bactérias redutoras de sulfato: *Rhodococcus erythropolis*

Alguns gêneros bacterianos como *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Bacillus* e *Lysinibacillus* utilizam o enxofre para o seu crescimento e para a manutenção de suas atividades e, por isso, foram aplicados em diversos estudos de biodessulfurização, principalmente, com DBT, um composto sintético modelo (AGARWAL et al., 2016; BHASARKAR; DIKSHIT; MOHOLKAR, 2015). No entanto, atualmente os pesquisadores têm voltados seus esforços para aplicar a BDS em frações reais de petróleo.

Outros trabalhos também destacam o interesse em isolar tanto novas estirpes psicrófilas, que apresentam elevada capacidade de dessulfurização, quanto estirpes termófilas, uma vez que no processo de refino de petróleo são requeridas temperaturas elevadas, favorecendo assim o desenvolvimento dessas estirpes (BHATIA; SHARMA, 2010; BONIEK et al., 2014; KONISHI et al., 2000). Desse modo, já foram encontradas novas estirpe psicrófilas dessulfurizantes no continente antártico e uma espécie gram-negativa conhecida como *Sphingomonas subarctic* no Japão (BONIEK et al., 2014; GUNAM et al., 2006, 2013).

Outra alternativa consiste em isolar novas estirpes de amostras de solo contaminando com elevada concentração de hidrocarbonetos, deste modo, adaptadas à condições similares de processo, pode-se maximizar a sua capacidade de utilizar os nutrientes disponíveis (BONIEK et al., 2010).

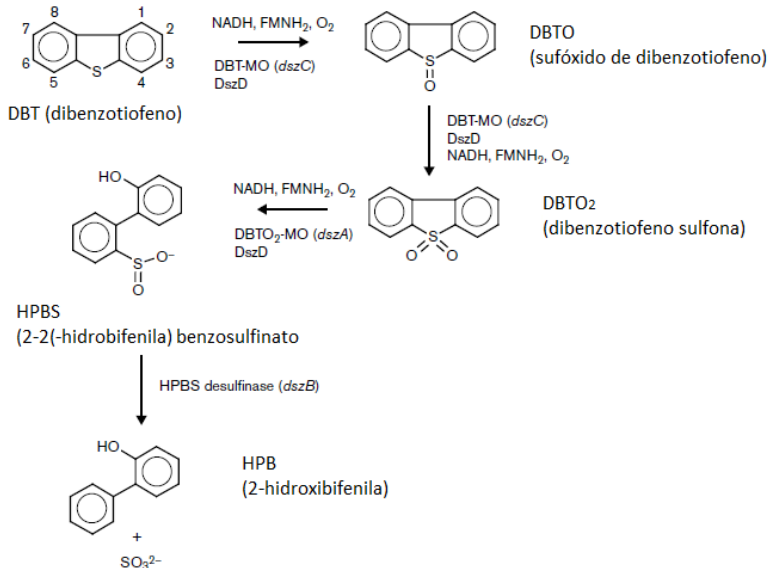
Em 1990 o Instituto de Tecnologia de Gás (IGT) dos Estados Unidos, expôs espécies bacterianas presentes em amostras de solo contaminados com enxofre a agentes mutagênicos. Entre o grupo de novas estirpes isoladas, duas foram capazes de romper a ligação carbono-enxofre, sendo estas espécies denominadas *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 e *Bacillus sphaericus* IGTS9 (BONIEK et al., 2014; IZUMI et al., 1994; KILBANE; JACKOWSKI, 1992).

Posteriormente a estirpe *R. rhodochrous* IGTS8 mostrou-se altamente similar ao *R. erythropolis* IGTS8, tornando-se alvo de diversas pesquisas, assim como outras estirpes, para compreensão da biologia molecular e genética envolvida nos processos de BDS (ABBAD-ANDALOUSSI et al., 2003; BONIEK et al., 2014; DENOME; OLSON; YOUNG, 1993; KILBANE; ROBBINS, 2007; MONTICELLO, 2000).

O mecanismo de dessulfurização pode seguir a via metabólica Kodama (anel destrutivo), onde o micro-organismo promove a degradação do enxofre, reduzindo o poder calorífico do combustível ou

a via 4S, onde a estirpe promove a dessulfurização do material, mantendo inalterada a fração de hidrocarboneto. Deste modo, o emprego de estirpes que promovam a dessulfurização através da via 4S são as mais interessantes. Na Figura 4 pode-se observar a rota de dessulfurização do DBT através da via 4S (DOBLE; KUMAR, 2005; MONTICELLO, 2000). No entanto, ressalta-se que as enzimas de dessulfurização também podem metabolizar através da via 4S uma gama de outros compostos químicos, como sulfetos, dissulfuretos, mercaptanos, sulfóxidos, sulfonas, sulfinatos, sulfonatos, tiofenos e benzotiofenos (KILBANE; STARK, 2016).

Figura 4 – Via 4S de dessulfurização do DBT.



Fonte: Adaptado de Monticello (2000).

Os genes primários envolvidos na dessulfurização biocatalítica do DBT através da via 4S, chamados de *dsz*, foram isolados e clonados com *Rhodococcus erythropolis IGTS8*, sendo posteriormente transferidos para outros micro-organismos, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida*, para obtenção de novas estirpes recombinantes capazes de dessulfurizar os compostos poliaromáticos sulfurosos heterocíclicos (DOBLE; KUMAR, 2005; GRAY; MRACHKO; SQUIRES, 2003; MONTICELLO, 2000).

Assim a via metabólica 4S pode ser então, dividida em quatro etapas, como mostra a Figura 5. Inicialmente, as moléculas sulfurosas são transferidas da fase oleosa para dentro das células e é por isso, que estirpes como *Rhodococcus spp.* têm se demonstrado capazes de metabolizar muitas moléculas insolúveis. O gene dessulfurizante *dsz*, provavelmente presente no citoplasma das células, é solúvel e ao entrar em contato com as moléculas Cx-DBT ocorre uma sequência de oxidações. No entanto, estes genes ao serem transferidos para outras estirpes como *E. coli* e *P. putida* apresentam um mecanismo específico de transporte hidrofóbico de compostos como o DBT para a fase aquosa antes de serem introduzidos nas células. E ainda, em certas situações pode ocorrer uma mutação, onde a estirpe não realiza o transporte do DBT (DOBLE; KUMAR, 2005).

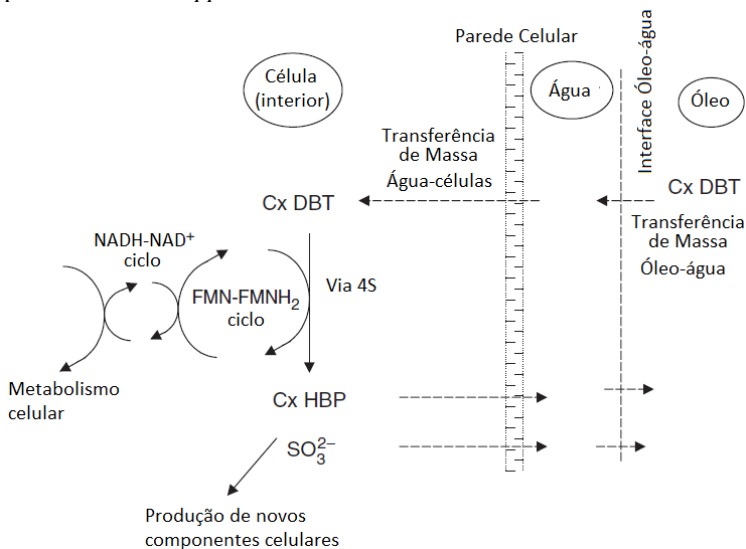
Nas etapas subsequentes do processo de dessulfurização do DBT por *Rhodococcus spp* temos um sistema multienzimático, composto por 4 enzimas: DBT mono-oxigenase (DszC), DBT sulfona mono-oxigenase (DszA), flavina redutase (DszD) e HPBS desulfinaase (DszB), produtos dos genes dessulfurizantes *dszC*, *dszA*, *dszD* e *dszB*, respectivamente. (DOBLE; KUMAR, 2005; MONTICELLO, 2000).

Assim, na segunda etapa, a enzima monoxigenase DBT (FMNH₂: DBT oxidoreductase) catalisa a oxidação de DBT para sulfóxido e, em seguida, catalisa a conversão de sulfóxido à sulfona. Para isso, a enzima realiza a transferência de um elétron do mononucleótido de flavina reduzida (FMNH₂) ao DBT para produzir flavina oxidada (FMN), sulfóxido DBT (DBTO) e sulfona DBT (DBTO₂), catalisando a oxidação de DBT para sulfóxido e deste para sulfona (DOBLE; KUMAR, 2005).

No próximo passo ocorre a clivagem da primeira ligação carbono-enxofre (C-S), catalisada por sulfona de DBT monooxigenase (FMNH₂: DBTO₂ oxidoreductase) que transfere um segundo elétron de mononucleótido de flavina (FMNH₂) ao DBTO₂ (DOBLE; KUMAR, 2005).

O passo final é catalisado pela enzima desulfinaase consiste na liberação do enxofre como sulfito e na produção de uma molécula hidrofóbica aromática de 2-hidroxibifenila (HPB), que retorna à fração orgânica, mantendo o valor energético do combustível. No entanto, o enxofre pode ainda ser assimilado pelas células do biocatalisador, assim como o sulfito formado pode ser oxidado a sulfato. (BONIEK et al., 2014; DOBLE; KUMAR, 2005; MONTICELLO, 2000).

Figura 5 – Esquema básico das etapas de dessulfurização de um óleo pela via 4S por *Rhodococcus spp.*



Fonte: Adaptado de Doble; Kumar (2005).

No entanto, há ainda algumas questões a serem exploradas, como a identificação de quantas etapas estão envolvidas na transferência de moléculas de Cx-DBT do óleo à enzima, na primeira fase da via 4S, se a transferência de massa entre as fases realmente não é uma etapa limitante e ainda, como Cx-HBP ou Cx-HPBS são excretados pelas células (DOBLE; KUMAR, 2005).

Em relação aos genes de dessulfurização, estudos recentes já identificaram três novos genes, designados como *bdsABC*, na estirpe *Gordonia C-6*, capazes de promover a dessulfurização do DBT, transformando-o em o-hidroxiestireno (CHAUHAN et al., 2015; WANG et al., 2013)

2.3.2.2 Perspectivas e desafios

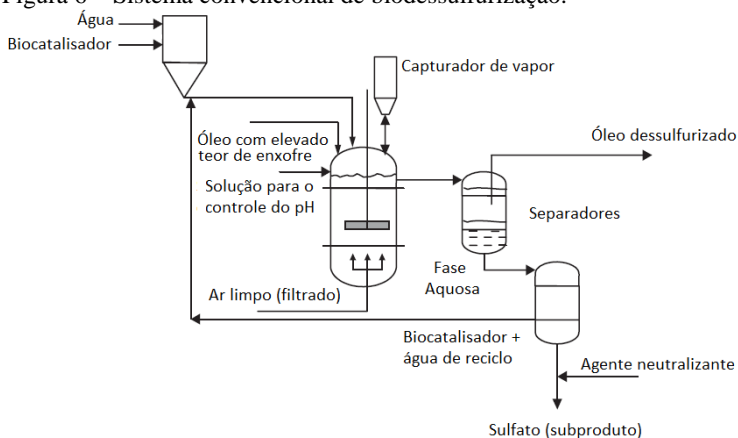
Na aplicação da tecnologia de biodessulfurização é necessário desenvolver um reator que se adeque as características de processo, considerando, por exemplo, questões relacionadas à transferência de massa, relação volumétrica entre as fases, disponibilidade de oxigênio, além de um sistema de recuperação e separação das fases óleo-água (DOBLE; KUMAR, 2005; MONTICELLO, 2000; SETTI et al., 2003).

Sabe-se que a eficiência do processo é afetada pelo design do biorreator, pela especificidade, estabilidade e também pela atividade do biocatalisador, além disso, a razão volumétrica entre as fases pode ser um fator limitante para aplicação do processo em larga escala. Neste contexto, os pesquisadores buscam determinar as propriedades físicas das células de modo a melhorar a transferência de massa, além de tornar mais eficaz a separação das fases e a recuperação dos produtos (DOBLE; KUMAR, 2005; SETTI et al., 2003).

Diversas configurações têm sido empregadas, como reatores de elevação de ar, contadores de fase de emulsão com células livres e reatores de leito fluidizado com células imobilizadas. No entanto, geralmente, empregam-se reatores de tanque agitado (GUPTA; ROYCHOUDHURY; DEB, 2005; MCFARLAND et al., 1998).

Um esquema típico do processo de BDS pode ser visto na Figura 6, onde o biocatalisador, a fração de petróleo, o ar e uma pequena quantidade de água são carregados em um reator descontínuo. O efluente do reator é separado em duas correntes, uma delas composta pelo óleo que deve retornar ao processo de refino e a outra corrente é composta pela mistura de água, biocatalisador, enxofre segregado durante o processo e outros produtos de reação. Para garantir a recuperação da água de processo e do biocatalisador, uma segunda etapa de separação é realizada, permitindo que em parte voltem ao reator e sejam reutilizados (DOBLE; KUMAR, 2005).

Figura 6 – Sistema convencional de biodessulfurização.



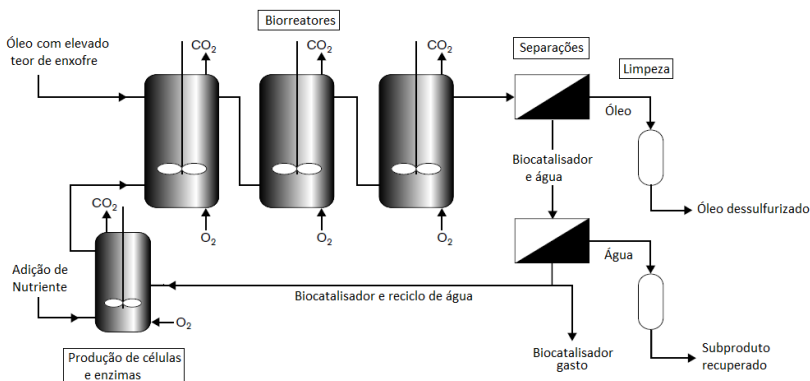
Fonte: Doble; Kumar (2005).

A técnica de biocatálise por transferência de fase inversa (IPTB) pode ser empregada para melhorar a transferência de massa e reduzir a inibição do biocatalisador por subprodutos acumulados durante a bioconversão, como sulfito, sulfato e compostos fenólicos. Neste caso, são usados receptores supramoleculares (ciclopropil-b-ciclodextrina), que recolhem seletivamente os compostos aromáticos de enxofre em solução nos compostos orgânicos, protegendo assim o micro-organismo (DOBLE; KUMAR, 2005; SETTI et al., 1999, 2003).

A adição de surfactantes no meio para a redução da viscosidade dos óleos pesados ou a própria natureza hidrofóbica de alguns micro-organismos, reduz a inibição da transferência de massa entre as fases. Com isso, forma-se uma emulsão que deve ser quebrada para recuperar o óleo dessulfurado, as células e separar os subprodutos. Neste caso, normalmente são empregados hidrociclones e filtros ou tanques para promover a separação das fases e para que sejam drenadas continuamente (DOBLE; KUMAR, 2005; LI; JIANG, 2013; YU et al., 1998).

A empresa norte-americana Energy Bio-Systems Corporation em parceria com outras cinco empresas, desenvolveu um sistema contínuo com reatores de multi-estágio, utilizando estirpes recombinantes *R. rhodochrous* IGTS8. Esta tecnologia pode ser empregada a fim de minimizar os gastos com a homogeneização do sistema e para superar a cinética lenta em sistema com baixas concentrações de enxofre. O projeto permite ainda o crescimento e a regeneração contínua do biocatalisador, dispensando a implantação de tanques externos. Na Figura 7 pode-se observar o esquema de processo compostos por três reatores com o intuito de atender as restrições norte-americanas de concentração de enxofre. O projeto, em escala piloto, vem sendo operado desde 1995 com capacidade de dessulfurizar cinco barris de petróleo por dia. No entanto, aplicação comercial desta biotecnologia ainda não é possível, devido a baixa a velocidade específica de degradação e a necessidade de repor a biomassa durante o processo. (BONIEK et al., 2014; DOBLE; KUMAR, 2005; GUPTA; ROYCHOUDHURY; DEB, 2005; LI et al., 1996; MONTICELLO, 2000; YU et al., 1998).

Figura 7 – Diagrama de fluxo do processo multi-estágio de BDS.



Fonte: Adaptado de Monticello, 2000.

Do ponto de vista industrial, a utilização de um organismo termofílico também pode ser uma alternativa interessante, uma vez que as temperaturas elevadas podem melhorar as velocidades de catálise enzimática, reduzir a contaminação bacteriana, e ainda, melhorar a estabilidade do biocatalisador (GRAY; MRACHKO; SQUIRES, 2003; MORYA; IYER; MOHOLKAR, 2008; SIVASANKAR; MOHOLKAR, 2009; SIVASANKAR; PAUNIKAR; MOHOLKAR, 2007).

Além disso, alguns estudos demonstraram que a cinética de dessulfurização pode ser melhorada através dos efeitos físicos e químicos da irradiação de ultrassom. Neste caso, são gerados turbulências de baixa intensidade que reduzem a limitação de transferência de massa e ocorre a formação de radicais altamente reativos que aceleram as reações químicas (AGARWAL et al., 2016; SIVASANKAR; MOHOLKAR, 2009; WARMOESKERKEN et al., 2002).

E por fim, a nanobiotecnologia também fornece meios de melhorar o processo de BDS e superar entraves existentes para aplicação da tecnologia em larga escala. Alguns estudos mostraram que estirpes de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 promoveram uma dessulfurização 56% maior após serem recobertas com nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 . Neste caso, o biocatalisador pôde ser recuperado ao final do processo, expondo o sistema a um campo magnético (ANSARI et al., 2009; BONIEK et al., 2014; DERIKVAND; ETEMADIFAR; BIRIA, 2014)

Entre outras aplicações a biodessulfurização poderia ainda ser empregada na desnitrificação de combustíveis, na remoção de metais

pesados, na transformação de óleo bruto pesado em leves e na despolimerização de asfaltenos. Além disso, o processo pode se voltar para a obtenção de moléculas de Cx-HPBS, penúltimo produto do metabolismo 4S, que funciona de modo eficaz como detergente (DOBLE; KUMAR, 2005). A dessulfurização biocatalítica também pode ser empregada como um processo complementar para as tecnologias de dessulfurização oxidativa e adsorbtiva (JIANG et al., 2016; KILBANE; STARK, 2016; STANISLAUS; MARAFI; RANA, 2010). Estas técnicas apesar de produzirem combustíveis com baixas concentrações de enxofre geram, simultaneamente, fluxos residuais enriquecidos com compostos organossulfurados que poderiam ser convertidos a produtos químicos com maior valor agregado, como surfactantes, antibióticos, poliésteres e outros compostos químicos. Essas aplicações podem fomentar pesquisas adicionais e tornar o processo economicamente viável. (KILBANE; STARK, 2016).

Além dos problemas já mencionados que dificultam a aceitação da aplicação da técnica de biodessulfurização, é fundamental que as pesquisas encontrem alternativas para reduzir os custos com o meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos dessulfurizantes. E, por fim, estabelecer os métodos de imobilização do biocatalisador, uma vez que se torna muito difícil manter a assepsia dentro da indústria de refino, assim como garantir a qualidade do produto final e um elevado índice de recuperação dos combustíveis (ALVES; PAIXÃO, 2014; BONIEK et al., 2014; LI et al., 2009; MCFARLAND, 1999)

2.4 EMPREGO DE RESÍDUOS COMO MEIO DE CULTURA

As indústrias geram diversos materiais classificados como resíduos, que devido a sua quantidade e composição ou potencial poluidor é necessário tratá-los para uma adequada disposição final. No entanto, quando reutilizados ou aplicados como matéria-prima em um novo processo, pode-se agregar valor aos mesmos e ao serem consumidos, reduzindo a sua carga orgânica é possível minimizar os custos com o seu tratamento. (WOICIECHOWSKI et al., 2013).

O Brasil produz anualmente bilhões de toneladas de resíduos agroindustriais nos aglomerados urbanos e nas plantas industriais. Os volumes concentrados de resíduos, provenientes dos processos industriais, quando valorizados passam a ser classificados como subprodutos, agregando valor aos mesmos (WOICIECHOWSKI et al., 2013).

Deste modo, diversas pesquisas científicas têm recebido subsídios públicos e privados, incentivando o desenvolvimento de uma economia sustentável através da aplicação dos resíduos agroindustriais como insumos ou matérias-primas em processos com caráter biotecnológico, uma vez que estes materiais são recursos abundantes e renováveis, compostos por substratos essenciais para a obtenção de produtos com valor econômico (WOICIECHOWSKI et al., 2013).

Em bioprocessos, onde o cultivo de micro-organismos é a base de resíduos agroindustriais, são necessários certos cuidados com o armazenamento e transporte do material, manutenção da esterilidade e formulação do meio. Estes materiais fornecem nutrientes essenciais para o desenvolvimento de micro-organismos. Contudo, algumas vezes faz-se necessário suplementar este tipo de material, já que normalmente, são ricos em carboidratos, mas pobres em proteína. (WOICIECHOWSKI et al., 2013).

2.4.1 Manipueira

O cultivo da mandioca destaca-se entre as principais culturas produzidas no mundo, devido a sua elevada produtividade e capacidade de adaptação a diferentes ambientes. Deste modo, a mandioca é uma fonte básica de carboidratos na dieta de milhões de pessoas em todo o mundo. No entanto, as raízes frescas possuem teor proteico inferior a 1% e acumulam glicosídeos cianogênicos, principalmente, a linamarinase, que através de uma enzima hidrolítica da própria planta, libera entre outros compostos, cianeto que é altamente tóxico, mas que pode ser eliminado da massa ao triturar as raízes e remover o seu caldo. (WOICIECHOWSKI ET AL., 2013; VEIGA et al., 2016)

Em 2010 foram produzidos cerca de 230 milhões de toneladas de raízes de mandioca no mundo, sendo que o Brasil produziu cerca de $2,3 \times 10^7$ toneladas, colocando-se neste mesmo ano como o terceiro maior produtor (FAO, 2013; FERNANDES JÚNIOR, 2001).

Por outro lado, são gerados grandes volumes de vários resíduos sólidos e líquidos, principalmente, no processamento industrial da mandioca para a produção de farinha e amido. A manipueira é um resíduo líquido gerado na etapa de prensagem da massa de mandioca para a fabricação da farinha, representando 30% da matéria-prima processada. Este resíduo é constituído pelos componentes solúveis da raiz e compostos insolúveis em suspensão, apresentando assim elevada carga orgânica e de cianeto, o que o torna altamente agressivo ao meio ambiente. Contudo, não é possível estabelecer um padrão para a

concentração dos seus compostos, já que a composição da manipueira está relacionada com a variedade da raiz, a qualidade e o manejo das mesmas, além do modo como é processada na indústria (CEREDA; PANTAROTO, 2001; FERNANDES JÚNIOR, 2001; KUNZLER et al., 2013; SILVA et al., 2016; WOICIECHOWSKI ET AL., 2013; WOSIACKI; CEREDA, 2002).

Na Tabela 9, observa-se a composição média da manipueira de acordo com Barana (1996, 2000 apud WOICIECHOWSKI et al., 2013) e Cereda (1994 apud WOICIECHOWSKI et al., 2013).

Tabela 9 – Composição média da manipueira.

Variáveis	Cereda (1994)	Barana (1996)	Barana (2000)
Sólidos totais (%MS)	6,28	4,51	5,54
Sólidos voláteis (%MS)	5,23	3,87	4,76
DQO (g/L)	63,0	60,0	62,3
Cianeto (mg/L)	444,0	140,7	112,2
Nitrogênio (mg/L)	4.900	3.000	1242
Carbono (mg/L)	37.000	35.000	12.330
Fósforo (mg/L)	160	300	325
Potássio (mg/L)	1.863	3.800	1.972
Cálcio (mg/L)	227	400	838
Enxofre (mg/L)	195	200	60
Magnésio (mg/L)	405	600	326
Ferro (mg/L)	15,3	6,4	12,4
Cobre (mg/L)	1,1	1,4	3,1
Zinco (mg/L)	4,0	5,0	32,5
Manganês (mg/L)	3,7	3,5	2,2

Fonte: Woiciechowski et al. (2013).

O tratamento da manipueira consiste em deixá-la sob a ação de agentes naturais em lagoas de estabilização, no entanto, quando disposta em águas fluviais causa sérios impactos ambientais. Ainda assim, em ambas as situações, o amido, presente em grande quantidade nesse efluente, deixa de ser aproveitado economicamente. A toxicidade deste resíduo se deve a elevada concentração de carboidratos e pela presença cianeto, devido a hidrólise da linamarina, um glicosídeo cianogênico (GODOY, 1940; SUMAN et al., 2011; WOSIACKI; CEREDA, 2002).

No entanto, este resíduo pode ser empregado para irrigação, fertilização e até mesmo para o controle de ervas daninhas no campo, na produção de etanol, assim como substrato para diversos micro-organismos em processos por fermentação submersa, para a produção de

biomassa e biomoléculas (WOICIECHOWSKI ET AL., 2013; SUMAN et al., 2011). Dentro deste contexto, avaliou-se neste estudo, o potencial da manipueira como meio de cultura para o processo de dessulfurização microbiana, uma vez que é formado por uma combinação de açúcares como a glicose, a frutose, a sacarose e, sobretudo, o amido solúvel (BARROS et al., 2013), além de apresentar íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) como fonte de nitrogênio (BARROS; PONEZI; PASTORE, 2008).

2.4.2 Trub

A cerveja é uma bebida alcoólica produzida em larga escala, devido a grande demanda e aceitação que o produto ganhou em todo mundo ao longo do tempo. Apesar das novas tecnologias permitirem mitigar a geração de subprodutos, alguns resíduos intrínsecos à produção da bebida, ainda são produzidos em grandes volumes. (MATHIAS; MELLO, 2014).

Entre estes resíduos está o trub, que assim como o bagaço de malte e a levedura residual, apresenta elevado teor de umidade (entre 80 e 90 %), promovendo arraste de diversos substratos e a perda de cerca de 20 % da água empregada no processo. Com isso, produzem-se significativas quantidades de efluentes, entre 0,2 e 0,4 kg de trub úmido para cada hectolitro de cerveja (BRIGGS et al., 2004; PRIEST; STEWART, 2006)

Para garantir a qualidade final da cerveja e evitar problemas de processamento, devido ao tamanho das partículas do trub quente, é essencial reduzir a concentração do mesmo no mosto da cerveja. No entanto, ressalta-se que as partículas menores que não se sedimentam, podem afetar positivamente a fermentação do mosto, devido à presença de ácidos graxos e zinco, compostos necessários para o correto metabolismo de levedura. (KÜHBECK et al., 2006, 2007; KUNZE, 2014)

O trub quente apresenta um teor proteico entre 50 e 70 %, resultante principalmente da coagulação de proteínas com elevado peso molecular. Além disso, é composto ainda, por cátions, como Ca^{2+} , ácidos graxos (1-2 %), substâncias amargas do lúpulo (10-20%), polifenóis (7-8 %) e carboidratos parcialmente hidrolisados, durante a etapa de cocção do mosto. E cerca de 20 % do trub é constituído por açúcares redutores (BARCHET, 1993; KUNZE, 2014; PRIEST; STEWART, 2006).

O trub apresenta uma composição variável de acordo com o processo de fabricação empregado em cada cervejaria. No entanto, devido à elevada concentração de proteínas e carboidratos, o mesmo pode ser reaproveitado, a fim de agregar valor ao material, e ainda evitar prejuízos ambientais ou custos extras com o tratamento do efluente gerado. Normalmente, o trub é misturado ao bagaço de malte para recuperação do mosto, sendo assim empregado na formulação de ração animal. Contudo, este resíduo pode vir a ser um substrato potencial em bioprocessos industriais, em virtude da elevada carga nutricional que ele contém (BARCHET, 1993; PANDEY et al., 2000; PRIEST; STEWART, 2006).

Uma vez que o Brasil está entre os maiores produtores de cerveja no mundo (CERVIERI JÚNIOR et al., 2014), grandes volumes de trub são gerados e podem ser aproveitados no processo de dessulfurização do gasóleo pesado, devido as características supracitadas.

2.5 ACELERADOR DE COMPOSTAGEM ORGANTI H-BIOL®

A compostagem consiste em um conjunto de técnicas aplicadas para controlar a decomposição de materiais orgânicos, sendo este um processo basicamente microbiano, que pode ocorrer espontaneamente na natureza. Neste processo, diferentes grupos de micro-organismos promovem a oxidação biológica dos compostos orgânicos complexos, obtendo assim um material estável, umidificado e rico em nutrientes minerais (DE BERTOLDI; VALLINI; PERA, 1983; TECNICONTROL BIOPRODUTOS, 2016).

Diversos fatores podem beneficiar ou interferir na compostagem, enquanto alguns produtos, conhecidos como aceleradores de compostagem ou ativadores, permitem potencializar o processo e melhorar o resultado final.

Se considerarmos que o processo de dessulfurização microbiana das frações de petróleo consiste na mineralização do enxofre presente em moléculas orgânicas complexas, o acelerador de compostagem poderia, neste caso, atuar como um biocatalisador para a dessulfurização do gasóleo pesado.

O acelerador de compostagem Organti H-Biol®, empregado neste trabalho e desenvolvido pela empresa Tecnicontrol Indústria e Comércio de Produtos Biológicos Ltda., utiliza micro-organismos estabilizados no próprio meio para a decomposição de moléculas complexas orgânicas. Dessa maneira, além de acelerar o processo de compostagem e mineralizar os nutrientes do solo, aumentado a sua

biodisponibilidade para as plantas, o produto reduz ainda a presença micro-organismos patogênicos, odores desagradáveis, minimiza a geração de chorume ou líquidos percolados e a emissão de gases poluentes (TECNICONTROL BIOPRODUTOS, 2016).

Os micro-organismos presentes em sua fórmula agem proporcionando a obtenção de um composto orgânico umidificado e com nutrientes de alto potencial e valor agrícola na adubação orgânica (TECNICONTROL BIOPRODUTOS, 2016). No entanto, ao aplicá-lo em um processo petroquímico e se confirmada a sua capacidade dessulfurizante, o produto terá um fim mais nobre, agregando valor ao mesmo e ampliando assim a sua aplicabilidade.

Entretanto, alguns parâmetros de processo, também são fatores interferentes na compostagem, e por isso, devem ser avaliados. A disponibilidade de oxigênio, por exemplo, é um dos fatores essenciais no processo de oxidação e para a respiração aeróbica dos micro-organismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica. Além disso, quando realizado em condições adequadas de temperatura, é possível maximizar atividade microbiana. No entanto, a própria atividade biológica, através da liberação de calor, faz aumentar a temperatura do sistema, sendo assim necessário, um sistema de controle de temperatura, para que esta não se eleve de tal maneira que iniba o crescimento dos micro-organismos presentes no acelerador (DE BERTOLDI; VALLINI; PERA, 1983).

A proporção carbono:nitrogênio (C:N) também pode interferir na decomposição da matéria orgânica. Teoricamente 10:1 seria a proporção ideal para as células de micro-organismos, enquanto o pH deve estar situação entre 5,5 e 8. O pH começa a cair logo no início do processo de compostagem, devido a presença de bactérias que promovem a quebra dos compostos complexos de carbono em seus intermediários na forma de ácidos orgânicos. Por outro lado, em associação com temperaturas elevadas, o pH básico pode promover a volatilização do nitrogênio na forma de amônia. (DE BERTOLDI; VALLINI; PERA, 1983)

2.6 ESTADO DA ARTE

As produções mencionadas ao longo deste capítulo indicam que apesar do potencial da tecnologia de biodessulfurização há certos aspectos econômicos e técnicos que limitam a sua aplicação em larga escala, como a razão mássica entre a fase aquosa e a fração a ser dessulfurização, os custos com o meio de cultura e o biocatalisador, a velocidade específica de dessulfurização e a adequação do sistema às

variações do teor de enxofre, por exemplo, garantido a eficiência do processo e a qualidade do produto final.

Deste modo, com o intuito de contribuir com o desenvolvimento deste bioprocesso, buscou superar os entraves relacionados aos custos com meio de fermentação e a estirpe, e ao mesmo tempo maximizar a eficiência na remoção dos compostos de enxofre no gasóleo pesado. Assim, avaliou-se a influência das condições nutricionais do meio de cultura sintético para a biodessulfurização por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277.

Além disso, não foram encontrados trabalhos que façam o uso de resíduos agropecuários como meio de fermentação no processo de biodessulfurização, apesar do seu elevado potencial como fonte de nutrientes, de apresentar baixo valor agregado e ser gerado em grandes volumes. Dessa maneira, o trub e a manipueira foram testados como meio cultivo, visando também reduzir os prejuízos ambientais e econômicos que poderiam gerar a indústria e a sociedade, quando não aproveitados

O processo de biodessulfurização também foi desenvolvido em um sistema composto pelo produto comercial Organti H-Biol®, buscando ampliar a aplicabilidade do produto e verificar sua capacidade de promover a remoção dos compostos de enxofre do gasóleo pesado. Ao realizar a dessulfurização em seu próprio meio e sem a necessidade de utilizar uma única estirpe isolada, o processo pode se tornar mais simples e com menores custos associados.

3 MATERIAS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste estudo, bem como as metodologias adotadas nos procedimentos analíticos e de biodessulfurização. Para avaliar a dessulfurização do gasóleo pesado em um sistema bifásico, empregando a estirpe bacteriana *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, testou-se como meio cultura o trub e a manipueira, além de avaliar a variação na composição do meio sintético. Assim, seguiram-se os procedimentos de inoculação e crescimento do micro-organismo e fermentação em reator descontínuo para remoção dos compostos de enxofre da fase orgânica. Posteriormente, foram realizadas as análises de concentração celular e de açúcares redutores totais na fase aquosa e a determinação do teor total de enxofre no gasóleo pesado. Além disso, também se avaliou o potencial de dessulfurização do gasóleo pesado por Organti HBiol®. Os experimentos, com exceção das análises do teor de enxofre, 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). No Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUTes) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) foram efetuadas as análises para determinação do teor de enxofre nas amostras de GOP.

3.1 MATERIAIS UTILIZADOS

3.1.1 Micro-organismo

A estirpe bacteriana *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, São Paulo, Brasil, foi empregada neste trabalho em ensaios de dessulfurização. Isso devido à sua capacidade, demonstrada por diversos autores, em remover quantidades significativas de enxofre de DBT e de diferentes frações de petróleo (BHASARKAR; DIKSHIT; MOHOLKAR, 2015; BOSHAGH; MOKHTARANI; MORTAHEB, 2014; CORTES; DE CARVALHO, 2015; DAVOODI-DEHAGHANI; VOSOUGHI; ZIAEE, 2010; DERIKVAND; ETEMADIFAR; BIRIA, 2014; DINAMARCA et al., 2014; FOLSOM et al., 1999; LI et al., 2008a; MAASS et al., 2015; STANCU, 2014; ZHANG et al., 2007).

3.1.2 Meio de Manutenção

Parte das células, após serem reativadas, foram mantidas em meio sólido *Streptomyces* (SM), conforme orientação do fornecedor (Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello). No entanto, para a manutenção da estirpe por um maior período, separou-se uma segunda porção de células e estas foram criopreservadas em glicerol.

A composição do meio sólido SM é descrita na Tabela 10.

Tabela 10 – Composição do meio de manutenção SM.

Composto	Marca	Concentração (g.L ⁻¹)
Extrato de Levedura (YE)	Synth	4,00
Extrato de Malte (ME)	VETEC	10,00
Glicose	VETEC	4,00
CaCO ₃	VETEC	2,00
Ágar	Dinâmica	12,00

Fonte: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (2015).

3.1.3 Meio de Cultura

O meio de cultura empregado no inóculo e para o crescimento celular foi otimizado por Todescato (2014), e sua composição encontra-se descrita na Tabela 11.

Tabela 11 – Composição do meio de cultura otimizado (OSM)

Composto	Marca	Concentração (g.L ⁻¹)
Extrato de Levedura (YE)	Synth	6,15
Extrato de Malte (ME)	VETEC	5,00
Glicose	VETEC	2,00
CaCO ₃	VETEC	1,10

Fonte: Todescato (2014).

3.1.4 Meio de Fermentação

O meio sintético de fermentação empregado nos ensaios de biodessulfurização era constituído pelos seguintes compostos: Extrato de Levedura (Synth), Extrato de Malte (VETEC), Glicose (VETEC) e Carbonato de Cálcio (VETEC). As proporções utilizadas de cada composto estão descritas no item 3.2.2.1.

Além disso, testou-se o trub, um subproduto do processo de fabricação da cerveja como meio fermentativo alternativo no processo de BDS, conforme se discorre no item 3.2.2.2. O material foi disponibilizado por uma cervejaria artesanal de Santa Catarina.

Neste contexto, também se utilizou a manipueira como substituto do meio sintético no processo de BDS, conforme especificações descritas no item 3.2.2.2. A manipueira é proveniente do processo de prensagem da mandioca na fabricação da farinha de mandioca e foi gentilmente fornecida pela empresa Fariman - Salezio Delfino & Cia Ltda. do estado de Santa Catarina, Brasil.

3.1.5 Acelerador de Compostagem Organti H-Biol®

O acelerador de compostagem Organti H-Biol® é um produto comercial composto por uma seleção de micro-organismos específicos estabilizadas em seu próprio meio (TECNICONTROL BIOPRODUTOS, 2016). O produto foi cedido pela empresa Tecnicontrol Ind. e Com. de Produtos Biológicos Ltda., responsável pelo desenvolvimento do mesmo.

3.1.6 Gasóleo Pesado

O gasóleo pesado utilizado como matéria-prima para dessulfurização foi cedido pela Petrobras, oriundo da plataforma Marlim Sul P-56, localizada no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

3.1.7 Reagente Ácido Dinitrossalicílico (DNS)

O reagente de Ácido Dinitrossalicílico (DNS) é empregado, de acordo com Ghose (1987), no método de determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART). O mesmo é então, produzido dissolvendo-se 306,00 g de tartarato de sódio e potássio (marca LAFAN) em 1.416,00 mL de água destilada e posteriormente, são adicionados 19,80 g de hidróxido de sódio (marca Nuclear) sob agitação. Finalmente, acrescentam-se lentamente à solução 10,60 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico (marca Sigma-Aldrich).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Reativação das Células de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 Liofilizadas

Os procedimentos para abertura da ampola e reativação das células de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 liofilizadas foram realizados em cabine de fluxo laminar vertical [PA 310 ECO (Pachance)], em ambiente estéril, conforme orientações fornecidas pela Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia.

Deste modo, inicialmente, desinfetou-se a superfície externa da ampola contendo as células liofilizadas com gaze embebida em álcool etílico 70,0%. Posteriormente, riscou-se a mesma na altura do ponto médio do tampão de algodão com uma lima, e com isso, foi possível quebrá-la. Em seguida, próximo a chama do bico de *Busen* removeu-se a porção superior da ampola e o tampão de algodão com o auxílio de uma pinça e então, adicionou-se lentamente 0,20 mL de água destilada (estéril), formando assim uma suspensão, após aproximadamente 15 minutos.

A suspensão de células foi transferida da ampola para um tubo de ensaio contendo 5,00 mL de meio SM. O material foi mantido em uma incubadora com agitação orbital [Excella E25/E25R (New Brunswick Scientific)] por 24 h a 24 °C e 180 rpm. Após este período, fez-se a estria de esgotamento do mesmo em placas de Petri contendo o meio sólido SM. Estas placas foram incubadas por 24 h a 24 °C e em seguida, armazenadas em geladeira a 4 °C.

Para a criopreservação do material foram transferidos 0,50 mL da suspensão de células reativadas para tubos criogênicos, contendo 0,36 mL de glicerol e 1,00 mL de meio. Após 24 h em incubadora a 24 °C, os tubos criogênicos foram armazenados em ultrafreezer (-80 °C).

3.2.2 Dessulfurização do Gasóleo Pesado por Células Livres de *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277

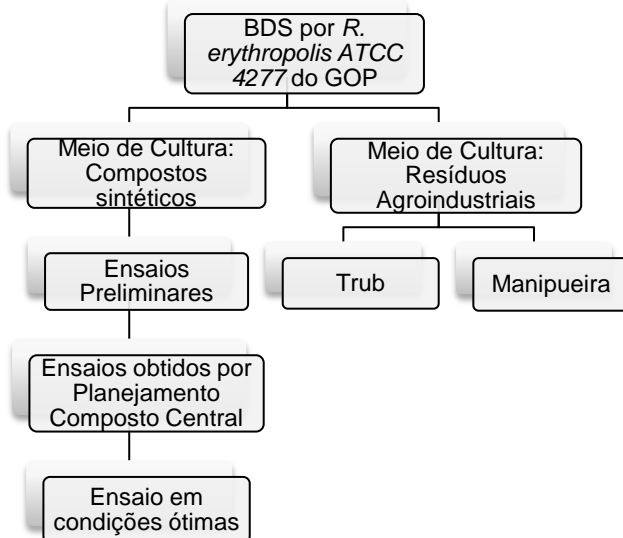
Para os ensaios de dessulfurização do GOP por células livres de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, inicialmente, foram inoculadas duas alçadas de células da cultura estoque em um frasco Erlenmeyer com 50 mL de meio OSM, previamente esterilizado, com o pH ajustado para 7,0. Este frasco permaneceu em incubadora a 24 °C e 180 rpm por 24 h. Após este período transferiu-se 20,0% (v/v) do inóculo para um

outro frasco com meio OSM (pH 7,0), também previamente esterilizado. Este Erlenmeyer foi então incubado por 24 h a 24 °C e 180 rpm.

Posteriormente adicionou-se 1,25% (v/v) do caldo celular com uma concentração celular entre 20 a 25 g de células/L (absorbância entre 0,700 e 0,800 à OD₆₀₀), em assepsia, para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 80,0% (v/v) do meio fermentativo (fase aquosa) e 20,0% (v/v) de fase orgânica (GOP). Deve-se ressaltar que as condições empregadas nesta etapa se basearam em estudos anteriores, realizados por Todescato (2014) e Maass (2014, 2015), que buscaram otimizar as condições de processo a fim de maximizar o crescimento celular da estirpe *R. erythropolis* ATCC 4277 e promover a dessulfurização de diferentes óleos.

Estes ensaios foram realizados conforme sequência apresentada na Figura 8 e serão descritos mais detalhadamente no item 3.2.2.1 para os ensaios realizados com meio de fermentação constituído por compostos sintéticos e no item 3.2.2.2 para os testes com trub e a manipueira como substratos nutricionais alternativos para a estirpe empregada.

Figura 8 – Fluxograma de ensaios de BDS por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 do gasóleo pesado.



Fonte: Autora (2017).

3.2.2.1 Dessulfurização em Meio de Fermentação Sintético

Frascos Erlenmeyers contendo o sistema bifásico de dessulfurização (80,0% v/v de GOP e 20,0% v/v de meio fermentativo sintético) foram incubados a 28 °C e 180 rpm.

A composição do meio sintético sofreu variações visando estabelecer a sua influência na remoção dos compostos de enxofre, conforme infra citado. Além disso, foi preparado para cada ensaio um frasco controle contendo a mesma composição para a fase aquosa, porém sem o GOP, a fim de estabelecer o efeito do mesmo no crescimento celular e no consumo de ART.

Para obtenção das curvas cinéticas de concentração celular, de ART e de remoção de enxofre, foram coletadas alíquotas em diferentes intervalos de tempo para análise das amostras da fase aquosa e do GOP.

Maass (2015) observou a influência da concentração dos compostos glicose e extrato de levedura, presentes no meio de fermentação, na dessulfurização do gasóleo pesado por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. Com base nisso, empregaram-se, inicialmente, neste estudo, oito variações na composição do meio fermentativo, conforme apresentado na Tabela 12. As amostras de GOP e da fase aquosa foram coletadas em 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 h de processo.

Tabela 12 – Composição do meio de fermentação dos ensaios de BDS iniciais.

Ensaio	Glicose (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	Extrato de Malte (g/L)	CaCO ₃ (g/L)
1	5,00	4,00	10,00	2,00
2	3,00	4,00	10,00	2,00
3	1,00	4,00	10,00	2,00
4	0,00	4,00	10,00	2,00
5	4,00	10,00	10,00	2,00
6	4,00	20,00	10,00	2,00
7	4,00	30,00	10,00	2,00
8	4,00	40,00	10,00	2,00

Fonte: Autora (2017).

Após a análise estatística dos resultados obtidos em relação à remoção de enxofre do GOP, determinou-se uma nova faixa de trabalho a ser empregada para o extrato de levedura (de 0,00 a 10,00 g/L) e para a glicose (de 0,00 a 3,00 g/L). Além disso, incluiu-se o extrato de malte no planejamento experimental, utilizando uma concentração entre 0,00 a

10,00 g/L, enquanto a concentração de CaCO_3 foi mantida constante. Ainda de acordo com os resultados iniciais o tempo total de fermentação foi limitado em 12 h.

Assim, elaborou-se um planejamento composto central com pontos axiais através do *software* STATISTICA® 7.0, sendo que foram adicionados 2 pontos centrais extras para proteção da curvatura. A matriz de planejamento obtida para as variáveis estudadas é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13 – Matriz do planejamento experimental obtida através do STATISTICA® 7.0 para testes com meio sintético.

Ensaio	Glicose		Extrato de Levedura		Extrato de Malte	
	(g/L)	Nível	(g/L)	Nível	(g/L)	Nível
1	1,00	(-1)	3,00	(-1)	2,50	(-1)
2	1,00	(-1)	3,00	(-1)	8,00	(+1)
3	1,00	(-1)	10,00	(+1)	2,50	(-1)
4	1,00	(-1)	10,00	(+1)	8,00	(+1)
5	3,00	(+1)	3,00	(-1)	2,50	(-1)
6	3,00	(+1)	3,00	(-1)	8,00	(+1)
7	3,00	(+1)	10,00	(+1)	2,50	(-1)
8	3,00	(+1)	10,00	(+1)	8,00	(+1)
9	0,32	(- α)	6,50	(+1)	5,00	(0)
10	3,68	(+ α)	6,50	(0)	5,00	(0)
11	2,00	(0)	0,61	(- α)	5,00	(0)
12	2,00	(0)	12,39	(+ α)	5,00	(0)
13	2,00	(0)	6,50	(0)	0,37	(- α)
14	2,00	(0)	6,50	(0)	9,62	(+ α)
15	2,00	(0)	6,50	(0)	5,00	(0)
16	2,00	(0)	6,50	(0)	5,00	(0)
17	2,00	(0)	6,50	(0)	5,00	(0)

Fonte: Autora (2017).

E por fim, novos ensaios foram realizados em triplicata nas condições ótimas determinadas pela análise do perfil de desejabilidade dos resultados obtidos dos ensaios oriundo do planejamento composto central.

3.2.2.2 Dessulfurização em Meio de Fermentação Composto por Trub e Manipueira

Os testes de biodessulfurização empregando o trub e a manipueira como meio de fermentação, foram realizados conforme já descrito anteriormente. Contudo, neste caso, foram coletadas apenas alíquotas para análise do teor de enxofre do GOP e da concentração ART nos respectivos substratos após 1, 2, 4, 8 12 e 16 h de dessulfurização.

3.2.3 Dessulfurização do Gasóleo Pesado por Acelerador de Compostagem Organti HBIol®

O acelerador de compostagem Organti HBIol®, devido a sua capacidade de acelerar o processo de decomposição de moléculas complexas orgânicas e de fornecer nutrientes para o desenvolvimento dos próprios micro-organismos estabilizados em seu meio, foi empregado no processo de biodessulfurização como potencial substituinte para o meio nutricional sintético e para a estirpe bacteriana dessulfurizante *R. erythropolis* ATCC 4277.

Assim, em frascos Erlenmeyers de 250 mL adicionou-se o acelerador de compostagem Organti HBIol®, em assepsia, sobre o GOP, formando um sistema bifásico de dessulfurização, que foi condicionado em incubadora com agitação orbital [Excella E25/E25R (New Brunswick Scientific)] a 180 rpm.

Deste modo, na primeira etapa deste estudo, os ensaios realizados foram determinados através de um planejamento fatorial 2², adotando-se como fatores a temperatura (°C) e o percentual de Organti H-Biol (% em massa) no sistema biocatalítico. As amostras de GOP para análise do teor de enxofre total foram coletadas em 1, 2, 6, 12 e 18 h de processo, visando construir a curva cinética de dessulfurização.

A matriz do planejamento fatorial (Tabela 14) foi obtida através do *software* STATISTICA® 7.0. Neste caso, avaliou-se uma faixa de temperatura entre 40 e 60 °C, de acordo com orientações do fornecedor, uma vez que o produto é composto por uma seleção de bactérias termofílicas, e testou-se entre 10,0 a 50,0 % (m/m) de Organti H-Biol®.

Tabela 14 – Matriz do planejamento experimental obtido no STATISTICA® 7.0 para os testes com acelerador de compostagem Organti H-Biol®.

Ensaio	Organti H-Biol®		Temperatura	
	% (m/m)	Nível	(°C)	Nível
1	10,0	(-1)	40	(-1)
2	50,0	(+1)	40	(-1)
3	10,0	(-1)	60	(+1)
4	50,0	(+1)	60	(+1)
5	30,0	(0)	50	(0)
6	30,0	(0)	50	(0)
7	30,0	(0)	50	(0)

Fonte: Autora (2017).

Além disso, foram realizados sete testes adicionais com o objetivo de minimizar a concentração de Organti HBiol® no processo. Testou-se entre 1,0 a 5,0 % (m/m) de acelerador de compostagem a 50 °C, como mostra a Tabela 15. As amostras de GOP foram coletadas, neste caso, em 2, 6 e 18 h de processo. Ressalta-se ainda que no terceiro ensaio foi utilizado 1,0 % (m/m) de Organti HBiol® e após 2 h de fermentação, adicionou-se mais 1,0% do produto, sendo levado a incubadora por mais 4 horas.

Tabela 15 – Matriz do planejamento experimental obtido no STATISTICA® 7.0 para os testes adicionais com acelerador de compostagem Organti H-Biol®.

Ensaio	Tempo (h)	Organti HBiol® (% m/m)	Temperatura (°C)
1	18	1,0	50
2	2	1,0	50
3	2+4	1,0+1,0	50
4	18	1,0	50
5	2	5,0	50
6	6	5,0	50
7	18	5,0	50

Fonte: Autora (2017).

3.2.4 Ensaios Analíticos

3.2.4.1 Caracterização do Trub e da Manipueira

Os substratos trub e manipueira foram analisados quanto à concentração total de carbono e nitrogênio, além de ser determinada a concentração de carbono orgânico total e carbono inorgânico, com intuito de verificar se a composição do material era condizente para aplicação no processo de biodessulfurização. Neste caso, empregou-se a técnica de mineralização completa por combustão seguida por análise por infravermelho em um Analisador de Carbono Orgânico Total [TOC-VCPH (SHIMADZU)] no Laboratório de Energia e Meio Ambiente (LEMA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Além disso, foi ainda realizado a análise para a determinação da concentração de ART, conforme descrito no item 3.2.4.3.

E a empresa Fariman disponibilizou o laudo técnico de caracterização da manipueira (ANEXO A).

3.2.4.2 Determinação da Concentração de Biomassa por Turbidimetria

A concentração celular das amostras de meio fermentativo foi determinada por turbidimetria (OD_{600}) usando um espectrofotômetro UV-Vis [modelo UV-1240 (Shimadzu)], conforme curva de calibração previamente construída (ANEXO B) por Maass (2015).

3.2.4.3 Determinação da Concentração de Açúcares no Caldo Fermentativo pelo Método DNS

De acordo com Ghose (1987) para determinar a concentração de açúcares redutores totais (ART) através do método DNS é necessário adicionar 1,50 mL do reagente DNS (descrito no item 3.1.7) a 1,00 mL de amostra. A mistura é aquecida em banho-maria por 5 min a 100 °C. Em seguida, o montante é resfriado até temperatura ambiente e, então, faz-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro ($\lambda=540\text{nm}$).

Para a construção da curva de calibração (Apêndice A) preparou-se uma solução de 1,00 g/L de glicose e, a partir desta, foram feitas diluições de modo a obter soluções com concentrações de glicose entre 0,10 e 0,90 g/L. A curva obtida apresentou um limite de linearidade com coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,995.

As amostras de trub foram previamente submetidas ao processo de hidrólise dos açúcares presentes, antes de serem analisadas, conforme

proposto por Ferri e Saggin (2014). Deste modo, misturou-se 1,00 mL de amostra com 1,00 mL de HCl 2 M, em seguida, a mistura foi aquecida em banho-maria durante 5 minutos até sua ebulição. Após o resfriamento da solução, a mesma foi neutralizada com 1,00 mL de NaOH 2,00 M. Posteriormente, a quantificação de ART nas amostras de trub foi realizada, conforme citado anteriormente.

3.2.4.4 Determinação da Concentração de Enxofre Total pelo método ASTM D-4294

As amostras GOP foram levadas a estufa bacteriológica a 100 °C por 15 min para purificação do material, separando traços da fase aquosa. Àquelas provenientes dos ensaios de biodessulfurização com o acelerador de compostagem Organti H-Biol® foram ainda, centrifugadas a 7.000 rpm por 600 s no Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR) e, posteriormente, filtradas para completa remoção de resquícios de Organti H-Biol®.

Após o processo de purificação do material, as amostras foram diluídas em uma razão de 50,0 % (m/m) com hexano P.A (marca Synth), se enquadrando dentro da faixa de detecção do equipamento de análise.

O teor de enxofre total em mg de enxofre.kg⁻¹ de GOP foi determinado em um espectrofotômetro de raio-X [Oxford (Model Twin X)] no Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUTets) na Universidade Federal do Paraná (UFPR), seguindo o método ASTM D-4294.

3.2.5 Planejamento Experimental e Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o *software* STATISTICA® 7.0. Os efeitos estimados foram avaliados considerando um nível de significância (α) de 5% em um intervalo de confiança de 95%. A análise dos resíduos também foi realizada a fim de estabelecer qual modelo, entre aqueles disponíveis pelo *software*, é capaz de ajustar-se adequadamente aos dados e descrever o perfil de remoção de enxofre do GOP, além de averiguar se as inferências estatísticas são válidas.

E por fim, obteve-se o perfil de desejabilidade que permite determinar o ponto ótimo dos fatores avaliados para cada variável resposta (CALADO; MONTGOMERY, 2003). Assim, visando maximizar a remoção de enxofre no GOP, através do perfil de desejabilidade determinou-se o ponto ótimo da composição do meio nutricional sintético e as condições ótimas de processo entre os fatores

avaliados para os testes com o acelerador de compostagem Organti H-Biol®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais obtidos no decorrer deste estudo, em relação à capacidade de dessulfurização do GOP pela bactéria *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 e pela seleção de bactérias termofílicas presentes no acelerador de compostagem Organti H-Biol®. Assim, a discussão destes resultados visa compreender e verificar de que modo a composição do meio nutricional de fermentação pode interferir e até mesmo favorecer a capacidade de dessulfurização da estirpe bacteriana. Além disso, destacam-se os resultados obtidos em sistemas biocatalíticos com tub e manípueira como uma alternativa para substituir o meio de cultura sintético e, com isso, reduzir os custos associados, visando a aplicação industrial da tecnologia de biodessulfurização. Do mesmo modo, avaliou-se a capacidade do acelerador de compostagem Organti H-Biol®, como biocatalisador no processo de dessulfurização GOP, discutindo acerca da influência da concentração do mesmo e da temperatura na eficiência do processo.

4.1 DESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO EM MEIO SINTÉTICO POR CÉLULAS LIVRES DE RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS ATCC4277

Na primeira fase deste trabalho buscou-se a otimização do processo de biodessulfurização do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, através da variação dos parâmetros nutricionais do meio de fermentativo sintético.

4.1.1 Influência da composição do meio nutricional na capacidade de dessulfurização

Maass (2015) e Todescato (2014) verificaram que a composição do meio nutricional influencia no processo de remoção dos compostos de enxofre do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. A Tabela 16 mostra a máxima remoção de enxofre obtida nos ensaios preliminares de dessulfurização em paralelo com concentração de glicose e extrato de levedura, bem como o tempo de processo necessário para atingir este resultado. Enquanto, na Tabela B.1 no APÊNDICE B podemos observar os resultados completos das cinéticas de dessulfurização destes mesmos ensaios.

Tabela 16 – Máxima remoção de enxofre nos ensaios preliminares de BDS do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277.

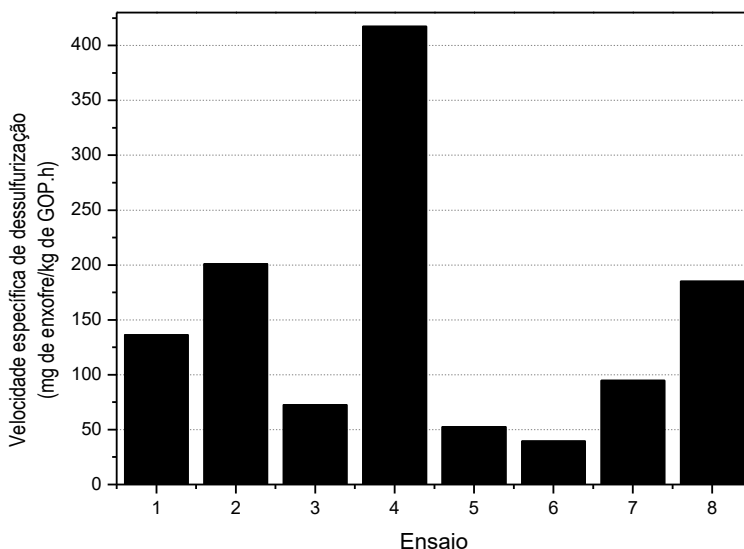
Ensaio	Tempo	Glicose	Extrato de Levedura	Concentração de Enxofre	Enxofre Removido	
	h	g/L		mg/kg	mg/kg	% massa
1	36	5,00	4,00	1978	4910	71,3
2	24	3,00	4,00	2064	4824	70,0
3	72	1,00	4,00	1660	5228	75,9
4	12	0,00	4,00	1878	5010	72,7
5	96	4,00	10,00	1830	5058	73,4
6	120	4,00	20,00	2136	4751	69,0
7	48	4,00	30,00	2335	4553	66,1
8	24	4,00	40,00	2444	4444	64,5

Fonte: Autora (2017).

De modo geral, a redução na concentração de glicose e extrato de levedura, dentro das faixas de estudo, favoreceu a remoção de enxofre. Provavelmente, a bactéria retira grupo sulfatos do esqueleto carbônico para poder usá-lo como nutriente, portanto, se o meio apresenta baixas concentrações de glicose é necessário que a estirpe busque outra fonte deste nutriente, promovendo assim uma maior dessulfurização da fase orgânica. Do mesmo modo, o extrato de levedura, além de fornecer vitaminas e nitrogênio que beneficiam o crescimento celular, sendo assim a sua presença no meio essencial, o mesmo também é fonte de enxofre, então, a partir de uma dada concentração, a presença de extrato de levedura também pode levar a inibição do processo de dessulfurização da fração orgânica.

A velocidade específica de dessulfurização para os ensaios de 5 a 8, apresentou um comportamento inverso, ou seja, o incremento na concentração do extrato de levedura favoreceu este índice, como mostra a Figura 9. Ressalta-se ainda que apesar do ensaio 3 (com 1,00 g/L de glicose) apresentar melhor desempenho na remoção de enxofre do que o ensaio 4 (sem adição de glicose), a velocidade específica de dessulfurização foi muito inferior. A velocidade específica de dessulfurização obtida para os ensaios 4 e 5, respectivamente, foi de 417,50 e 52,69 mg de enxofre. kg^{-1} de GOP $\cdot \text{h}^{-1}$.

Figura 9 – Velocidade específica de dessulfurização para a máxima remoção de enxofre nos ensaios preliminares de BDS.



Fonte: Autora (2017).

Para um modelo de segunda ordem, analisaram-se os efeitos estimados das variáveis glicose e extrato de levedura, além do tempo, em relação aos resultados das cinéticas de dessulfurização. Os dados completos das cinéticas de BDS podem ser visualizados no Apêndice B.

Para os ensaios de 1 a 4 somente o termo linear da variável tempo (1) apresentou efeito significativo sobre a variável resposta (remoção de enxofre do GOP), como se pode observar na Tabela 17. Além disso, ressalta-se que o efeito da variável tempo é negativo, ou seja, quanto maior o tempo de processo, menor é remoção de enxofre do GOP. Possivelmente, isto pode estar associado ao caráter hidrofóbico da estirpe, onde se verificou a redução da viscosidade da fração orgânica ao longo da fermentação, fazendo com que as células contendo o enxofre assimilado na forma de sulfito migrem entre as fases,

Tabela 17 – Efeitos estimados para os ensaios de BDS de 1 a 4 com respectivos índices estatísticos.

	Efeitos	Erro Padrão	Teste t de Student	Nível p
Média/Interações	3460,98	478,07	7,2395	0,0000
(1) Tempo (L)	-1352,12	650,93	-2,0772	0,0497
(1) Tempo (Q)	-407,65	1172,97	-0,3475	0,7315
(2) Glicose (g/L) (L)	1034,95	581,06	1,7811	0,0887
(2) Glicose (g/L) (Q)	1179,51	1050,53	1,1228	0,2736
(1) e (2)	1022,55	840,24	1,2170	0,2365

Fonte: Autora (2017).

Para os ensaios de 5 a 8, o termo linear da concentração de extrato de levedura (2), além do termo de interação deste com o tempo (1) e (2), destacados na Tabela 18, apresentaram efeito significativo e negativo na remoção de enxofre, conforme esperado.

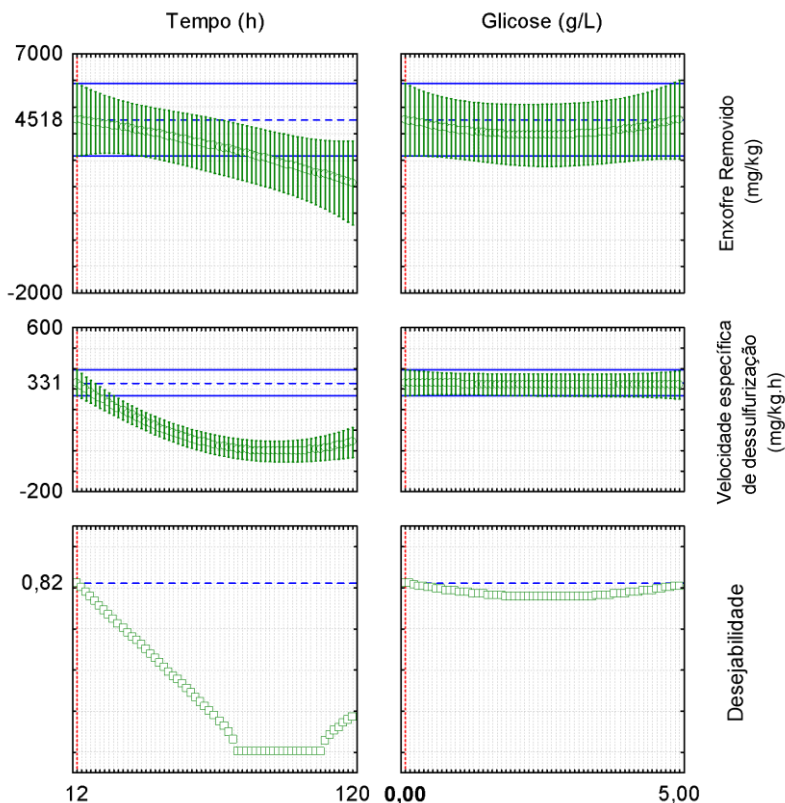
Tabela 18 – Efeitos estimados para os ensaios de BDS de 5 a 8 com respectivos índices estatísticos.

	Efeitos	Erro Padrão	Teste t de Student	Nível p
Média/Interações	4195,17	130,81	32,0717	0,0000
(1) Tempo (L)	-136,39	187,68	-0,7267	0,4751
(1) Tempo(Q)	465,4	341,06	1,3646	0,1862
(2) Ext. de Lev.(g/L) (L)	- 1130,19	174,06	-6,4931	0,0000
(2) Ext. de Lev. (g/L) (Q)	-192,41	285,61	-0,6737	0,5075
(1) e (2)	-717,37	251,77	-2,8493	0,0093

Fonte: Autora (2017).

O perfil de desejabilidade indica o ponto ótimo entre as variáveis para maximizar a variável resposta. Neste caso, analisando os ensaios de 1 a 4, como mostra a Figura 10, tanto a concentração de glicose, quanto o tempo de processo podem ser minimizados com base no intervalo testado para estes fatores.

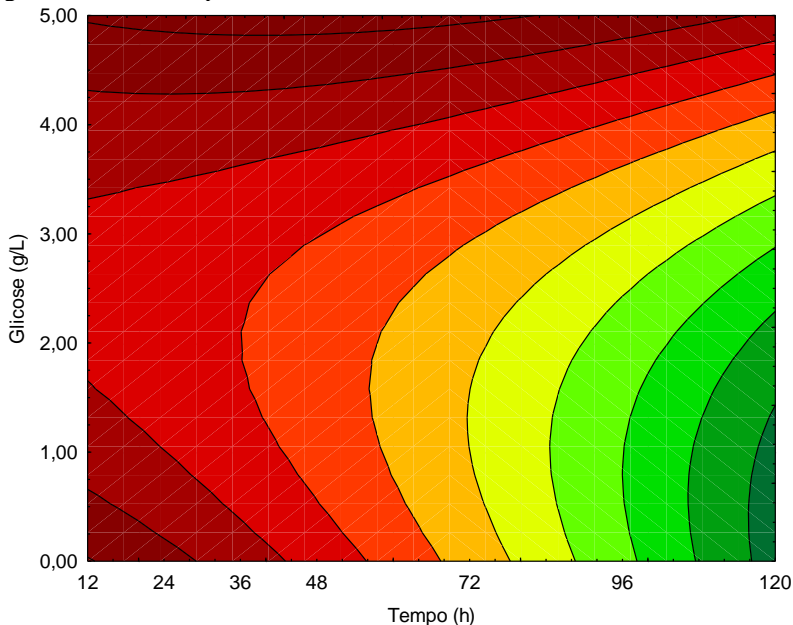
Figura 10 – Avaliação do efeito do tempo (h) e da concentração de glicose (g/L) na remoção de enxofre (mg/kg) e na velocidade específica de dessulfurização (mg/kg.h) nos ensaios preliminares de BDS através do perfil para valores preditos e desejabilidade.



Fonte: Autora (2017).

O gráfico com as curvas de superfície (Figura 11) demonstra que à medida que o processo se estende é necessária uma maior concentração de glicose para promover a remoção de enxofre do GOP. Do ponto de vista industrial, é interessante que ao reduzir o tempo de processo também se emprega uma menor concentração de glicose, visando assim reduzir os custos associados, sem perder a eficiência de BDS.

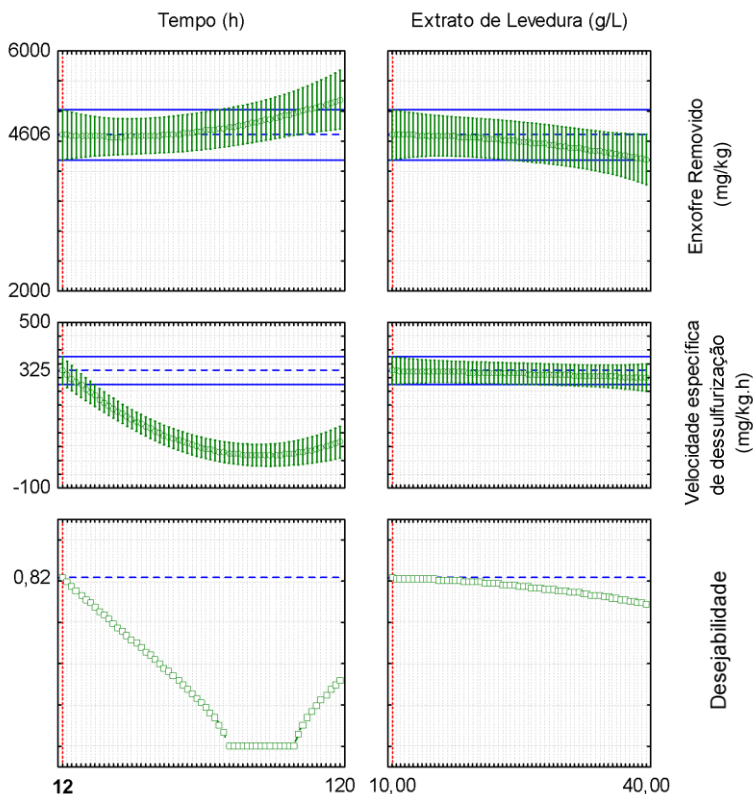
Figura 11 – Curvas de nível do teor de enxofre removido em mg de enxofre/kg GOP (■ 4500; ■ 4250; ■ 4000; ■ 3750; ■ 3500; ■ 3250; ■ 3000; ■ 2750; ■ 2500 e ■ 2250) para os fatores tempo e variação na concentração de glicose nos ensaios preliminares de BDS.



Fonte: Autora (2017).

Para os ensaios de 5 a 8 a remoção de enxofre aumenta ao longo do processo, mas ao ponderar as duas variáveis em questão, o perfil de desejabilidade indica que concentração de extrato de levedura empregada no processo deve ser igual a 10,00 g/L com tempo de fermentação de até 12 h, como mostra a Figura 12.

Figura 12 – Avaliação do efeito do tempo (h) e da concentração de extrato de levedura (g/L) na remoção de enxofre (mg/kg) e na velocidade específica de dessulfurização (mg/kg.h) nos ensaios preliminares de BDS através do perfil para valores preditos e desejabilidade.

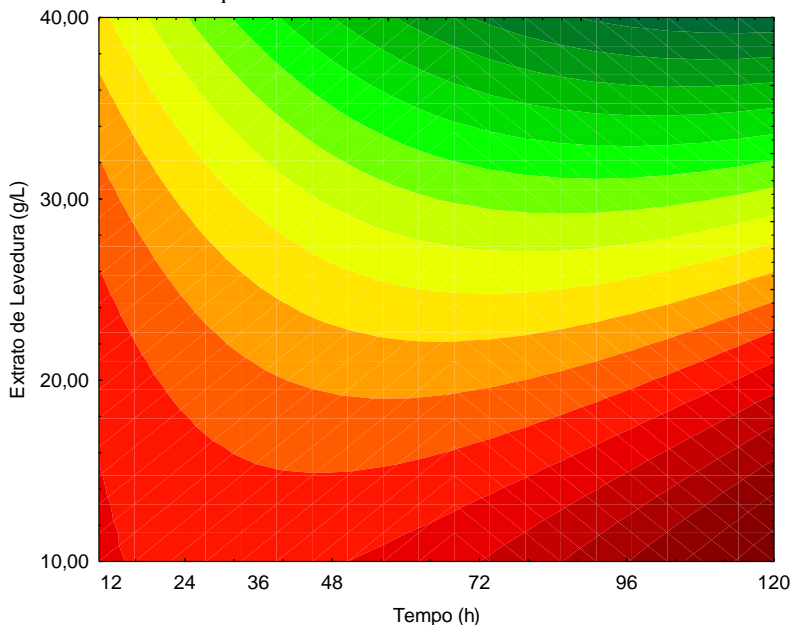


Fonte: Autora (2017).

No gráfico das curvas de nível, apresentado na Figura 13, observa-se a mesma tendência, ou seja, a medida que o tempo de processo se estende e a concentração de extrato de levedura é reduzida, maior será a remoção de enxofre da fração orgânica.

No entanto, o efeito da concentração de extrato de levedura se sobressai sobre o tempo na determinação do ponto ótimo pelo perfil de desejabilidade, uma vez que a análise dos efeitos estimados mostrou que a variável tempo apresenta efeito significativo apenas quando interage com a variável da concentração de extrato de levedura.

Figura 13 – Curvas de nível do teor de enxofre removido em mg de enxofre/kg GOP (■ 5000; ■ 4800; ■ 4600; ■ 4400; ■ 4200; ■ 4000; ■ 3800; ■ 3600 e ■ 3400) para os fatores tempo e variação na concentração de extrato de levedura nos ensaios preliminares de BDS.



Fonte: Autora (2017).

Assim, com base nas análises estatísticas das cinéticas de dessulfurização em conjunto com a avaliação dos valores obtidos de máxima remoção de enxofre, determinou-se uma nova faixa de trabalho de 0,00 a 10,00 g/L de extrato de levedura e de 0,00 a 3,00 g/L de glicose, além disso, fixou-se o tempo de processo em 12 horas. Como o extrato de malte, assim como a concentração de glicose, é fonte de carbono para a estirpe bacteriana, incluiu-se no planejamento experimental este composto como um fator de estudo. Neste caso, considerando a concentração de extrato de malte empregada no meio SM, adotou-se o intervalo de 0,00 a 10,00 g/L para este composto.

4.1.1.1 Planejamento Experimental para Otimização do Meio de Fermentação

Nesta etapa avaliou-se a influência composição do meio de fermentação na biodessulfurização do gasóleo pesado, utilizando planejamento experimental obtido a partir do *software* STATISTICA® 7.0, conforme descrito no item 3.2.2.1.

Na Tabela 19, observam-se os resultados obtidos para a remoção de enxofre em 12 h de processo, em paralelo com concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte, empregados em cada um dos 17 ensaios realizados.

Tabela 19 – Resultados para remoção de enxofre nos ensaios oriundos do planejamento experimental.

Ensaio	Glicose	Extrato de Levedura	Extrato de Malte	Concentração de Enxofre	Enxofre Removido	
	g/L			mg/kg	mg/kg	% massa
1	1,00	3,00	2,50	2516	4372	63,5
2	1,00	3,00	8,00	3651	3237	47,0
3	1,00	10,00	2,50	2076	4812	69,9
4	1,00	10,00	8,00	2461	4427	64,3
5	3,00	3,00	2,50	3422	3466	50,3
6	3,00	3,00	8,00	2796	4092	59,4
7	3,00	10,00	2,50	2026	4862	72,0
8	3,00	10,00	8,00	3409	3479	50,5
9	0,32	6,50	5,00	2266	4622	68,7
10	3,68	6,50	5,00	2430	4458	66,5
11	2,00	0,61	5,00	2362	4884	67,4
12	2,00	12,39	5,00	1804	5442	75,1
13	2,00	6,50	0,38	2867	4021	58,4
14	2,00	6,50	9,62	3349	3539	51,4
15	2,00	6,50	5,00	2028	5218	72,0
16	2,00	6,50	5,00	2793	4453	61,4
17	2,00	6,50	5,00	2508	4738	63,5

Fonte: Autora (2017).

Em três ensaios obteve-se uma remoção percentual de enxofre superior a 70,0%, equivalente aos resultados mais expressivos alcançados nos ensaios iniciais. Deste modo, estes valores não representam um avanço significativo na eficiência de processo, mas reiteram as condições propostas anteriormente, como a redução no

tempo de processo e na concentração das fontes de carbono e nitrogênio no meio nutricional.

Na Tabela 20 são mostrados os efeitos estimados e respectivos índices estatísticos, obtidos segundo planejamento composto central, para os fatores estudados sobre a variável resposta (remoção de enxofre do GOP). Assim, para um modelo de segunda ordem, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância $\alpha = 0,05$ apenas o termo linear da variável concentração de malte (3) e termo independente do modelo, apresentaram efeito significativo. A redução da concentração de extrato de malte no meio favorece a remoção de enxofre do GOP, uma vez que assim como para os demais fatores, o efeito estimado é negativo. Deste modo, pode-se empregar uma concentração equivalente ao nível inferior testado para cada um dos três fatores avaliados.

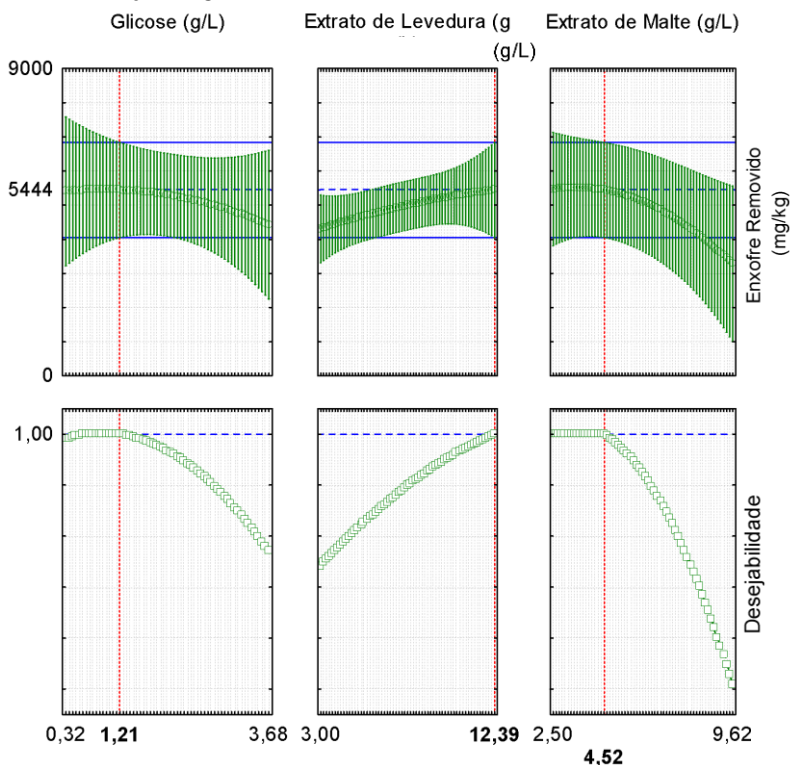
Tabela 20 – Efeitos estimados e respectivos índices estatísticos para otimização do processo de BDS.

	Efeitos	Erro Padrão	Teste t de Student	Nível p
Médias/Interações	4787,07	300,31	15,9402	0,0000
(1) Glicose (g/L) (L)	-189,79	343,80	-0,5520	0,6047
(1) Glicose (g/L) (Q)	-271,61	331,14	-0,8202	0,4494
(2) Ext. de Levedura (g/L)(L)	674,58	523,00	1,2898	0,2535
(2) Ext. de Levedura (g/L)(Q)	-238,78	756,24	-0,3158	0,7650
(3) Ext. de Malte (g/L)(L)	-1440,95	498,65	-2,8897	0,0342
(3) Ext. de Malte (g/L)(Q)	-1463,35	769,40	-1,9020	0,1156
(1) e (2)	-283,55	511,41	-0,5544	0,6032
(1) e (3)	239,64	493,23	0,4859	0,6476
(2) e (3)	-560,43	662,28	-0,8462	0,4361

Fonte: Autora (2017).

Através do perfil para valores preditos e desejabilidade determinou-se o ponto ótimo entre as variáveis estudadas a fim de maximizar a remoção de enxofre do GOP, como mostra a Figura 14. Assim, a composição nutricional otimizada neste estudo é composta por: 1,21 g/L de glicose, 4,52 g/L de extrato de malte e 12,39 g/L de extrato de levedura, além do carbonato de cálcio (2,00 g/L), sendo este constante para todos os estudos.

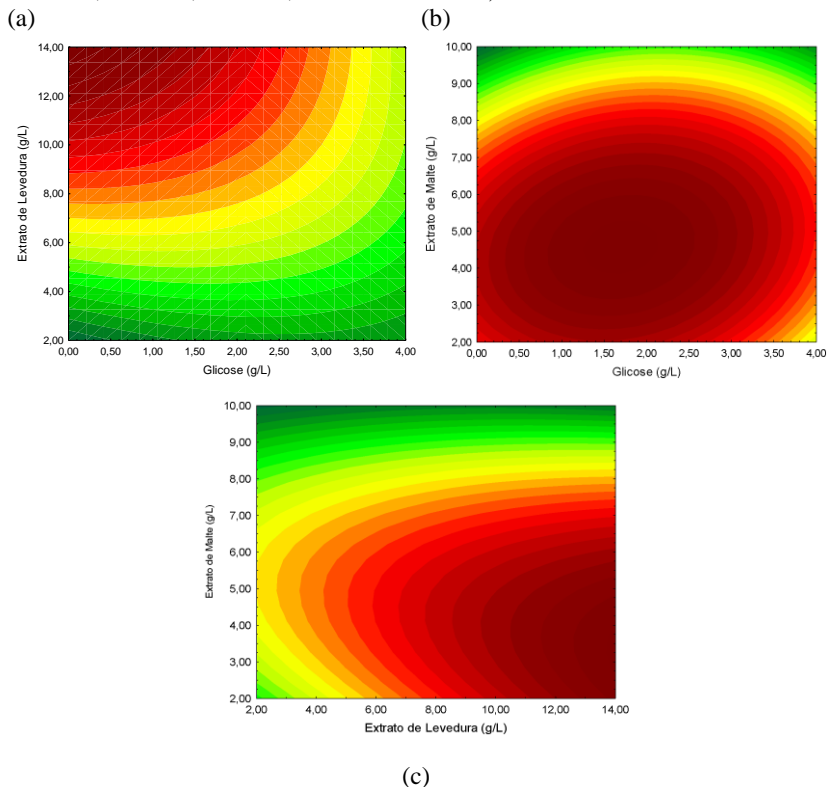
Figura 14 – Perfil para valores preditos e deseabilidade em 12 h de fermentação dos ensaios de BDS, oriundos do planejamento compostos central com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.



Fonte: Autora (2017).

As curvas de nível para as três variáveis de estudo são apresentadas na Figura 15, onde se observa que a maximização da concentração de extrato de levedura e da concentração de glicose resulta em índices de remoção de enxofre superiores a 5.000 mg (Figura 13a). Enquanto que ao relacionar as variáveis concentração de extrato de malte e de glicose verifica-se que independente da concentração de glicose empregada, deve-se utilizar uma concentração de extrato de malte inferior a 8,00 g/L (Figura 13b). Concentrações superiores de extrato de malte, ao contrário do que ocorre com a variável extrato de levedura, não favorecem a remoção de enxofre (Figura 13c).

Figura 15 – Gráficos das curvas de nível do teor de enxofre removido em mg de enxofre/kg GOP referente aos ensaios de BDS em condições otimizadas para as variáveis (a) glicose e extrato de levedura (■ 5400; ■ 5000; ■ 4600; ■ 4200 e ■ 3800), (b) extrato de malte e glicose (■ 4500; ■ 4000; ■ 3500; ■ 3000 e ■ 2500) e (c) extrato de levedura e extrato de malte (■ 5400; ■ 5000; ■ 4600; ■ 4200; ■ 3800; ■ 3400 e ■ 3000).



Fonte: Autora (2017).

4.1.1.2 Ensaios de BDS nas condições ótimas

As concentrações de glicose, extrato de levedura e de malte no meio de nutricional foram otimizadas e através perfil de desejabilidade definiu-se as condições ótimas para o meio de fermentação, como descrito no item 4.1.1.1. Deste modo, foi realizado em triplicata um ensaio cinético de BDS sob estas condições e as médias dos resultados obtidos, bem como o seu desvio padrão, estão expressos na Tabela 21.

Tabela 21 – Cinéticas de BDS do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em meio de nutricional otimizado (1,21 g/L de glicose, 4,52 g/L de extrato de malte, 12,39 g/L de extrato de levedura e 2,00 g/L carbonato de cálcio).

Tempo h	Concentração de Enxofre mg/kg	Enxofre Removido	
		mg/kg	% massa
1	2680 ± 83	4556 ± 83	63,0 ± 1,1
2	2767 ± 186	4470 ± 186	61,8 ± 2,6
4	2800 ± 191	4436 ± 191	61,3 ± 2,6
8	2350 ± 205	4886 ± 205	67,6 ± 2,8
12	2556 ± 350	4680 ± 350	64,7 ± 4,8
16	2439 ± 377	4797 ± 377	66,3 ± 5,2

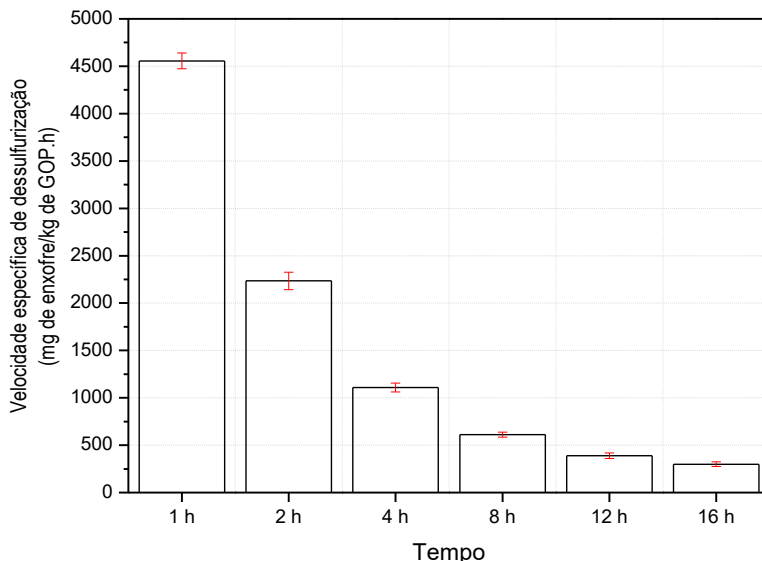
Fonte: Autora (2017).

Em geral, nota-se certa variabilidade entre os resultados das repetições, indicando que pequenas variações na composição do meio nutricional e na concentração celular podem afetar a resposta dos ensaios quanto a remoção de enxofre do GOP. No entanto, cabe ressaltar que se alcançou uma remoção máxima de enxofre superior a 70,0% dentro do intervalo de tempo de 8 a 12 h.

Na Figura 16 observa-se ainda, que ao contrário do índice de dessulfurização que apresenta um pequeno ganho à medida que decorre o tempo de fermentação, a velocidade específica de dessulfurização decai bruscamente indicando que o biocatalisador perde sua atividade ao longo do processo. Além disso, percebe-se que os desvios entre as réplicas não são tão proeminentes e diminuem para menores velocidades específicas e maiores tempos de fermentação.

Em virtude disso, promover a BDS em um sistema em série com menores intervalos de tempo de processo, pode ser uma alternativa interessante para promover uma maior remoção de enxofre.

Figura 16 – Média das velocidades específicas de dessulfurização para remoção de enxofre ao longo dos ensaios de BDS em meio de nutricional otimizado (1,21 g/L de glicose, 4,52 g/L de extrato de malte, 12,39 g/L de extrato de levedura e 2,00 g/L carbonato de cálcio).



Fonte: Autora (2017).

O teor de enxofre removido e a velocidade específica de dessulfurização alcançada para os maiores índices de dessulfurização são superiores àqueles reportados por outros estudos, mesmo àqueles que empregaram o processo biocatalítico para a dessulfurização para óleo modelo DBT ou para outros óleos com baixas concentrações de enxofre (FOLSOM et al., 1999; GUCHHAIT et al., 2005; LI et al., 2005, 2008b; MAASS et al., 2015; MAGHSOUDI et al., 2001; OMIDIJI; OKPUZOR, 2002; YU et al., 2006; ZHANG et al., 2007). No entanto, outros autores (CHANG et al., 2000; DINAMARCA et al., 2010, 2014; MAASS et al., 2015) ao empregar frações com maior concentração de enxofre, como o gasóleo leve e o gasóleo pesado, também atingiram uma maior dessulfurização. Contudo, os resultados obtidos mostram-se expressivos até mesmo quando comparados a estes trabalhos, devido a otimização das condições nutricionais do meio sintético.

Deste modo, comparando com o trabalho de Maass (2015), que também empregou a estirpe *R. erythropolis* ATCC 4277 para a

dessulfurização do gasóleo pesado, atingiu-se uma remoção de enxofre 23 % maior, além de reduzir o tempo de processo em cerca de 6 h, aumentando assim a velocidade específica de dessulfurização. Na Tabela 22, podemos verificar composição do meio de fermentação empregado por Maass (2015) e Todescato (2014), para maximizar a remoção de enxofre e o crescimento celular, respectivamente.

Tabela 22 – Composição dos meios de fermentação e cultura.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)		
	Meio YM Maass (2015)	Meio OMS Todescato (2014)	Meio Otimizado Autora (2017)
CaCO ₃	2,00	1,00	2,00
Extrato de levedura	3,00	6,15	12,39
Extrato de malte	3,00	5,00	4,52
Glicose	10,00	2,00	1,21
Peptona bacteriológica	5,00	-	-

Fonte: Autora (2017).

Neste caso, observamos que as condições ótimas definidas neste estudo, diferem daquelas empregadas por ambos os autores, sendo assim o aumento do índice de dessulfurização do GOP não está associado ao aumento da concentração celular no meio, mas principalmente, à otimização dos parâmetros nutricionais.

4.1.2 Influência dos parâmetros nutricionais e do gasóleo pesado no crescimento celular da estirpe *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277

Em estudos anteriores observou-se que a concentração dos componentes do meio nutricional ou a fonte de nutrientes empregada também afetam o crescimento celular durante a BDS (DEL OLMO et al., 2005; MAASS et al., 2015; TODESCATO, 2014). Assim, neste trabalho, buscou-se avaliar a influência da composição do meio fermentação em relação ao crescimento celular da estirpe *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. Além de verificar se a concentração celular está correlacionada com a remoção de enxofre e observar se a concentração dos nutrientes afeta ou não os dois processos da mesma maneira.

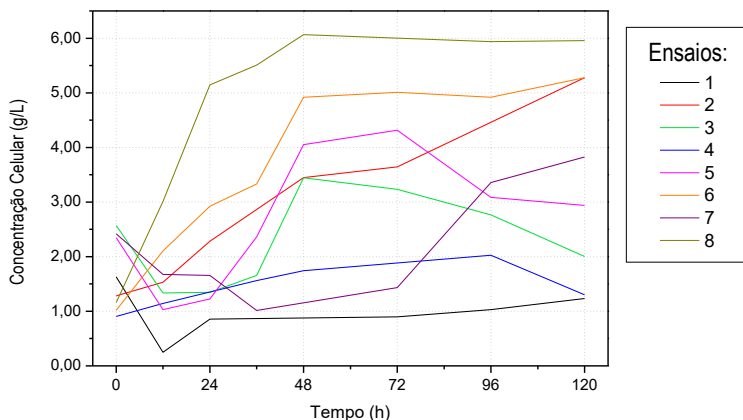
Para cada ensaio realizado, tal como já explicitado anteriormente, foi realizado um ensaio controle, ou seja, sob as mesmas condições nutricionais e parâmetros de processo, porém sem a presença da fase orgânica, a fim de verificar também, de que modo a presença do GOP favorece ou inibe o aumento da biomassa no meio.

Ressalta-se ainda, que as curvas cinéticas possuem pontos discrepantes, onde há uma diminuição da concentração de biomassa em meio a curva cinética de crescimento. Este comportamento deve estar associado às variabilidades de processo, uma vez que se tratavam de amostras destrutivas e a falta de homogeneidade do sistema.

Na Figura 15 estão ilustradas as cinéticas de crescimento celular referente aos oito ensaios iniciais deste estudo. Percebe-se que para alguns destes ensaios foi necessário um tempo de adaptação da estirpe ao meio nutricional e, além disso, certas condições nutricionais proporcionaram um maior crescimento celular, não havendo uma correlação clara com o aumento ou redução da concentração de glicose e extrato de levedura. Deve-se ressaltar também que embora a condição inicial tenha sido mantida aproximadamente constante, uma vez que cada frasco de ensaio recebeu o mesmo volume de caldo celular (2,5 mL) com uma absorbância entre 0,700 e 0,800 à OD_{600} , provavelmente a composição do meio de fermentação que se difere em cada ensaio e a falta de homogeneidade de sistema afetaram os valores medidos para a concentração celular inicial, conforme mostra a Figura 17.

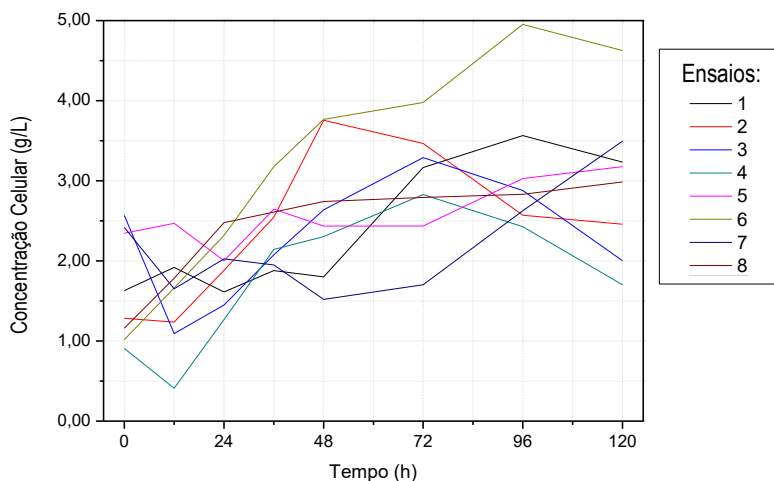
A presença do gásóleo pesado no sistema também pode ter afetado os resultados cinéticos. Na Figura 18, têm-se as curvas de concentração celular para os respectivos ensaios de controle. Neste caso, observa-se que na ausência do GOP foi necessário um menor tempo de adaptação celular e há uma maior similaridade entre as curvas obtidas.

Figura 17 – Cinéticas de concentração celular para os 8 ensaios preliminares de BDS, com variação na concentração de glicose e de extrato de levedura, conforme descrito na Tabela 12, item 3.2.2.1.



Fonte: Autora (2017).

Figura 18 – Cinéticas de concentração celular para os 8 ensaios controle dos estudos preliminares de BDS, com variação na concentração de glicose e de extrato de levedura, conforme descrito na Tabela 12, item 3.2.2.1.



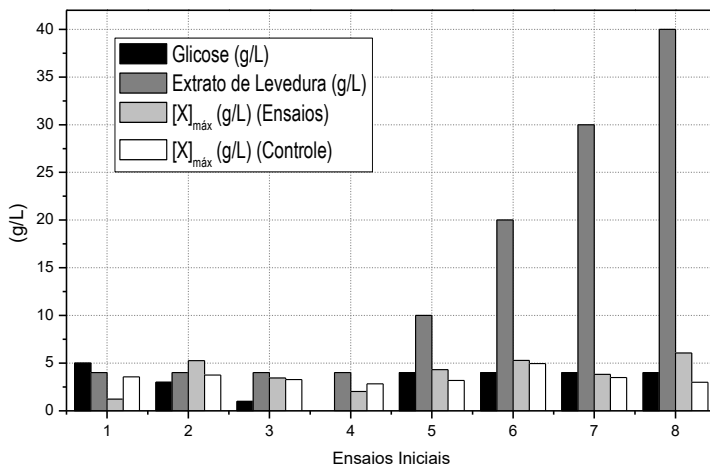
Fonte: Autora (2017).

Pode-se afirmar que a presença do GOP influenciou no crescimento celular, proporcionando simultaneamente uma maior

concentração de biomassa no meio nutricional e uma maior variabilidade nos dados, conforme ilustrado na Figura 17.

Além disso, o efeito do GOP e do teor de glicose e extrato de levedura no sistema também foi avaliado em termos de concentração celular máxima obtida ($[X]_{\text{máx}}$) em cada ensaio e respectivo controle. Neste caso, através da Figura 19 nota-se que a concentração de glicose influenciou no aumento da concentração de células no meio, principalmente, na presença do gasóleo pesado. Já em relação ao extrato de levedura, na presença do GOP, não há uma tendência tão clara, porém, alcançou-se uma concentração celular máxima maior do que nos testes com variação na concentração de glicose. Além disso, a presença do GOP maximizou o crescimento celular, atingindo uma concentração máxima de 5,28 g /L no ensaio 2 em 120 h de processo, enquanto que no respectivo controle atingiu-se 3,76 g/L em 48 h de processo. Nos ensaios de 5 a 8 alcançou-se a máxima concentração celular de 6,06 g/L no ensaio 8 em 48 h de processo, enquanto no respectivo teste controle atingiu-se 2,98 g/L em 120 h de fermentação.

Figura 19 – Concentração celular máxima medida para os 8 ensaios de BDS e de controles dos estudos preliminares de BDS, em paralelo com a concentração de glicose e extrato de levedura empregada.

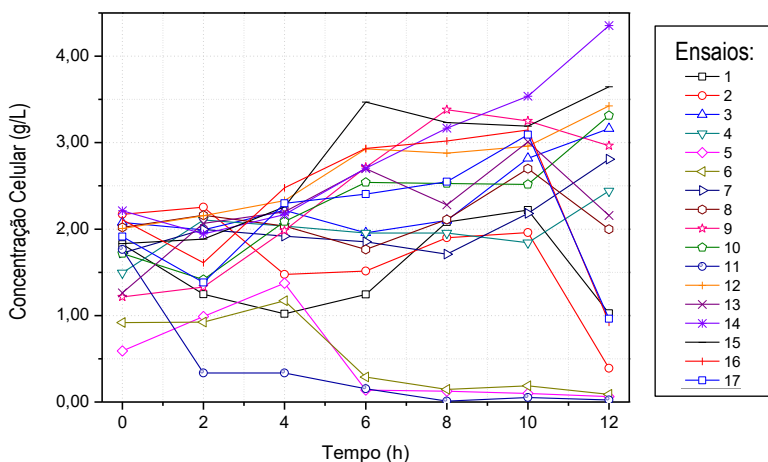


Fonte: Autora (2017).

4.1.2.1 Avaliação do crescimento celular nas condições do planejamento experimental, apresentado na Tabela 13

A concentração celular no caldo fermentativo também foi avaliada para os ensaios do planejamento experimental. A Figura 20 ilustra as cinéticas de concentração celular para até 12 h de processo nos dezessete ensaios realizados.

Figura 20 – Cinéticas de concentração celular para os 17 ensaios de BDS nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.2.1, com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.



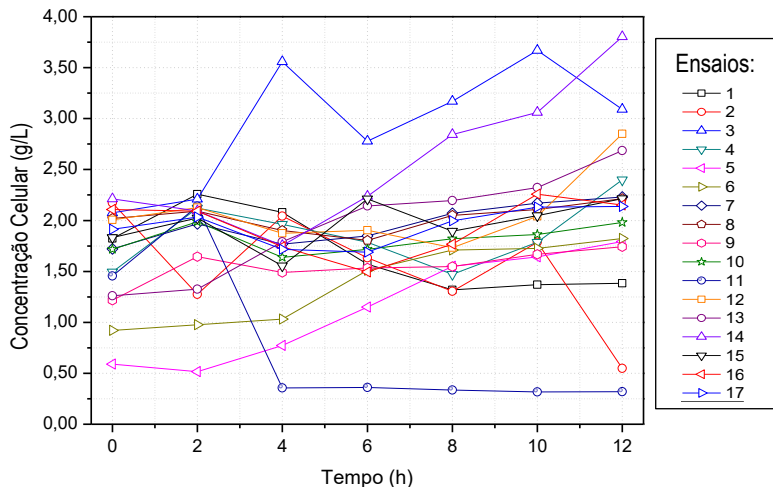
Fonte: Autora (2017).

As cinéticas dos ensaios 9, 10 e 14, apresentaram um melhor desempenho no sentido do ganho de biomassa, sendo utilizadas, neste caso, concentrações intermediárias de glicose, extrato de levedura e maltose, dentro dos níveis avaliados. Por outro lado, nos ensaios 5, 6 e 11 observou-se apenas o decaimento celular e nestas três situações foram empregadas baixas concentrações de extrato de malte e elevadas teores de glicose, apesar do teor máximo empregado de glicose já ser um valor relativamente baixo.

Além disso, observa-se na Figura 19, com as cinéticas para os ensaios de controle, que a presença do GOP realmente afeta o processo de crescimento celular. Neste caso, o crescimento celular foi menos acentuado, sendo que das melhores situações observadas em relação ao crescimento celular na presença do GOP (Figura 21), apenas o ensaio 14

apresentou desempenho semelhante no respectivo ensaio de controle. Por outro lado, de modo geral, a morte celular não foi tão proeminente como ocorreu em alguns ensaios de BDS.

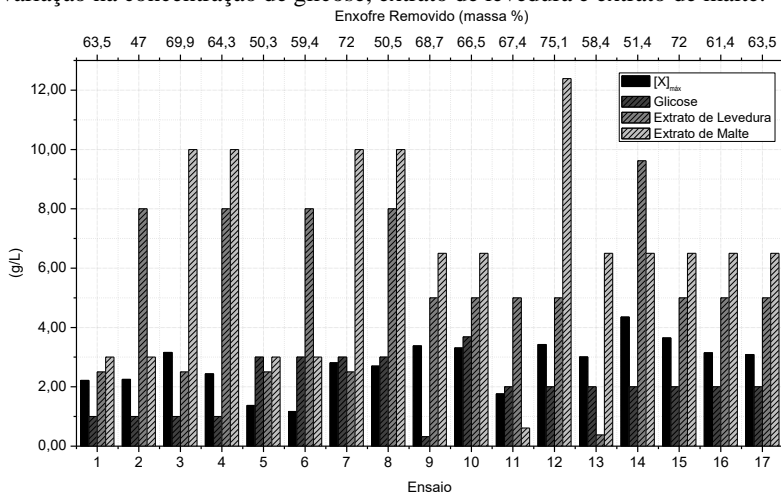
Figura 21 – Cinéticas de concentração celular para os 17 ensaios de controle nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.2.1, com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.



Fonte: Autora (2017).

Na Figura 22 tem-se a concentração celular máxima obtida para os ensaios do planejamento experimental de BDS em paralelo com a concentração de glicose, extrato de malte e de levedura, além de apresentar os valores de BDS (% massa) obtidos em 12 h de processo.

Figura 22 – Concentração celular máxima medida para os 17 ensaios de BDS e de controle nas condições do planejamento experimental, em paralelo com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.



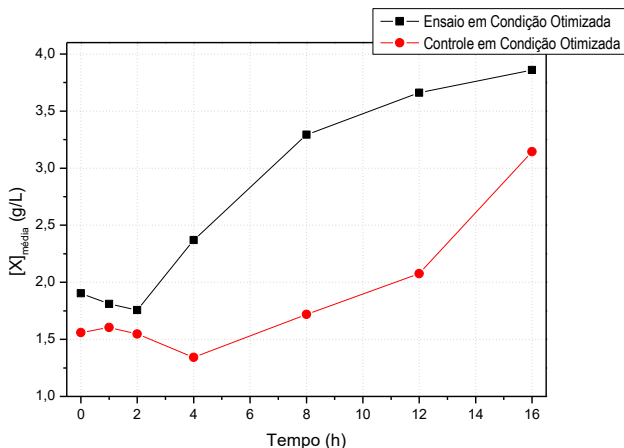
Fonte: Autora (2017).

A concentração celular máxima foi obtida no ensaio 14, sendo esta igual a 4,35 g de células/L em 12 h de processo. Neste ensaio utilizou-se uma concentração intermediária de glicose e extrato de levedura, enquanto que o extrato de maltose foi empregado em maior concentração. Nos ensaios com alta concentração de extrato de levedura, mesmo sob baixas concentrações das fontes de carbono, alcançaram-se elevadas concentrações de biomassa. Em relação ao percentual de enxofre removido do GOP não foi observado uma relação clara com a concentração celular alcançada.

4.1.2.2 Avaliação da concentração de biomassa para os ensaios de dessulfurização em condição nutricional otimizada

A partir da análise estatística dos resultados de biodessulfurização foram propostas as condições ótimas para o meio nutricional e estas foram empregadas em um novo ensaio, realizado em triplicata. E assim, como realizado para os demais ensaios, fez-se a análise da concentração celular. Deste modo, na Figura 23, pode-se observar as curvas cinéticas de concentração celular média, obtidas para o ensaio em condição nutricional otimizada e o respectivo ensaio para o controle do efeito do GOP no sistema.

Figura 23 – Cinéticas de concentração celular média nos para o ensaio em condições otimizadas, determinadas através do perfil de desejabilidade, conforme descrito no item 4.1.1.2 e respectivo controle.



.Fonte: Autora (2017).

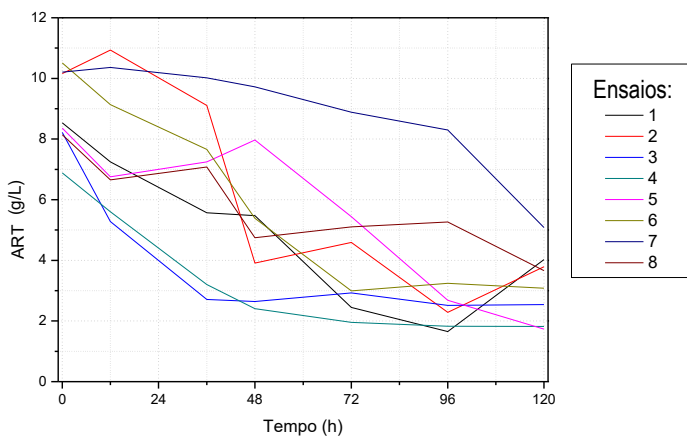
Podemos observar que, neste caso, o tempo de adaptação da estirpe no meio de fermentação foi menor na presença do gasóleo pesado e, além disso, atingiu-se uma maior concentração de biomassa ($3,86 \pm 0,3072$ g de células/L) em 16 h de processo. Deste modo, podemos verificar que a presença da fração orgânica no meio não inibe o desenvolvimento da estirpe bacteriana *R. erythropolis*, que assim se demonstra adequada para aplicação na biodessulfurização do GOP., conforme já evidenciado anteriormente (DINAMARCA et al., 2014; MAASS, 2015)

4.1.3 Consumo de Açúcares Redutores Totais no Caldo Fermentativo

A glicose e o extrato de malte são fontes nutricionais de carbono utilizadas no sistema biocatalítico de BDS para o crescimento e manutenção da estirpe *R. erythropolis* ATCC 4277. Estes substratos pertencem ao grupo dos açúcares redutores, uma vez que em meio básico são capazes de se oxidar. Deste modo, avaliou-se o consumo de açúcares redutores totais (ART) ao longo da fermentação, a fim de averiguar se estes substratos poderiam ser fatores limitantes no processo.

Na Figura 24 nota-se através das curvas de consumo de ART para o grupo de ensaios iniciais de BDS, que mesmo após 120 h há cerca de 2 g de glicose/ L remanescente no meio. Deste modo, acredita-se que as fontes de carbono foram empregadas em proporções suficientes para a nutrição celular. Além disso, apesar da variabilidade dos resultados obtidos pelo método DNS, verificamos que exceto para o ensaio 7 o consumo de ART foi acentuado até 48 h de processo, sendo que para as menores concentrações de glicose utilizadas (ensaio 3 e 4) praticamente não houve mais consumo do nutriente após este período.

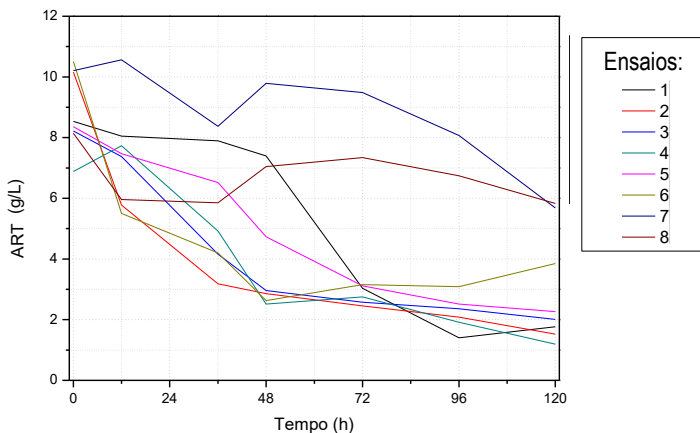
Figura 24 – Cinéticas de consumo de ART para os 8 ensaios preliminares de BDS, com variação na concentração de glicose e de extrato de levedura, conforme descrito na Tabela 12, item 3.2.2.1.



Fonte: Autora (2017).

As cinéticas de consumo de ART para o grupo de ensaios iniciais de controle também foram determinadas, como mostra a Figura 25. Neste caso, nos experimentos 1 e 8 o consumo de ART foi menos acentuado do que nos respectivos ensaios de BDS, porém para os demais ensaios observou-se um comportamento semelhante, e ao final do processo, novamente, verificou-se que o substrato não foi totalmente consumido.

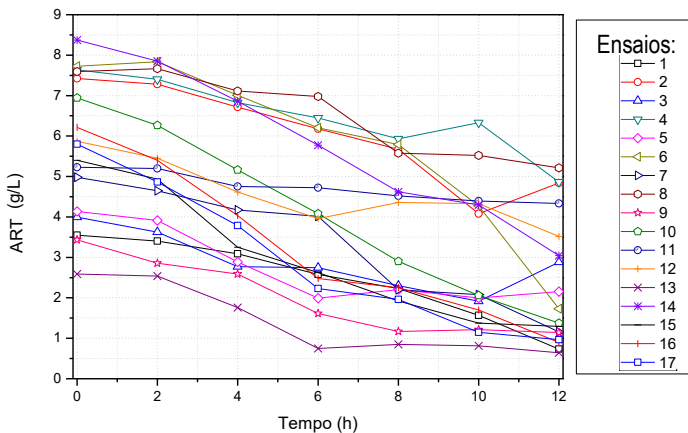
Figura 25 – Cinéticas de consumo de ART para os 8 ensaios controle dos estudos preliminares de BDS, com variação na concentração de glicose e de extrato de levedura, conforme descrito na Tabela 12, item 3.2.2.1.



Fonte: Autora (2017).

Na segunda etapa deste estudo fez-se análise da concentração de ART no grupo de ensaios propostos pelo planejamento experimental, assim como nos ensaios realizados sob as mesmas condições, porém sem o GOP, para o controle do processo. Deste modo, a Figura 26 mostra o consumo de ART ao longo de 12 h de fermentação para os dezessete ensaios realizados, sendo que, de modo geral, a concentração de ART no meio reduziu-se linearmente, exceto para o ensaio 12, onde praticamente não há diferença entre a concentração inicial e final.

Figura 26 – Cinéticas de consumo de ART para os 17 ensaios de BDS nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.2.1, com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.

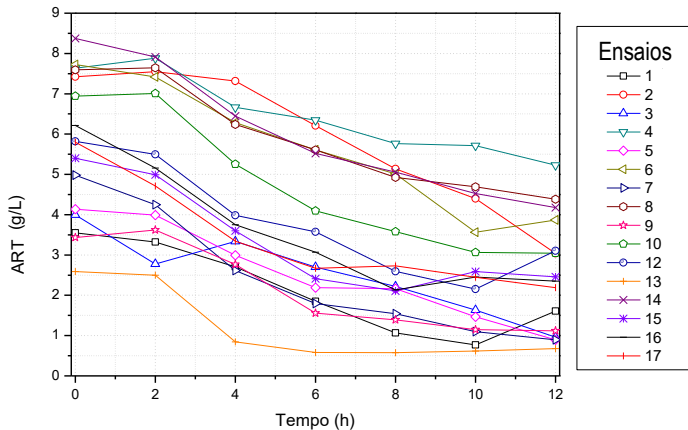


Fonte: Autora (2017).

Além disso, ressalta-se que os dados apresentados para este grupo de ensaios se mostraram mais condizentes com os valores iniciais esperados se comparado aos testes iniciais e que a maior dispersão da concentração inicial de açúcares se deve a variação simultânea de glicose e extrato de malte no meio fermentativo. A partir da Figura 23 verifica-se ainda que ao final do processo há uma quantidade remanescente de açúcares não consumidos, mesmo para as situações onde se empregou uma menor concentração das fontes nutricionais. No entanto, a disponibilidade de açúcares ao final do processo em alguns ensaios foi inferior a 2 g de glicose /L, sendo consumido entre 0,89 até 5,57 g de glicose/L.

Em relação aos ensaios de controle, sendo que as cinéticas para o consumo de ART são apresentadas na Figura 27, observa-se um comportamento semelhante ao descrito anteriormente para o sistema biocatalítico de BDS, no entanto, apenas nos ensaios 9, 11, 12 e 13 consumiu-se uma quantidade equivalente de açúcares redutores.

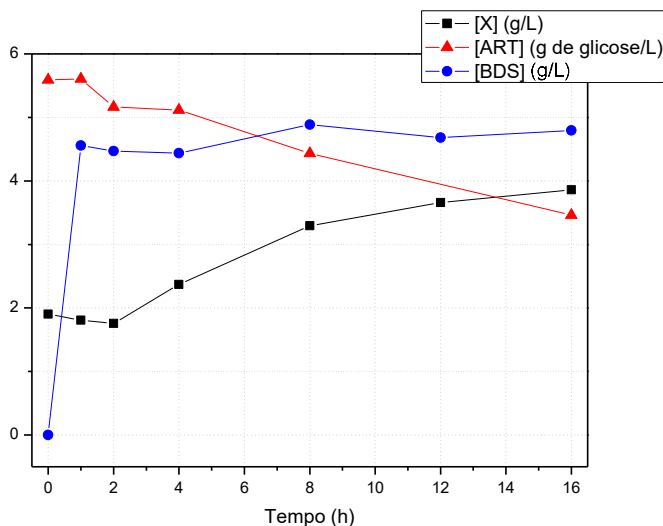
Figura 27 – Cinéticas de consumo de ART para os 17 ensaios de controle nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.2.1, com variação na concentração de glicose, extrato de levedura e extrato de malte.



Fonte: Autora (2017).

Ao finalizar a etapa de otimização do processo de BDS, aplicaram-se as condições otimizadas em um novo ensaio realizado em triplicata, tal como já explicitado anteriormente. Assim, na Figura 28 foi plotado a curva de consumo de ART em conjunto com as curvas de crescimento celular no meio de fermentação e de biodessulfurização do GOP para até 16 h de processo, com o intuito de observar melhor um paralelo entre os parâmetros.

Figura 28 – Cinéticas de consumo de ART, crescimento de *R. erythropolis* e de dessulfurização para o ensaio de BDS em condições ótimas.



Fonte: Autora (2017).

Através da Figura 28 é possível observar que tanto o consumo de enxofre no GOP, quanto o início do consumo de açúcares redutores, ocorre ainda na fase lag do crescimento bacteriano, ou seja, dentro de 2 h de processo. Após 8 h de fermentação, o comportamento da curva crescimento celular atinge a fase estacionária e já não se observa um aumento na velocidade de biodessulfurização, no entanto a concentração de ART continua em declínio até o final do tempo de processo.

4.2 DESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO POR CÉLULAS LIVRES DE *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ATCC 4277 EM MEIOS NUTRICIONAIS ALTERNATIVOS

O custo com o meio de cultura para o crescimento da estirpe bacteriana envolvida no processo de BDS é um dos fatores limitantes na aplicação deste bioprocessos (ALVES; PAIXÃO, 2014; BONIEK et al., 2014). Por isso, otimizar as condições nutricionais ou ainda, aplicar novas alternativas para substituir o meio de cultura sintético é fundamental para viabilização da aplicação industrial da BDS.

Deste modo, nos tópicos a seguir serão discutidos os resultados obtidos para os ensaios de biodessulfurização do gasóleo pesado,

testando como meio nutricional para a bactéria *R. erythropolis* ATCC 4277, o trub e a manipueira. Além de avaliar a composição dos materiais e o comportamento do consumo de açúcares redutores ao longo destes ensaios.

4.2.1 Trub

O trub empregado neste estudo, conforme Tabela 23, possui um elevado teor de Carbono Orgânico Total (COT) e de Nitrogênio Total (NT), indicando que possui uma elevada carga de nutrientes assim como relatado em outros estudos. Contudo, podem ocorrer variações na composição em função do processo de fabricação em diferentes cervejarias. (BARCHET, 1993; KUNZE, 2014; PANDEY et al., 2000; PRIEST; STEWART, 2006). Deste modo, o trub pode fornecer condições para o crescimento celular da estirpe *R. erythropolis* ATCC 4277 no processo de BDS do gasóleo pesado.

Tabela 23 – Caracterização físico-química do trub.

Material	COT (g/L)	CT (g/L)	CI (g/L)	NT (g/L)	pH
trub	80,73	80,92	0,19	19,40	5,58

Fonte: Autora (2017).

Dentre as características físico-químicas do trub destaca-se o seu pH natural que tem caráter ácido. Estudos anteriores (TODESCATO, 2014) demonstraram que o pH neutro seria mais adequado para a fermentação em meio sintético. Neste estudo, no entanto, diferente dos ensaios com meio de fermentação sintético fez-se o uso do trub sem tratamento prévio, sendo que o mesmo foi apenas previamente esterilizado, para evitar a proliferação de outros micro-organismos, podendo assim o pH ser um parâmetro de estudo para trabalhos futuros.

4.2.1.1 Capacidade de Biodessulfurização

O trub foi testado como potencial substituinte para o meio de fermentação sintético na biodessulfurização do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 24.

Tabela 24 – Cinética da BDS do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em meio aquoso composto por trub.

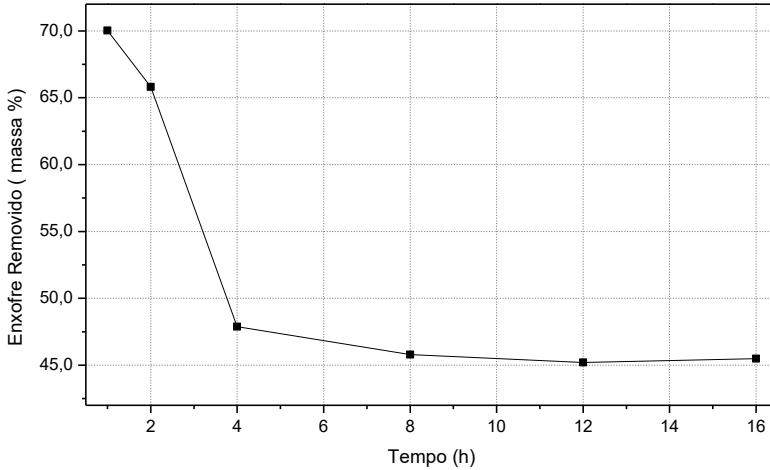
Tempo	Concentração de Enxofre	Enxofre Removido	
		mg/kg	% massa
h	mg/kg	mg/kg	% massa
0	7246	0	0
1	2173	5073	70,0
2	2477	4769	65,8
4	3777	3469	47,9
8	3928	3318	45,8
12	3970	3276	45,2
16	3950	3296	45,6

Fonte: Autora (2017).

A remoção máxima de enxofre foi igual a 70,0%, logo na primeira hora de processo, alcançando assim uma velocidade específica de dessulfurização equivalente a $5.073 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Deste modo, os resultados indicam que o trub pode oferecer nutrientes para a estirpe, beneficiando a dessulfurização do GOP, principalmente, devido à elevada velocidade específica de degradação e remoção de enxofre da fase orgânica.

No entanto, através da Figura 29 podemos visualizar o decaimento na remoção de enxofre ao longo do tempo de processo. Isto pode estar associado ao transporte dos compostos sulfurados da fase aquosa para a fase orgânica do sistema, devido à redução da tensão superficial na interface do sistema, uma vez que a estirpe empregada apresenta características hidrofóbicas e capacidade de síntese de biossurfactante na presença de compostos oleosos como o gasóleo pesado e combustíveis de petróleo (BICCA; FLECK; AYUB, 1999; FENG; SWIFT; SINGHAL, 2013; MAASS, 2015; PIROG et al., 2015; RODRIGUES et al., 2006; SHAVANDI et al., 2011; XIA et al., 2011).

Figura 29 Cinética de dessulfurização do GOP por *R. erythropolis* para ensaio com meio de fermentação substituído por trub.



Fonte: Autora (2017).

A menor remoção de enxofre em intervalos maiores de tempo pode também ser justificada pela interferência no contato entre a parede celular e a fase orgânica pelos aglomerados formados, uma vez que o trub é constituído por partículas de diferentes tamanhos (JAKUBOWSKI et al., 2016).

Deste modo, é essencial aprimorar o método de separação e recuperação das fases, com o intuito de evitar a contaminação do gasóleo pesado e assim maximizar a remoção de enxofre. Além disso, deve-se estudar os parâmetros de processo e de tratamento do material para encontrar as condições ideais, tal como se fez para o meio sintético.

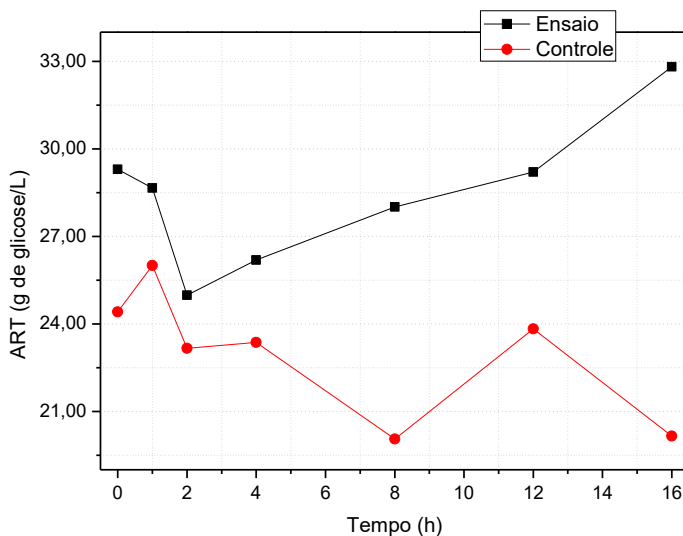
4.2.1.2 Consumo de Açúcares Redutores

Segundo Mathias e Mello (2014) não há muitos relatos na literatura sobre os métodos aplicados para a determinação do teor de açúcares redutores solúveis nos resíduos cervejeiros. Entretanto alguns pesquisadores (BANDINELLI, 2015; GENCHEVA; DIMITROV; DOBREV, 2012) aplicaram o método DNS para determinar o teor de grupos redutores presentes no bagaço de malte e em amostras de mosto.

Deste modo, devido à similaridade entre os materiais, a concentração de açúcares redutores totais (ART) no trub foi determinada

e acompanhada ao longo do processo de BDS e ensaio de controle, pelo método DNS, como mostra a Figura 30.

Figura 30– Cinética de consumo de ART no teste com trub como meio de fermentação para o processo de BDS do gasóleo pesado e respectivo controle.



Fonte: Autora (2017).

Deste modo, observamos que mesmo partindo da mesma amostra, a concentração inicial de ART apresenta elevada variação, devido a falta de homogeneidade do material. Além disso, a discrepância em alguns pontos analisados pode estar associada à interferentes presentes no trub e a presença de sólidos em suspensão. Em até 2 h de fermentação o ART presente no trub é consumido, no entanto, após este período há um incremento na concentração de açúcares redutores no ensaio de BDS, enquanto a concentração do mesmo continua diminuindo no sistema de controle. Assim, é necessário analisar mais profundamente a composição das alíquotas de trub, obtidas ao longo do processo, para compreender este comportamento, averiguar formas de tratamento prévio do material para eliminar possíveis interferentes, ou ainda, aplicar outras técnicas para a determinação de açúcares no meio.

4.2.2 Manipueira

A caracterização da manipueira para aplicação como caldo de fermentação e fonte de nutrientes para a estirpe *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 na biodessulfurização do GOP foi realizada e os resultados estão descritos na Tabela 25.

Deste modo, observamos que a manipueira apresentou um teor de carbono orgânico total dentro do intervalo de concentração verificado por outros autores e uma concentração ainda maior de nitrogênio total (WOICIECHOWSKI et al., 2013), sendo estes componentes nutricionais essenciais para o desenvolvimento celular nos processos fermentativo.

Tabela 25 – Caracterização media da Manipueira.

Resíduo	COT (g/L)	CT (g/L)	CI (g/L)	NT (g/L)	pH
manipueira	23,16	23,22	0,06	24,52	4,46

Fonte: Autora (2017).

No ANEXO A, pode-se visualizar o relatório de ensaios do Laboratório Biocontrol da manipueira gerada pelo processo de produção de farinha de mandioca na empresa Fariman. Com base nestes resultados, nota-se que o pH medido está condizente com o exposto no laudo da Biocontrol, apresentando um pH ácido e, portanto, diferente ao empregado nos ensaios realizados em meio sintético. Já em relação ao teor de carbono e nitrogênio, os valores medidos foram superiores, onde esta discrepância pode estar relacionada à composição variável do resíduo, conforme já relatado por outros autores (CEREDA; PANTAROTO, 2001; FERNANDES JÚNIOR, 2001; KUNZLER et al., 2013; SILVA et al., 2016; WOICIECHOWSKI ET AL., 2013; WOSIACKI; CEREDA, 2002). A variação da composição dos resíduos pode estar relacionada, entre outros fatores, ao processo fabril ou a oscilação natural da composição dos produtos agrícolas, afetando consequentemente no rendimento e na sua aplicabilidade como insumo em novos processos.

A realização de tratamento prévio para a eliminação ou redução da concentração de compostos tóxicos, ou ainda, para a correção de parâmetros como o pH, há a implicação de custos que podem inviabilizar a utilização do resíduo. Em virtude disso, a manipueira foi apenas esterilizada, sem ser submetida a qualquer outro tratamento prévio e empregada em seu pH natural tal como ocorreu com o trub,

para avaliar a sua capacidade como meio de fermentação no processo de dessulfurização do GOP.

4.2.2.1 Capacidade de Biodessulfurização

A capacidade de dessulfurização do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em meio de fermentação substituído por manipueira foi avaliado nesta etapa e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 26.

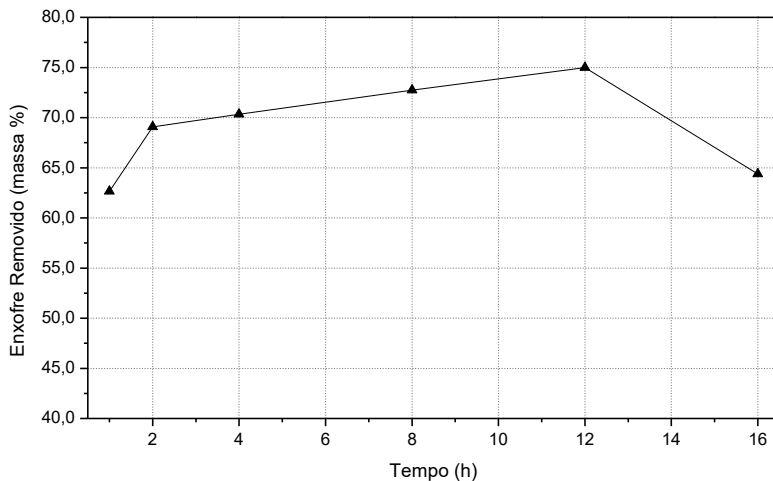
Tabela 26 – Cinética de BDS do GOP por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 em meio substituído por manipueira.

Tempo h	Concentração de Enxofre mg/kg	Enxofre Removido	
		mg/kg	massa %
0	7246	0	0
1	2706	4540	62,7
2	2240	5006	69,1
4	2150	5096	70,3
8	1974	5271	72,7
12	1812	5434	75,0
16	2580	4666	64,4

Fonte: Autora (2017).

Os resultados obtidos demonstram um aumento no teor de enxofre removido ao longo do processo, alcançando assim uma remoção percentual máxima de 75 % com uma velocidade específica de degradação de $452 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Deste modo, a dessulfurização foi superior àquela obtida com o trub, porém a uma menor velocidade específica de degradação, uma vez que mesmo sem tratamento prévio para remoção de possíveis compostos tóxicos, inerentes a composição da manipueira, a estirpe bacteriana se adaptou melhor a este meio, mantendo o índice de dessulfurização por mais tempo, conforme se observa na Figura 31.

Figura 31 – Cinética de dessulfurização do GOP por *R. erythropolis* para ensaio com meio de fermentação substituído por manipueira.



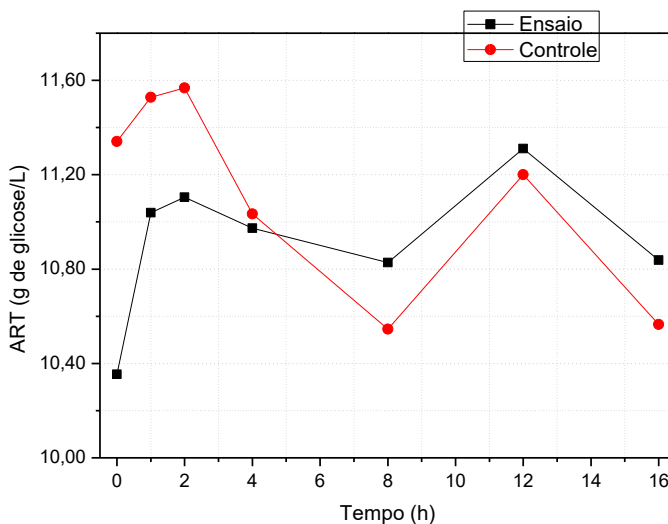
Fonte: Autora (2017).

Contudo, deve-se ressaltar que assim como o trub, para aplicar a manipueira na biodessulfurização de compostos petroquímicos, outros parâmetros de processo devem ser estudados, bem como os métodos separação e recuperação das fases e ainda, buscar compreender de que forma a composição do resíduo pode beneficiar ou interferir negativamente na remoção do enxofre e na qualidade do produto final.

4.2.1.2 Consumo de Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores totais (ART), similarmente ao que ocorreu na etapa de estudo com o meio sintético e com o trub, foi determinada na manipueira pelo método DNS. Deste modo, a Figura 32 apresenta a curva cinética para o consumo de ART ao longo do processo de dessulfurização e no sistema controle.

Figura 32 – Cinética de consumo de ART no teste com a manipueira como meio de fermentação para o processo de BDS do gasóleo pesado e respectivo controle.



Fonte: Autora (2017).

Assim como o trub, a falta de homogeneidade do material e a presença de sólidos em suspensão podem ter interferido nos resultados obtidos, uma vez que o método DNS é colorimétrico. Deste modo, foi observada uma discrepância na concentração inicial de ART, assim como um aumento na concentração do mesmo ou invés do seu consumo ao longo do processo, tal como era esperado.

No entanto, a manipueira assim como outros resíduos agropecuários lignocelulósicos, contém além dos açúcares redutores, o amido, que é não fermentescível. Contudo, através da hidrólise ácida ou enzimática, o amido presente nestes materiais é convertido a açúcares redutores, aumentando assim a sua concentração no meio fermentativo. Este processo é normalmente empregado como etapa preliminar à fermentação para a produção de bioetanol (BARROS et al., 2013; FERREIRA et al., 2013; SUMAN et al., 2011). Dessa maneira, acredita-se que o amido presente na manipueira possa ter sofrido processo de hidrólise ao longo do processo, aumentando assim a disponibilidade de açúcares redutores, ao mesmo tempo em que a estirpe se nutria destes compostos, justificando o comportamento da curva cinética do ensaio e controle do processo de biodessulfurização.

4.3 DESSULFURIZAÇÃO DO GASÓLEO PESADO POR ACELERADOR DE COMPOSTAGEM ORGANTI HBIOL®

Nesta seção será abordado e discutido os resultados obtidos para os ensaios de BDS do gasóleo pesado por acelerador de compostagem Organti H-Biol®. Dessa maneira, será avaliado o efeito da temperatura e da concentração acelerador de compostagem (massa %) no sistema sobre a remoção de enxofre da fase orgânica. Além disso, através das cinéticas de dessulfurização e ainda, por meio de ensaios pontuais extras, será observado o comportamento do processo ao longo do tempo.

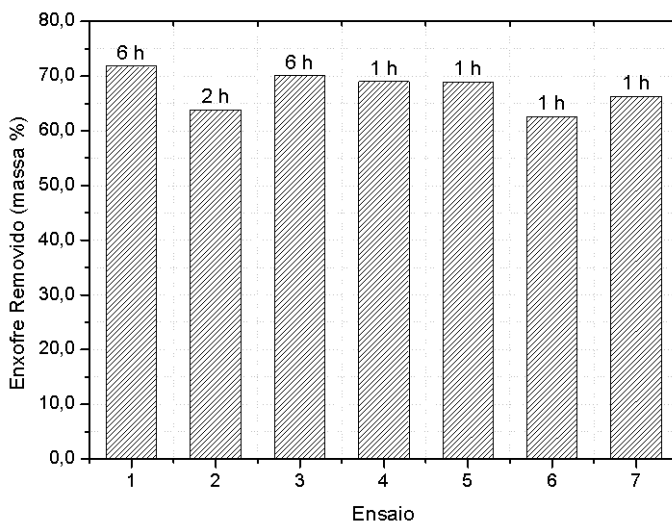
4.4.1 Planejamento Experimental Fatorial 2²

Inicialmente, foi elaborado um planejamento experimental do tipo fatorial 2², conforme descrito no item 3.2.3. Os resultados cinéticos obtidos para o teor de enxofre removido do GOP por meio do processo de BDS com o acelerador de compostagem estão expressos na Tabela B.2 no APÊNDICE B. Sendo que estes dados indicaram que a seleção de micro-organismos presentes no Organti H-Biol é capaz de promover a dessulfurização do GOP mediante as condições testadas, uma vez que se atingiu índices de remoção superiores a 60,0 % (em massa) em todos os ensaios.

Além disso, deve-se ressaltar que as bactérias presentes no Organti H-Biol® são termofílicas, e com isso, pode-se empregar temperaturas superiores àquelas utilizadas no processo de BDS por *R. erythropolis*. Tal fato representa uma vantagem em termos de processo, uma vez que durante o refino do petróleo, o mesmo é submetido a temperaturas superiores, minimizando assim os custos com o resfriamento dos fluxos a serem dessulfurizados.

Na Figura 33, observa-se a máxima remoção percentual de enxofre obtida em cada ensaio, além disso, constata-se que algumas condições promoveram uma maior velocidade específica de dessulfurização. A remoção percentual máxima (massa %) foi alcançada em 6 h de processo com 10,0 % (m/m) de Organti HBIol® à 60 °C, sendo igual a 70,1 % com a velocidade específica de dessulfurização de 845,67 mg de enxofre·kg⁻¹·h⁻¹.

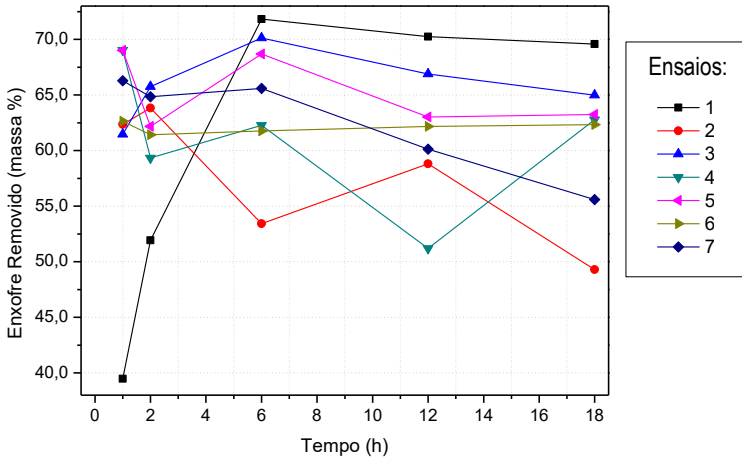
Figura 33– Remoção percentual máxima de enxofre (massa %) do GOP por Organti H-Biol® nos 7 ensaios de BDS nas condições do planejamento experimental, conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.3.



Fonte: Autora (2017).

As cinéticas de dessulfurização biocatalítica são apresentadas na Figura 34, onde se observa que em 1 h de processo, exceto para o ensaio 1, alcançou-se uma remoção superior a 60 %. Além disso, de modo geral, o processo atinge o seu ápice em 6 h e após este período inicia-se o decaimento da eficiência de remoção do enxofre da fase orgânica.

Figura 34 – Cinéticas de dessulfurização do GOP por Organti H-Biol® para os 7 de BDS nas condições do planejamento experimental, com variação na concentração Organti H-Biol® (% massa) e na temperatura (°C), conforme descrito na Tabela 14, item 3.2.3.



Fonte: Autora (2017).

Os resultados para 6 h de processo foram analisados estatisticamente no intervalo de confiança de 95%, e a um nível de significância $\alpha = 0,05$. A Tabela 27 apresenta os efeitos estimados das variáveis estudadas, temperatura e percentual mássico de Organti H-Biol®, na degradação do enxofre do GOP para um modelo de segunda ordem, além dos respectivos índices estatísticos. Conforme destacado em **negrito** na Tabela 27, apenas o teor de acelerador de compostagem e a constante do modelo apresentaram efeito significativo sobre a variável resposta, ou seja, na remoção de enxofre no GOP.

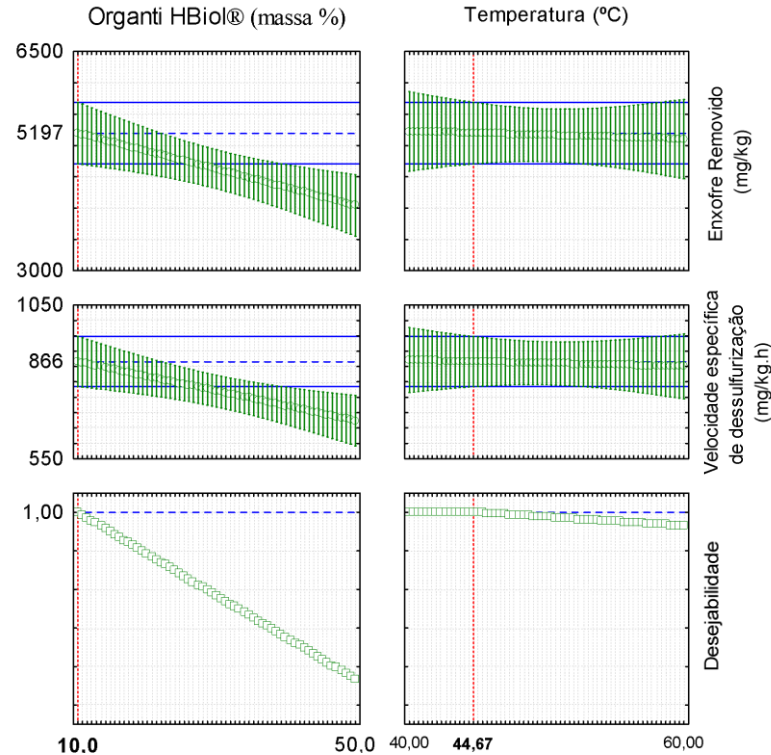
Tabela 27 – Efeitos estimados dos fatores estudados e da constante do modelo de regressão com respectivos índices estatísticos para os ensaios com Organti HBiol®.

	Efeitos	Erro Padrão	Teste t de Student	Nível p
Média/Interações	4689,49	79,72	58,8245	0,0000
(1) Organti HBiol® (massa %)	-949,69	210,92	-4,5026	0,0205
(2) Temperatura (°C)	258,95	210,92	1,2277	0,3071
(1) e (2)	381,78	210,92	1,8100	0,1680

Fonte: Autora (2017).

Dentro dos níveis estudados para a concentração de Organti H-Biol® no meio, o efeito da variável é negativo, ou seja, deve-se minimizar a concentração do Organti H-Biol® para maximizar a remoção de enxofre. A mesma tendência foi observada na análise do perfil de valores preditos e desejabilidade, como mostra a Figura 35, que indicou que para maximizar a variável resposta deve-se empregar um teor de acelerador de compostagem equivalente ao nível inferior avaliado. Deste modo, as condições ideais de processo são iguais a 10,0% (m/m) de acelerador de compostagem a uma temperatura de 44,87 °C.

Figura 35 – Avaliação do efeito da concentração de Organti H-Biol® (massa %) e da temperatura (°C) na remoção de enxofre (mg/kg) e na velocidade específica de dessulfurização (mg/kg.h) em 6 h de fermentação dos ensaios de BDS por Organti H-Biol®, oriundos do planejamento fatorial 2², através do perfil para valores preditos e desejabilidade.



Fonte: Autora (2017).

4.4.2 Ensaios Pontuais Extras

Como o ponto ótimo para a concentração do acelerador de compostagem foi de 10,0% (m/m), o valor mínimo testado, foram realizados ensaios extras com proporções inferiores a fim de verificar a eficiência do composto nestas condições. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 28.

Tabela 28 – Resultados dos ensaios extras de BDS do GOP por acelerador de compostagem Organti H-Biol®.

Ensaio	Tempo	Organti HBiol®	Temperatura	Concentração de Enxofre	Enxofre Removido	
	h	% m/m	°C	mg/kg	mg/kg	massa %
1	18	1,0	50	6895	341	4,7
2	2	1,0	50	6175	1061	14,7
3	2+4	1,0+1,0	50	2963	4273	59,0
5	2	5,0	50	2083	5153	71,2
6	6	5,0	50	2039	5197	71,8
7	18	5,0	50	2128	5108	70,6

Fonte: Autora (2017).

De acordo com estes dados, verificamos que é possível manter a eficiência de processo, com uma dessulfurização percentual acima de 70,0%, empregando 5,0% de Organti H-Biol®. Já os ensaios com apenas 1,0% do produto não apresentaram resultados satisfatórios. No entanto, em um processo semi-contínuo, onde após duas 2 h, fez-se a adição de mais 1,0% de Organti H-Biol®, totalizando assim 6 h de processo, atingiu-se uma remoção de 59,0%. Acredita-se que assim como ocorreu no processo de BDS por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, após um determinado tempo de fermentação, os compostos sulfurados já removidos do GOP retornam à fração orgânica. Deste modo, ao promovermos a dessulfurização em uma sequência de estágios, neste caso, em dois estágios (ensaio 3, conforme descrito na Tabela 28), possivelmente a separação das fases ocorre antes da saturação do Organti H-Biol® ou ao menos, antes que os compostos sulfurados retornem ao óleo. E com isso, no segundo estágio de dessulfurização, promove-se uma nova remoção do enxofre do GOP, maximizando a eficiência do processo. Além disso, reduzimos ainda, o tempo de processo e a concentração necessária do Organti H-Biol®, sendo ambos os aspectos interessantes do ponto de vista econômico.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO S FUTUROS

5.1 CONCLUSÕES

Ao término deste estudo, acerca da avaliação da influência das fontes de carbono e nitrogênio na dessulfurização do gasóleo pesado por *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, conclui-se que, dentro dos intervalos estudo, a redução da concentração de glicose e extrato de malte beneficiou a remoção de enxofre, enquanto o teor de extrato de levedura deve ser superior àquele indicado pelo fornecedor para desenvolvimento da estirpe.

De acordo com a análise do perfil de desejabilidade estabeleceram-se as condições ótimas de processo em relação à composição nutricional do meio de fermentação. Assim, empregando 1,21 g/L de glicose, 4,52 g/L de extrato de malte e 12,39 g/L de extrato de levedura, atingiu-se uma remoção percentual (em massa) de 70,0% em 8 h de, a uma velocidade específica de degradação superior a 4.500 mg de enxofre. kg de $\text{GOP}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Nos ensaios preliminares atingiu-se uma remoção percentual de 75,9% (em massa) em 72 h, empregando 1,00 g/L de glicose, 10,00 g/L de extrato de malte e 4,00 g/L de extrato de levedura. Deste modo, a otimização das condições nutricionais, através de planejamento experimental, permitiu, principalmente, minimizar o tempo de processo, elevando assim a velocidade específica de degradação do enxofre. Além disso, os resultados encontrados são aproximadamente 23,0 % superiores aos obtidos em estudos anteriores em condições similares.

Além disso, verificou-se que as melhores condições para o crescimento celular não estão associadas às condições ótimas de dessulfurização.

Em relação aos ensaios de biodessulfurização, substituindo o meio de fermentação sintético por trub e manipueira, constatou-se que estes materiais podem ser empregados sem gerar perdas na eficiência de remoção do enxofre do gasóleo pesado. No teste com o trub atingiu-se uma remoção percentual de 70,0% em apenas 1 h de processo, com uma velocidade específica de 5.063,32 mg de enxofre. kg $\text{GOP}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Para o ensaio com a manipueira pode-se dizer que o tempo ideal de processo foi de 12 h com uma remoção percentual de 75,0%, embora apresentasse menor velocidade específica de dessulfurização (452,0 mg de enxofre, kg $\text{GOP}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Quanto ao uso do acelerador de compostagem Organti H-Biol®, verificou-se por planejamento experimental, que concentrações superiores a 10,0 % (m/m) do produto afetam negativamente na remoção de enxofre do gásóleo pesado. Assim, atingiu-se uma dessulfurização de 70,1% com a velocidade específica de dessulfurização de 845,67 mg de enxofre·kg de GOP⁻¹·h⁻¹. A análise do perfil de desejabilidade indicou, então, que dentro dos intervalos estudados para os fatores temperatura e concentração percentual de Organti H-Biol® as condições ótimas de processo são iguais a 10,0% (m/m) de acelerador de compostagem a uma temperatura de 44,87 °C. Além disso, ao explorar diferentes estratégias de suplementação do produto ao meio de reação, foi possível obter resultados bastante expressivos, reduzindo a concentração do mesmo e o tempo de processo. Em 6 h de processo, apenas 2,0% deste produto foi requerido para obter uma dessulfurização de 59,0%, enquanto que com 5,0% atingiram-se resultados próximos aos obtidos com o meio sintético (71,8% em massa). Embora o Organti H-Biol® seja um produto aplicado em plantações para acelerar o processo de compostagem de matéria orgânica, na BDS foi capaz de substituir não só o meio de fermentação, mas também o próprio biocatalisador, que representa um dos principais dispêndios do processo.

A aplicação da BDS ao gásóleo pesado permite a formação de produtos petrolíferos de melhor qualidade com uma concentração reduzida de contaminantes que causam a poluição do ar. Além disso, o uso de resíduos como meio nutricional apresenta vantagens, como a redução dos danos ambientais que poderiam ser causados caso eles não recebessem um destino adequado e a redução do custo de processo.

Desta forma, os resultados obtidos representam um avanço para aplicação da biodessulfurização em escala industrial, uma vez que se exploraram meios de reduzir os custos de processo e, ainda, aumentar a eficiência, maximizando a remoção de enxofre, sob elevadas velocidades específicas de degradação do composto.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são propostas sugestões para trabalhos futuros, com base nos resultados obtidos:

- Otimizar o processo de biodessulfurização com meio de fermentação constituído por trub e por manipueira.
- Explorar novas estratégias para a suplementação do Organti H-Biol® no sistema e, assim, melhorar os resultados obtidos.

- Adaptar a estirpe *R. erythropolis* ATCC 4277 aos compostos sulfurosos presentes no gasóleo pesado.
- Realizar experimentos com o micro-organismo imobilizado.
- Avaliar a utilização de um biorreator com fluxo contínuo para ampliação da escala de processo.
- Verificar a presença de compostos de enxofre no meio nutricional após o processo de dessulfurização, para comprovar efetivamente a remoção dos mesmos da fração orgânica e avaliar se os compostos podem migrar entre as fases, devido à formação de biossurfactante.
- Estudar métodos de separação e recuperação das fases do sistema biocatalítico e como isso afeta a qualidade do produto final.
- Avaliar quais compostos são degradados no gasóleo pesado durante o processo de BDS.
- Verificar a viabilidade de reciclo do biocatalisador e do meio nutricional.
- Avaliar as condições empregadas também na desnitração do gasóleo pesado.

REFERÊNCIAS

ABADIE, E. **Curso de Formação de Operadores de Refinaria: Processos de Refino**. Curitiba: Petrobras, 2002. 76 p. Adaptado do Material Original de Elie Abadie. Disponível em: <www.tecnicodepetroleo.ufpr.br/apostilas/petrobras/processos_de_refino.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2016.

ABBAD-ANDALOUSSI, S. et al. Multi-criteria comparison of resting cell activities of bacterial strains selected for biodesulfurization of petroleum compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 3–4, p. 446–454, 2003.

AGARWAL, M. et al. Physical insight into ultrasound-assisted biodesulfurization using free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* MTCC 3552. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 254–267, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP (Brasil). Resolução nº 3, de 27 de janeiro de 2016. ANP: legislação: qualidade. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/rodada-legislacao/qualidade>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP (Brasil). Resolução nº 69, de 23 de dezembro de 2014. ANP: legislação: qualidade. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/rodada-legislacao/qualidade>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP (Brasil). Resolução nº 30, de 29 de junho de 2015. ANP: legislação: qualidade. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/rodada-legislacao/qualidade>>. Acesso em: 30 ago. 2016a.

ALVES, L.; PAIXÃO, S. M. Enhancement of dibenzothiophene desulfurization by *Gordonia alkanivorans* strain 1B using sugar beet molasses as alternative carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3297–3305, 2014.

AMOS, M. K.; MOHAMMED, I. A.; YARO, S. A. Sulphide Scavengers in Oil and Gas Industry – A Review. **Nafta**, v. 61, n. 2, p. 85–92, 2010.

ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro: ANP, 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/noticias/3138-anp-divulga-anuario-estatistico-2016>>. Acesso em: 30 out. 2016b.

ANSARI, F. et al. DBT Degradation Enhancement by Decorating *Rhodococcus erythropolis* IGST8 With Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1505–1512, 2009.

ÁVILA, B. M. F. et al. 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, n. 21, p. 3208–3216, 2011.

BANDINELLI, P. C. **Estudo de caso de melhoria no Processo de Mosturação de uma cervejaria no RS**. 2015. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

BARCHET, Ron. Hot Trub: Formation and removal. *Brewing Techniques*, Sake, v. 1, n. 4, nov./dez. 1993. Bimestral. Disponível em: <<http://www.morebeer.com/brewingtechniques/library/backissues/issue1.4/barchet.html>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

BARROS, F. F. C. et al. Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology research international**, v. 2013, p. 103960, 2013.

BARROS, F. F. C.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 1071–1078, 2008.

BASTOS, Valéria Delgado. **Desafios da petroquímica brasileira no cenário global**. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2009. v. 29. Coleção Produção BNDES - Artigos. Disponível em: <<https://web.bndes.net/bib/jspui/handle/1408/1845>>. Acesso em: 21 maio 2016.

BHASARKAR, J. B.; DIKSHIT, P. K.; MOHOLKAR, V. S. Ultrasound assisted biodesulfurization of liquid fuel using free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* MTCC 3552: A mechanistic investigation. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 369–378, 2015.

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, n. 3, 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, n. 3, p. 231–236, 1999.

BONIEK, D. et al. Characterization of bacterial strains capable of desulphurisation in soil and sediment samples from Antarctica. **Extremophiles**, v. 14, n. 5, p. 475–481, 2010.

BONIEK, D. et al. Biodesulfurization: A mini review about the immediate search for the future technology. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 17, n. 1, p. 29–37, 2014.

BOSHAGH, F.; MOKHTARANI, B.; MORTAHEB, H. R. Effect of electrokinetics on biodesulfurization of the model oil by *Rhodococcus erythropolis* PTCC1767 and *Bacillus subtilis* DSMZ 3256. **Journal of Hazardous Materials**, v. 280, p. 781–787, 2014.

BRIGGS, D. E. et al. **Brewing: science and practice**. [s.l.: s.n.]. v. 86
CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de Experimentos usando o Statística**. 1. ed. Rio de Janeiro: e-papers, 2003.

CEREDA, Marney Pascoli; PANTAROTO, Suzan. Linamarinina e sua Composição no ambiente. In: CEREDA, Marney Pascoli. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. 4. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. Cap. 2. p. 38-47. (Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas).

CERVIERI JÚNIOR, Osmar et al. **O Setor de Bebidas no Brasil**. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, 2014. 40 v. Coleção Produção BNDES - Artigos. Disponível em: <<https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/3462>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

CHANDRA SRIVASTAVA, V. An evaluation of desulfurization technologies for sulfur removal from liquid fuels. **RSC Adv.**, v. 2, n. 3, p. 759–783, 2012.

CHANG, J. H. et al. Desulfurization of light gas oil in immobilized-cell systems of *Gordona sp.* CYKS1 and *Nocardia sp.* CYKS2. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, n. 2, p. 309–312, 2000.

CHAUHAN, A. K. et al. Biodesulfurization of benzonaphthothiophene by an isolated *Gordonia sp.* IITR100. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 105–111, 2015.

CHEN, H. et al. Methoxylation pathway in biodesulfurization of model organosulfur compounds with *Mycobacterium sp.* **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 2085–2087, 2009.

CORTES, M. A. L. R. M.; DE CARVALHO, C. C. C. R. Effect of carbon sources on lipid accumulation in *Rhodococcus* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 100–105, 2015.

AGOSTO, Márcio de Almeida D. **Transporte, Uso de Energia e Impactos Ambientais: Uma abordagem introdutória**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

DAVOODI-DEHAGHANI, F.; VOSOUGHI, M.; ZIAEE, A. A. Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 1102–1105, 2010.

DE BERTOLDI, M.; VALLINI, G.; PERA, A. The biology of composting: A review. **Waste Management & Research**, v. 1, n. 2, p. 157–176, 1983.

DEL OLMO, C. H. et al. Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: Influence of media composition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 157–166, 2005.

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. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 59, n. 9, p. 2837–2843, 1 set. 1993.

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

DIAS, José Luciano de Mattos; QUAGLINO, Maria Ana. **A questão do petróleo no Brasil**: Uma história da Petrobrás. Rio de Janeiro: CPDOC: PETROBRAS, 1993. 211 p. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10438/6731>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

DINAMARCA, M. A. et al. Biodesulfurization of gas oil using inorganic supports biomodified with metabolically active cells immobilized by adsorption. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2375–2378, 2010.

DINAMARCA, M. A. et al. Optimizing the biodesulfurization of gas oil by adding surfactants to immobilized cell systems. **Fuel**, v. 116, p. 237–241, 2014.

DOBLE, M.; KUMAR, A. **Biotreatment of Industrial Effluents**. Nova York: Butterworth-heinemann, 2005. 337 p.

ERDOĞAN, S. et al. V2O5--polyimide hybrid material: synthesis, characterization, and sulfur removal properties in fuels. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 16, n. 3, p. 619–628, 2014.

FAO. **Statistical Yearbook 2013: World food and agriculture**. 2. ed. Roma: Food And Agriculture Organization Of The United Nations, 2013. 289 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

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.

FERNANDES JÚNIOR, Ary. Tratamento Físico e Biológicos da Manipueira. In: CEREDA, Marney Pascoli. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. 4. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. Cap. 10. p. 138-139.

FERREIRA, S. M. et al. Produção de açucares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz. **Revista brasileira de produtos agroindustriais**, v. 15, n. 62, p. 383–390, 2013.

FERRI, M. J.; SAGGIN, R. **Elaboração de fermentado alcoólico de amorapreta (*Rubus spp.*) com mel de abelha (*Apis mellifera*)**. 2014. 36 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

FOLSOM, B. R. et al. Microbial desulfurization of alkylated dibenzothiophenes from a hydrodesulfurized middle distillate by *Rhodococcus erythropolis* I-19. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4967–4972, 1999.

GENCHEVA, P.; DIMITROV, D.; DOBREV, G. Hydrolysates from malt spent grain with potential application in the bioethanol production. v. 1, n. Table 1, p. 135–141, 2012.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GODOY, Juvenal Mendes de. Fecularia e amidonaria. 2. ed. São Paulo: Romiti, 1940. 288 p.

GRAY, K. A.; MRACHKO, G. T.; SQUIRES, C. H. Biodesulfurization of fossil fuels. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 229–235, 2003.

GUCHHAIT, S. et al. Bio-desulfurization of model organo-sulfur compounds and hydrotreated diesel - Experiments and modeling. **Chemical Engineering Journal**, v. 112, n. 1–3, p. 145–151, 2005.

GUNAM, I. B. W. et al. Biodesulfurization of alkylated forms of dibenzothiophene and benzothiophene by *Sphingomonas subarctica* T7b. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 322–327, 2006.

GUNAM, I. B. W. et al. Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives using resting and immobilized cells of *Sphingomonas subarctica* T7b. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 473–482, 2013.

GUPTA, A. K.; IBRAHIM, S.; AL SHOAIBI, A. Advances in sulfur chemistry for treatment of acid gases. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 54, p. 65–92, 2016.

GUPTA, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; DEB, J. K. Biotechnology of desulfurization of diesel: Prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 356–366, 2005.

HERNÁNDEZ-MALDONADO, A. J.; YANG, R. T. Desulfurization of Transportation Fuels by Adsorption. **Catalysis Reviews**, v. 46, n. 2, p. 111–150, 2004.

IZUMI, Y. et al. Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 223–226, 1994.

JAKUBOWSKI, M. et al. An assessment of the potential of shadow sizing analysis and Particle Image Velocimetry (PIV) to characterise hot trub morphology. **Journal of Food Engineering**, v. 173, p. 34–41, 2016.

JIANG, B. et al. Efficient oxidative desulfurization of diesel fuel using amide-based ionic liquids. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 89–96, 2016.

KILBANE, J. J. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 305-314, 2006.

KILBANE, J. J.; JACKOWSKI, K. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus Rhodochrous* IGTS8. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 9, p. 1107–1114, 1992.

KILBANE, J. J.; ROBBINS, J. Characterization of the *dszABC* genes of *Gordonia amicalis* F.5.25.8 and identification of conserved protein and DNA sequences. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 843–851, 2007.

KILBANE, J. J.; STARK, B. Biodesulfurization: a model system for microbial physiology research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 8, 2016.

KOHL, Arthur Lionel; NIELSEN, Richard. **Gas Purification**. 5. ed. Houston: Gulf Publishing Company, 1997.

KONISHI, J. et al. Demonstration of the carbon-sulfur bond targeted desulfurization of benzothiophene by thermophilic *Paenibacillus sp.* strain A11-2 capable of desulfurizing dibenzothiophene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 187, n. 2, p. 151–154, 2000.

KÜHBECK, F. et al. Influence of lauter turbidity and hot trub on wort composition, fermentation, and beer quality. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 64, n. 1, 2006.

KÜHBECK, F. et al. Effect of hot trub and particle addition on fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6–7, p. 711–720, 2007.

KUNZE, Wolfgang. **Technology Brewing and Malting**. 5. ed. Berlin: VLB, 2014.

KUNZLER, K. R. et al. Anaerobic reactors with biofilter and different diameter-length ratios in cassava starch industry wastewater treatment. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 4, p. 612–624, ago. 2013.

LE BORGNE, S.; QUINTERO, R. Biotechnological processes for the refining of petroleum. **Fuel Processing Technology**, v. 81, n. 2, p. 155–169, 2003.

LI, G. Q. et al. Improved biodesulfurization of hydrodesulfurized diesel oil using *Rhodococcus erythropolis* and *Gordonia sp.* **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 10, p. 1759–1764, 2008a.

LI, M. Z. et al. Genetic analysis of the dsz promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 22, p. 6409–6418, 1996.

LI, W. et al. Biodesulfurization of dibenzothiophene and other organic sulfur compounds by a newly isolated *Microbacterium* strain ZD-M2. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 1, p. 45–50, 2005.

LI, W.; JIANG, X. Enhancement of bunker oil biodesulfurization by adding surfactant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 103–108, 2013.

LI, Y. G. et al. Improvement of biodesulfurization activity of alginate immobilized cells in biphasic systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 145–150, 2008b.

LI, Y. G. et al. In situ magnetic separation and immobilization of dibenzothiophene-desulfurizing bacteria. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5092–5096, 2009.

MAASS, D. et al. Desulfurization and denitrogenation of heavy gas oil by *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1447–1453, 2015.

MAASS, D. **Processos biotecnológicos aplicados à remoção de enxofre e nitrogênio do gásóleo pesado e à produção de surfactantes a partir do resíduo da extração bifásica do azeite de oliva**. 2015. 160 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MACHADO, M. E. et al. 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. et al. Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus sp.* strain P32C1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, n. 2, p. 151–156, 2001.

MARCELIS, C. **Anaerobic biodesulfurization of thiophenes**. 2002. 178 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química e Bioprocessos, Tecnologia Ambiental, Universidade de Wageningen, Wageningen, 2002.

MARIANO, J. B. **Impactos Ambientais do Refino de Petróleo**. 2001. 289 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências em Planejamento Energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001. Disponível em: <<http://www.ppe.ufrj.br/pppe/production/tesis/jbmariano.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2016.

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M. DE. Caracterização de resíduos cervejeiros. p. 1–8, 2014.

MCFARLAND, B. L. et al. Biocatalytic sulfur removal from fuels: applicability for producing low sulfur gasoline. **Critical reviews in microbiology**, v. 24, n. 2, p. 99–147, 1998.

MCFARLAND, B. L. Biodesulfurization. **Current opinion in microbiology**, v. 2, p. 257–264, 1999.

MONTICELLO, D. J. 95/05640 Multistage process for deep desulfurization of fossil fuels. **Fuel and Energy Abstracts**, v. 36, n. 6, p. 405, 1995.

MONTICELLO, D. J. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 540–546, 2000.

MORAIS, J. M. **Petróleo em águas profundas : uma história tecnológica da Petrobras na exploração e produção offshore**. Brasília: IPEA : Petrobras, 2013. 424 p.

MORYA, N. K.; IYER, P. K.; MOHOLKAR, V. S. A physical insight into sonochemical emulsion polymerization with cavitation bubble dynamics. **Polymer**, v. 49, n. 7, p. 1910–1925, 2008.

OMIDIJI, O.; OKPUZOR, J. E. Enzymic recovery of extract from cold trub derived from brewing with un-malted sorghum (*Sorghum bicolor*). **Process Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 787–792, 2002.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PETROBRAS (Org.). **Exploração e Produção de Petróleo e Gás**. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/exploracao-e-producao-de-petroleo-e-gas/>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

PIROG, T. et al. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 11–18, 2015.

PORTAL BRASIL. **Brasil terá gasolina com baixo teor de enxofre a partir de 2014, diz ANP**. 2013. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2013/12/brasil-tera-gasolina-com-baixo-teor-de-enxofre-a-partir-de-2014-diz-anp>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. **Handbook of Brewing**. 2 ed. Flórida: CRC Press and Taylor Andamp; Francis Group, 2006. 829p.

QUIAN, E. W. Development of novel nonhydrogenation desulfurization process-oxidative desulfurization of distillate. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, v. 51, n. 1, p. 14–31, 2008.

RODRIGUES, L. et al. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 1–10, 2006.

SETTI, L. et al. Developments in destructive and non-destructive pathways for selective desulfurizations in oil-biorefining processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 111–117, 1999.

SETTI, L. et al. Inverse Phase Transfer Biocatalysis for a Biodesulfurization Process of Middle Distillates. p. 80–83, 2003.

SHAVANDI, M. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus sp.* strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 477–482, 2011.

SILVA, Paula Tereza de Souza e et al. Caracterização e avaliação paramétrica da manípueira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 21., 2016, Fortaleza. Anais... . Fortaleza: Abeq, 2016. p. 1 - 8. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1057949>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

SIVASANKAR, T.; MOHOLKAR, V. S. Physical insights into the sonochemical degradation of recalcitrant organic pollutants with cavitation bubble dynamics. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 6, p. 769–781, 2009.

SIVASANKAR, T.; PAUNIKAR, A. W.; MOHOLKAR, V. S. Mechanistic approach to enhancement of the yield of a sonochemical reaction. **AIChE Journal**, v. 53, n. 5, p. 1132–1143, 2007.

SOLEIMANI, M.; BASSI, A.; MARGARITIS, A. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 570–596, 2007.

SONG, C. An overview of new approaches to deep desulfurization for ultra-clean gasoline, diesel fuel and jet fuel. **Catalysis Today**, v. 86, n. 1–4, p. 211–263, 2003.

STANCU, M. M. Physiological cellular responses and adaptations of *Rhodococcus erythropolis* IBBP01 to toxic organic solvents. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 26, n. 10, p. 2065–2075, 2014.

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, n. 1–2, p. 1–68, 2010.

SUMAN, P. A. et al. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 4, p. 379–384, 2011.

TAKADA, M. et al. De-repression and comparison of oil-water separation activity of the dibenzothiophene desulfurizing bacterium, *Mycobacterium sp.* G3. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 12, p. 871–874, 2005.

TECNICONTROL BIOPRODUTOS. **Acelerador de Compostagem**. 2016. Disponível em:

<<http://www.tecnicontrol.ind.br/produtos/categoria/acelerador-de-compostagem>>. Acesso em: 30 nov. 2016a.

TECNICONTROL BIOPRODUTOS. **Organti H-Biol: Acelerador de Compostagem**. 2016. Disponível em:

<<http://www.tecnicontrol.ind.br/produtos/detalhes/organti>>. Acesso em: 30 nov. 2016b.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de Engenharia de Petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência:PETROBRAS, 2001.

TODESCATO, D. **Remoção de compostos sulfurados e nitrogenados do gasóleo pesado (GOP) em sistema bifásico pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator batelada**. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

VEIGA, J. P. S. et al. Characterization and productivity of cassava waste and its use as an energy source. **Renewable Energy**, v. 93, p. 691–699, 2016.

WANG, W. et al. Genetic analysis of benzothiophene biodesulfurization pathway of *Gordonia terrae* strain C-6. **PLoS one**, v. 8, n. 12, p. e84386, 19 jan. 2013.

WARMOESKERKEN, M. M. C. G. et al. Laundry process intensification by ultrasound. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 210, n. 2–3, p. 277–285, 2002.

WOICIECHOWSKI, Adenise Lorenci et al. Emprego de Resíduos Agroindustriais em Bioprocessos Alimentares. In: PASTORE, Gláucia Maria; BICAS, Juliano Lemos; MARÓSTICA JUNIOR, Mario Roberto (Ed.). **Biotecnologia de Alimentos**. Curitiba: Atheneu Editora, 2013. Cap. 6. p. 143-171. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/277004248>>. Acesso em: 05 maio 2016.

WOSIACKI, G.; CEREDA, M. P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. **Agrarian Science and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 27–43, 2002.

XIA, W.-J. et al. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 392, n. 1, p. 124–130, 2011.

YANG, J. et al. Two-layer continuous-process design for the biodesulfurization of diesel oils under bacterial growth conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 212–218, 2007.

YU, B. et al. Selective biodegradation of S and N heterocycles by a recombinant *Rhodococcus erythropolis* strain containing carbazole dioxygenase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 2235–2238, 2006.

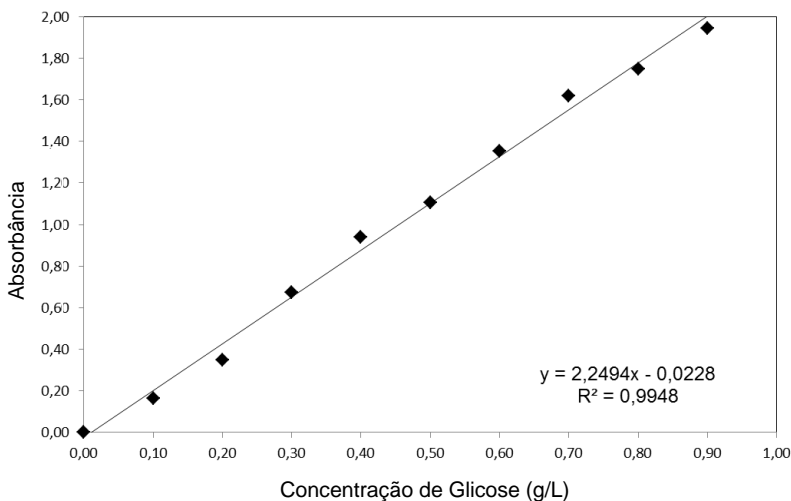
YU, L.Q.; MEYER, T.A. Folsom BR (1998) Oil/water/biocatalyst three phase separation process. US patent 5,772,901

ZHANG, Q. et al. Extensive desulfurization of diesel by *Rhodococcus erythropolis*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 1, p. 123–127, 2007.

APÊNDICE A – Curva de calibração da concentração de açúcares redutores totais (ART)

Na Figura A1 tem-se a curva de calibração que correlaciona a concentração de açúcares redutores totais com as suas respectivas densidades óticas para a determinação deste mesmo parâmetro nas amostras coletadas da fase aquosa do sistema biocatalítico.

Figura A1 – Curva de calibração da concentração de açúcares redutores totais (ART) *versus* densidade ótica.



Fonte: Autora (2017).

APÊNDICE B – Resultados cinéticos de BDS

Tabela B.1 – Resultados das cinéticas dos ensaios preliminares de dessulfurização do GOP por *R. erythropolis* ATCC 42277

(continua)

Ensaio	Tempo	Glicose	Extrato de Levedura	Concentração de Enxofre	Enxofre Removido	
	h	g/L	g/L	mg/kg	mg/kg	massa %
1	12	5,00	4,00	2422	4466	69,0
1	24	5,00	4,00	3448	3440	49,9
1	36	5,00	4,00	1978	4910	71,3
1	48	5,00	4,00	2224	4664	67,7
1	72	5,00	4,00	2218	4670	67,8
1	96	5,00	4,00	2524	4364	63,4
1	120	5,00	4,00	2148	4740	68,8
2	12	3,00	4,00	2142	4746	68,9
2	24	3,00	4,00	2064	4824	70,0
2	36	3,00	4,00	2190	4698	68,2
2	48	3,00	4,00	3436	3452	50,1
2	72	3,00	4,00	4318	2570	37,3
2	96	3,00	4,00	3754	3134	45,5
2	120	3,00	4,00	4616	2272	33,0
3	12	1,00	4,00	2276	4612	67,0
3	36	1,00	4,00	2600	4288	62,3
3	48	1,00	4,00	2288	4600	66,8
3	72	1,00	4,00	1660	5228	75,9
3	96	1,00	4,00	4154	2734	39,7
3	120	1,00	4,00	5642	1246	18,1
4	12	0,00	4,00	1878	5010	72,7
4	24	0,00	4,00	2076	4812	69,9
4	36	0,00	4,00	2830	4058	58,9
4	48	0,00	4,00	3290	3598	52,2
4	72	0,00	4,00	3940	2948	42,8
4	96	0,00	4,00	4878	2010	29,2
4	120	0,00	4,00	3536	3352	48,7
5	12	4,00	10,00	2450	4438	64,4
5	24	4,00	10,00	1969	4919	71,4
5	36	4,00	10,00	2396	4492	65,2
5	48	4,00	10,00	2610	4278	62,1
5	72	4,00	10,00	2006	4882	70,9
5	96	4,00	10,00	1830	5058	73,4

(conclusão)

Ensaio	Tempo	Glicose	Extrato de Levedura	Concentração de Enxofre	Enxofre Removido	
	h	g/L	g/L	mg/kg	mg/kg	massa %
5	120	4,00	10,00	1900	4988	72,4
7	12	4,00	20,00	2212	4676	67,9
7	24	4,00	20,00	2222	4666	67,7
7	36	4,00	20,00	2734	4154	60,3
7	48	4,00	20,00	2492	4396	63,8
7	72	4,00	20,00	2434	4454	64,7
7	96	4,00	20,00	2404	4484	65,1
7	120	4,00	20,00	2136	4752	69,0

Fonte: Autora (2017).

Tabela B.2 – Resultados das cinéticas de dessulfurização do GOP por acelerador de compostagem Organti HBiol®.

(continua)

Ensaio	Tempo	Organti HBiol®	Temperatura	Concentração de Enxofre	Enxofre Removido	
	h	massa %	°C	mg/kg	mg/kg	massa %
1	1	10,0	40	4379	2857	39,5
1	2	10,0	40	3479	3757	51,9
1	6	10,0	40	2039	5197	71,8
1	12	10,0	40	2153	5083	70,3
1	18	10,0	40	2202	5034	69,6
2	1	50,0	40	2725	4511	62,4
2	2	50,0	40	2618	4618	63,8
2	6	50,0	40	3371	3865	53,4
2	12	50,0	40	2981	4255	58,8
2	18	50,0	40	3668	3568	49,3
3	1	10,0	60	2788	4448	61,5
3	2	10,0	60	2478	4758	65,8
3	6	10,0	60	2162	5074	70,1
3	12	10,0	60	2396	4840	66,9
3	18	10,0	60	2534	4702	65,0
4	1	50,0	60	2240	4996	69,0
4	2	50,0	60	2942	4294	59,3
4	6	50,0	60	2730	4506	62,3
4	12	50,0	60	3532	3704	51,2
4	18	50,0	60	2694	4542	62,8
5	1	30,0	50	2243	4993	69,0
5	2	30,0	50	2737	4499	62,2

(conclusão)

Ensaio	Tempo	Organti HBiol®	Temperatura	Concentração de Enxofre	Enxofre Removido	
	h	massa %	°C	mg/kg	mg/kg	massa %
5	6	30,0	50	2267	4969	68,7
5	12	30,0	50	2675	4561	63,0
5	18	30,0	50	2660	4576	63,2
6	1	30,0	50	2704	4532	62,6
6	2	30,0	50	2791	4445	61,4
6	6	30,0	50	2767	4469	61,8
6	12	30,0	50	2737	4499	62,2
6	18	30,0	50	2725	4511	62,3
7	1	30,0	50	2440	4796	66,3
7	2	30,0	50	2544	4692	64,8
7	6	30,0	50	2490	4746	65,6
7	12	30,0	50	2885	4351	60,1
7	18	30,0	50	3213	4023	55,6

Fonte: Autora (2017).

ANEXO A – Laudo do Laboratório Biocontrol para a caracterização da manuseira



RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_422.2016_Ef_1_1

Gravatal, 20 de maio de 2016

DADOS DO CLIENTE

Cliente: Salézio Dellino & Cia Ltda - EPP	Cidade: Jaguaruna - Santa Catarina
Endereço: Estrada Geral, S/N*	CEP: 88.715-000
CNPJ: 79.877.700/0001-19	Fone: (48) 3624-4141

DADOS DA AMOSTRA

Amostra: 422.2016_Ef_1_1	Coletor: Laboratorio Glaudson Mendes Leandro - CRQ/SC 13200673
Procedência: Efluente	Data Coleta: 04/05/2016 10:50
Ponto Coleta: Efluente bruto - Saída da lavação	
Temperatura Amostra na coleta: 31,9°C	
Data Recebimento: 04/05/2016 17:10	
Condições Climáticas: Ensolado	

PARÂMETRO	RESULTADO	UNIDADE
Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO	950	mg/L Oxig.
pH	3,74	pH a 25°C

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA DE REALIZAÇÃO
Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO	1	-	DIN 38409 - Part 52	05/05/2016
pH	0,00 a 14,00	-	SMWW, 22ª Edição, Método 4500 H+ B	04/05/2016

Nota 01: SMWW - Standard Methods for the Examination Of Wastewater, 22ª Ed.

Nota 02: LQ - Limite de Quantificação

Nota 03: O(s) resultado(s) dest(a) análise(s) tem significado restrito e se aplica somente a amostra analisada.

Nota 04: O Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido por completo e sem nenhuma alteração.

Nota 05: Plano de amostragem conforme NBR 9898/87.

*Observação: Análise (s) realizada (s) por Laboratório subcontratado.

Verifique a autenticidade deste documento no endereço abaixo ou no QR-Code ao lado:

<http://biocontrol.glahnet3.com.br/valida.php>

Código: 422.2016 - Chave de autenticação: D1C-AGLC-NN0



Gustavo Eng Cargin - CRQ13302388
assinatura digitalizada



RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_422.2016_Ef_1_2

Gravataí, 20 de maio de 2016

DADOS DO CLIENTE

Cliente: Salsizio Dellino & Cia Ltda - EPP **Cidade:** Jaguaruna , Santa Catarina
Endereço: Estrada Geral, S/N° **CEP:** 88.715-000
CNPJ: 79.877.700/0001-19 **Fone:** (48) 3624-4141

DADOS DA AMOSTRA

Amostra: 422.2016_Ef_1_2 **Coletor:** Laboratório Glaudson Mendes Leandro - CRQ/SC 13200673
Procedência: Efluente **Data Coleta:** 04/05/2016 10:30

Ponto Coleta: Efluente tratado - Saída decantador

Temperatura Amostra na coleta: 19,5°C

Data Recebimento: 04/05/2016 17:10

Condições Climáticas: Ensolado

1ª Legislação: Lei Estadual de Santa Catarina Nº 14.675, de abril de 2009

2ª Legislação: CONAMA - Resolução nº 430 : 2011 Seção I e II

PARÂMETRO	LEGISLAÇÃO	2ª LEGISLAÇÃO	RESULTADO	UNIDADE
Carbono Orgânico Total *	-	-	713	mg/L
Cianeto total *	-	≤ 1,0 mg/L	0,120	mg CN - /L
Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO	Redução de 80%	Redução de 60%	250	mg/L Oxdg.
Fósforo Total	4,0 ou Redução de 75%	-	52,7	mg P/L
Nitrogênio Kjeldahl *	-	-	9,0	mg/L
pH	entre 6,0 e 9,0	entre 5,0 e 9,0	4,17	pH a 25°C
Potássio *	-	-	37,267	mg K/L
Sólidos Sedimentáveis	-	≤ 1,0 mL/L	3,5	mL/L

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA DE REALIZAÇÃO
Carbono Orgânico Total	5,0	-	SMWW, 22ª Edição, Método 5310 B/C	12/05/2016
Cianeto total	0,009	-	SMWW, 22ª Edição, Método 4500 CN- C	17/05/2016
Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO	1	-	DIN 38409 - Part 52	05/05/2016
Fósforo Total	0,05	-	PE 09 - Kit Spectroquant 1.14848	12/05/2016
Nitrogênio Kjeldahl	2,0	-	SMWW, 22ª Edição, Método 4500 Norq B	18/05/2016
pH	0,00 a 14,00	-	SMWW, 22ª Edição, Método 4500 H+ B	04/05/2016
Potássio	0,063	-	SMWW, 22ª Edição, Método 3111 B/ 3120 B	14/05/2016
Sólidos Sedimentáveis	0,1 a 1000	-	SMWW, 22ª Edição, Método 2540 F	09/05/2016

Nota 01: SMWW - Standard Methods for the Examination Of Wastewater, 22ª Ed.

Nota 02: LQ - Limite de Quantificação

Nota 03: O(s) resultado(s) desta(s) análise(s) tem significado restrito e se aplica somente a amostra analisada.

Nota 04: O Relatório de Ensaio somente pode ser reproduzido por completo e sem nenhuma alteração.

Nota 05: Plano de amostragem conforme NBR 9895/87.

*Observação: Análise (s) realizada (s) por Laboratório subcontratado.



RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_422.2016_Ef_1_2

Verifique a autenticidade deste documento no endereço abaixo ou no QR-Code ao lado.:

<http://bioccontrol.glabnet3.com.br/valida.php>

Código: 422.2016 - Chave de autenticação: DIC-AGLC-NN0

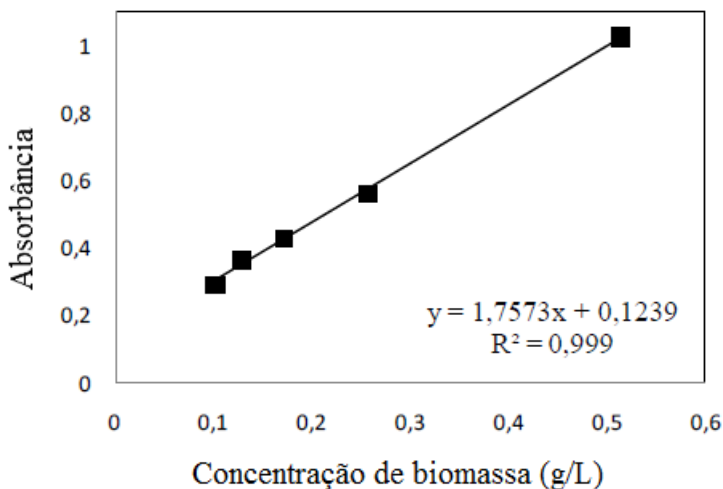


Gustavo Eng Cargnin - CRQ13302388
assinatura digitalizada

ANEXO B – Curva de calibração da concentração de biomassa

Na Figura B.1 tem-se a curva de calibração obtida por Maass (2015) e que correlaciona a concentração de células de *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 com as suas respectivas densidades óticas para a determinação da concentração celular nas amostras coletadas da fase aquosa do sistema biocatalítico.

Figura B.1 – Curva de calibração da concentração de biomassa de *Rhodococcus erythropolis* de ATCC 4277 versus absorvância (OD₆₀₀).



Fonte: Adaptado de Maass, 2015.