

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

Danielle Maass

**DESSULFURIZAÇÃO DO DBT E DO ÓLEO DIESEL EM
SISTEMA BIFÁSICO PELO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277
EM REATOR DESCONTÍNUO**

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

Florianópolis
2012

M111d Maass, Danielle

Dessulfurização do DBT e do óleo diesel em sistema bifásico pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo [dissertação] / Danielle Maass ; orientador, Antônio Augusto Ulson de Souza. - Florianópolis, SC, 2012. 154 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Engenharia química. 2. Dessulfuração. 3. Combustíveis diesel. I. Souza, Antonio Augusto Ulson de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU 66.0

Danielle Maass

**DESSULFURIZAÇÃO DO DBT E DO ÓLEO DIESEL EM
SISTEMA BIFÁSICO PELO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277
EM REATOR DESCONTÍNUO**

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

Florianópolis, 12 de março de 2012.

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto.
Coordenador do CPGENQ

Prof^o, Dr.^o Antonio Augusto
Ulson de Souza,
Orientador
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof.^a,Dr.^a Selene M. de A.
Guelli Ulson de Souza,
Co-Orientadora
Universidade Federal de Santa
Catarina

Banca Examinadora:

Prof.^a,Dr.^a Denise Esteves
Moritz
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof^oDr. José Vladimirdede
Oliveira
Universidade Federal de Santa
Catarina

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

*Dedico esta dissertação às pessoas
mais importantes da minha vida:
minha mãe, Arlete, e meu esposo,
Gilles.*

AGRADECIMENTOS

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

À professora Denise Esteves Moritz, pelo repasse de seus conhecimentos e sugestões.

Ao professor coordenador Carlos Itsuo Yamamoto, à gerente técnica Myriam Lorena Melgarejo Navarro Cerutti, e à colega Fulvy Antonella Venturi, por viabilizarem as análises no Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos – LACAUT, da Universidade Federal do Paraná.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos da ANP, através do PRH-09/MECPETRO, por propiciar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC, pela oportunidade concedida.

A todos os colegas do grupo LABSIN/LABMASSA por se mostrarem sempre prestativos.

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

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A queima de combustíveis fósseis tem liberado uma grande quantidade de poluentes na atmosfera. Entre os mais nocivos encontra-se o dióxido de enxofre (SO₂), que ao reagir com a umidade do ar se transforma em ácido sulfúrico, sendo, portanto, o causador da chuva ácida. A chuva ácida é extremamente prejudicial para a fauna e flora; acelera os processos de corrosão de prédios e monumentos; e gera graves problemas de saúde para o ser humano. Em vista disso, muitos países têm reformulado sua legislação a fim de exigir a comercialização de combustíveis com teores baixíssimos de enxofre. Os processos de dessulfurização existentes não são capazes de remover o enxofre a níveis tão baixos. Por isso, tem-se desenvolvido um novo processo denominado biodessulfurização. Nesse processo, a degradação do enxofre se dá através da ação de micro-organismos que atuam como catalisadores. A bactéria *Rhodococcus erythropolis* vem despontando como uma das mais promissoras na biodessulfurização, pois remove o enxofre dos organossulfurados sem quebrar os anéis benzênicos, mantendo assim o potencial energético dos mesmos. Nesse trabalho buscou-se analisar a capacidade da cepa nacional *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 de dessulfurizar o dibenzotiofeno e o óleo diesel A S1800 em reator descontínuo utilizando concentrações de fase orgânica (n-dodecano ou diesel) de 20, 80 e 100% (v/v). O *R. erythropolis* ATCC4277 não foi capaz de degradar os compostos de enxofre presentes no óleo diesel A S1800, no entanto, foi capaz de degradar o DBT em 93,3, 98,0 e 95,5% quando na presença de 20, 80 e 100% (v/v) de n-dodecano, respectivamente. Através dos resultados obtidos neste trabalho concluiu-se que as melhores condições para realizar o processo de dessulfurização do DBT em reator descontínuo pelo *R. erythropolis* ATCC4277 é utilizando 80% (v/v) de n-dodecano como fase orgânica, o pH do meio fermentativo variando entre 6,5 e 7,5 e conduzi-lo sob em uma faixa de temperatura entre 25 e 30°C.

Palavras-chave: Biodessulfurização, *Rhodococcus erythropolis*, dibenzotiofeno, óleo diesel, n-dodecano.

ABSTRACT

For decades the burning of fossil fuels released a lot of pollutants in the atmosphere. Among the most harmful is sulfur dioxide (SO₂), which reacts with the moisture in the air and turns into sulfuric acid, being the main cause of acid rain. Acid rain is very harmful to animal and plant kingdoms; accelerates the corrosion's processes of buildings and monuments, and causes serious health problems for humans. As a result, many countries have reformed their legislation to require the sale of fuels with very low sulfur content. The existing processes of desulfurization are not capable of removing sulfur so low. Therefore, there has developed a new process called biodesulfurization. In this process, the degradation of sulfur occurs through the action of microorganisms that act as catalysts. The bacterium *Rhodococcus erythropolis* has emerged as one of the most promising for biodesulfurization because it removes the sulfur without breaking the benzene rings, thereby maintaining the potential energy of the same. In this study we sought to examine the capacity of national *Rhodococcus erythropolis* strain ATCC4277 desulfurizing of the dibenzothiophene and diesel A S1800 in the batch reactor using concentrations of organic phase (n-dodecane or diesel) of 20, 80 and 100% (v/v). *R. erythropolis* ATCC4277 was not able to degrade the sulfur compounds present in diesel A S1800, but was capable of degrading DBT in 93.3, 98.0 and 95.5% in the presence of 20, 80 and 100% (v/v) of n-dodecane, respectively. Based in the results obtained in this study, it was concluded that the best conditions to perform the process of desulfurization of DBT in the batch reactor with *R. erythropolis* ATCC4277 is using 80% (v/v) of n-dodecane as organic phase, the pH of the fermentation medium ranging between 6.5 and 7.5 and drive it on in a temperature range between 25 and 30 °C.

Keywords: Biodesulfurization, *Rhodococcus erythropolis*, dibenzothiophene, diesel fuel, n-dodecane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Via metabólica Kodama da degradação oxidativa do DBT (GUPTA et al., 2005)	46
Figura 1.2: Via metabólica “4S” da degradação do composto DBT(GUPTA et al., 2005)	48
Figura 1.3: Diagrama conceitual de algumas etapas da dessulfurização de compostos Cx-DBTs (MONTICELLO, 2000).....	49
Figura 1.4: Diagrama conceitual do processo de BDS (MONTICELLO, 2000)	51
Figura 2.1: Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência – HPLC (LABMASSA, EQA/UFSC) (DA LUZ, 2009).....	65
Figura 2.2: Espectrômetro de fluorescência de raio-x (LACAUT, EQ/UFPR).....	66
Figura 3.1: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 após 24hs de crescimento nas temperaturas de 20, 28 e 50°C.....	72
Figura 3.2: Influência da temperatura no crescimento e na degradação do poluente pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> (SCHREIBEROVA et al., 2008).....	73
Figura 3.3: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 após 24hs de crescimento em pH 2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 8,0; e 10,0.....	74
Figura 3.4: Influência do pH no crescimento e na degradação do poluente pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> (SCHREIBEROVA et al., 2008)	75
Figura 3.5: Determinação da CMI dos compostos DBT, óleo diesel e n-dodecano através do método de difusão em ágar.....	76
Figura 3.6: Determinação da CMI do composto DBT através do método de difusão em ágar.....	76
Figura 3.7: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 após 24hs de crescimento na presença das concentrações de óleo diesel de 10, 30, 50, 70 e 100% (v/v)	77
Figura 3.8: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 após 24hs de crescimento na presença das concentrações de gasolina de 10, 30, 50, 70 e 100% (v/v)	78

Figura 3.9: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 após 24hs de crescimento na presença das concentrações de DBT de 1.000, 2.500, 5.000, 10.000 e 20.000ppm	79
Figura 3.10: Crescimento celular, consumo de glicose, degradação do DBT e produção de 2-HBP pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 20% (v/v) de n-dodecano durante 20h de reação.....	81
Figura 3.11: Sobreposição dos cromatogramas do DBT no instante inicial e dos produtos formados pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 20% (v/v) de n-dodecano após 20h de reação	83
Figura 3.12: Atividades específicas de degradação do DBT e de produção da 2-HBP pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 20% (v/v) de n-dodecano.....	84
Figura 3.13: Crescimento celular, consumo de glicose, degradação do DBT e produção de 2-HBP pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 80% (v/v) de n-dodecano durante 20h de reação.....	85
Figura 3.14: Sobreposição dos cromatogramas do DBT no instante inicial e dos produtos formados pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 80% (v/v) de n-dodecano após 20h de reação.....	85
Figura 3.15: Atividades específicas de degradação do DBT e de produção da 2-HBP pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 80% (v/v) de n-dodecano	86
Figura 3.16: Comparação entre as atividades específicas de degradação do DBT e de produção da 2-HBP pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20 e 80% (v/v) de n-dodecano.....	87
Figura 3.17: Degradação do DBT e produção de 2-HBP pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0mM de DBT dissolvido em 100% (v/v) de n-dodecano durante 20hs de reação	88

Figura 3.18: Sobreposição dos cromatogramas do DBT no instante inicial e dos produtos formados pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 100% (v/v) de n-dodecano após 20h de reação.....	89
Figura 3.19: Microscopia de fluorescência das células do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 após 20h em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 100% (v/v) de n-dodecano.....	89
Figura 3.20: Crescimento celular e consumo de glicose do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20 ou 80% (v/v) de óleo diesel durante 20 h de reação.....	93
Figura 3.21: Comparação das curvas de crescimento celular do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20 ou 80% (v/v) de óleo diesel ou n-dodecano durante 20hs de reação.....	93
Figura 3.22: Microscopia de fluorescência das células do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 após 20h em reator descontínuo contendo 100% (v/v) de óleo diesel.....	95
Figura 3.23: Velocidades específicas μ_S (DBT), μ_S (glicose), μ_P (2-HBP) e μ_X da reação de dessulfurização pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20% (v/v) de n-dodecano.....	98
Figura 3.24: Velocidades específicas μ_S (DBT), μ_S (glicose), μ_P (2-HBP) e μ_X da reação de dessulfurização pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 80% (v/v) de n-dodecano.....	99
Figura 3.25: Velocidades específicas μ_S (glicose) e μ_X da reação de dessulfurização pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20% (v/v) de óleo diesel.....	101
Figura 3.26: Velocidades específicas μ_S (glicose) e μ_X da reação de dessulfurização pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 80% (v/v) de óleo diesel.....	102
Figura A.1: Curva de calibração concentração celular versus densidade ótica	117
Figura A.2: Fase <i>log</i> do crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 na presença de meio YMA.....	118

Figura A.3: Fase <i>log</i> do crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em sistema bifásico contendo 20% (v/v) de n-dodecano e 3,0mM de DBT	118
Figura A.4: Fase <i>log</i> do crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em sistema bifásico contendo 80% (v/v) de n-dodecano e 3,0mM de DBT	119
Figura A.5: Fase <i>log</i> do crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em sistema bifásico contendo 20% (v/v) de óleo diesel A S1800.....	119
Figura A.6: Fase <i>log</i> do crescimento do <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em sistema bifásico contendo 80% (v/v) de óleo diesel A S1800.....	120
Figura A.7: Determinação do valor de Ks para ensaio em sistema bifásico contendo 20% (v/v) de n-dodecano.....	120
Figura A.8: Determinação do valor de Ks para ensaio em sistema bifásico contendo 20% (v/v) de óleo diesel A S1800.....	121
Figura A.9: Determinação do valor de Ks para ensaio em sistema bifásico contendo 80% (v/v) de óleo diesel A S1800.....	121
Figura B.1: Curva de calibração da concentração de glicose <i>versus</i> densidade ótica pelo método DNS, para uma concentração máxima de glicose de 2g/L.....	123
Figura B.2: Curva de calibração da concentração de glicose <i>versus</i> densidade ótica pelo método DNS, para uma concentração máxima de glicose de 10g/L.....	124
Figura C.1: Curva de calibração da concentração de DBT <i>versus</i> área no HPLC.....	125
Figura C.2: Curva de calibração da concentração de 2-HBP <i>versus</i> área no HPLC.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Frações típicas do petróleo(THOMAS, 2004)	33
Tabela 1.2: Análise elementar do óleo cru típico (% em peso)(THOMAS, 2004)	34
Tabela 1.3: Formas de comercialização do óleo diesel (PETROBRAS, 2011)	37
Tabela 1.4: Evolução da diminuição do teor de enxofre no diesel brasileiro (ANP, 2011)	39
Tabela 1.5: Composição da gasolina, segundo o processo de obtenção da Petrobras (PETROBRAS, 2011)	40
Tabela 1.6: Diferenças entre os tipos de gasolina comercializadas no Brasil(PETROBRAS, 2011)	42
Tabela 1.7: Evolução da diminuição do teor de enxofre no gasolina brasileira (ANP, 2011)	44
Tabela 2.1: Composição do meio de manutenção YMA	56
Tabela 2.2: Composição do meio de fermentação YMA modificado.....	57
Tabela 2.3: Construção do ensaio para a determinação da CIM	62
Tabela 3.1: Comparação entre a duração das fases <i>lag</i> e <i>log</i> durante o crescimento celular do <i>Rhodococcus erythropolis</i> obtidas por diferentes autores	82
Tabela 3.2: Comparação entre os percentuais de degradação do DBT alcançados pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 na presença das concentrações de n-dodecano de 20, 80 e 100% (v/v)	90
Tabela 3.3: Estatística descritiva da variável reposta concentração de DBT (mg/L) após 20hs degradação pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 na presença das concentrações de n-dodecano de 20, 80 e 100% (v/v)	91
Tabela 3.4: ANOVA da variável reposta concentração de DBT (mg/L) após 20hs de degradação pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 na presença das concentrações de n-dodecano de 20, 80 e 100% (v/v)	91
Tabela 3.5: Resultados do teste de Tukey para a variável reposta concentração de DBT (mg/L) após 20hs de degradação pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 na presença das concentrações de n-dodecano de 20, 80 e 100% (v/v)	92

Tabela 3.6: Comparação entre as concentrações e os percentuais de degradação do enxofre alcançados pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20, 80 ou 100% (v/v) de óleo diesel	94
Tabela 3.7: Parâmetros cinéticos da reação de dessulfurização em reator descontínuo contendo 20, 80 ou 100% (v/v) de n-dodecano pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277.....	96
Tabela 3.8: Parâmetros cinéticos da reação de dessulfurização em reator descontínuo contendo 20 ou 80% (v/v) de óleo diesel pelo <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC4277.....	100
Tabela A.1: Dados de concentração celular versus densidade ótica para a construção da curva de calibração do método de turbidimetria	117
Tabela B.1: Dados de concentração de glicose versus densidade ótica para a construção da curva de calibração do DNS	123
Tabela B.2: Dados de concentração de glicose versus densidade ótica para a construção da curva de calibração do DNS	124
Tabela C.1: Dados de concentração DBT versus área para a construção da curva de calibração no HPLC	125
Tabela C.2: Dados de concentração 2-HBP versus área para a construção da curva de calibração no HPLC	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	
ANOVA	Análise de Variância	
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis	
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>	
BDS	Biodessulfurização	
CMI	Concentração Mínima Inibitória	
Cx-BT	Benzo-alquilados	
Cx-DBT	Dibenzotiofenos	
DBT	Dibenzotiofeno	
DNC	Departamento Nacional de Combustíveis	
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico	
GL	Graus de Liberdade	
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo	
2-HBP	2-Hidroxibifenila	
HDS	Hidrodessulfurização	
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia de Fase Líquida de Alta Eficiência)	
K_s	Constante de Saturação	[M·L ⁻³]
Log P	Logaritmo do Coeficiente de Partição	
M	Massa	[M]
ME	Extrato de Malte	
MS	Médias dos Quadrados	
p	Probabilidade do erro envolvido em aceitar o resultado como válido	
P	Concentração de Produto	[M·L ⁻³]
P_f	Concentração de Produto Final	[M·L ⁻³]
$P_{máx}$	Concentração Máxima de Produto	[M·L ⁻³]
P_o	Concentração de Produto Inicial	[M·L ⁻³]
PROCONVE	Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores	
R^2	Coefficiente de Correlação	
S	Concentração de Substrato	[M·L ⁻³]
S_f	Concentração de Substrato Final	[M·L ⁻³]
S_o	Concentração de Substrato Inicial	[M·L ⁻³]
SS	Soma dos Quadrados	

t	Tempo de Reação	[T]
V	Volume	[L ⁻³]
X	Concentração Celular	[M·L ⁻³]
X	Concentração Celular	[M·L ⁻³]
X _{máx}	Concentração Celular Máxima	[M·L ⁻³]
X _o	Concentração Celular Inicial	[M·L ⁻³]
YMA	<i>Yeast Malt Extract Agar</i>	
Y _{p/s}	Fator de Conversão de Substrato em Produto	[M·M ⁻¹]
Y _{p/x}	Fator de Conversão de Células em Produto	[M·M ⁻¹]
Y _{x/s}	Fator de Conversão de Substrato em Células	[M·M ⁻¹]
α	Nível de Significância	
λ	Comprimento de Onda	[L]
μ _p	Velocidade Específica de Formação do Produto	[T ⁻¹]
μ _s	Velocidade Específica de Consumo do Substrato	[T ⁻¹]
μ _x	Velocidade Específica de Crescimento	[T ⁻¹]
μ _x ^{máx}	Velocidade Específica de Crescimento Máxima	[T ⁻¹]

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
1.10 PETRÓLEO	31
1.1.1 Histórico	31
1.1.1.1 <i>Mundial</i>	31
1.1.1.2 <i>No Brasil</i>	32
1.1.2 Constituintes do petróleo	33
1.1.2.1 <i>Compostos sulfurados</i>	34
1.2 ÓLEO DIESEL	35
1.2.1 Produção	35
1.2.2 Aplicação e consumo	36
1.2.2.1 <i>Óleo diesel rodoviário</i>	36
1.2.3 Teor de enxofre	37
1.3 GASOLINA	39
1.3.1 Tipos de gasolina	41
1.3.2 Produção e consumo	42
1.3.3 Teor de enxofre	43
1.4 BIODISSULFURIZAÇÃO	44
1.4.1 <i>Rhodococcus erythropolis</i>	48
1.4.2 Biodissulfurização: avanços e desafios	50
CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS	55
2.1 MATERIAIS	55
2.1.1 Micro-organismo	55
2.1.2 Meios de Cultura, Manutenção e Fermentação	56
2.1.3 Reagente Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	57
2.1.4 Solventes	57
2.2 MÉTODOS	57
2.2.1 Reativação das Células de Rhodococcus erythropolis Liofilizadas	57
2.2.2 Método da Turbidimetria para Determinação da Concentração Celular	58
2.2.2.1 <i>Determinação Gravimétrica da Concentração Celular</i> ..	58
2.2.3 Determinação da Curva de Crescimento Celular do Rhodococcus erythropolis ATCC4277	59
2.2.4 Determinação da Concentração de Açúcares no Caldo Fermentativo pelo Método DNS	60

2.2.5 Percentual de inibição pelo pH e pela temperatura.....	60
2.2.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	61
2.2.7 Dessulfurização por células livres de Rhodococcus erythropolis ATCC4277 em sistema reacional bifásico.....	62
2.2.8 Análises	63
2.2.8.1 <i>Concentração Celular e Concentração de Açúcares no Caldo Fermentativo</i>	<i>63</i>
2.2.8.2 <i>Cromatográficas</i>	<i>64</i>
2.2.8.3 <i>Determinação de Traços de Enxofre Total por Fluorescência de UV.....</i>	<i>65</i>
2.2.8.4 <i>Microscopia de Fluorescência.....</i>	<i>66</i>
2.2.8.5 <i>Análise de Variância – ANOVA</i>	<i>66</i>
2.2.9 Determinação dos Parâmetros Cinéticos	67
2.2.9.1 <i>Fatores de Conversão</i>	<i>67</i>
2.2.9.2 <i>Produção e Produtividade</i>	<i>68</i>
2.2.9.3 <i>Velocidades Específicas e Velocidade Específica de Crescimento Máxima</i>	<i>69</i>
2.2.9.4 <i>Constante de Saturação (K_S).....</i>	<i>69</i>
CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÕES	71
3.1 INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DO <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ATCC4277	71
3.2 INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DE N-DODECANO, ÓLEO DIESEL A S1800, GASOLINA TIPO C E DBT NO CRESCIMENTO DO <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ATCC4277	75
3.3 DESSULFURIZAÇÃO DO DBT EM REATOR DESCONTÍNUO PELO <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ATCC4277 UTILIZANDO N-DODECANO COMO FASE ORGÂNICA	81
3.3.1 Sistema bifásico contendo 20% (v/v) de n-dodecano	81
3.3.2 Sistema bifásico contendo 80% (v/v) de n-dodecano	84
3.3.3 Sistema monofásico contendo n-dodecano.....	87
3.3.4 Comparação entre os resultados referentes às três concentrações de n-dodecano utilizadas no reator descontínuo	90
3.4 DESSULFURIZAÇÃO DO ÓLEO DIESEL EM REATOR DESCONTÍNUO PELO <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> ATCC4277	92
3.4.1 Sistemas bifásicos contendo 20 e 80% (v/v) de óleo diesel A S1800 e sistema monofásico contendo 100% (v/v) de óleo diesel A S1800	92
3.5 PARÂMETROS CINÉTICOS.....	96

3.5.1 N-dodecano como fase orgânica.....	96
3.5.2 Óleo diesel A S1800 como fase orgânica.....	100
CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES E SUGESTÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
APÊNDICE A	117
APÊNDICE B	123
APÊNDICE C	125
ANEXO A	127

INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica é um tema em voga atualmente. Sendo amplamente debatido não só no âmbito acadêmico, mas também por políticos, empresários e leigos. Esse tipo de poluição se dá, principalmente, através da queima do combustível e do carvão, na qual ocorre a liberação de altas concentrações de gases para a atmosfera, incluindo, entre eles, o dióxido de enxofre (SO_2) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os grandes centros urbanos são os principais responsáveis pelas altas emissões destes compostos, uma vez que os mesmos apresentam uma maior concentração de veículos automotores e indústrias em geral (ONAKA et al., 2001).

Altos índices de emissão de SO_2 fazem com que esse composto reaja com a umidade presente na atmosfera e acabe formando o ácido sulfúrico. O ácido sulfúrico, por sua vez, gera acidez na chuva que, por conseguinte, provoca a acidificação de rios, lagos e fontes naturais; aceleração dos processos de corrosão de prédios e monumentos; redução da visibilidade e a geração de problemas de saúde como: pneumonias, problemas respiratórios e agravamento de doenças cardiovasculares (ALVES et al., 1999). Por este motivo, muitos países vêm modificando suas legislações no sentido de exigir a produção de combustíveis com baixo teor ou até mesmo livres de enxofre.

A remoção dos compostos sulfurados do carvão, petróleo e seus derivados, antes da sua combustão, seria uma das estratégias para diminuir os níveis de emissão de SO_2 para a atmosfera (DENOME et al., 1994). Atualmente, tem-se removido o enxofre nas refinarias através de um processo de quebra catalítica conhecido como hidrodessulfurização (HDS).

A HDS é realizada por catálise metálica na presença de hidrogênio em condições extremas de temperatura e pressão (MAGHSOUDI et al., 2001). Entretanto, este processo é adequado somente para a remoção de compostos simples de enxofre que se encontrem sob a forma inorgânica, não apresentando eficiência para estruturas mais complexas.

Uma das alternativas apontadas para solucionar esse problema é a biodessulfurização (BDS), que utiliza micro-organismos para degradar os compostos organossulfurados presentes nos combustíveis fósseis. Todavia, esse é um processo que ainda se encontra em fase de desenvolvimento (GROSSMAN, 2001).

Estudos que envolvem a BDS vêm utilizando o dibenzotiofeno (DBT) como um “composto modelo” a fim de representar os compostos sulfurados presentes nos combustíveis (ANNWEILER, 2001). Diversos micro-organismos já foram descritos na literatura como capazes de degradar o DBT, entre os quais se destacam os do gênero *Rhodococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Brevibacterium sp.* e *Pseudomonas sp.* (AFFERDEN et al., 1990; KEULEN et al., 1997; KIRIMURA et al., 2000; MAGHSOUDI et al., 1999; ODA & OHTA, 2002; SCHILLING et al., 2002).

Uma das vantagens concernentes à BDS é a de que os micro-organismos são capazes de remover o enxofre do DBT, sem desfazer os anéis aromáticos para tal, mantendo assim o valor energético do combustível. A degradação ocorre pela via metabólica sulfóxido-sulfona-sulfonato-sulfato, normalmente denominada “4S”. Trata-se de uma via que ataca especificamente o átomo de enxofre presente no DBT deixando-o, ao final, sob uma forma tratável (sulfato). Além disso, o DBT, após ser metabolizado, é transformado no composto 2-hidroxibifenila, no qual os dois anéis aromáticos permanecem intactos, implicando assim na manutenção do seu potencial energético (ALVES et al., 1999; GALLANGHER et al., 1993; SETTI et al., 1997; WANG & KRAWIEC, 1994).

Em vista do exposto e observando que não há um trabalho que utilize um micro-organismo de cepa nacional como biocatalisador no processo de dessulfurização do DBT e do óleo diesel A S1800, constatou-se ser este um importante nicho para contribuições científicas.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é investigar a capacidade de dessulfurização de combustíveis através de uma rota biotecnológica utilizando o *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277.

Os principais objetivos específicos deste trabalho são:

- Avaliar a influência de fatores como pH e temperatura no crescimento do micro-organismo;
- Determinar as concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos compostos DBT, gasolina tipo C, n-dodecano e óleo diesel A S1800.
- Avaliar a eficácia da remoção de compostos sulfurosos de formulações sintéticas de combustíveis, utilizando-se o DBT como o composto sulfurado modelo em reatores descontínuos;
- Avaliar a eficácia da remoção de compostos sulfurosos do óleo diesel em reatores descontínuos;

- Determinar os parâmetros cinéticos que regem esse processo de dessulfurização.

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

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

No Capítulo I é apresentado o levantamento bibliográfico dos principais trabalhos abordando os aspectos fundamentais envolvidos no processo de dessulfurização do DBT e do óleo diesel A S1800. Também são abordadas as características gerais do óleo diesel e da gasolina tipo C (comum), bem como o histórico do petróleo no Brasil e no mundo. Além disso, discorre-se sobre as características do *Rhodococcus erythropolis*. E expõem-se ainda algumas das pesquisas mais relevantes relacionadas com o presente trabalho, enfocando os principais resultados obtidos para posterior comparação.

No Capítulo II é apresentada a metodologia empregada nos estudos da capacidade de dessulfurização do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277; da resistência às alterações de pH, temperatura e concentração de compostos como o DBT, n-dodecano, gasolina tipo C e óleo diesel A S1800; e determinação dos parâmetros cinéticos. Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa – LABMASSA – do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

No Capítulo III são apresentados os resultados das análises do percentual de degradação do DBT e da formação do 2-HBP por cromatografia de fase líquida de alta eficiência (HPLC); do percentual de remoção de enxofre do óleo diesel A S1800 por espectrômetro de fluorescência de raio-x; da cinética do processo de dessulfurização; da condição celular após reação por microscopia de fluorescência; e dos cálculos para a determinação dos parâmetros cinéticos.

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

Nos Apêndices A, B e C são apresentadas as curvas de calibração do DBT e da 2-HBP no cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (HPLC), curvas de crescimento do obtidas no presente trabalho.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentado o levantamento bibliográfico dos principais trabalhos abordando os aspectos fundamentais envolvidos no processo de dessulfurização do DBT e do óleo diesel. Também são abordadas as características gerais do óleo diesel e da gasolina tipo C (comum), bem como o histórico do petróleo no Brasil e no mundo. Além disso, discorre-se sobre as características do *Rhodococcus erythropolis*. E expõem-se ainda alguns dos trabalhos mais relevantes relacionados com o presente trabalho, enfocando os principais resultados obtidos para posterior comparação.

1.1 O PETRÓLEO

1.1.1 Histórico

1.1.1.1 *Mundial*

A participação do petróleo na vida do homem remonta a tempos bíblicos, tendo-se registro da sua utilização pelos fenícios, egípcios, gregos e romanos. No Novo Mundo, os índios pré-colombianos, incas, maias e outras civilizações antigas, também estavam familiarizados com o petróleo, dele se aproveitando para diversos fins. Era então conhecido pelos mais variados nomes: betume, asfalto, alcatrão, lama, resina, azeite, nafta, óleo de rocha, bálsamo da terra, múmia, bréia, piche de Trinidad, etc. Nesta fase, o petróleo era retirado de exsudações naturais encontradas em todos os continentes (NEIVA, 1986; THOMAS, 2004).

Na sociedade moderna, o início e a sustentação do processo de busca pelo petróleo bem com a crescente afirmação do produto datam de 1859, quando foi iniciada a exploração comercial nos Estados Unidos. Descobriu-se que a destilação do mesmo resultava em produtos que substituíam, com grande margem de lucro, o querosene (obtido do carvão e do óleo de baleia) que era amplamente utilizado para a iluminação. Posteriormente, com a invenção dos motores a diesel e à gasolina, estes derivados, até então desprezados, adicionaram lucros expressivos à atividade.

Os poços e a perfuração pelo método de percussão se multiplicaram, vivendo seu período áureo até o fim do século passado. Entretanto, nesse mesmo período, inicia-se o desenvolvimento do

processo rotativo de perfuração, que foi utilizado pela primeira vez em 1900. Com o passar dos anos, desenvolveu-se uma grande variedade de estruturas marítimas, incluindo navios, para portar esses equipamentos de perfuração (THOMAS, 2004).

Na década de 1960 a abundância de petróleo disponível no mundo, o excesso de produção, aliados aos baixos preços praticados pelo mercado, estimularam o consumo desenfreado. Já nos anos 70, houve brutais elevações no processo do petróleo. Essa última, também ficou marcada pelos significativos avanços na geoquímica orgânica, com conseqüente aumento no entendimento das áreas de geração e migração de petróleo. Com isso, nos anos 80 e 90, os avanços tecnológicos reduziram os custos, criando assim um novo ciclo econômico para a indústria petrolífera (THOMAS, 2004).

1.1.1.2 No Brasil

O histórico do petróleo no território brasileiro inicia em 1858, quando o Marquês de Olinda assina o Decreto nº 2.266 que concede a José Barros Pimentel o direito de extrair mineral betuminoso para a fabricação de querosene na então província da Bahia. Contudo, o primeiro poço brasileiro só foi perfurado em 1897 no estado de São Paulo.

Durante décadas inúmeros poços foram perfurados em todo o Brasil sem muito sucesso. Até que em 1953, no governo Vargas, foi instituído o monopólio estatal do petróleo com a criação da Petrobras, que iniciou de maneira decisiva as pesquisas sobre o petróleo brasileiro.

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

Atualmente o parque de refino brasileiro é composto por treze refinarias, das quais onze pertencem ao grupo Petrobras, sendo as outras duas pertencentes a grupos privados.

Em 2011, a produção nacional de petróleo foi de 1.552 mil barris de petróleo por dia, representando 2% na produção mundial, tornando o Brasil o 15º maior produtor de petróleo no mundo. Em termos de refino, a indústria petroquímica brasileira possui uma capacidade instalada de processamento de 1.897 mil barris de petróleo por dia, representando

5,26% da capacidade mundial e o 12º lugar entre os maiores refinadores de petróleo (ANP, 2011).

1.1.2 Constituintes do petróleo

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

O petróleo contém centenas de compostos químicos, no entanto, é separado em frações de acordo com a faixa de ebulição dos compostos (THOMAS, 2004). A Tabela 1.1 apresenta as frações típicas que são obtidas do petróleo.

Tabela 1.1: Frações típicas do petróleo.

Fração	Temperatura de ebulição (°C)	Composição aproximada	Usos
Gás residual	----	$C_1 - C_2$	gás combustível.
Gás liquefeito de petróleo – GLP	Até 40	$C_3 - C_4$	gás engarrafado, uso doméstico e industrial.
Gasolina	40 – 175	$C_5 - C_{10}$	combustível de automóveis, solvente.
Querosene	175 – 235	$C_{11} - C_{12}$	iluminação, combustível de aviões a jato.
Gasóleo leve	235 – 305	$C_{13} - C_{17}$	diesel, fornos.
Gasóleo pesado	305 – 400	$C_{18} - C_{25}$	combustível, matéria-primap/ lubrificantes.
Lubrificantes	400 – 510	$C_{26} - C_{38}$	óleos lubrificantes.
Resíduo	Acima de 510	C_{38+}	asfalto, piche, impermeabilizantes.

Fonte: THOMAS, 2004.

Apesar dos óleos obtidos de diferentes reservatórios possuírem características distintas, a maioria é composta principalmente por hidrogênio e carbono (hidrocarbonetos), na razão de 2:1 aproximadamente. No entanto, encontra-se ainda uma quantidade muito pequena de outros elementos, como enxofre, nitrogênio e oxigênio, bem como baixas concentrações de compostos orgânicos metálicos, principalmente níquel e vanádio (FATORELLI, 2005). Na Tabela 1.2 tem-se o resultado de uma análise elementar do óleo cru típico.

Tabela 1.2: 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, 2004.

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

1.1.2.1 Compostos sulfurados

O enxofre é o terceiro elemento mais abundante encontrado no petróleo, apresentando uma concentração que fica na faixa de 0,06 e 8,0%, sendo considerada como concentração média 0,65% em massa. Normalmente, encontra-se esse elemento no petróleo sob as formas de sulfetos, polissulfetos, benzotiofenos e derivados, moléculas policíclicas

com nitrogênio e oxigênio, gás sulfídrico, dissulfeto de carbono, sulfeto de carbonila e enxofre elementar (muito raro).

Os compostos sulfurados são indesejáveis por:

- aumentarem a polaridade dos óleos (aumentando a estabilidade das emulsões);
- serem responsáveis pela corrosividade dos produtos do petróleo;
- contaminarem os catalisadores utilizados nos processos de transformação;
- determinarem a cor e o cheiro dos produtos finais.

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

1.2 ÓLEO DIESEL

O óleo diesel é um produto oriundo da destilação do petróleo bruto, tendo como características ser pouco inflamável, medianamente tóxico, pouco volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico. É constituído principalmente por hidrocarbonetos parafínicos, oleofínicos e aromáticos, mas também possui em sua composição, em baixas concentrações, substâncias que contém átomos de enxofre, nitrogênio e oxigênio (PETROBRAS, 2011).

A massa específica do diesel de petróleo é de aproximadamente 0,832 kg/L, o que implica em uma massa específica 12% superior à da gasolina. Apresenta um valor energético de 35,86 MJ e libera 2,6 kg de CO_2 para cada litro queimado. Alcança uma eficiência da ordem 45% entre energia química e energia mecânica quando empregado em motores turbo a diesel (US DEPARTMENT OF ENERGY, 2011).

1.2.1 Produção

As frações denominadas de gasóleos, básicas para a produção de óleo diesel, são obtidas a partir do refino do petróleo pelos processos de destilação atmosférica, craqueamento catalítico fluido e coqueamento retardado. A esses gasóleos podem-se agregar outras frações como a nafta pesada ou querosene, resultando no produto conhecido como óleo diesel. A incorporação destas e de outras frações obtidas por outros

processos de refinação dependem da demanda global de derivados de petróleo pelo mercado consumidor (ALVES et al., 2008).

1.2.2 Aplicação e consumo

Devido à alta energia liberada ao se comprimir uma mistura óleo diesel/ar, passou-se a utilizá-la para gerar energia e movimentar máquinas e motores de grande porte. Por isso, o óleo diesel é empregado em motores de combustão interna e ignição por compressão (motores do ciclo diesel) utilizados nos mais diversos meios de transporte (automóveis, furgões, ônibus, caminhões, pequenas embarcações marítimas, locomotivas e navios), máquinas de grande porte e em aplicações estacionárias (geradores elétricos, por exemplo).

No Brasil, o óleo diesel é o derivado de petróleo mais consumido no país, devido à predominância do transporte rodoviário, tanto de passageiros quanto de carga. Em 2009, o volume de óleo diesel comercializado representou 41% do volume total de derivados. Outro fator que vem impulsionando a comercialização desse produto no território brasileiro é o crescimento econômico ocorrido nos últimos anos. Houve ainda uma redução no percentual da importação deste derivado, devido à elevação da produção interna recente.

De acordo com sua aplicação, o óleo diesel é comercializado como rodoviário ou marítimo (ANP, 2011).

1.2.2.1 Óleo diesel rodoviário

O óleo diesel automotivo é dividido em subgrupos que permitem sua adequação às necessidades ambientais e dos usuários.

Óleo diesel metropolitano (máximo 0,35% de enxofre)

Segundo a PETROBRAS (2011), esstipo de óleo diesel deve ser utilizado nas regiões com as maiores frotas em circulação e que possuam condições climáticas adversas a dispersão dos gases resultantes da combustão do mesmo, necessitando de maior controle das emissões.

Extra diesel aditivado

Esse tipo de óleo diesel é assim denominado por conter um pacote multifuncional de aditivos que objetivam manter limpo o sistema de alimentação do combustível, reduzir o desgaste dos bicos injetores,

diminuir a formação de sedimentos e depósitos, proporcionar melhor separação da água eventualmente presente no diesel e conferir maior proteção anticorrosiva a todo o sistema de alimentação (PETROBRAS, 2011).

Diesel Padrão (ou de Referência)

É especialmente produzido para o consumo das companhias montadoras de veículos a diesel, que o utilizam para a homologação de motores nos ensaios de consumo, desempenho e de emissões (PETROBRAS, 2011).

Na Tabela 1.3 observam-se as formas de comercialização do óleo diesel segundo a Resolução da ANP nº 42.

Tabela 1.3: Formas de comercialização do óleo diesel.

SEGMENTO AUTOMOTIVO						
	Diesel Podium S-50	Extra Diesel S-50	Diesel Comum S-50	Extra Diesel	Diesel Comum	Diesel Inverno
Presença de Biodiesel	Sim (5% em volume)					
Presença de Aditivos	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim (se extra diesel)
Enxofre Total máx. (ppm)	50			500 ou 1800 Conforme Resolução ANP Nº 65, de 09/12/2011		500
Número de Cetano mín.	51	46		42		
Coloração	Incolor a amarelada (Presença de corante vermelho no S1800)					
Filtração Complementar nos postos	Sim	Não				

Fonte: PETROBRAS, 2011.

1.2.3 Teor de enxofre

O petróleo contém compostos de enxofre, muito dos quais remanesce após o refino. Com isso, tem-se no óleo diesel comercializado um teor de enxofre que varia entre 50 e 1800ppm.

Os óxidos de enxofre formados pela combustão do óleo diesel podem ser descarregados para a atmosfera ou se transformar em ácidos na câmara de combustão. Por isso, menores teores de enxofre no diesel implicariam na redução da emissão de óxidos de enxofre e de particulados, bem como na diminuição do desgaste dos anéis e cilindros nos motores.

Nos países desenvolvidos, os teores de enxofre encontrados no diesel possuem níveis muito baixos. No Japão, o teor máximo de enxofre no diesel é de 10 ppm. Em países europeus, desde 1996 já havia diesel comercializado possuindo aproximadamente 50 ppm. E, em 2005 todo o diesel comercializado na União Européia passou a ter concentração máxima de enxofre de 50 ppm. Nos Estados Unidos, tais valores de concentração já haviam sido atingidos em 1993. Atualmente, os padrões americanos são da ordem de 15 ppm.

No Brasil, até 1994, o diesel possuía 13.000 ppm. A partir de 1994 passaram a existir no Brasil duas qualidades distintas de óleo diesel previstas em lei; o diesel rural, vendido no interior do país, e o diesel metropolitano, comercializado num raio de 40km dos grandes centros.

Hoje o diesel comercializado no interior possui 1800ppm de enxofre (0,2%) enquanto que o diesel metropolitano possui no máximo 500ppm (0,05%). Ambos os tipos de combustível, atendem às exigências legais dos fabricantes de motores, conforme se observa na Tabela 1.4.

Cientes do impacto ambiental causado pela alta taxa de emissão de enxofre na atmosfera, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) aprovou no dia 16 de outubro de 2009, a Resolução da ANP nº42, que especifica a diminuição gradativa do teor de enxofre no óleo diesel, determinando que a partir do dia 1º de janeiro de 2014 o diesel S1800 deixe de ser comercializado sendo totalmente substituído pelo diesel S50 (PROGRAMA AMBIENTAL DO TRANSPORTE, 2008).

Tabela 1.4: Evolução da diminuição do teor de enxofre no diesel brasileiro.

Data	Legislação	Enxofre Máximo (ppm)			
29.11.1955	Resolução CNP nº 5	10.000			
12.03.1963	Resolução CNP nº 3	10.000			
09.03.1976	Resolução CNP nº 4	13.000			
22.01.1980	Resolução CNP nº 7	13.000			
20.12.1993	Portaria DNC nº 28	A	B	D	
		10.000	5.000	10.000	
23.03.1996	Portaria DNC nº 9	A	B	C	D
		10.000	5.000	3.000	10.000
04.08.1997	Portaria DNC nº 32	A	B	C	D
		10.000	5.000	3.000	2.000
27.12.2001	Portaria ANP nº 310	Metropolitano 2.000		Interior 3.500	
22.03.2005	Portaria ANP nº 310 (Resolução da ANP nº 12)	S500 500	Metropolitano 2.000		Interior 3.500
17.07.2006	Resolução da ANP nº 15	Metropolitano 500		Interior 2.000	
16.10.2007	Resolução da ANP nº 32	50 (Fase P6 – S50)			
24.12.2008	Resolução da ANP nº 15 (Resolução da ANP nº 41)	Metropolitano 500		Interior 1.800	
14.10.2009	Resolução ANP nº 31	10 (Fase P7 – S10)			
16.10.2009	Resolução ANP nº 42	Óleo diesel	Óleo diesel	Óleo diesel	
		A/B S50	A/B S500	A/B S1800	
		50	500	1800	

Fonte: ANP, 2011.

1.3 GASOLINA

Basicamente, a gasolina é um combustível constituído por hidrocarbonetos e, em menor quantidade, por compostos oxigenados, sulfurados, nitrogenados e metálicos. Os hidrocarbonetos que compõem a gasolina (aromáticos, olefínicos e saturados) são em

geral, mais "leves" do que aqueles que compõem o óleo diesel, uma vez que são formados por moléculas de menor cadeia carbônica (normalmente cadeias de 4 a 12 átomos de carbono).

As gasolinas automotivas são utilizadas como combustível para motores de combustão interna com ignição por centelha. São empregadas principalmente em carros de passageiros, caminhões de carga e veículos utilitários. Entretanto, também são muito utilizadas em equipamentos agrícolas, motores marítimos de dois e quatro tempos, e motores a explosão fixos terrestres.

A gasolina básica (sem oxigenados) possui uma composição complexa. Sua formulação pode demandar a utilização de diversas correntes nobres oriundas do processamento do petróleo como nafta leve, nafta craqueada, nafta reformada, nafta alquilada, entre outras. No entanto, a proporção destes componentes varia de acordo com a refinaria que a produz. Na Tabela 1.5, têm-se as principais correntes formadoras da gasolina, bem como seus processos de obtenção e propriedades (PETROBRAS, 2011).

Tabela 1.5: Composição da gasolina, segundo o processo de obtenção da Petrobras.

Constituintes	Processo de Obtenção	Faixa de ebulição (°C)	Índice de Octano Motor (Clear)
Butano	destilação e processos de transformação	-	101
Isopentano	destilação, processos de transformação, isomerização	27	75
Alcoilada	Alcoilação	40 - 150	90 - 100
Nafta leve de destilação	Destilação	30 - 120	50 - 65
Nafta pesada de destilação	Destilação	90 - 220	40 - 50
Hidrocraqueada	Hidrocraqueamento	40 - 220	80 - 85
Craqueada cataliticamente	Craqueamento catalítico	40 - 220	78 - 80
Polímera	Polimerização de olefinas	60 - 220	80 - 100
Craqueada termicamente	Coqueamento retardo	30 - 150	70 - 76
Reformada	Reforma catalítica	40 - 220	80 - 85

Fonte: PETROBRAS, 2011.

1.3.1 Tipos de gasolina

Atualmente, o Departamento Nacional de Combustíveis – DNC define e especifica quatro tipos de gasolina como disponíveis para consumo: tipo A, tipo A *premium*, tipo C e tipo C *premium*. Cada um desses é definido em função das principais características de projeto dos motores, da taxa de compressão do motor, e de outras variáveis que afetam o desempenho do motor.

Gasolina automotiva tipo A

Esta gasolina constitui-se basicamente de uma mistura de naftas numa proporção tal que enquadre o produto na especificação prevista.

Gasolina tipo A-premium

Este tipo apresenta uma formulação especial. É obtida a partir da mistura de naftas de elevada octanagem (nafta craqueada, nafta alquilada, nafta reformada) e que acabam fornecendo ao produto maior resistência à detonação, do que a fornecida pela gasolina tipo A comum.

Gasolina tipo C

Esta gasolina é preparada pelas companhias distribuidoras que adicionam álcool etílico anidro à gasolina tipo A. O teor de álcool na gasolina final atinge à faixa de 21 a 23% em volume, conforme prevê a legislação atual. Esta gasolina apresenta uma octanagem mínima de 80 (MON).

Gasolina tipo C-premium

É elaborada pela adição de 21 a 23% de álcool anidro à gasolina tipo A-*premium*. Foi desenvolvida com o intuito de atender aos veículos nacionais e importados que necessitem de altas taxas de compressão, alto desempenho no motor e que possuam a recomendação dos fabricantes para utilizar um combustível de elevada resistência à detonação.

Gasolina Aditivada

Adicionam-se a uma parte da gasolina do tipo A, comum ou *premium*, além do álcool etílico, produtos (aditivos) que conferem à gasolina características especiais. Esses aditivos multifuncionais possuem, entre outras, características detergentes e dispersantes e têm a finalidade de melhorar o desempenho do produto (PETROBRAS, 2011).

Através da Tabela 1.6 observam-se as diferentes características das gasolinas comercializadas no Brasil.

Tabela 1.6: Diferenças entre os tipos de gasolina comercializadas no Brasil.

DIFERENÇAS ENTRE AS GASOLINAS			
Característica	Gasolina Podium	Gasolina Aditivada Supra	Gasolina Comum
Octanagem IAD	95 Maior Desempenho	87	
Classificação ANP	Premium	Comum	
Enxofre (máx. ppm)	30 Menos Poluente	1.000	
Aditivos	Sim Detergentes/Dispersantes		Não possui
Álcool Anidro	Obrigatório em todas as gasolinas automotivas brasileiras, em percentual definido pela legislação.		
Cor	Levemente alaranjada	Verde, em razão do corante adicionado pela BR	Amarelada

Fonte: PETROBRAS, 2011.

1.3.2 Produção e consumo

A Petrobras, empresa petrolífera brasileira, produz diversos tipos de gasolina utilizando tecnologia própria, fabricando as diversas frações de petróleo constituintes da gasolina e misturando-as entre si e com os aditivos, através de formulações convenientemente definidas para atender aos requisitos de qualidade do produto.

O grande crescimento da produção de gasolina, motivado pelo desenvolvimento da indústria automobilística, foi possível não só através do refino, mas também de processos de transformação de frações pesadas, que fazem aumentar o rendimento total do produto em relação ao petróleo.

1.3.3 Teor de enxofre

O petróleo contém compostos de enxofre sob diferentes formas e quantidades variáveis, conforme sua origem. Tais compostos são indesejáveis por:

- causarem odores desagradáveis em alguns produtos;
- corroerem os equipamentos de refinação, tanques de armazenamento e motores;
- danificarem certos catalisadores utilizados nos processos de refino;
- agirem como produtos antagônicos em relação aos compostos antidetonantes, reduzindo a sua eficiência;
- formarem óxidos de enxofre que vão se transformar em poluentes atmosféricos.

A ANP vem introduzindo melhorias na qualidade dos combustíveis, por meio de revisões nas especificações brasileiras com resultados significativos para o meio ambiente, sem perder de vista a responsabilidade de contemplar, ao mesmo tempo, a qualidade e a garantia de suprimento.

No dia 10 de outubro de 2009 foi publicada a Resolução ANP nº 38, que estabelece as especificações da gasolina comercial com limite máximo de 50ppm de enxofre para atendimento à fase L6 do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (Proconve). Trata-se de uma redução significativa dos atuais 1.000 ppm para 50 ppm. Esta gasolina estará disponível para comercialização em 1º de janeiro de 2014.

Através dos dados contidos na Tabela 1.7 pode-se constatar a evolução da diminuição do teor de enxofre na gasolina comercializada no Brasil ao longo de décadas (ANP, 2011).

Tabela 1.7: Evolução da diminuição do teor de enxofre na gasolina brasileira.

Data	Legislação	Enxofre Máximo (ppm)	
04.09.1979	Resolução CNP nº 14	2.500	
30.11.1982	Resolução CNP nº 15	2.500	
17.11.1994	Portaria DNC nº 43	2.000	
20.05.1998	Portaria ANP nº 71	Comum	Premium
		1.5000	1.000
28.12.1999	Portaria ANP nº 197	1.000	
21.08.2001	Portaria ANP nº 197	1.000	
	(Portaria ANP nº 204)		
27.12.2001	Portaria ANP nº 309	1.000	
10.10.2009	Resolução ANP nº 38	50 (Fase L6)	

Fonte: ANP, 2011.

1.4 BIODISSULFURIZAÇÃO

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

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

Uma das alternativas para substituir e/ou complementar o processo de hidrodessulfurização (HDS) é o processo biológico denominado de biodessulfurização (BDS). Na BDS utilizam-se micro-organismos para degradar os compostos organossulfurados presentes

nos combustíveis fósseis. Como os micro-organismos atuam ao nível da remoção do enxofre ligado covalentemente a matrizes orgânicas, este processo torna-se mais eficaz para adessulfurização dos combustíveis fósseis do que a HDS (ALVES, 1999).

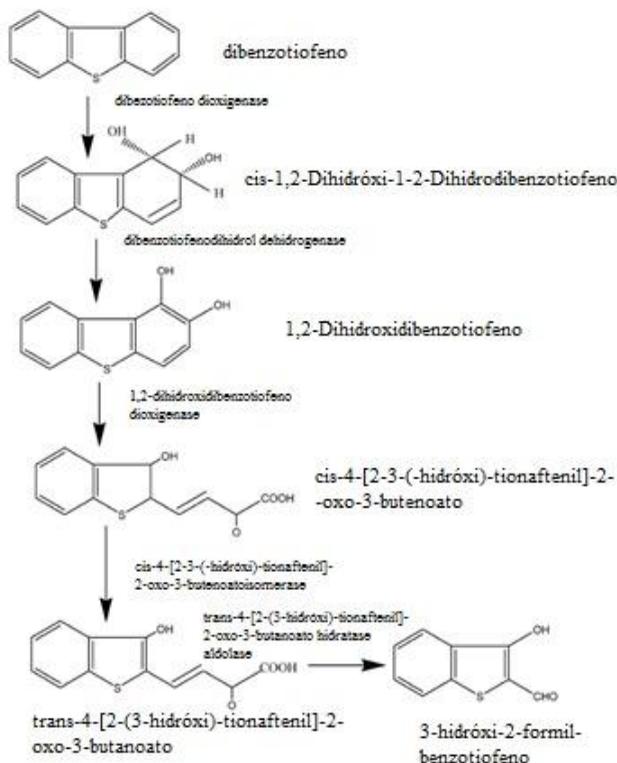
Há mais de quatro décadas que se desenvolveu o conceito de utilizar micro-organismos na remoção do enxofre de combustíveis fósseis. Isso ocorreu quando se descobriram micro-organismos acidófilos capazes de oxidar compostos sulfurosos como o *Acidianus*, *Sulpholobus* e o *Thiobacillus*. No entanto, os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

Inicialmente, focou-se na utilização do dibenzotiofeno (DBT) como um composto modelo nos processos de dessulfurização, em virtude de que o DBT e os derivados de DBT representam a maior proporção de enxofre tiofênico no petróleo e seus destilados, e de que os DBTs alquil-substituídos são os mais difíceis de remover entre todos os compostos organossulfurados (alguns deles resistem até mesmo ao tratamento com HDS ultra-profunda) (OLDFIELD et al., 1998).

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

A divergência na formação dos produtos pelos micro-organismos supracitados se deve, principalmente, às diferentes vias metabólicas utilizadas por cada um deles no processo de BDS, dentre as quais se destacam três: Kodama, Van der Afferden e a 4S.

Figura 1.1: Via metabólica Kodama da degradação oxidativa do DBT.



Fonte: GUPTA et al., 2005.

Na via de Kodama, apresentada na Figura 1.1, o ataque ao anel benzênico ocorre nas posições 2 e 3 do DBT, isso culmina na quebra de um dos anéis benzênicos fazendo com que o composto perca um pouco do potencial energético. Além disso, o produto final do DBT ainda contém o átomo de enxofre, apresentando níveis de toxicidade biológica semelhantes ao substrato inicial (ALVES et al., 1999; GALLAGHER et al., 1993; GUPTA et al., 2005).

Em 1990, Van Afferden propôs uma via metabólica diferente (utilizando como micro-organismo a *Brevibacterium sp.*), na qual o DBT é convertido a benzoato e sulfito, que por sua vez é oxidado a sulfato, por oxidação abiótica. Então, o benzoato é totalmente mineralizado a dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O). Assim, o DBT é

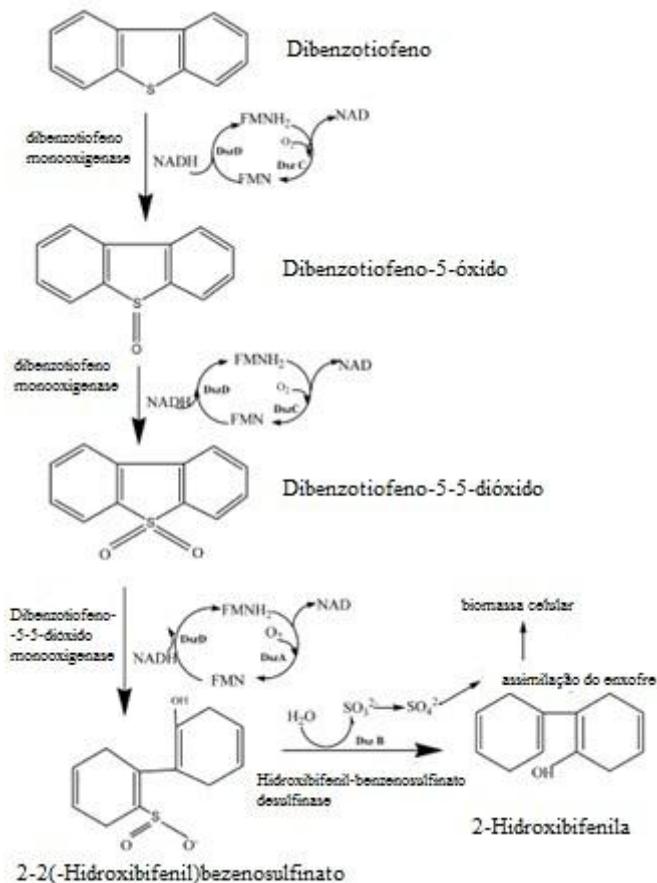
utilizado como nutriente pela bactéria como fonte de carbono e enxofre (AFFERDEN et al., 1990). Esta via de degradação do DBT não é muito interessante para os processos de BDS de combustíveis fósseis, uma vez que a mineralização completa da estrutura carbonada implicará necessariamente em uma diminuição da energia química dos combustíveis (ALVES et al., 1999).

Uma terceira via metabólica, que está representada na Figura 1.2, é a via sulfóxido-sulfona-sulfonato-sulfato, mais conhecida como “4S”, foi apresentada pela primeira vez por Kilbane (1999). Trata-se de uma via específica para a remoção do átomo de enxofre presente no DBT, em que o grupo tiofênico sofre um ataque oxidativo progressivo. Esta via envolve um sistema multienzimático, com três atividades diferentes (GRAY et al., 1996).

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

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

Figura 1.2: Via metabólica “4S” da degradação do composto DBT.



Fonte: GUPTA et al., 2005.

1.4.1 *Rhodococcus erythropolis*

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

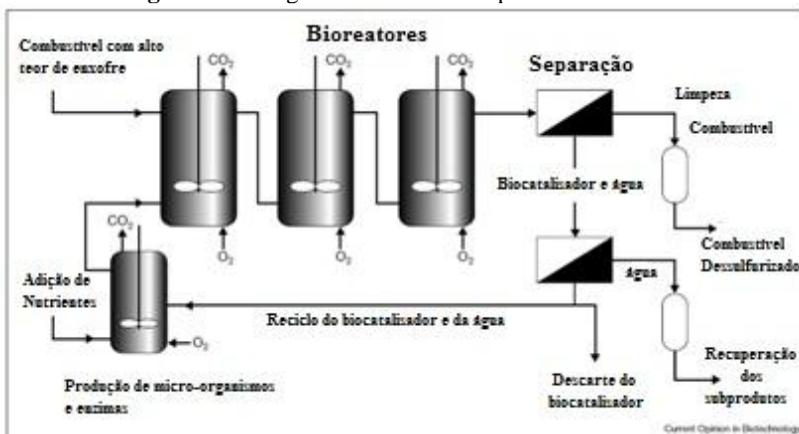
de acessar os compostos Cx-DBTs tanto na fase aquosa quanto na orgânica (MONTICELLO, 2000).

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

1.4.2 Biodessulfurização: avanços e desafios

De acordo com Monticello (2000), o esquema representado na Figura 1.4 seria um diagrama conceitual do processo de BDS. Ele destaca que três bioreatores seriam necessários para que se atingissem as baixas concentrações de enxofre requeridas pelas novas legislações, uma vez que as velocidades específicas de degradação e produtividade dos micro-organismos estudados até o momento ainda são muito baixas. Além disso, nesse cenário, as células cresceriam e seriam “revitalizadas” durante o processo, um passo necessário para se atingir o longo tempo de residência do biocatalisador requerido para um processo viável comercialmente. Com relação, aos processos de separação, Monticello (2000) acredita que eles poderão ser realizados somente por hidrociclones ou combinando os mesmos com outros processos de decantação de baixo custo e sistemas de centrifugação.

Figura 1.4: Diagrama conceitual do processo de BDS.



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

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

Outra barreira para a aceitação comercial da BDS envolve a logística do manuseio asséptico, carregamento, estocagem e uso de células vivas de bactérias em relação ao ambiente de refino.

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

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

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

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

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

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

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

Uma das soluções para o problema de separação da mistura óleo/células/água é imobilizar as células dos micro-organismos, uma vez que as células imobilizadas são separadas mais facilmente e há ainda um menor risco de contaminação. Li et al. (2005), Li et al. (2008), Li et al. (2009) e Naito et al. (2001) realizaram o processo de BDS com os micro-organismos imobilizados, obtendo uma fácil separação ao final do

processo. No entanto, o percentual de degradação foi expressivamente inferior com relação aos obtidos com células livres, devido principalmente à maior resistência a transferência de massa. Cabe então desenvolver um suporte que não iniba a transferência de massa, que seja resistente o suficiente para se reutilizado várias vezes no processo industrial e de baixo custo.

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

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

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

Os procedimentos para a dessulfurização do DBT e do óleo diesel A S1800 envolvem de maneira geral as etapas de inoculação, adaptação e crescimento do micro-organismo; fermentação em reatores descontínuos contendo 20, 80 e 100% (v/v) dos compostos a serem dessulfurizados; análises do teor de enxofre dos compostos após fermentação.

Todos os experimentos infracitados foram realizados no Laboratório de Transferência de Massa – LABMASSA – do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Exceto as análises do teor de enxofre nas amostras de óleo diesel que foram feitas no Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos – LACAUT– do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e as análises de microscopia de fluorescência que foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica – ENGEBIO – do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Micro-organismo

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

2.1.2 Meios de Cultura, Manutenção e Fermentação

Meio de Manutenção

O meio *Yeast Malt Extract Agar* (YMA) foi escolhido por ter sido sugerido como o melhor meio de manutenção pela própria Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. A composição do meio YMA é descrita a seguir na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição do meio de manutenção YMA.

Composto	Marca	Concentração (g/L)
Extrato de levedura (YE)	Biolife	3,0
Extrato de malte (ME)	Biolife	3,0
Bacto peptona (BP)	Himedia	5,0
Glicose	VETEC	10,0
CaCO ₃	Nuclear	2,0
Ágar	Himedia	20,0

Meio de Cultura

Para o inóculo empregou-se o meio YMA (Tabela 2.1) sem ágar (YM), uma vez que se desejava um meio líquido. O mesmo se deu no meio de crescimento, no entanto, visando a formação das enzimas “dessulfurizantes” suplementou-se o meio com 0,5mM de DBT (MA et al., 2006).

Meio de Fermentação

O meio de fermentação empregado foi o YM modificado conforme apresentado na Tabela 2.2. Removeu-se o ME a fim de se reduzir o tempo da fase lag, o que poderia implicar em uma conseqüente diminuição da produtividade.

Tabela 2.2: Composição do meio de fermentação YM modificado.

Composto	Marca	Concentração (g/L)
Extrato de levedura (YE)	Biolife	3,0
Bacto peptona (BP)	Himedia	5,0
Glicose	VETEC	10,0
CaCO ₃	Nuclear	2,0

2.1.3 Reagente Ácido Dinitrosalicílico (DNS)

Segundo Ghose (1987) o reagente DNS utilizado no método de determinação da concentração de açúcares redutores deve ser produzido dissolvendo-se 306g de tartarato de sódio e potássio (marca LAFAN) em 1416 mL de água destilada e adicionando-se, posteriormente, 19,8g de hidróxido de sódio (marca Nuclear) sob agitação. Finalmente, acrescentam-se lentamente à solução 10,6g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (marca Sigma-Aldrich).

2.1.4 Solventes

Inúmeros estudos como os realizados por Carvalho et al. (2004, 2005a, 2005b, 2007 e 2009) e por Ohshiro et al. (1996) demonstram a excelente adaptação do *Rhodococcus erythropolis* ao n-dodecano devido ao seu valor de *log P*. Ohshiro et al. (1996) descreve ainda como o n-dodecano incrementa a capacidade de dessulfurização do DBT pelo micro-organismo. Por isso o composto n-dodecano 99% (marca VETEC) serviu como solvente para o DBT 98% (marca Sigma-Aldrich) nos ensaios de dessulfurização.

Para as análises no HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) utilizou-se água MiliQ e metanol para UV/HPLC (marca JT Baker).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Reativação das Células de *Rhodococcus erythropolis* Liofilizadas

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

Após a abertura da ampola as células de *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 foram reativadas despejando-se o conteúdo da ampola em um tubo de ensaio contendo 5mL de meio YM obtendo-se

assim uma suspensão das células que permaneceram no tubo por aproximadamente 15 min afim de se reidratarem.

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

2.2.2 Método da Turbidimetria para Determinação da Concentração Celular

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

Decorrido esse tempo, utilizou-se uma alíquota do meio de crescimento (diluída 1:10) para fazer uma varredura automática no espectrofotômetro UV-Vis (marca Shimadzu, modelo UV-1240) a fim de se determinar o comprimento de onda ideal para se efetuar as leituras. O comprimento de onda que apresentou maior absorbância foi o de 600nm.

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

2.2.2.1 Determinação Gravimétrica da Concentração Celular

Como a turbidimetria é um método indireto para a determinação da concentração celular faz-se necessária a utilização de um método direto como a gravimetria para que a construção de uma curva de calibração absorbância *versus* concentração celular seja possível (MORITZ, 1998).

A determinação gravimétrica da concentração celular é expressa como massa de células secas por unidade de volume. Por isso cinco alíquotas de 10mL cada foram retiradas do meio de crescimento citado no item 1.2.2 e filtradas à vácuo através de uma membrana de acetato de celulose com poros de 0,45µm previamente secas até atingirem uma massa constante em micro-ondas por aproximadamente 15min. Após a filtragem as membranas contendo as células são novamente secas em micro-ondas por aproximadamente 15min (até atingirem uma massa constante). A concentração de biomassa é obtida pela diferença entre a massa das membranas dividida pelo volume da alíquota, conforme equação (01) (MORITZ, 1998).

$$[X]_{\frac{g}{L}} = \frac{M_{membranafinal(g)} - M_{membranainicial(g)}}{V_{aliquota(L)}} \quad (01)$$

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

2.2.3 Determinação da Curva de Crescimento Celular do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277

De início inocularam-se duas alçadas de células da cultura estoque em um frasco Erlenmeyer contendo meio de manutenção YMA (sem ágar) previamente autoclavado a 121°C por 20 min, o mesmo permaneceu em uma incubadora a 28°C e 150rpm por 24h. Posteriormente transferiu-se 5% (v/v) do inóculo para outro frasco Erlenmeyer contendo meio de crescimento YMA (sem ágar) esterilizado, neste instante retirou-se a primeira alíquota do meio de crescimento e leu-se sua absorbância no espectrofotômetro ($\lambda=600\text{nm}$); nas oito primeiras horas retiraram-se alíquotas de quatro em quatro horas e posteriormente retiraram-se alíquotas de duas em duas horas até que o crescimento do micro-organismo atingisse a fase estacionária.

Com os dados obtidos através desse método foi possível construir as curvas de crescimento do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 para

cada ensaio (Apêndice A) bem como identificar a fase *log* de cada curva de crescimento (Apêndice A).

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

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

Utilizando-se dessa metodologia construíram-se duas curvas de calibração (Apêndice B), uma para até 10g/L e outra para até 2g/L de açúcar redutor, que visam relacionar a absorbância obtida com a concentração de açúcar no caldo fermentativo. As curvas obtidas apresentaram limites de linearidade com coeficientes de correlação (R^2) iguais a 0,998 e 0,999, respectivamente.

2.2.5 Percentual de inibição pelo pH e pela temperatura

Tais ensaios foram realizados em tubos Falcon fechados com rolhas de algodão (permitindo assim as trocas gasosas essenciais ao micro-organismo) contendo 20mL de meio de crescimento YMA (sem ágar) esterilizado. Em cada tubo adicionou-se 1mL do inóculo do *Rhodococcus erythropolis* previamente preparado.

As alterações do pH no teste de inibição para tal foram realizadas adicionando-se gradativamente porções das soluções de 1M NaOH e de 1M HNO₃ até que se observasse no pHmetro (marca Quimis, modelo 400M2) o valor desejado de pH. Determinou-se o percentual de inibição do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 na presença de meios de crescimento com pH de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0, sendo que o controle foi feito em um tubo com pH 7,0, pois segundo a Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” trata-se do pH ótimo para essa bactéria. Os tubos permaneceram na incubadora por 24h a 28°C e 150rpm, em seguida leram-se a absorbância de cada um dos tubos no espectrofotômetro ($\lambda=600\text{nm}$) e determinaram-se as concentrações celulares respectivas comparado-as com a obtida no tubo controle conforme demonstrado na equação (02).

$$\% \text{ de inibição} = \frac{[X]_{\text{controle}} - [X]_{\text{teste}}}{[X]_{\text{controle}}} * 100 \quad (02)$$

O percentual de inibição causado pela temperatura foi definido colocando-se os tubos Falcon contendo meio de crescimento YMA (sem ágar) mais 1mL de inóculo na incubadora à temperatura de 20°C ou de 50°C durante 24h a 150rpm e determinando-se a concentração celular final. As concentrações celulares obtidas nos ensaios com as duas temperaturas foram comparadas com a concentração celular resultante do crescimento a 28°C (que segundo a Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” trata-se da temperatura ótima para essa bactéria) através da equação (02).

2.2.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Método de Difusão

Testes preliminares de difusão em ágar foram realizados a fim de se avaliar a sensibilidade do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 a certos compostos, conforme metodologia descrita por Otrrosky et al. (2008). Esses testes foram executados em placas de Petri contendo meio de manutenção YMA, previamente inoculadas com uma suspensão microbiana de concentração 4,0 ±0,5g/L. Confeccionaram-se poços de 1,0 cm de diâmetro ao longo do meio de manutenção e os mesmos foram preenchidos com os compostos a serem testados (como o DBT, óleo diesel A S1800, n-dodecano, gasolina tipo Ce outros), em seguida, as placas eram deixadas na incubadora por 48h a 28°C. A CMI foi considerada aquela concentração e/ou composto puro capaz de desenvolver halo de inibição do crescimento microbiano maior ou igual a 1,4cm de diâmetro.

Método da macrodiluição em caldo

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

Conduziram-se os ensaios para determinação da CMI pelo método da macrodiluição em caldo utilizando diferentes concentrações de DBT em tubos Falcon fechados com rolhas de algodão contendo 10mL de meio de crescimento YMA (sem ágar) esterilizado, 1mL do inóculo do *Rhodococcus erythropolis* previamente preparado e 10mL de n-dodecano onde encontravam-se dissolvidas as seguintes concentrações de DBT: 1.000; 2.500; 5.000; 10.000; e 20.000 ppm. Os tubos permaneceram na incubadora por 24h a 28°C sob agitação de 200rpm. O percentual de inibição pelo DBT foi calculado através da equação (02) onde a concentração celular final em cada tubo foi comparada com a concentração celular do tubo controle onde só havia os 10mL de meio YMA e os 10mL de n-dodecano sem DBT.

Em contra partida os experimentos com o óleo diesel A S1800 e a gasolina tipo C foram conduzidos em frascos Erlenmeyer contendo diferentes concentrações de meio de cultura YMA e desses combustíveis fósseis, conforme apresentado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Construção do ensaio para a determinação da CIM

Concentração combustível % (v/v)	Volume Meio de Cultura (mL)	Volume do Combustível (mL)
0 (controle)	100	0
10	90	10
30	70	30
50	50	50
70	30	70
90	10	90

Esses Erlenmeyers permaneceram na incubadora a 28°C por 24h sob agitação de 200rpm e as concentrações celulares obtidas ao término das 24h foram comparadas à concentração final obtida no frasco controle de acordo com a equação (02).

2.2.7 Dessulfurização por células livres de *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em sistema reacional bifásico

A primeira etapa na determinação da capacidade de dessulfurização do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 foi inocular duas alçadas de células da cultura estoque em um frasco Erlenmeyer

contendo meio de manutenção YMA (sem ágar) previamente autoclavado a 121°C por 20 min, e deixá-lo na incubadora a 28°C e 150rpm por 24h.

Como etapa seguinte tinha-se o meio de crescimento onde além de possibilitar o aumento da massa celular total também propiciava uma indução da atividade biocatalítica pela presença do DBT (Maet al., 2006). Portanto, transferiu-se 5% (v/v) do inóculo para um frasco Erlenmeyer contendo meio de cultura YMA esterilizado (conforme item 1.1.2.2) e este permaneceu durante 18h na incubadora a 28°C e 150rpm. Ulteriormente o conteúdo do Erlenmeyer foi centrifugado (centrífuga marca Jouan, modelo B4I) a 5000x g durante 10min, descartou-se o sobrenadante e lavaram-se as células com uma solução 0,1M de fosfato buffer. As células devidamente lavadas foram transferidas em assepsia para o frasco contendo o meio fermentativo acrescido da fase orgânica a ser dessulfurizada.

O sistema de biocatálise era composto por duas fases: uma aquosa (o meio fermentativo YMA) e outra orgânica (que poderia ser n-dodecano acrescido de 500ppm de DBT ou óleo diesel A S1800). Testaram-se três concentrações distintas da fase orgânica: 20, 80 e 100% (v/v), visando estabelecer seu impacto no percentual de dessulfurização. O sistema biocatalítico permanecia na incubadora por 24hs a 28°C e 200rpm. Ao final da fermentação centrifugava-se o conteúdo do Erlenmeyer a 5000xg durante 10min a fim de se obter uma separação das duas fases e encaminhar cada uma delas para suas respectivas análises.

Vale ressaltar que a concentração de 3,0 mM (500ppm) de DBT nos experimentos realizados com n-dodecano possuía o objetivo de simular a concentração média de enxofre no diesel comercial do tipo interior segundo Resolução ANP n° 42.

2.2.8 Análises

2.2.8.1 Concentração Celular e Concentração de Açúcares no Caldo Fermentativo

Determinou-se a concentração celular em cada ensaio através da leitura da absorbância de cada amostra no espectrofotômetro UV-Vis (marca Shimadzu, modelo UV-1240) utilizando um comprimento de onda $\lambda=600\text{nm}$. Cada amostra possuía um volume mínimo de 2,5mL. E

antes de cada leitura descontava-se o valor da absorbância concernente ao meio de crescimento desprovido de células do micro-organismo.

As análises da concentração de açúcares seguem um procedimento análogo ao supracitado, no entanto, realizavam-se as leituras de absorbância utilizando $\lambda=540\text{nm}$ e descontava-se o valor da absorbância da mistura de 1mL de água destilada com 1,5mL do reagente DNS, fervida por 5min em banho-maria, antes de cada leitura.

2.2.8.2 Cromatográficas

Realizaram-se as análises dos compostos DBT e 2-HBP (Sigma-Aldrich, 99% padrão HPLC) em um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência, mais conhecido por sua sigla em inglês HPLC (*high performance liquid chromatography*), da marca CG composto de uma bomba modelo CG 480-E, conectado a um detector UV/visível modelo CG 437-B e coluna Nucleosil C18 fase reversa de 250 mm, diâmetro interno de 4,6 mm. Acoplado ao sistema, tem-se um microcomputador que monitora a resposta de saída da coluna cromatográfica através de um programa de aquisição de dados. A Figura 2.1 apresenta o cromatógrafo empregado no estudo.

Figura 2.1: Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência – HPLC (LABMASSA, EQA/UFSC)



Fonte: DA LUZ, 2009.

A escolha dos eluentes e da proporção da fase móvel se deu adaptando a metodologia descrita por Bahtia et al. (2010), Calzada et al. (2009), Caro et al. (2007) e Kirimura et al. (2001) com a técnica desenvolvida por Da Luz (2009) no LABMASSA do EQA/UFSC. Portanto, os eluentes utilizados nas corridas experimentais foram o metanol para HPLC (JT Baker) e água MiliQ, previamente filtrados em

membranas de nylon (metanol) e de acetato de celulose (água MiliQ), com diâmetro de 47 mm e poro de 0,45 μm . A fase móvel foi preparada nas proporções de 80:20 (metanol/água) e então desaerada em ultrassom por aproximadamente 40min, para evitar a formação de bolhas de ar no cabeçote da bomba ou na saída do detector. A vazão da fase móvel utilizada foi de 1,0 mL/min.

Coletavam-se as amostras com uma seringa de vidro e as mesmas eram previamente filtradas em uma unidade filtrante de poliéster, com carcaça em polipropileno, com diâmetro de 25 mm e poro de 0,20 μm . Após a filtragem 20 μL da amostra eram injetados no HPLC. A detecção das mesmas se deu no comprimento de onda de $\lambda=254$ nm.

Com vistas à obtenção das curvas de calibração dos compostos DBT e 2-HBP, realizaram-se leituras com variação na concentração de 10 a 500ppm. Para cada ponto obteve-se a leitura da área correspondente à concentração da amostra. Através dos valores obtidos, foi possível a elaboração dos gráficos da área *versus* a concentração dos compostos, obtendo-se assim as curvas de calibração. As curvas obtidas para os compostos DBT e 2-HBP apresentaram limites de linearidade com coeficientes de correlação (R^2) iguais a 0,999 e 0,997, respectivamente. As mesmas encontram-se no Apêndice C.

2.2.8.3 Determinação de Traços de Enxofre Total por Fluorescência de UV

As análises do teor de enxofre nas amostras de óleo diesel A S1800 foram feitas em um espectrômetro de fluorescência de raio-x (marca SEA, modelo 2000) no Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUT), do Departamento de Engenharia Química, no Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), utilizando-se o método da *American Society for Testing and Materials* ASTM-D5453.

Calculou-se o teor de enxofre das amostras de diesel com base nas curvas de calibração previamente desenvolvidas pelo próprio LACAUT. Essas curvas, segundo os técnicos do LACAUT, possuem um desvio padrão na leitura de cada amostra de ± 56 ppm.

Figura 2.2: Espectrômetro de fluorescência de raio-x (LACAUT, EQ/UFPR).



2.2.8.4 Microscopia de Fluorescência

A fim de se observar as condições das células do *R. erythropolis* ATCC4277 após 20h de reação em reatores descontínuos contendo 100 % (v/v) de n-dodecano ou óleo diesel realizaram-se análises de microscopia de fluorescência.

Tais análises foram feitas no Laboratório de Engenharia Bioquímica – ENGEBIO – do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em um microscópio (marca BIOVAL) aumentando-se 400 vezes o alcance das lentes objetiva (marca Olympus, modelo EA40) e ocular (marca Olympus, modelo PL 100/1,25).

2.2.8.5 Análise de Variância – ANOVA

Fez uso do *software* STATISTICA® 7.0 para realizar a análise de variância – ANOVA – a fim de se avaliar se havia ou não diferença significativa entre as médias das concentrações finais de DBT obtidas por cada tratamento.

Pois segundo Takeshita (2010), na análise de variância testam-se duas hipóteses: H_0 , ou hipótese nula, e H_1 , ou hipótese alternativa. A hipótese nula H_0 sempre afirma que não há nenhuma diferença entre

médias de diferentes tratamentos ou fatores. Assume-se que não há mudança na resposta, qualquer que seja a modificação imposta sobre o processo estudado. Já a hipótese alternativa $H1$, ao contrário, afirma que há alteração na resposta Y devido à modificação nas variáveis independentes (fatores controláveis).

Neste contexto, utilizaram-se duas probabilidades na tomada de decisão entre $H0$ ou $H1$:

- Nível de significância (α): que é a probabilidade tolerável de se rejeitara hipótese nula $H0$ quando esta for verdadeira.

- Valor p : este representa a probabilidade do erro envolvido em aceitar o resultado observado como válido. No caso, a regra de decisão é de rejeitar a hipótese nula se $p \leq \alpha$, provando a hipótese alternativa $H1$. O valor p representa um índice decrescente da confiabilidade de um resultado, quanto maior o valor p , menor a confiabilidade na relação observada (TAKESHITA, 2010).

Dentro da análise de variância utilizou-se o teste F a fim de se comparar as variâncias estimadas através da razão entre elas, a qual deve ser muito maior que 1 para haver diferenças estatisticamente significativas. Se o teste F for significativo, rejeita-se a $H0$ de não-diferença entre as médias e se aceita a hipótese alternativa de que as médias são diferentes umas das outras (TAKESHITA, 2010).

Caso obtenha-se um teste F estatisticamente significativo da ANOVA rejeitando-se a hipótese nula de que os diferentes tratamentos não interferem no processo estudado, deseja-se saber quais médias são diferentes umas das outras e que contribuem para o efeito observado, isto é, quais grupos são particularmente diferentes um dos outros. Para isso, fez-se uso do Método de Tukey de comparações múltiplas onde realizou-se a estatística sobre as médias experimentais marginais ponderadas (*weighted marginal means*). O intervalo de confiança foi estabelecido como $1-\alpha$ para as diferenças entre as médias dos tratamentos (TAKESHITA, 2010).

2.2.9 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

2.2.9.1 Fatores de Conversão

O fator de conversão de substrato em células (g de células/ g de substrato) foi calculado segundo a equação (03).

$$Y_{x/s} = \frac{(X_{\text{máx}} - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (03)$$

O cálculo do fator de conversão de substrato em produto (g de substrato (glicose ou DBT)/ g de produto (2-HBP)) se deu através da equação (04).

$$Y_{p/s} = \frac{(P_{m\acute{a}x})}{(S_o - S_f)} \quad (04)$$

Analogamente, o fator de conversão de células em produto (g de células/g de produto) foi calculado segundo a equação (05).

$$Y_{p/x} = \frac{(P_f - P_o)}{(X_{m\acute{a}x} - X_o)} \quad (05)$$

Onde:

$X_{m\acute{a}x}$, $P_{m\acute{a}x}$: valores máximos das concentrações celular e de produto (g/L), respectivamente;

X_o , P_o , S_o : valores iniciais das concentrações de células, produto e substrato (g/L), respectivamente;

P_f , S_f : concentrações finais do produto e substrato, respectivamente.

2.2.9.2 Produção e Produtividade

Utilizou-se a equação (06) para calcular a produção da 2-HBP.

$$Produção = \frac{M_p}{t} \quad (06)$$

Já a produtividade foi determinada pela equação (07).

$$Produtividade = \frac{P}{t} \quad (07)$$

Onde:

M_p : massa de 2-HBP (mg);

P : concentração de 2-HBP (mg/L);

t : tempo de reação (h).

2.2.9.3 Velocidades Específicas e Velocidade Específica de Crescimento Máxima

As velocidades específicas de crescimento (μ_x), formação do produto (μ_p) e de consumo do substrato (μ_s) foram determinadas segundo a metodologia descrita por Ley Duy & Zajic (1973) (apresentada no Anexo A) e resumida por Borzani et al. (2008).

Determinou-se a velocidade específica de crescimento máxima através do coeficiente angular da reta obtida plotando-se o logaritmo neperiano da concentração celular (apenas os pontos concernentes à fase *log*) em função do tempo.

2.2.9.4 Constante de Saturação (K_S)

As constantes de saturação foram obtidas a partir da linearização da equação de Monod (08), conforme apresentado na equação (09).

$$\mu_X = \mu_X^{m\acute{a}x} \cdot \frac{S}{S+K_S} \quad (08)$$

$$\frac{1}{\mu_X} = \frac{1}{\mu_X^{m\acute{a}x}} + \frac{K_S}{\mu_X^{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S} \quad (09)$$

Onde:

μ_x : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1});

$\mu_x^{m\acute{a}x}$: velocidade específica de crescimento celular máxima (h^{-1});

S: concentração de substrato (g/L);

K_S : constante de saturação (g/L).

Em seguida construiu-se um gráfico com os valores de $1/\mu_x$ versus $1/S$, onde o K_S foi determinado pelo coeficiente angular da reta obtida pelo gráfico. Esses gráficos encontram-se no Apêndice A.

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÕES

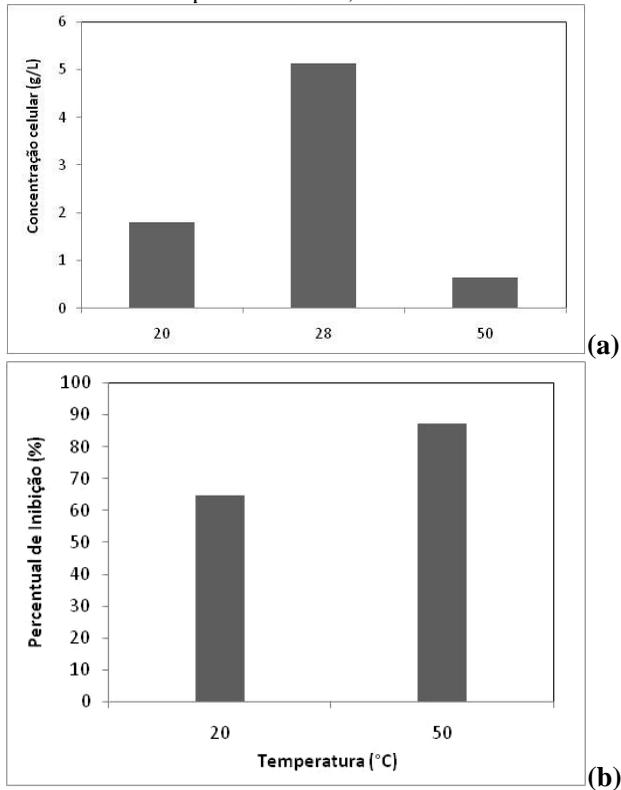
Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados experimentais concernentes ao estudo da capacidade de dessulfurização do DBT e do óleo diesel A *S1800* pela bactéria *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277. A discussão se dará em torno dos resultados referentes à influência de fatores como pH, temperatura, e concentrações dos compostos n-dodecano, óleo diesel A *S1800*, gasolinatipo C (comum) e DBT no crescimento do micro-organismo; percentual de enxofre removido do DBT e do óleo diesel A *S1800* pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277; parâmetros cinéticos do processo de dessulfurização.

3.1 INFLUÊNCIA DO pH E DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277

Além da indicação dada pelo próprio fornecedor da bactéria *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 a Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, outros autores como Carvalho et al.(2009) e Guchhait et al.(2005) também utilizam-se da temperatura de 28°C e do pH 7,0 ($\pm 0,2$) em seus ensaios com esta bactéria. Contudo, decidiu-se determinar a influência do pH e da temperatura no crescimento do *R. erythropolis* ATCC4277 visando ampliar a aplicabilidade dessa bactéria no âmbito industrial, principalmente quando se pensa em processos petroquímicos, onde a matéria-prima dificilmente se encontra na temperatura ambiente e com um pH neutro.

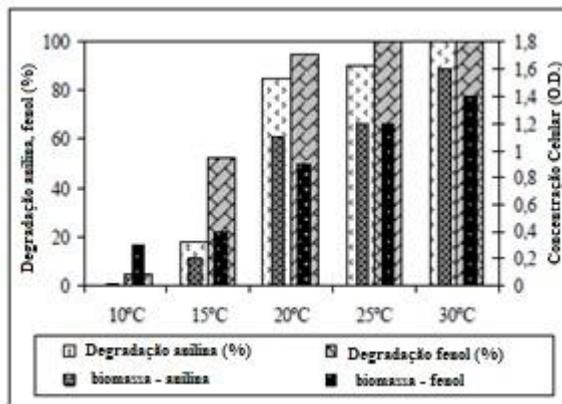
Na Figura 3.1 têm-se a concentração celular obtida após 24h de crescimento nas temperaturas 20, 28 e 50°C (a) e o percentual de inibição causado pelas temperaturas de 20 e 50°C (b). A inibição causada pelo crescimento em ambas as temperaturas foi grande, sendo de $64 \pm 0,5\%$ e de $87 \pm 0,05\%$ para 20 e 50°C, respectivamente.

Figura 3.1: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 após 24h de crescimento nas temperaturas de 20, 28 e 50°C.



O mesmo comportamento foi observado por Tomioka et al. (1994), Carvalho et al. (2004), Olmo et al. (2005), Schreiberova et al. (2008) e Suhaila et al. (2010) onde as maiores concentrações celulares foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 30°C, conforme se pode observar na Figura 3.2. Tais autores também constataram que o crescimento é consideravelmente inibido por temperaturas inferiores a 20°C e para temperaturas superiores a 35°C.

Figura 3.2: Influência da temperatura no crescimento e na degradação do poluente pelo *Rhodococcus erythropolis*.

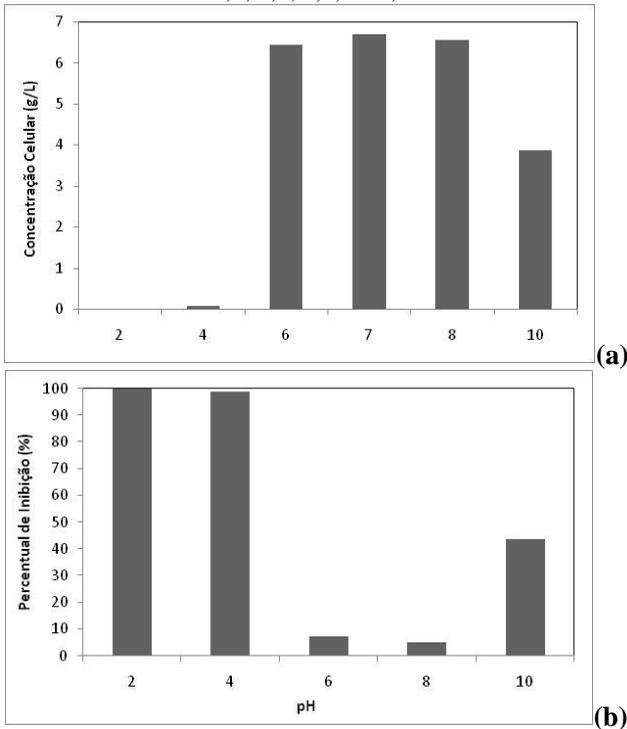


Fonte: SCHREIBEROVA et al., 2008.

Segundo Heipieper et al. (2007) tal inibição pode ser explicada pelas alterações causadas na membrana celular por temperaturas que se distanciem da temperatura ideal para aquele micro-organismo. A temperatura que ocasiona uma mudança no estado físico da cadeia lipídica de uma fase gel ordenada para uma fase líquido-cristalina desordenada é chamada de temperatura de transição de fase. Dependendo do seu comprimento, grau de saturação, e configuração, os ácidos graxos da membrana celular podem exibir diferentes temperaturas de transição (pontos de fusão), o que explicaria a alta inibição por temperaturas tão distintas.

Têm-se na Figura 3.3 a concentração celular obtida após 24hs de crescimento em meios com pH 2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 10,0; e o percentual de inibição do crescimento do *R. erythropolis* ATCC4277 frente a esses valores de pH quando comparados ao pH ótimo (7,0).

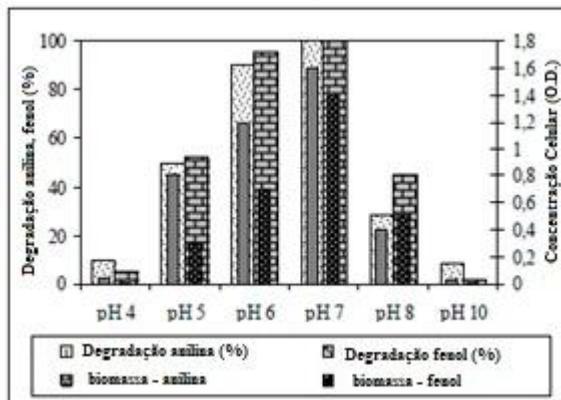
Figura 3.3: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 após 24h de crescimento em pH 2,0; 4,0; 6,0; 7,0; 8,0; e 10,0.



Os percentuais de inibição causados pelos pH 2,0 e 4,0 foram de $99,9 \pm 0,11\%$ e $98,9 \pm 0,12\%$, respectivamente, isso significa que o crescimento do micro-organismo se tornou praticamente inviável. O pH 10,0 também afetou expressivamente o crescimento microbiano, reduzindo em $43,7 \pm 0,17\%$ a concentração celular. Já os pH 6,0 e 8,0 produziram pouca diferença em relação ao crescimento em pH 7,0 uma vez que os percentuais de inibição foram $7,3 \pm 0,18\%$ e $5,1 \pm 0,29\%$, respectivamente. Tais resultados vêm corroborar os resultados obtidos pelos autores Tomioka et al. (1994), Wang & Krawiec (1996), Olmo et al. (2005), Schreiberova et al. (2008) e Suhaila et al. (2010), que determinaram a faixa de pH entre 6,5 e 7,5 como a que proporciona maior crescimento celular. Esses autores também observaram que em

pH muito ácidos ou muito básicos o crescimento do *R. erythropolis* sofre forte inibição, segundo observa-se na Figura 3.4.

Figura 3.4: Influência do pH no crescimento e na degradação do poluente pelo *Rhodococcus erythropolis*.



Fonte: SCHREIBEROVA et al., 2008.

3.2 INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DE N-DODECANO, ÓLEO DIESEL A S1800, GASOLINA TIPO C E DBT NO CRESCIMENTO DO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277

Nos ensaios realizados pelo método de difusão em ágar não houve a formação de halo de inibição para nenhum dos compostos, conforme se constata nas Figuras 3.5 e 3.6.

Ohshiro et al. (1996) e Carvalho et al. (2005a, 2005b, 2009) estudaram a adaptação do *R. erythropolis* ao n-dodecano e os resultados positivos foram atribuídos ao valor do $\log P$ desse solvente que é igual a 7,0, significando que esse composto apresenta baixa toxicidade ao micro-organismo. O $\log P$ é o logaritmo do coeficiente de partição do solvente em uma mistura padrão octanol/água, que normalmente é utilizado como um índice de toxicidade do solvente com relação ao crescimento celular. Valores abaixo de 5,0 são considerados tóxicos para a maioria dos micro-organismos (OHSHIRO et al., 1996).

Figura 3.5: Determinação da CMI dos compostos DBT, óleo diesel A S1800 e n-dodecano através do método de difusão em ágar.

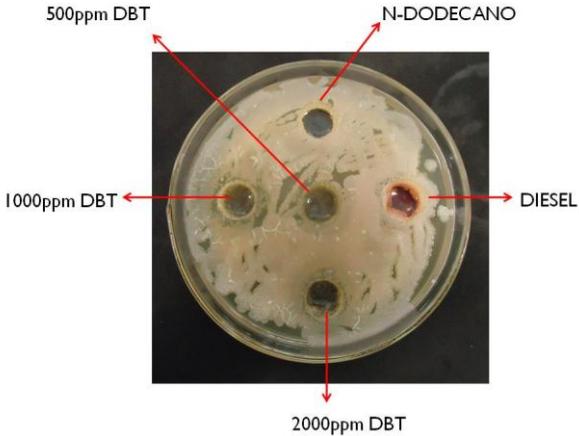
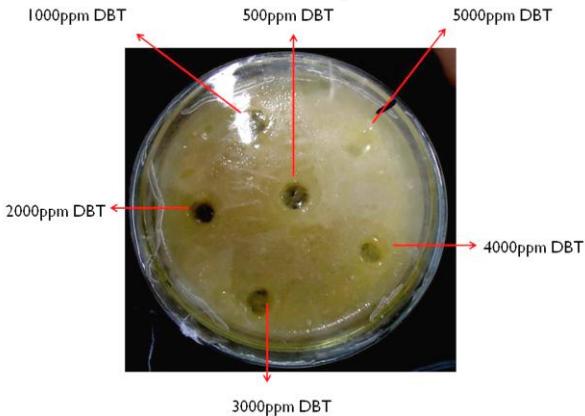


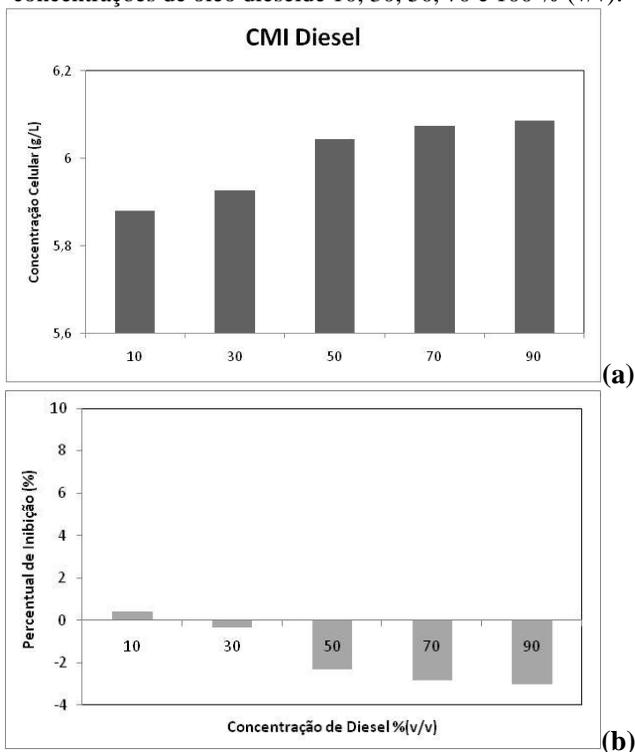
Figura 3.6: Determinação da CMI do composto DBT através do método de difusão em ágar.



Uma boa adaptação do *R. erythropolis* a um meio bifásico contendo 20% de óleo diesel é descrita por Li et al. (2008), Zhang et al. (2007), Guchhait et al. (2005), Maghsoudi et al. (2001) e Whyte et al. (1999), no entanto, nenhum teste de que se tenha conhecimento foi realizado utilizando óleo diesel puro como fonte nutritiva para o crescimento do micro-organismo. Todavia, nota-se pela Figura 3.7 que a concentração celular do micro-organismo na presença das diferentes

concentrações de óleo diesel foram próximas e, até mesmo, superiores a encontrada no frasco contendo apenas meio nutritivo. Além disso, as inibições, quando houveram, foram muito pequenas, na ordem $0,42 \pm 0,02\%$ (para a concentração de óleo diesel de 10% (v/v)). Por conseguinte, não há uma CMI de óleo diesel A S1800 com relação a essa bactéria.

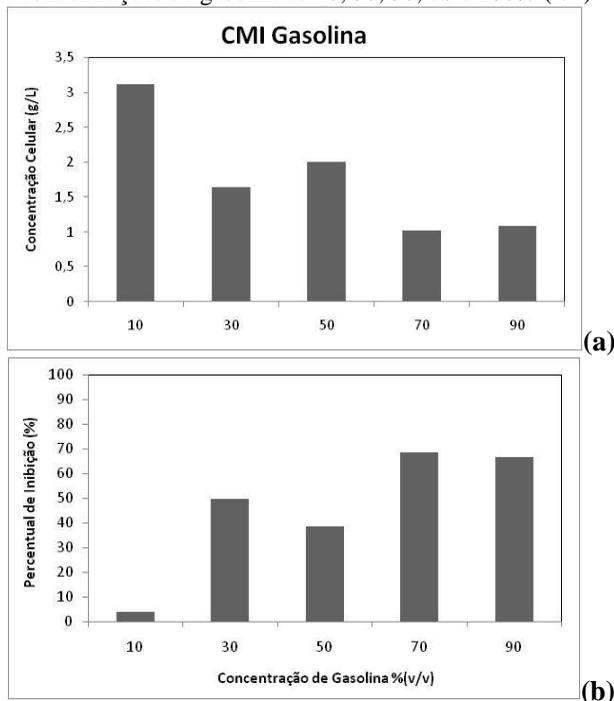
Figura 3.7: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 após 24 h de crescimento na presença das concentrações de óleo diesel de 10, 30, 50, 70 e 100 % (v/v).



A capacidade de adaptação do *R. erythropolis* a altas concentrações de óleo diesel A S1800 (pelo método da diluição em caldo) ou até mesmo na presença dele puro (pelo método da difusão em ágar), como se constata nas Figuras 3.5 e 3.7, se deve ao fato de que essas bactérias podem modular a viscosidade de lipídios da membrana para manter ou aumentar a fluidez da mesma através da diminuição do grau de saturação, através do aumento da razão *cis/trans* dos ácidos

graxos, e aumentando a quantidade relativa de ácidos graxos ramificados (WHYTE et al., 1999).

Figura 3.8: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 após 24hs de crescimento na presença das concentrações de gasolina de 10, 30, 50, 70 e 100% (v/v).

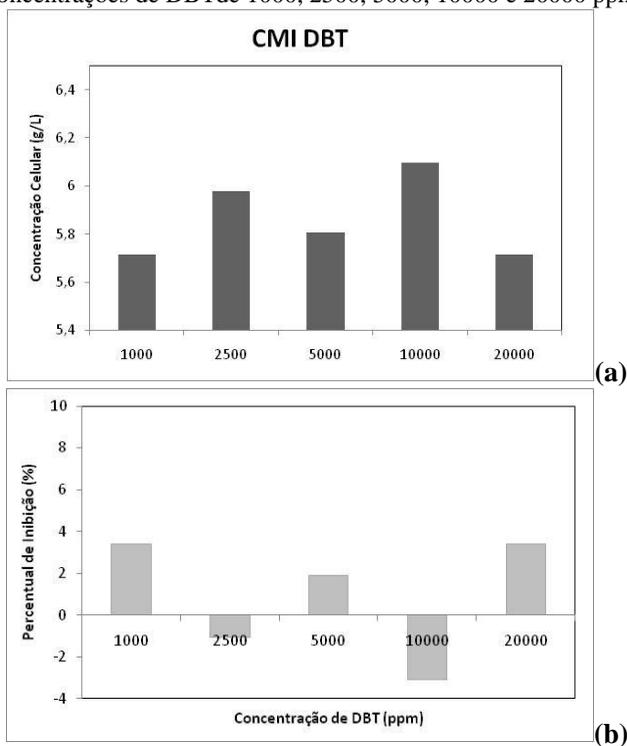


O mesmo já não pôde ser observado no teste de CMI para a gasolina tipo C (comum), o micro-organismo não foi capaz de modular a viscosidade da membrana celular e findou por ter seu crescimento inibido expressivamente, de acordo com o demonstrado na Figura 3.8. Onde os percentuais de inibição para as concentrações de gasolina de 10, 30, 50, 70 e 90% (v/v) foram de $4,08 \pm 0,34$, $49,55 \pm 0,34$, $38,43 \pm 0,35$, $68,64 \pm 0,23$ e $66,54 \pm 0,13\%$, respectivamente. Esse alto percentual de inibição pode ter sido causado em parte pelo álcool anidro presente na gasolina tipo C, pois o mesmo é altamente tóxico para esse tipo de micro-organismo. Portanto, a CMI da gasolina tipo C para o *R. erythropolis* ficou próxima ao valor de 30% (v/v).

Yu et al. (2006) também constatou que as células de *R. erythropolis* possuem apenas uma resistência parcial a altas concentrações de gasolina, tanto que o mesmo optou por utilizar uma concentração de apenas 10% (v/v) de gasolina no reator de dessulfurização.

De que se tenha conhecimento nenhum estudo específico foi realizado no sentido de se determinar a CMI do DBT com relação à espécie *R. erythropolis*. Para tal, buscou-se testar a resistência do *R. erythropolis* ATCC4277 na presença de diferentes concentrações de DBT como 1000, 2500, 5000, 10000 e 20000ppm visando uma maior proximidade com o teor real de enxofre do petróleo cru e seus derivados.

Figura 3.9: Concentração celular (g/L) (a) e percentual de inibição (b) do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 após 24 h de crescimento na presença das concentrações de DBT de 1000, 2500, 5000, 10000 e 20000 ppm.



De acordo com o apresentado na Figura 3.9, os valores da concentração celular ao final das 24hs de crescimento ficaram bem próximos para todas as concentrações de DBT testadas, o que indica que esse composto, mesmo presente em altas concentrações, não afeta o crescimento celular do micro-organismo. Portanto, não foi possível determinar uma CMI do DBT em relação ao *R. erythropolis* ATCC4277, uma vez que não se observou inibição em nenhuma das concentrações avaliadas.

Tal constatação fica ainda mais evidente quando se observam os percentuais de inibição (Figura 3.9b), onde para as concentrações de DBT de 1000, 5000 e 20000ppm os percentuais de inibição foram de $3,4 \pm 0,03\%$, $1,88 \pm 0,05\%$ e $3,39 \pm 0,11\%$, respectivamente. Já para as concentrações de DBT de 2500 e 10000ppm não houve inibição e sim uma concentração celular final superior à encontrada no frasco controle (sem DBT) em $1,05 \pm 0,04\%$ e $3,09 \pm 0,07\%$, respectivamente. Com isso, constata-se que os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar (Figura 3.6) foram coerentes aos alcançados pelo método de diluição em caldo (Figura 3.9b) para as diferentes concentrações de DBT.

Os resultados supracitados corroboram os estudos realizados por pesquisadores como, por exemplo, Denome et al. (1993,1994), Gray et al. (1996), Oldfield et al. (1998) e Debabov (2010), que demonstraram que o *R. erythropolis* utiliza o DBT tanto como fonte de carbono e energia principal quanto como fonte secundária (co-substrato) principalmente através da via metabólica “4S” (ALVES, 1999).

Além disso, os trabalhos desenvolvidos por Maghsoudi et al.(2001), Guchhait et al. (2005), Yu et al.(2006), Zhang et al.(2007), Li et al.(2008), que fazem uso do óleo diesel e gasolina em seus reatores de dessulfurização também comprovam a boa adaptação do *R. erythropolis* a altas concentrações de compostos sulfurosos uma vez que o óleo diesel e a gasolina utilizados possuíam uma concentração de enxofre que variava entre 1260 e 500ppm.

3.3 DESSULFURIZAÇÃO DO DBT EM REATOR DESCONTÍNUO PELO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 UTILIZANDO N-DODECANO COMO FASE ORGÂNICA

3.3.1 Sistema bifásico contendo 20% (v/v) de n-dodecano

Através dos resultados apresentados na Figura 3.10 percebe-se que o maior consumo de glicose, DBT e formação de 2-HBP se dá no momento em que o *R. erythropolis* ATCC4277 encontra-se na fase *log*. Esse mesmo comportamento foi encontrado pelos autores Davoodi-Dehaghani et al. (2010), Maghsoudi et al. (2001) e Izumi et al. (1994), no entanto, o início da fase *log* varia muito entre esses estudos. Conforme se pode constatar pela Tabela 3.1, o *R. erythropolis* ATCC4277 é o micro-organismo que apresenta as menores faixas de duração da fase *lag* e *log* quando comparado aos outros micro-organismos. Isso pode representar uma vantagem industrial, tendo em vista que o tempo dispensado com a adaptação dessa bactéria ao ambiente de dessulfurização chega a ser cinco vezes menor e que o tempo de duração da dessulfurização é três vezes menor.

Figura 3.10: Crescimento celular, consumo de glicose, degradação do DBT e produção de 2-HBP pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 20 % (v/v) de n-dodecano durante 20h de reação.

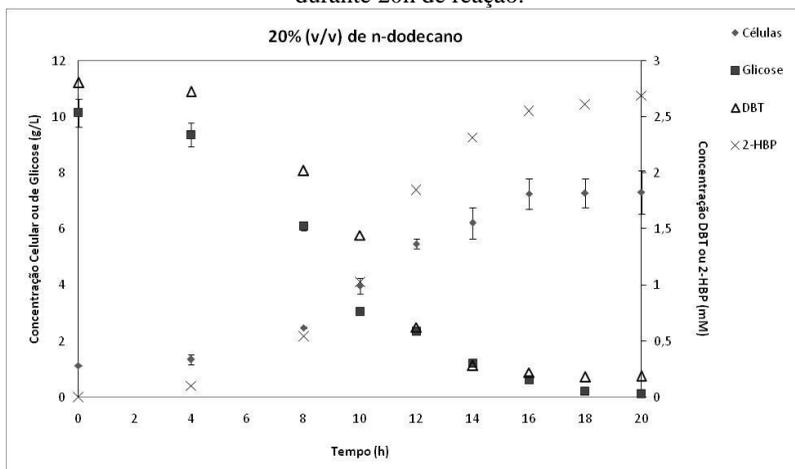


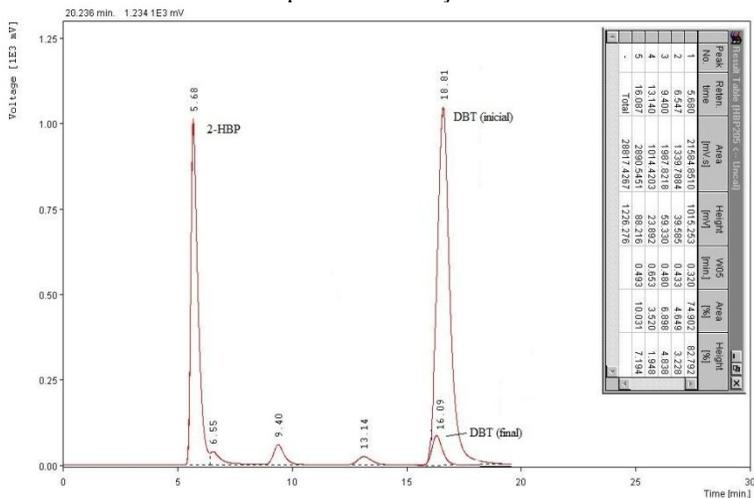
Tabela 3.1: Comparação entre a duração das fases *lag* e *log* durante o crescimento celular do *Rhodococcus erythropolis* obtidas por diferentes autores.

Autores	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Duração da fase <i>lag</i> (h)	Duração da fase <i>log</i> (h)
Davoodi-Dehaghani et al.	SHT87	30	25
Izumiet al.	D-1	10	35
Maass	ATCC4277	6	10
Maghsoudi et al.	P32C1	6	18

Outro importante aspecto referente à Figura 3.10 a ser discutido é o de que o percentual de DBT dessulfurizado foi de aproximadamente 93,3%, sendo que o DBT foi convertido em 2-HBP em uma proporção estequiométrica de 1:1 (Figura 3.11). Essa proporção estequiométrica de 1:1 também foi observada por Maghsoudi et al. (2001), Oldfield et al. (1998) e Izumi et al. (1994), o que significa que o *R. erythropolis* é capaz de metabolizar grande parte do DBT disponível pela via “4S” não implicando assim na perda do potencial energético do composto. No entanto, Maghsoudi et al. (2001) ressalta que quando a concentração inicial do DBT é muito alta (aproximadamente 24mM) essa proporção estequiométrica não se mantém e o percentual de conversão cai para 26%.

A redução de 93,3% na concentração de DBT e a conversão estequiométrica 1:1 ficam ainda mais evidentes na Figura 3.11 onde se têm sobrepostos o cromatograma obtido através da análise em HPLC no instante inicial do processo de dessulfurização e o obtido após 20h de reação.

Figura 3.11: Sobreposição dos cromatogramas do DBT no instante inicial e dos produtos formados pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0mM de DBT dissolvido em 20% (v/v) de n-dodecano após 20 h de reação.



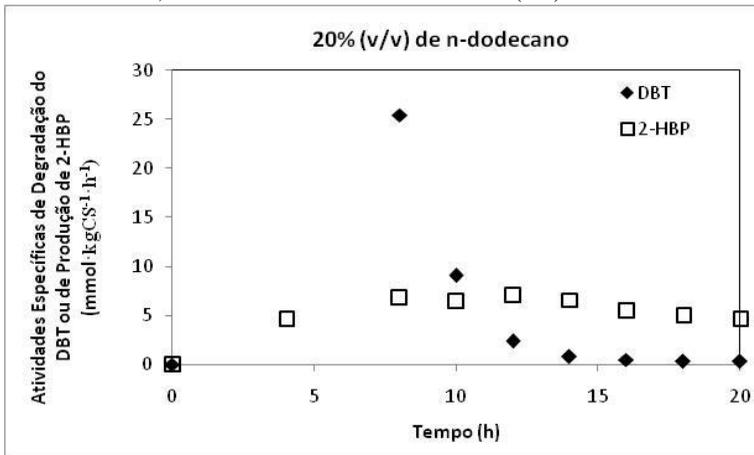
Deve-se destacar ainda que o tempo necessário para que a concentração de DBT atingisse seus níveis mais baixos foi de aproximadamente 16h, sendo assim um tempo inferior aos descritos por Li et al. (2008), Konoshi et al. (2005) e Izumi et al. (1994), o que vem a ser uma grande vantagem quando se pensa no âmbito industrial.

Visando uma análise mais aprofundada do comportamento do *R. erythropolis* ATCC4277 ao longo do processo de desulfurização no reator descontínuo, calcularam-se as atividades específicas de consumo do DBT e de produção da 2-HBP, conforme apresentadas na Figura 3.12.

Percebe-se pela Figura 3.12 que a atividade específica de degradação do DBT é consideravelmente superior à velocidade de produção da 2-HBP durante a fase *log*. Oldfield et al. (1998) afirma que essa discrepância nas velocidades específicas se deve a um fenômeno que ocorre durante o crescimento de alguns micro-organismos onde o substrato é completamente consumido nos estágios iniciais do crescimento, mas a quantidade de produto formado não corresponde ao máximo teórico até o fim da fase exponencial de crescimento. Ainda segundo Oldfield et al. (1998) isso se deve ao fato de que grande parte

do substrato é primeiramente adsorvido pela membrana celular para que somente depois de ter sido metabolizado seja então liberado pela célula.

Figura 3.12: Atividades específicas de degradação do DBT e de produção da 2-HBP pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0mM de DBT dissolvido em 20% (v/v) de n-dodecano.



Os valores das atividades específicas obtidos são relativamente semelhantes aos valores encontrados por Maghsoudi et al. (2001) e Yan et al. (2000). Percebe-se que os valores da atividade específica de produção da 2-HBP se mantêm praticamente constantes ao longo de todo o processo reacional, o que é um bom indicativo de que o *R. erythropolis* ATCC4277 utiliza o DBT como co-substrato até o final do processo. Contudo, Yan et al. (2000) conseguiu uma atividade específica de produção de 2-HBP seis vezes maior ao alimentar constantemente o reator com uma mistura etanol/DBT. Já Maghsoudi et al. (2001) alcançou uma maior atividade específica quando aumentou a concentração inicial de DBT. Essas poderiam ser boas alternativas para incrementar as atividades específicas do *R. erythropolis* ATCC4277 no sistema reacional testado.

3.3.2 Sistema bifásico contendo 80% (v/v) de n-dodecano

Ao se comparar a Figura 3.10 com a Figura 3.13 nota-se que o comportamento do crescimento celular, consumo de glicose e DBT, e o

da produção de 2-HBP foram bastante semelhantes. A degradação do DBT e a produção também acompanharam a fase *log* e esta fase apresentou o mesmo tempo de duração (10h).

Figura 3.13: Crescimento celular, consumo de glicose, degradação do DBT e produção de 2-HBP pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 80% (v/v) de n-dodecano durante 20 h de reação.

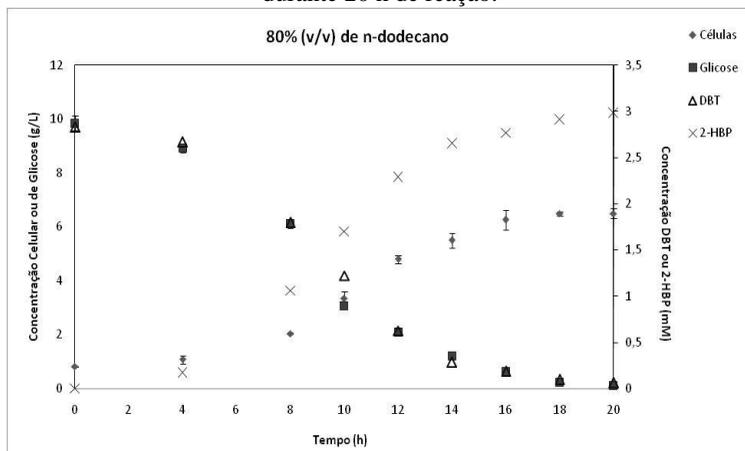
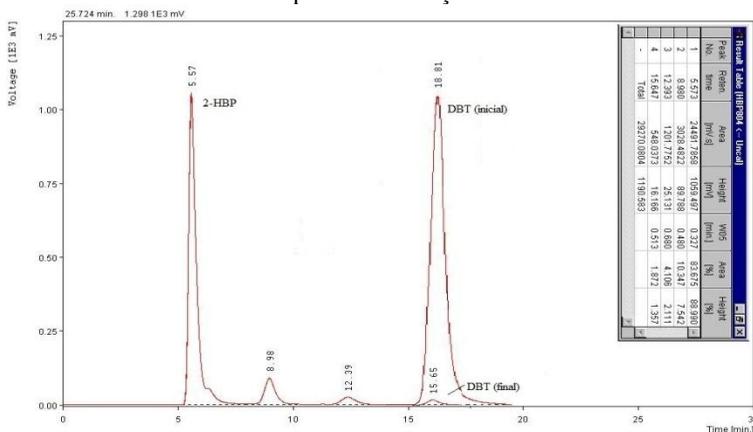


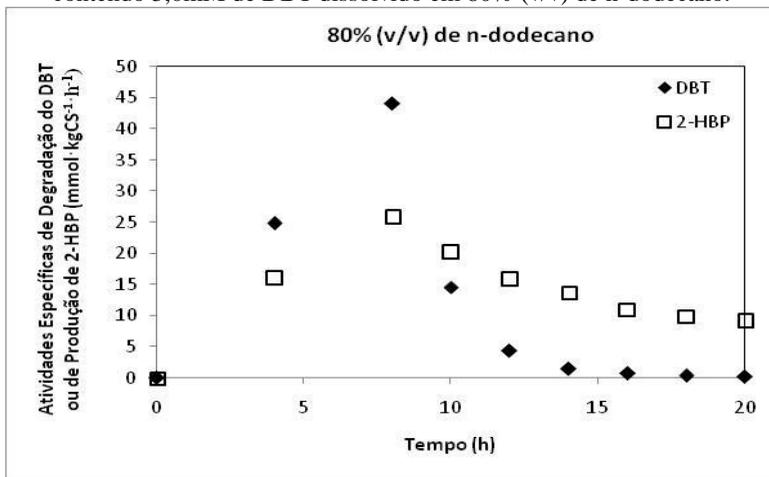
Figura 3.14: Sobreposição dos cromatogramas do DBT no instante inicial e dos produtos formados pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0mM de DBT dissolvido em 80% (v/v) de n-dodecano após 20h de reação.



Todavia, o percentual de DBT degradado progrediu de 93,3% para 98%, conforme evidenciado na Figura 3.14, onde se tem a sobreposição dos cromatogramas obtidos via análise das amostras removidas nos instantes inicial e final da reação. Estes resultados são análogos aos obtidos por Maghsoudi et al. (2001) que ao fazer uso de 75% de fase orgânica no reator descontínuo obteve um percentual de degradação de aproximadamente 80%.

Segundo o que foi observado por Maghsoudi et al. (2001) e ao se comparar os resultados alcançados neste trabalho utilizando 20 e 80% de fase orgânica (n-dodecano) pode-se divisar que o emprego de uma maior quantidade de fase orgânica torna a degradação do DBT superior e ainda, em um âmbito industrial, quanto maior for a concentração da fase orgânica menores serão os custos para, posteriormente, separar a fase aquosa do produto desejado.

Figura 3.15: Atividades específicas de degradação do DBT e de produção da 2-HBP pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0mM de DBT dissolvido em 80% (v/v) de n-dodecano.



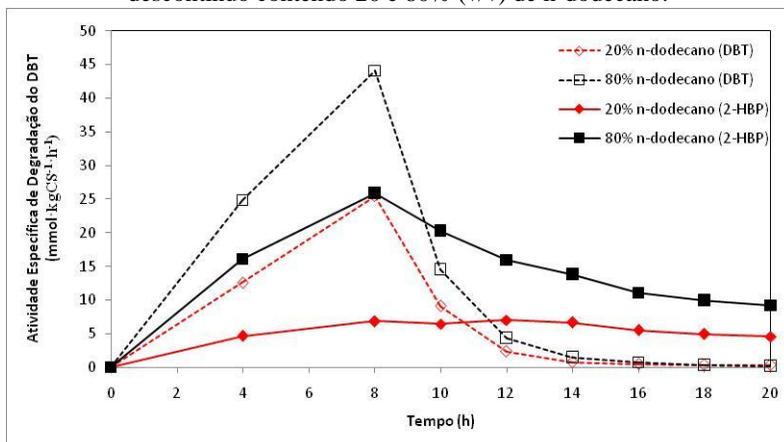
Através da Figura 3.15 é possível observar novamente o comportamento descrito por Oldfield et al. (1998), onde se tem uma atividade de degradação do DBT expressivamente superior à atividade de produção da 2-HBP no início da fase *log* (que é a fase onde a célula está apenas adsorvendo o substrato) e ao término da fase *log* se tem a

situação inversa (é o momento onde a célula libera o produto relativo à metabolização do substrato para o meio reacional).

A grande diferença entre o processo de dessulfurização utilizando 20% (v/v) de fase orgânica e o que faz uso de 80% (v/v) está nos valores das atividades específicas de degradação do DBT e de produção da 2-HBP, segundo o que se pode observar na Figura 3.16. No sistema reacional utilizando 80% (v/v) de fase orgânica a atividade específica de produção da 2-HBP chegou a atingir valores cinco vezes maiores quando comparados aos valores alcançados pelo sistema reacional contendo 20% (v/v) de n-dodecano. A atividade específica de degradação do DBT também foi consideravelmente maior no meio reacional contendo 80% de n-dodecano durante a fase *log*.

Tal comportamento foi destacado no trabalho de Maghsoudi et al. (2001), onde encontrou-se um aumento na atividade específica de produção de 2-HBP de 30% para o meio reacional contendo 75% (v/v) de fase orgânica com relação ao contendo 25% (v/v).

Figura 3.16: Comparação entre as atividades específicas de degradação do DBT e de produção da 2-HBP pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20 e 80% (v/v) de n-dodecano.

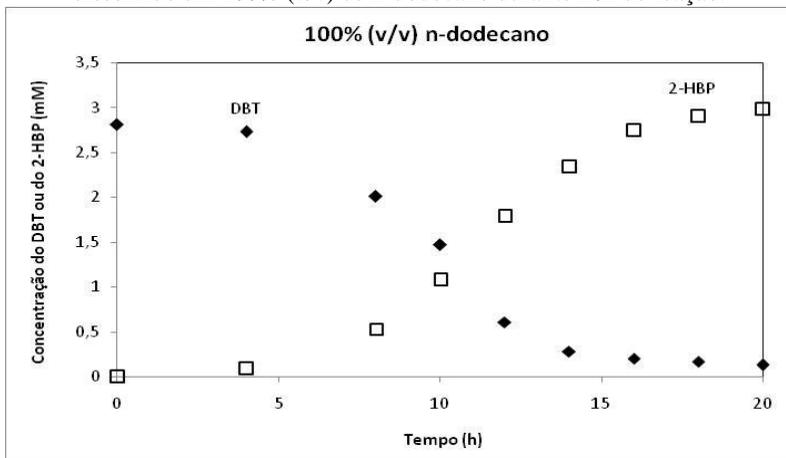


3.3.3 Sistema monofásico contendo n-dodecano

De que se tenha conhecimento nenhum estudo para determinar a capacidade de dessulfurização foi conduzido utilizando células livres de *R. erythropolis* ATCC4277 em um meio reacional contendo apenas um

solvente orgânico (n-dodecano). Ensaios fazendo uso desse meio reacional composto puramente por solvente orgânico foram realizados e os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.17.

Figura 3.17: Degradação do DBT e produção de 2-HBP pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 100% (v/v) de n-dodecano durante 20h de reação.



O comportamento exibido nas Figuras 3.10 e 3.13 são análogos ao encontrado na Figura 3.17. Novamente a conversão do DBT em 2-HBP se deu a razão de 1:1 e o percentual de degradação do DBT foi de 95,5%, conforme evidenciado na Figura 3.18, onde se tem a sobreposição dos cromatogramas obtidos via análise das amostras removidas nos instantes inicial e final da reação.

Os resultados supracitados são muito promissores quando se pensa em uma futura aplicação industrial desse método, uma vez que não seriam necessários grandes dispêndios de recursos com um meio de crescimento para o micro-organismo e com a separação da mistura células/produto. Com isso, esse método pode se tornar uma alternativa mais sustentável para os métodos já existentes, como a HDS (DEBABOV, 2010).

Figura 3.18: Sobreposição dos cromatogramas do DBT no instante inicial e dos produtos formados pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 3,0mM de DBT dissolvido em 100% (v/v) de n-dodecano após 20 h de reação.

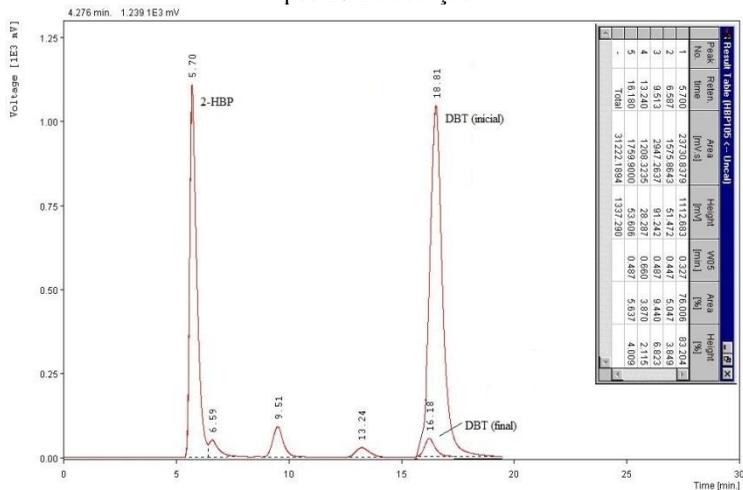
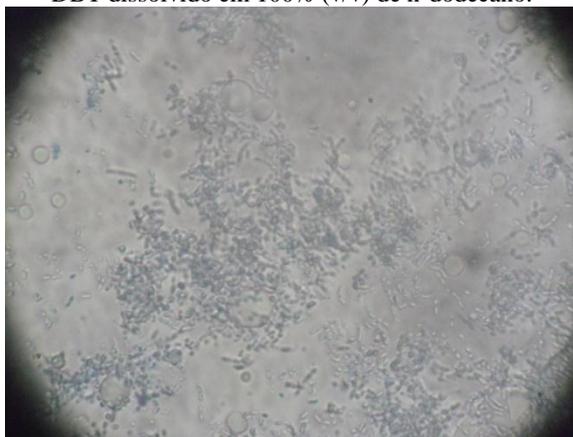


Figura 3.19: Microscopia de fluorescência das células do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 após 20 h em reator descontínuo contendo 3,0 mM de DBT dissolvido em 100% (v/v) de n-dodecano.



Uma vez que o crescimento celular não pode ser acompanhado nestes ensaios, buscou-se visualizar a viabilidade celular após 20 h de processo de dessulfurização. Através da microscopia de fluorescência

apresentada na Figura 3.19 nota-se a presença de uma quantidade considerável de células refringentes mesmo após 20h de reação, o que é um indício de que as células do *R. erythropolis* ATCC4277 foram capazes de se adaptar a um meio reacional composto apenas por uma fase orgânica. Além disso, as células se encontram dispersas no meio, o que também é um indicativo de que o meio oferece condições favoráveis para esse micro-organismo.

Este comportamento é corroborado pelos dados de Carvalho et al. (2004, 2005a, 2005b, 2009) discute em seus estudos sobre a capacidade das células de *R. erythropolis* se adaptarem bem ao solvente n-dodecano. Isso se deve (conforme discutido anteriormente) à capacidade do *R. erythropolis* de aumentar o grau de saturação dos ácidos graxos da membrana celular fazendo com que sua membrana citoplasmática seja capaz de se adaptar a toxicidade do solvente (HEIPIEPER et al., 2007).

3.3.4 Comparação entre os resultados referentes às três concentrações de n-dodecano utilizadas no reator descontínuo

Ao se comparar os percentuais de degradação do DBT para as três concentrações de n-dodecano testadas como fase orgânica em reator descontínuo (Tabela 3.2), percebe-se que o melhor resultado obtido foi o do reator contendo 80% (v/v) de fase orgânica. A diferença entre os resultados pode ser explicada levando-se em consideração que a reação ocorrida na presença de 100% (v/v) de n-dodecano pode ter causado uma situação de estresse no *R. erythropolis* ATCC4277, que desperdiçou tempo e energia em tentar adaptar sua membrana celular à toxicidade desse composto (CARVALHO et al., 2005).

Com relação à reação desenvolvida na presença de 20% (v/v) de fase orgânica, o déficit no percentual de degradação do DBT pode ter ocorrido em razão de um menor contato entre as células (dispersas na fase aquosa) e a fase orgânica, uma vez que o volume da fase aquosa era consideravelmente maior.

Tabela 3.2: Comparação entre os percentuais de degradação do DBT alcançados pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 na presença das concentrações de n-dodecano de 20, 80 e 100% (v/v).

Concentração de n-dodecano no reator % (v/v)	Percentual de degradação do DBT (%)
20	93,3
80	98,0
100	95,5

Realizou-se uma análise de variância (ANOVA) a fim de se avaliar se há diferenças significativas entre médias através da análise de suas variâncias.

Para os tratamentos estatísticos descritos pelas Tabelas 3.3 e 3.4, considerou-se sempre que o nível de significância (α) adotado foi de 5% e o intervalo de confiança de 95%. Como cada medida foi realizada três vezes, o número de graus de liberdade (GL) é igual a 2.

Tabela 3.3: Estatística descritiva da variável resposta concentração de DBT (mg/L) após 20h de degradação pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 na presença das concentrações de n-dodecano de 20, 80 e 100% (v/v).

Fase Orgânica % (v/v)	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	-95% Intervalo de Conf.	+95% Intervalo de Conf.
20	3	34,9115	0,294714	0,121471	34,61433	35,20878
80	3	10,71001	0,156829	0,117823	10,41278	11,00724
100	3	23,25475	0,146954	0,145824	22,95752	23,55197

Em geral, nota-se que o desvio padrão médio foi relativamente baixo, o que estreita o intervalo de 95% de confiança de cada média, fazendo com os valores das concentrações apresentados sejam confiáveis.

A Tabela 3.4 mostra a análise de variância (ANOVA) das concentrações finais de DBT obtidas pelo *R. erythropolis* ATCC4277 após 20h de reação de dessulfurização conduzidas em reator descontínuo contendo 20, 80 e 100% (v/v) de n-dodecano como fase orgânica.

Tabela 3.4: ANOVA da variável resposta concentração de DBT (mg/L) após 20h de degradação pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 na presença das concentrações de n-dodecano de 20, 80 e 100% (v/v).

Efeito	SS	GL	MS	F	p
Interceptação	4743,946	1	4743,946	107170,6	0,000000
Variável resposta	878,966	2	439,483	9928,4	0,000000
Erro	0,266	6	0,044	-----	-----

Como o valor do teste F para a variável resposta foi muito superior a 1,0 e o valor de $p \leq \alpha$ adotado, pode-se dizer que há diferença significativa entre os tratamentos aplicados (TAKESHITA, 2010).

Portanto, sabe-se que a mudança na concentração de fase orgânica do reator pode influenciar no percentual de degradação do DBT.

Visando estabelecer qual das concentrações de n-dodecano proporcionou a maior remoção de enxofre, realizou-se o teste de Tukey. Na Tabela 3.5 têm-se os resultados referentes a essa comparação de múltiplas médias.

Tabela 3.5: Resultados do teste de Tukey para a variável reposta concentração de DBT (mg/L) após 20h de degradação pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 na presença das concentrações de n-dodecano de 20, 80 e 100% (v/v).

Grupo Tukey	Concentração de n-dodecano % (v/v)	Médias
A	80	10,71001
B	100	23,25475
C	20	34,91155

Pelos grupos de Tukey apresentados na Tabela 3.5 percebe-se que a concentração de n-dodecano que proporcionou a melhor média de dessulfurização foi a de 80%(v/v). Uma vez que dentre as três concentrações estudadas foi a que na média apresentou uma concentração final de DBT inferior às demais.

3.4 DESSULFURIZAÇÃO DO ÓLEO DIESEL EM REATOR DESCONTÍNUO PELO *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277

3.4.1 Sistemas bifásicos contendo 20 e 80% (v/v) de óleo diesel A S1800 e sistema monofásico contendo 100% (v/v) de óleo diesel A S1800

O comportamento exibido nas Figuras 3.10, 3.13 e 3.17 é análogo ao encontrado na Figura 3.20. No entanto, percebe-se que o consumo de glicose no reator contendo 80% (v/v) de óleo diesel foi mais veloz se comparado ao com concentração de 20% (v/v). Tal comportamento se deve ao fato de que a célula precisa de mais energia em menos tempo para adaptar sua parede celular a um ambiente tão hostil quanto esse contendo 80% (v/v) de óleo diesel (HEIPIEPER et al., 2007).

Figura 3.20: Crescimento celular e consumo de glicose do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20 ou 80% (v/v) de óleo diesel durante 20h de reação.

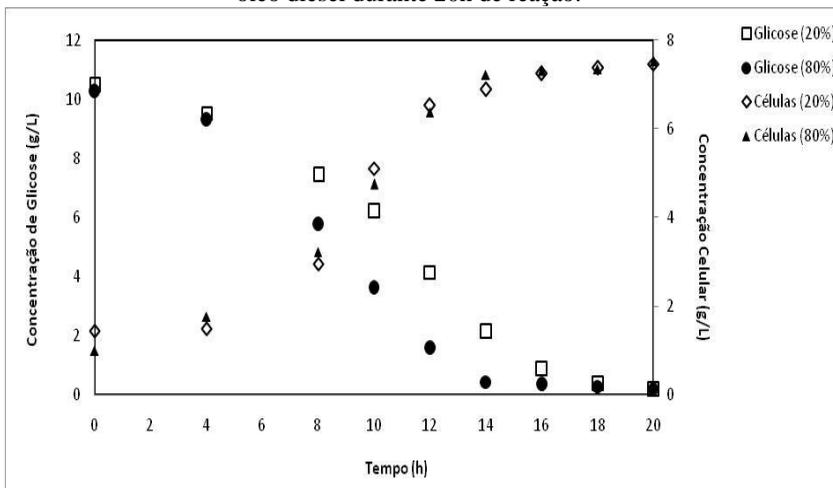
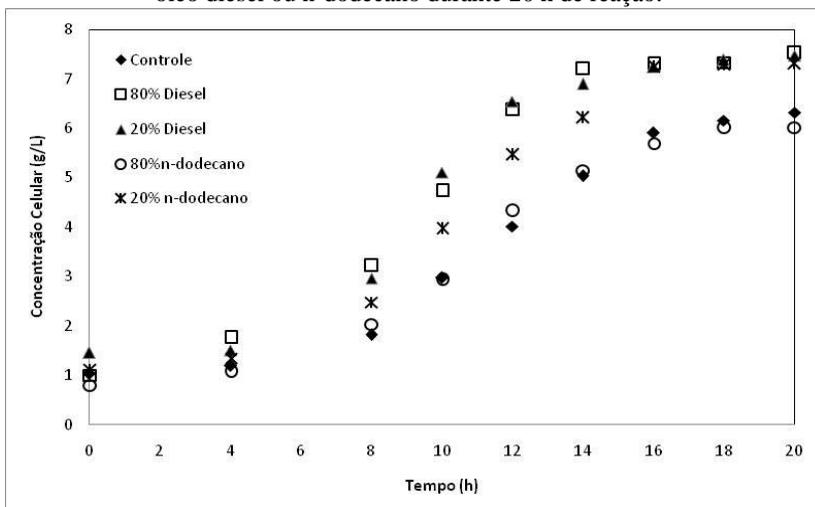


Figura 3.21: Comparação das curvas de crescimento celular do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20 ou 80% (v/v) de óleo diesel ou n-dodecano durante 20 h de reação.



O crescimento celular do *R. erythropolis* ATCC4277 na presença de 20 e 80% (v/v) de óleo diesel A S1800 foi um pouco superior aos obtidos na presença de 20 e 80% (v/v) de n-dodecano, conforme é possível observar na Figura 3.21. Isso pode ter ocorrido devido à presença de hidrocarbonetos em abundância, bem como de compostos nitrogenados e sulfurados que podem ter contribuído para uma melhor nutrição do micro-organismo tanto atuando como substrato quanto como co-substrato (ALVES et al., 1999; CARVALHO et al., 2005a; CARVALHO et al., 2005b).

Na Tabela 3.6 têm-se as concentrações de enxofre após 20h de reação bem como a comparação entre os resultados obtidos nos reatores contendo 20, 80 e 100% (v/v) de óleo diesel A S1800.

Tabela 3.6: Comparação entre as concentrações e os percentuais de degradação do enxofre alcançados pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20, 80 ou 100% (v/v) de óleo diesel.

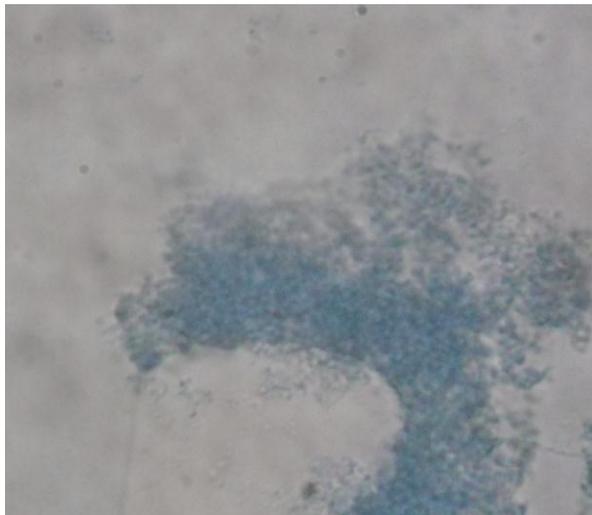
Concentração de óleo diesel (%(v/v))	Concentração inicial de enxofre (mg/kg)	Concentração final de enxofre (mg/kg)	Percentual de degradação do enxofre (%)
20	1226 ($\pm 4,1$)	1189 ($\pm 11,3$)	3,0
80	1226 ($\pm 4,1$)	1165,5 ($\pm 9,2$)	4,9
100	1226 ($\pm 4,1$)	1183 ($\pm 8,5$)	3,5

Levando-se em consideração o desvio padrão das amostras e o da curva de calibração do equipamento (± 56 mg/kg), não se pode afirmar que houve alguma degradação do enxofre. Esses resultados não condizem com os encontrados por Li et al. (2008), Zhang et al. (2007), Ma et al. (2006), Maghsoudi et al. (2001) e Folsom et al. (1999), que obtiveram um percentual de degradação de enxofre de 86% (em reator contendo 20% (v/v) de óleo diesel), 97% (em reator contendo 15% (v/v) de óleo diesel), 78% (em reator contendo 10% (v/v) de óleo diesel), 23,7% (em reator contendo 25% (v/v) de óleo diesel) e 67% (em reator contendo 15% (v/v) de óleo diesel), respectivamente. D'Addario et al. (1996) alcançou um percentual de dessulfurização do óleo diesel inferior aos demais autores, entre 14 e 18% (em reator contendo 50% (v/v) de óleo diesel), mas destacou que esse percentual foi obtido sem a adição de nenhum surfactante e/ou emulsificante que ampliasse o contato entre as células (fase aquosa) e a fase orgânica.

Um dos fatores que podem ter influenciado a capacidade de dessulfurização é o de que o micro-organismo não foi adaptado para consumir os demais compostos sulfurados presentes no óleo diesel,

tendo sido adaptado somente ao DBT, isso pode ter proporcionado um ambiente nutricional desfavorável. Segundo Ma et al. (2006), uma adaptação prévia do micro-organismo aos compostos a serem dessulfurizados é uma condição primordial para um bom desempenho do mesmo como biocatalisador.

Figura 3.22:Microscopia de fluorescência das células do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 após 20 h em reator descontínuo contendo 100% (v/v) de óleo diesel.



As dificuldades de nutrição do *R. erythropolis* ATCC4277 ficam mais claras ao analisarmos a microscopia de fluorescência da Figura 3.22. Carvalho et al. (2009) afirma que o crescimento em condições de privação nutricional pode aumentar a hidrofobicidade celular, que age como uma força de ignição para uma junção célula-célula ou biogranulação. A adesão ocorre quando a repulsão eletrostática é superada pelas forças de van der Waals ou interações hidrofóbicas (CARVALHO et al., 2009). Além disso, Carvalho et al. (2004, 2005a) afirma que: as células do *R. erythropolis*, na presença de solventes com baixos valores de $\log P$, acabam por se agregar para proteger a população celular contra esses compostos hidrofílicos; a resistência desse micro-organismo diminui com o aumento da toxicidade do sistema, impossibilitando assim as células de manterem sua viabilidade sob condições severas; e um período de contato entre as células e o solvente, anterior à adição do substrato, é prejudicial para o *R.*

erythropolis. Assim sendo, esses fatores podem ter influenciado a capacidade de dessulfurização do *R. erythropolis* ATCC4277, uma vez que as células encontram-se agregadas e não há indícios de células refringentes.

3.5 PARÂMETROS CINÉTICOS

3.5.1 N-dodecano como fase orgânica

Através da Tabela 3.7 visualizam-se os parâmetros cinéticos provenientes dos ensaios de dessulfurização do DBT pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 conduzidos em reator descontínuo contendo 20, 80 ou 100% (v/v) de n-dodecano como fase orgânica.

Tabela 3.7: Parâmetros cinéticos da reação de dessulfurização em reator descontínuo contendo 20, 80 ou 100% (v/v) de n-dodecano pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277.

Parâmetro	Concentração de n-dodecano % (v/v)		
	20	80	100
$\mu_x^{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,177	0,158	-----
$Y_{x/s}$ (glicose)	0,643	1,189	-----
$Y_{x/s}$ (DBT)	12,695	14,913	10,313
$Y_{p/s}$	0,949	1,052	0,996
$Y_{p/x}$	0,075	0,063	0,096
K_s (g/L)	0,014	-----	-----
Produtividade ($\text{mgP} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	91,618	101,642	101,252
Produção ($\text{mgP} \cdot \text{h}^{-1}$)	22,904	25,41	25,31

A concentração de fase orgânica que proporcionou os melhores parâmetros cinéticos foi a de 80% (v/v), com exceção do fator de conversão de células em produto ($Y_{p/x}$), onde cada grama de célula está produzindo 63mg de 2-HBP enquanto que nos reatores com 20 e 100% (v/v) de n-dodecano cada grama de célula produz 75,0 e 96,0mg de 2-HBP, respectivamente. Outro parâmetro não favorável foi o fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), onde cada grama de substrato

está produzindo 1,189g de célula, isso significa que o coeficiente de manutenção celular neste caso é maior. Apesar das células despendem mais energia para adaptar a parede celular a um ambiente mais hostil (conforme discutido no item 3.3.2), o fator de conversão do DBT em 2-HBP ($Y_{p/s}$), produtividade e produção foram superiores.

Por conseguinte, a concentração de 80% (v/v) de fase orgânica acabou sendo a que proporcionou um melhor contato entre as células de *R. erythropolis* ATCC4277 e o DBT, tornando-se assim a concentração de fase orgânica reacional mais eficiente entre as demais testadas.

Olmo et al. (2005) alcançou um valor de $Y_{x/s}$ (glicose) de 2,72, esse valor é 4,2 vezes superior ao obtido para a concentração de n-dodecano de 20% (v/v) e 2,3 vezes maior do que o alcançado para a concentração de 80% (v/v). Isso indica que o coeficiente de manutenção do *R. erythropolis* ATCC4277 é inferior ao do *R. erythropolis* IGTS8, o que pode vir a implicar em menores gastos com meio de fermentação futuramente.

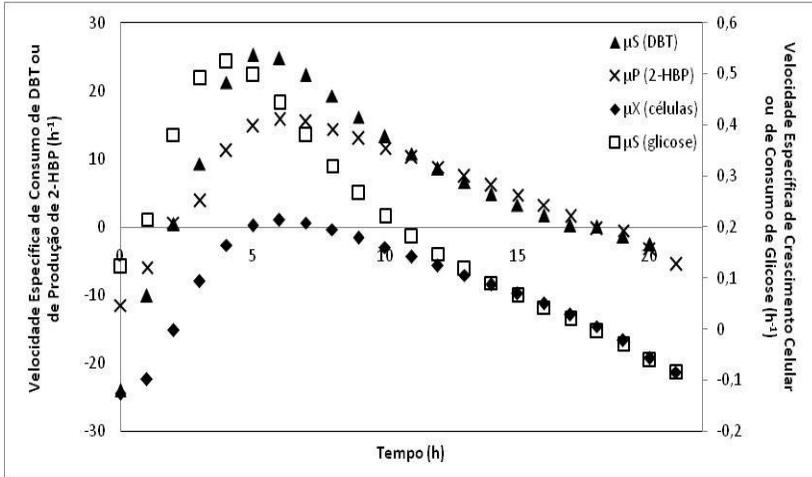
Já com relação ao fator $Y_{x/s}$ (DBT), Olmo et al. (2005) conseguiu um valor igual a 2,84, tal valor é 4,5 vezes inferior ao obtido no reator com 20% (v/v) de n-dodecano, 5,25 vezes menor com relação ao do reator contendo 80% (v/v) de fase orgânica e 3,6 vezes inferior ao obtido no reator com 100% (v/v) de n-dodecano. Guchhait et al. (2005), por sua vez, alcançou um valor para o $Y_{x/s}$ (DBT) igual a 9,2, sendo assim, 1,38 vezes inferior ao obtido no reator com 20% (v/v) de n-dodecano, 1,62 vezes menor com relação ao do reator contendo 80% (v/v) de fase orgânica e 1,12 vezes inferior ao obtido no reator com 100% (v/v) de n-dodecano. Tais resultados demonstram que o *R. erythropolis* ATCC4277 utiliza uma quantidade superior de DBT como co-substrato do que o *R. erythropolis* IGTS8 e o *R. erythropolis* JUBT1, isso é vantajoso, pois é metabolizando o DBT que se remove o enxofre presente nele.

O valor do $\mu_x^{\text{máx}}$ alcançado por Guchhait et al. (2005) foi de $0,0467 \text{ h}^{-1}$, ou seja, um valor 3,6 vezes inferior (em média) aos apresentados na Tabela 3.7. Isso significa que o *R. erythropolis* ATCC4277 possui uma fase *log* muito mais rápida que o *R. erythropolis* JUBT1, o que é um excelente resultado se pensarmos que a degradação do DBT está correlacionada ao crescimento celular.

Todavia, vale ressaltar ainda que as diferenças entre os valores obtidos por Olmo et al. (2005), Guchhait et al. (2005) e os deste trabalho podem ter ocorrido tanto devido à utilização de diferentes espécies de

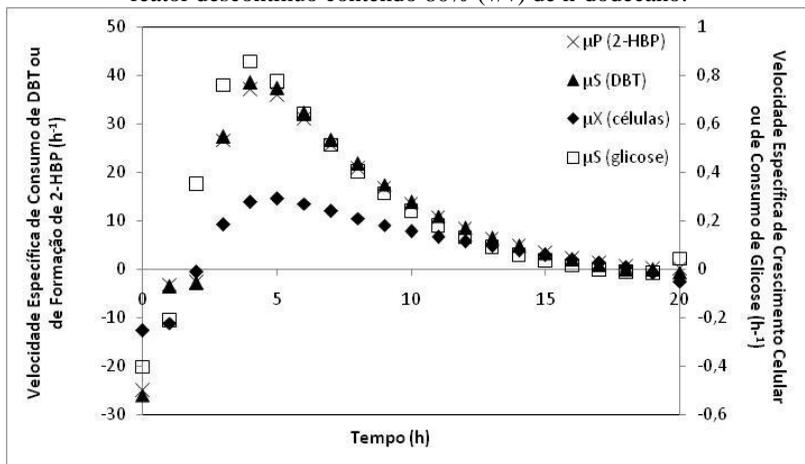
Rhodococcus sp., quanto ao emprego de condições distintas nos reatores fermentativos.

Figura 3.23: Velocidades específicas μ_S (DBT), μ_S (glicose), μ_P (2-HBP) e μ_X da reação de dessulfurização pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20% (v/v) de n-dodecano.



Realizando-se uma análise comparativa entre as velocidades específicas concernentes ao processo de dessulfurização em reator descontínuo contendo 20% (v/v) de n-dodecano (Figura 3.23), torna-se possível determinar o tipo de processo fermentativo (BORZANI et al., 2008). Percebe-se que as velocidades específicas de degradação do DBT (μ_S) e de produção da 2-HBP (μ_P) apresentam perfis semelhantes, correlacionando-se muito bem. Analogamente, o comportamento do perfil de velocidade específica de crescimento celular (μ_X) segue o mesmo andamento dos demais perfis. Com isso, pode-se dizer que a formação do produto está associada ao crescimento, ou seja, a formação da 2-HBP está diretamente ligada às reações do catabolismo e/ou de decomposição do DBT (BORZANI et al., 2008). Por conseguinte, um reator partindo de uma maior concentração inicial de células pode acabar formando uma maior quantidade de 2-HBP.

Figura 3.24: Velocidades específicas μ_S (DBT), μ_S (glicose), μ_P (2-HBP) e μ_X da reação de dessulfurização pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 80% (v/v) de n-dodecano.



Encontrou-se o mesmo comportamento na Figura 3.24, onde se têm as velocidades específicas referentes ao processo de dessulfurização em reator descontínuo contendo 80% (v/v) de n-dodecano. Novamente os perfis de velocidade específica da degradação do DBT (μ_S), da produção da 2-HBP (μ_P) e do crescimento celular (μ_X) apresentam comportamento análogo. Indicando que nesse processo a formação do produto também está associada ao crescimento celular (BORZANI et al., 2008).

Vale ressaltar que as velocidades específicas alcançadas pelo reator contendo 80% (v/v) de n-dodecano foram superiores às encontradas no reator com 20% (v/v) de fase orgânica. Isso porque as células tiveram de consumir os substratos de maneira mais rápida a fim de obter energia para adaptar-se ao ambiente hostil (conforme discutido nos itens 3.4.1 e 3.5.1). Além disso, o reator com 80% (v/v) de n-dodecano, por possuir uma concentração de fase aquosa inferior, acabava propiciando um maior contato entre as células e o DBT fazendo com que a produção de enzimas ocorresse mais rapidamente e, por consequência, aumentando a velocidade de formação da 2-HBP.

3.5.2 Óleo diesel A S1800 como fase orgânica

Através da Tabela 3.8 visualizam-se os parâmetros cinéticos concernentes aos ensaios de dessulfurização do óleo diesel A S1800 pelo *R. erythropolis* ATCC4277 conduzidos em reator descontínuo contendo 20 ou 80% (v/v) de óleo diesel como fase orgânica.

Tabela 3.8: Parâmetros cinéticos da reação de dessulfurização em reator descontínuo contendo 20 ou 80% (v/v) de óleo diesel pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277.

	Concentração de óleo diesel %(v/v)	
Parâmetro	20	80
$\mu_x^{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,198	0,170
$Y_{x/s}$ (glicose)	0,583	0,755
K_s (g/L)	1,634	4,614

Os valores de $\mu_x^{\text{máx}}$ apresentados na Tabela 3.8 ficaram próximos entre si e também não diferiram muito dos encontrados na Tabela 3.7. Isso significa que o perfil de crescimento do *R. erythropolis* ATCC4277 não sofreu grandes alterações mesmo quando na presença desses diferentes compostos, mantendo análogos os tempos de cada fase do crescimento bem como as concentrações celulares para cada fase, conforme apresentado na Figura 3.21 (item 3.4.1).

Todavia, esses valores de $\mu_x^{\text{máx}}$ foram muito superiores ao descrito por Guchhait et al. (2005) em seus ensaios com óleo diesel. Guchhait et al. (2005) obteve um valor de $\mu_x^{\text{máx}}$ igual a 0,0402 (h^{-1}), ou seja, o crescimento do *Rhodococcus sp.* JUBT1 é muito mais lento do que o do *R. erythropolis* ATCC4277. Isso implica em um aumento no tempo de residência do *Rhodococcus sp.* JUBT1 no reator descontínuo para a reação de dessulfurização, o que não é nada interessante para uma futura aplicação industrial.

Comparando-se os fatores de conversão $Y_{x/s}$ da Tabela 3.8 com o valor alcançado por Guchhait et al. (2005), que foi de 0,72, percebe-se que ele é bastante próximo ao obtido no reator com 80% (v/v) de óleo diesel. O que corrobora um comportamento da espécie *Rhodococcus sp.* diante de concentrações mais elevadas de óleo diesel.

Os valores do fator de conversão $Y_{x/s}$ (glicose) da Tabela 3.8 pouco divergem entre si, no entanto, encontra-se uma discrepância

maior ao compararmos o valor obtido no reator contendo 80% (v/v) de n-dodecano (Tabela 3.7) com o reator contendo 80% (v/v) de óleo diesel. Apesar do $Y_{x/s}$ para o reator contendo 80% (v/v) de n-dodecano ter sido 1,6 vezes maior do que o reator com 80% (v/v) de óleo diesel, a concentração celular do reator contendo diesel foi superior ao do reator com n-dodecano durante praticamente toda a fermentação. Isso nos leva a crer que as células do *R. erythropolis* ATCC4277 acabaram utilizando algum composto presente no diesel como fonte energética (CARVALHO et al., 2005a).

Analisando-se as constantes de saturação K_s apresentadas na Tabela 3.8, nota-se que seus valores são muito superiores ao obtido por Guchhait et al. (2005), que foi de 0,095 (g/L), e também ao valor de 0,014 (g/L) apresentado na Tabela 3.7, para reator contendo 20% (v/v) de n-dodecano.

Figura 3.25: Velocidades específicas μ_s (glicose) e μ_x da reação de dessulfurização pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 20% (v/v) de óleo diesel.

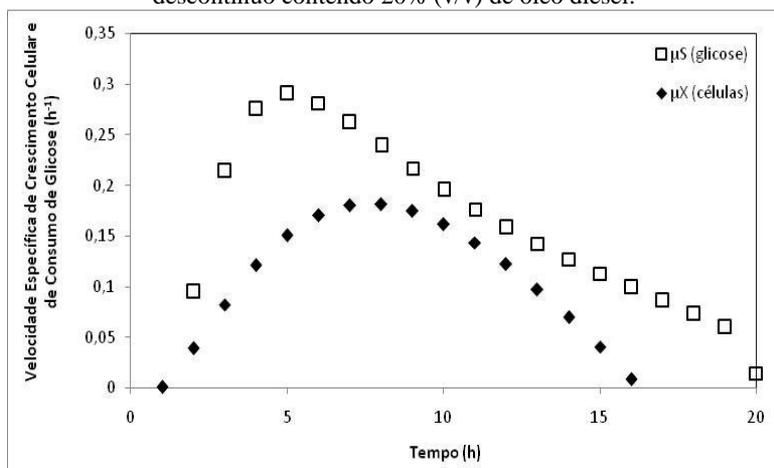
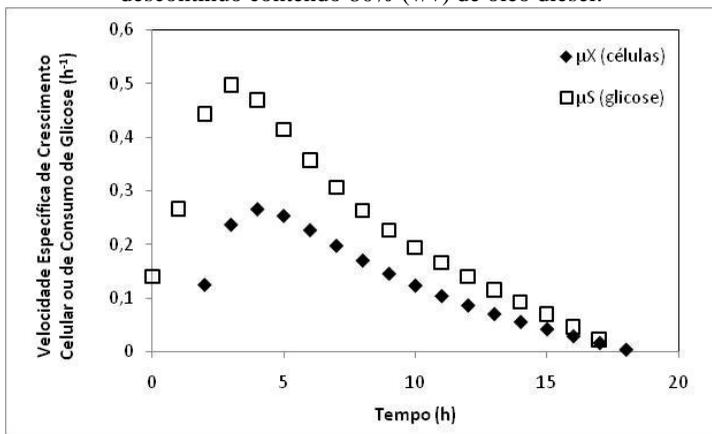


Figura 3.26: Velocidades específicas μ_s (glicose) e μ_x da reação de dessulfurização pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em reator descontínuo contendo 80% (v/v) de óleo diesel.



Segundo (BORZANI et al., 2008), quanto maior for o valor de K_s , menor será a duração da fase *log* e mais difícil será para o micro-organismo alcançar a velocidade específica de crescimento máxima. No entanto, se o valor de K_s for muito inferior aos valores da concentração de substrato (o que é caso dos valores de K_s das Tabelas 3.7 e 3.8), tem-se um modelo de Monod de ordem zero, onde a velocidade de crescimento não varia muito, chegando a alcançar os valores da velocidade específica de crescimento máxima. Ao se analisarem os perfis de velocidade específica de crescimento celular das Figuras 3.25 e 3.26, e a curvas de crescimento da Figura 3.21, observa-se que as velocidades específicas de crescimento celular alcançam o valor máximo, indicando assim de que a cinética se adequa ao modelo de Monod de ordem zero.

Além disso, percebe-se na Figura 3.25, que o perfil da velocidade específica de crescimento não se correlaciona bem com o perfil da velocidade específica de consumo de glicose. Inicialmente, os dois perfis possuem comportamentos semelhantes, mas depois do início da fase *log* as curvas já não se relacionam mais tão bem.

Todos esses indícios apontam mais uma vez para a afirmativa de Carvalho et al. (2005a) de que o micro-organismo ao se deparar com um meio nutritivo desconhecido, e até mesmo tóxico, consome inicialmente a fonte de carbono conhecida e, depois que se adapta ao meio, passa a se nutrir de outras fontes de carbono.

CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho realizou-se o estudo da influência de fatores como pH, temperatura, e concentrações dos compostos n-dodecano, óleo diesel A S1800, gasolina tipo C (comum) e DBT no crescimento do micro-organismo; o percentual de dessulfurização do DBT e do óleo diesel A S1800 pelo *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277; e os parâmetros cinéticos concernentes ao processo de dessulfurização.

O crescimento do *R. erythropolis* ATCC4277 sob a ação das temperaturas de 20 e 50°C é extremamente prejudicado. Este é um indicativo de que a temperatura em que são dirigidos os experimentos com *R. erythropolis* ATCC4277 apresenta forte influência sobre o crescimento do mesmo, e que as melhores temperaturas de trabalho são as entre 25 e 30°C.

Os valores de pH entre 6,0 e 8,0 são os que promovem as maiores concentrações celulares e um crescimento mais eficiente do *R. erythropolis* ATCC4277.

Nos ensaios da determinação da CMI pelo método de difusão em ágar não houve a formação de halos de inibição para os poços contendo apenas n-dodecano e óleo diesel A S1800 bem como para os contendo 500, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000ppm de DBT.

Não se encontrou nenhuma CMI do óleo diesel A S1800 com relação ao *R. erythropolis* ATCC4277, entre as concentrações testadas (10, 30, 50, 70 e 90% (v/v)).

O *R. erythropolis* ATCC4277 não apresentou sensibilidade à nenhuma das concentrações de DBT avaliadas (500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 10000 e 20000ppm).

O crescimento celular do *R. erythropolis* ATCC4277 foi extremamente abalado pelas concentrações de gasolina tipo C testadas (10, 30, 50, 70 e 90% (v/v)). Obtendo-se percentuais de inibição entre 4,08(±0,34) e 68,64(±0,23)%. Portanto, a CMI da gasolina tipo C encontrada para o *R. erythropolis* ficou próxima ao valor de 30% (v/v).

O *R. erythropolis* ATCC4277 se mostrou capaz de dessulfurizar o DBT pela via metabólica “4S”, transformando-o em 2-HBP na razão estequiométrica de 1:1, em um sistema descontínuo bifásico utilizando n-dodecano como fase orgânica.

Os percentuais de degradação do DBT alcançados pelo *R. erythropolis* ATCC4277 nos sistemas contendo 20, 80 e 100% (v/v) de n-dodecano foram 93,3, 98,0 e 95,5%, respectivamente.

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que há diferença significativa entre os três tratamentos para um nível de significância de 5%, ou seja, alteração do volume de fase orgânica no sistema reacional possui influência na concentração final de DBT. Pelo teste de Tukey, o sistema que apresentou a maior média de degradação do DBT, isto é, o que teve mais influência sobre o resultado final foi o contendo 80% (v/v) de n-dodecano.

Quanto à atividade específica de degradação do DBT, o maior valor alcançado foi de $44 \text{ mmolDBT} \cdot \text{kgCS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pelo sistema contendo 80% (v/v) de n-dodecano.

Nos sistemas bifásicos as maiores atividades de degradação do DBT se deram durante a fase *log* de crescimento do micro-organismo, isso implicou em uma diminuição de 33,33% no tempo total de dessulfurização em relação ao encontrado em outros estudos.

A concentração de n-dodecano no meio reacional que apresentou os melhores parâmetros cinéticos foi a de 80% (v/v). O fator de conversão do DBT em 2-HBP ($Y_{p/s}=1,052$), produtividade ($101,642 \text{ mg2-HBP} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e produção ($25,41 \text{ mg2-HBP} \cdot \text{h}^{-1}$) foram superiores às demais concentrações de n-dodecano.

Através da análise comparativa entre os perfis das velocidades específicas de degradação do DBT (μ_s), produção da 2-HBP (μ_p) e crescimento celular (μ_x) concernentes ao processo de dessulfurização em reator descontínuo contendo 20 e 80% (v/v) de n-dodecano, percebeu-se que os perfis possuem comportamentos análogos. Com isso, pode-se dizer que a formação da 2-HBP está diretamente ligada às reações do catabolismo e/ou de decomposição do DBT.

Os testes de dessulfurização dos compostos sulfurosos presentes no óleo diesel A *S1800* realizados em reator descontínuo demonstraram que a bactéria *R. erythropolis* ATCC4277 não é capaz de remover o enxofre dos compostos sulfurados após 20hs de fermentação.

Os parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios em reator descontínuo contendo 20, 80 e 100% (v/v) de óleo diesel A *S1800*, mantiveram-se análogos aos encontrados nos experimentos conduzidos com n-dodecano como fase orgânica.

Os valores das constantes de saturação K_s obtidas nos ensaios com óleo diesel A *S1800* nos permitiram concluir que a cinética dessa reação segue o modelo de Monod de ordem zero.

Avaliando-se os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que as melhores condições para se realizar o processo de dessulfurização do DBT em reator descontínuo pelo *R. erythropolis* ATCC4277 é utilizando 80% (v/v) de n-dodecano como fase orgânica, o

pH do meio fermentativo variando entre 6,5 e 7,5 e conduzi-lo sob uma faixa de temperatura entre 25 e 30°C.

SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DA PESQUISA

Algumas sugestões são propostas para continuidade aos estudos iniciados nestetrabalho:

- Adaptar o *R. erythropolis* ATCC4277 aos compostos sulfurosos presentes no óleo diesel e na gasolina tipo C (comum).
- Realizar experimentos com o micro-organismo imobilizado ou em reator contínuo.
- Modelar e simular os experimentos realizados a fim de se determinar qual modelo cinético descreve melhor os dados experimentais.
- Aumentar as concentrações iniciais de DBT e de células a fim de observar que impacto esses aumentos teriam no percentual de dessulfurização.
- Avaliar se o micro-organismo consome algum outro composto do óleo diesel e que implicações esse consumo traria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFERDEN, V., SCHACHT, S., KLEIN, J., TRÜPER, H. **G.Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp.** *Archive Microbiologic*, p. 324 - 328, 1990.
- ALVES, L., MESQUITA, E., GÍRIO, F. M. **Dessulfurização bacteriana de combustíveis fósseis.** *Biotecnologia Ambiental*, n. 62, p. 3-8, 1999.
- ALVES, M. V. **Estabilidade e filtrabilidade de óleo diesel.** Dissertação de Mestrado. Engenharia química, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2008.
- ANNWEILLER, E.; MICHAELIS, W., MECKENSTOCK, R. U. **Anaerobic cometabolic conversion of benzothiophene by a sulfate-reducing enrichment culture and in a tar-oil-contaminated aquifer.** *American Society for Microbiology*, v. 67, n.11, p. 5077 – 5083, 2001.
- ANP, 2011. *On line*. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso: maio de 2011.
- BHATIA, S.; SHARMA, D.K. **Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain *Pantoea agglomerans* D23W3.** *Biochemical Engineering Journal*, v.50, p.104–109, 2010.
- BOLTES, K.; CARO, A.; LETON, P., RODRIGUEZ, A., GARCIA-CALVO, E. **Gas–liquid mass transfer in oil–water emulsions with an airlift bioreactor.** *Chemical Engineering and Processing*, v.47, p. 2408–2412, 2008.
- SCHMIDELL, W., LIMA, U. de A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica.** Edgard Blücher, São Paulo, v. 2, 2008.
- BOUCHEZ-NAÏTALI, M.; ABBAD-ANDALOUSSI, S.; WARZYODA, M., MONOT, F. **Relation between bacterial strain resistance to solvents and biodesulfurization activity in organic medium.** *Appl Microbiol Biotechnol*, v.65, p. 440–445, 2004.
- CALZADA, J.; HERAS, S.; ALCON, A., SANTOS, V. E., GARCIA-OCHOA, F. **Biodesulfurization of dibenzothiophene (DBT) using *Pseudomonas putida* CECT 5279: a biocatalyst formulation comparison.** *Energy Fuels*, v.23, p. 5491–5495, 2009.

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

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

CARVALHO, C. C. C. R.; da FONSECA, M. M. R. *The remarkable Rhodococcus erythropolis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 67, p. 715-726, 2005(c).

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

CARVALHO, C. C. C. R.; PORETTI, A.; da FONSECA, M. M. R. *Cell adaptation to solvent, substrate and product: a successful strategy to overcome product inhibition in a bioconversion system*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 69, p. 268-275, 2005(b).

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

da LUZ, A. D. **Aplicação de processos adsorptivos na remoção de compostos BTX presentes em efluentes petroquímicos**. Dissertação de Mestrado. Engenharia química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

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

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

DEBABOV, V. G. *Microbial desulfurization of motor fuel*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 46, n. 8, p. 733-738, 2010.

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

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

FATORELLI, L. **Proposta de avaliação de risco ecológico para contaminações de petróleo e derivados – estudo de caso.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

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

GALLANGHER, J.R., OLSON, E.S., STANLEY, D. C. **Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 107, p. 31 - 36, 1993.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulose activities.** *Pure & Appl. Chem.*, v. 59, p. 257 - 268, 1987.

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

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

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

- GUPTA, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; DEB, J. K. **Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges.** *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 66, p. 356–366, 2005.
- HEIPIEPER, H. J.; NEUMANN, G.; CORNELISSEN, S., MEINHARDT, F. **Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems.** *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 71, p. 961–973, 2007.
- HOU, Y.; KONG, Y.; YANG, J., ZHANG, J., SHI, D., XIN, W. **Bio-desulfurization of dibenzothiophene by immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* UP-1.** *Fuel*, v. 84, p. 1975–1979, 2005.
- IZUMI, Y.; OHSHIRU, T.; OGINO, H., HINE, Y., SHIMAO, M. **Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 223–226, 1994.
- IZUMI, Y.; OHSHIRU, T. **Purification and characterization of enzymes involved in desulfurization of dibenzothiophene in fossil fuels.** *Journal of Molecular Catalysis*, p. 1061 – 1064, 2001.
- KAMALI, N.; TAVALLAIE, M.; BAMBALI, B., KHARKANE, A.A., MIRI, M. **Site-directed mutagenesis enhances the activity of NADH-FMN oxidoreductase (*DszD*) of *Rhodococcus erythropolis*.** *Biotechnol Lett*, v. 32, p. 921–927, 2010.
- KAUFMAN, E. N.; HARKINS, J. B.; RODRIGUEZ, M., TSOURIS, C., SELVARAJ, P. T., MURPHY, S. E. **Development of an electro-spray bioreactor for crude oil processing.** *Fuel Processing Technology*, v. 52, p. 127–144, 1997.
- KEULEN, F. V., CORREIA, C. N., Da FONSECA, M. M. R. **Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*.** *Journal of Molecular Catalysis*, p. 295 – 299, 1997.
- KIRIMURA, K., FURUYA, T., SATO, R., ISHII, Y., KINO, K., USAMI, S. **Bio-desulfurization of naphthothiophene and benzothiophene through selective cleavage of carbon-sulfur bonds by *Rhodococcus* sp. strain WU-K2R.** *American Society for Microbiology*, v. 68, n. 8, p. 3867 – 3872, 2002.

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

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

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

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

LI, F.; XU, P.; MA, C. Q., LUO, L. L., WANG, X. S. ***Microbial desulfurization of gasoline in a Mycobacterium goodii x7b immobilized-cell system***. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 276–281, 2005.

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

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

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

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

- MAGHSOUDI, S. KHEIROLOMOOM, A., VOSSOUGH, S., TANAKA, E., KATOH, S. *Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated Corynebacterium sp. strain P32C1*. *Biochemical Engineering Journal*, p. 11-16, 1999.
- MAGHSOUDI, S.; VOSSOUGH, S.; KHEIROLOMOOM, A., TANAKA, E., KATOH, S. *Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by Rhodococcus sp. strain P32C1*. *Biochemical Engineering Journal*, v.8, p. 151-156, 2001.
- MONTICELLO, D. J. *Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates*. Elsevier Science, p. 540-546, 1999.
- MORITZ, D. E. **Estudo do crescimento de três leveduras produtoras de aromas**. Dissertação de Mestrado. Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 1998.
- NAITO, M.; KAWAMOTO, T.; FUJINO, K., KOBAYASHI, M., MARUHASHI, K., TANAKA, A. *Long-term repeated biodesulfurization by immobilized Rhodococcus erythropolis KA2-5-1 cells*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 55, p. 374-378, 2001.
- NAKAYAMA, N.; MATSUBARA, T., OHSHIRO, T., MOROTO, Y., KAWATA, Y., KOIZUMI, K., HIRAKAWA, Y., SUZUKI, M., MARUHASHI, K., IZUMI, Y., KURANE, R. *A novel enzyme, 2V-hydroxybiphenyl-2-sulfinase (DszB), from a dibenzothiophene-desulfurizing bacterium Rhodococcus erythropolis KA2-5-1: gene overexpression and enzyme characterization*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1598, p.122-130, 2002.
- NEIVA, J. **Conheça o Petróleo / Prefácio de Ozires Silva**. 5a ed., Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1986.
- NODA, K., KOGURE, T.; IRISA, S., MURAKAMI, Y., SAKATA, M., KURODA, A. *Enhanced dibenzothiophene biodesulfurization in a microchannel reactor*. *Biotechnol Lett*, v.30, p.451-454, 2008.
- ODA, S.; OHTA, H. *Biodesulfurization of dibenzothiophene with Rhodococcus erythropolis ATCC 53968 and its mutant in an interface bioreactor*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 5, p. 474 - 477, 2002.

- OHSHIRO, T.; HIRATA, T.; HASHIMOTO, I., IZUMI, Y. *Characterization of benzothiophene desulfurization reaction by whole cells of Rhodococcus erythropolis H-2 in the presence of hydrocarbon*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 82, n. 6, p. 610-612, 1996.
- OLDFIELD, C.; WOOD, N. T.; GILBERT, S. C., MURRAY, F. D., FAURE, F. R. *Desulphurization of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus Rhodococcus, and related taxa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 74, p. 119-132, 1998.
- OLMO, C.H.; SANTOS, V. E., ALCON, A., GARCIA-OCHOA, F. *Production of a Rhodococcus erythropolis IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of operational conditions*. *Biochemical Engineering Journal*, v.22,p. 229–237, 2005.
- ONAKA, T., KONISHI, J., ISHII, Y., MARUHASHI, K. *Desulfurization characteristics of thermophilic Paenibacillus sp. strain A11-2 against asymmetrically alkylated dibenzothiophenes*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n° 2, p. 193 – 196, 2001.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O., FREITAS, B. R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18,p. 301-307, 2008.
- OYAMA, S.T.; ZHAO, H., GOTT, T., ZHAO, H., LEE, Y. *Transition metal phosphide hydroprocessing catalysts: a review*. *Catal. Today*, v. 143, p. 94-107, 2008.
- PETROBRAS, 2011. *On line*. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br>>. Acesso: maio de 2011.
- SCHILLING, B. M., ALVAREZ, L. M., WANG, D. I., COONEY, C. L. *Continuous desulfurization of dibenzothiophene with Rhodococcus rhodochrous IGTS8 (ATCC 53968)*. *American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers*, p.1207 - 1213, 2002.
- SCHREIBEROVA, O.; HRDINOVA, J.; KRULIKOVSKA, T., MASAK, J., CEJKOVA, A., JIRKU, V. *Removal of phenol and aniline by bacterial biofilm*. *4th European Bioremediation Conference*, 2008.

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

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

TAKESHITA, E.V. **Inchamento de borrachas vulcanizadas sob ação de solventes orgânicos**. Tese de Doutorado. Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

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

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

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

US DEPARTMENT OF ENERGY. Disponível em:
<<http://www1.eere.energy.gov>>. Acesso em: agosto, 2011.

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

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

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

YAN, H.; KISHIMOTO, M.; OMASA, T., KATAKURA, Y., SUGA, K., OKUMURA, K., YOSHIKAWA, O. ***Increase in Desulfurization Activity of Rhodococcuserythropolis KA2-5-1 Using Ethanol Feeding***. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 89, n. 4, p.361-366, 2000.

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

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

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

APÊNDICE A

CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR, CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR, DETERMINAÇÃO DA FASE LOG E $\mu_x^{\text{máx}}$, E DETERMINAÇÃO DE K_S .

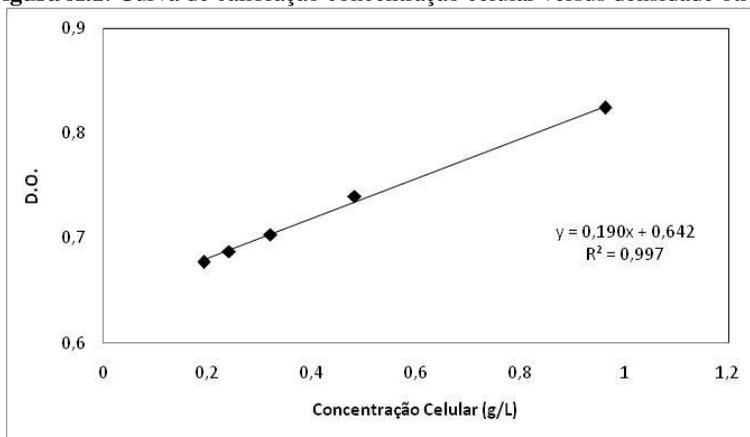
Na Tabela A.1 têm-se as médias dos dados utilizados para construir a curva de calibração concentração celular *versus* densidade ótica (D.O), pelo método de turbidimetria.

Tabela A.1: Dados de concentração celular versus densidade ótica para a construção da curva de calibração do método de turbidimetria.

Massa seca (g)	Fator de diluição	D.O.	Concentração celular por diluição (g/L)
0,0379($\pm 0,0020$)	1:2	0,8240	1,9275($\pm 0,11$)
0,0387($\pm 0,0018$)	1:4	0,7400	0,9637($\pm 0,099$)
0,0392($\pm 0,0031$)	1:6	0,7035	0,6425($\pm 0,14$)
0,0385($\pm 0,0027$)	1:8	0,6875	0,4818($\pm 0,082$)
0,0392($\pm 0,0016$)	1:10	0,6770	0,3855($\pm 0,12$)

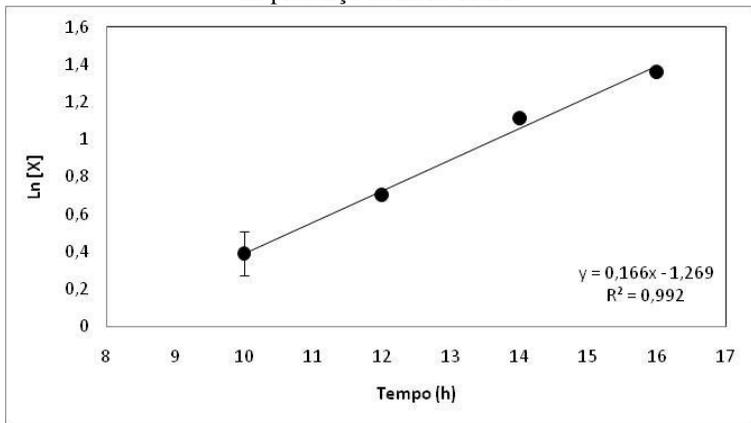
Através dos dados da Tabela A.1 construiu-se a curva de calibração apresentada na Figura A.1.

Figura A.1: Curva de calibração concentração celular versus densidade ótica.



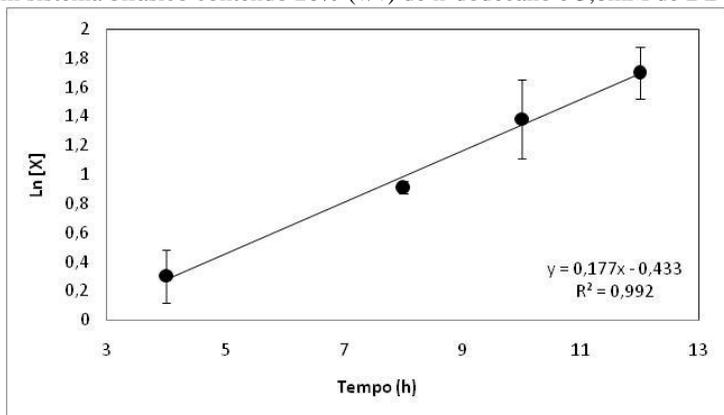
Na Figura A.2 tem-se a fase *log* do crescimento do *R. erythropolis* ATCC4277 para ensaio utilizando apenas meio de crescimento YMA, através da qual se determinou a $\mu_x^{\text{máx}}$.

Figura A.2: Fase *log* do crescimento do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 na presença de meio YMA.



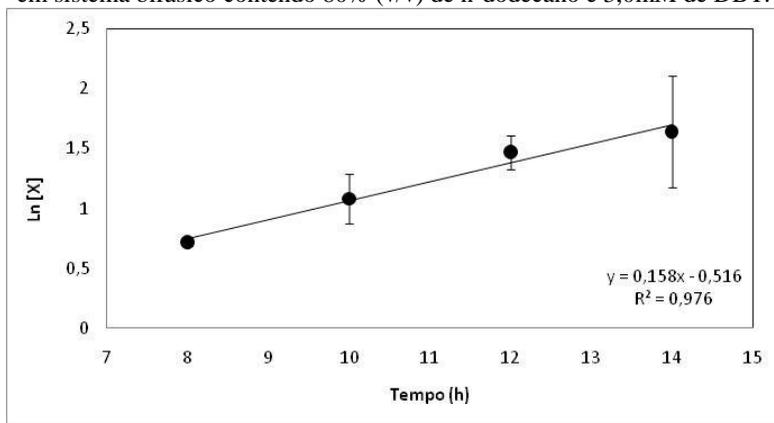
Na Figura A.3 tem-se a fase *log* do crescimento do *R. erythropolis* ATCC4277 para ensaio em sistema bifásico utilizando 20% (v/v) de n-dodecano e 3,0mM de DBT, através da qual se determinou a $\mu_x^{\text{máx}}$.

Figura A.3: Fase *log* do crescimento do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em sistema bifásico contendo 20% (v/v) de n-dodecano e 3,0mM de DBT.



Na Figura A.4 tem-se a fase *log* do crescimento do *R. erythropolis* ATCC4277 para ensaio em sistema bifásico utilizando 80% (v/v) de n-dodecano e 3,0mM de DBT, através da qual se determinou a $\mu_x^{\text{máx}}$.

Figura A.4: Fase *log* do crescimento do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em sistema bifásico contendo 80% (v/v) de n-dodecano e 3,0mM de DBT.



Para os ensaios em sistema bifásico utilizando 20 e 80% (v/v) de óleo diesel A S1800 obtiveram-se as fases *log* do crescimento do *R. erythropolis* ATCC4277 apresentadas nas Figuras A.5 e A.6, respectivamente. Através das quais se determinaram os valores de $\mu_x^{\text{máx}}$.

Figura A.5: Fase *log* do crescimento do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em sistema bifásico contendo 20% (v/v) de óleo diesel A S1800.

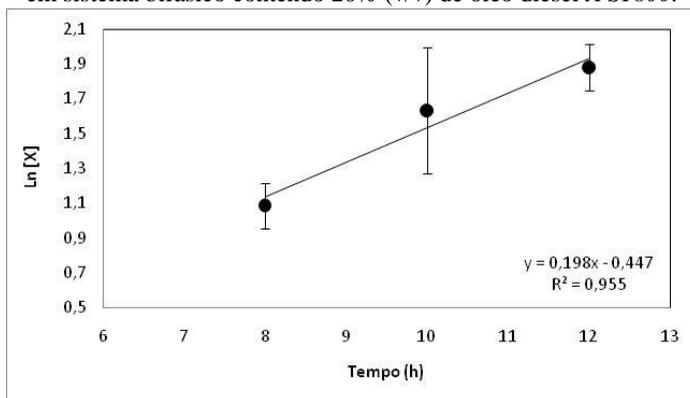
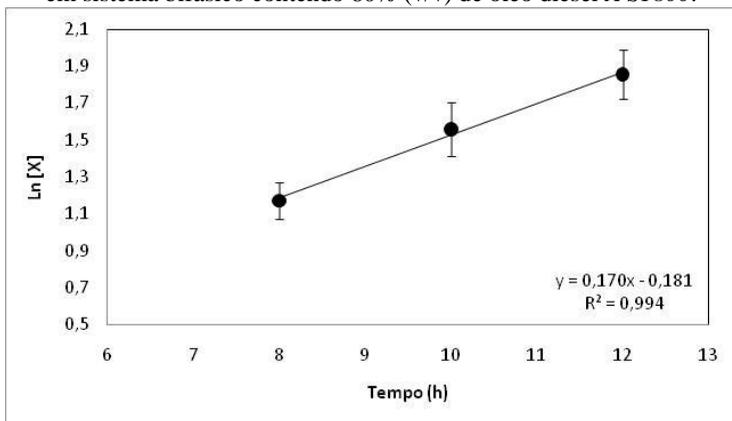


Figura A.6: Fase *log* do crescimento do *Rhodococcus erythropolis* ATCC4277 em sistema bifásico contendo 80% (v/v) de óleo diesel A S1800.



Os valores de K_s foram calculados a partir das curvas apresentadas nas Figuras A.7, A.8 e A.9, para os ensaios em sistema bifásico contendo 20% (v/v) de n-dodecano, 20 e 80% (v/v) de óleo diesel A S1800, respectivamente.

Figura A.7: Determinação do valor de K_s para ensaio em sistema bifásico contendo 20% (v/v) de n-dodecano.

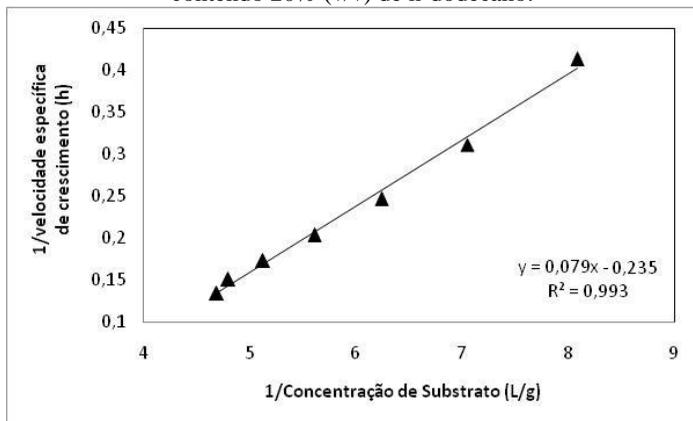


Figura A.8: Determinação do valor de K_s para ensaio em sistema bifásico contendo 20% (v/v) de óleo diesel A S1800.

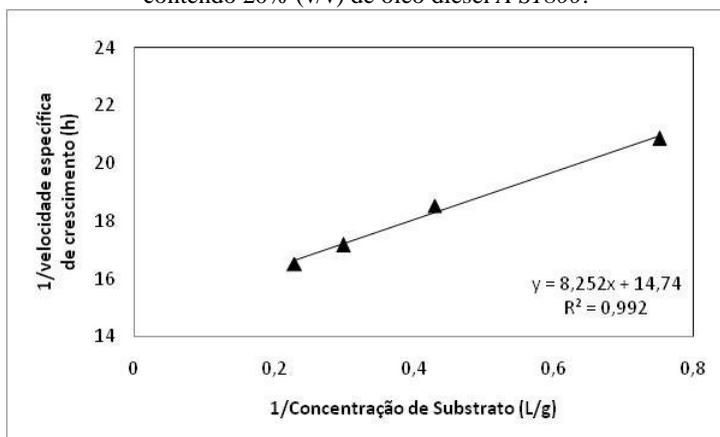
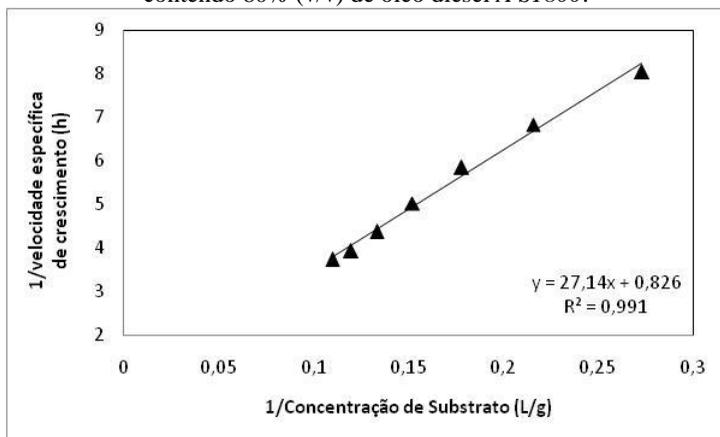


Figura A.9: Determinação do valor de K_s para ensaio em sistema bifásico contendo 80% (v/v) de óleo diesel A S1800.



APÊNDICE B

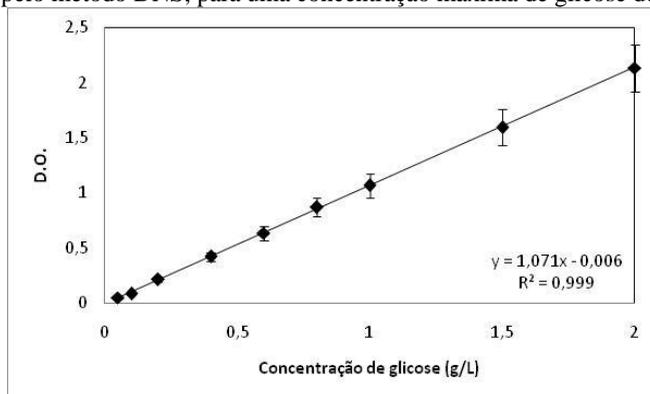
CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES NO MEIO FERMENTATIVO PELO MÉTODO DNS.

Na Tabela B.1 têm-se as médias dos dados utilizados para construir a curva de calibração da concentração de glicose (para concentrações de até 2g/L) *versus* densidade ótica (D.O), pelo método DNS. A curva de calibração construída através dos dados da Tabela B.1 é apresentada na Figura B.1.

Tabela B.1: Dados de concentração de glicose *versus* densidade ótica para a construção da curva de calibração do DNS.

Concentração de glicose (g/L)	D.O.
2	2,135
1,5	1,595
1	1,065
0,8	0,87
0,6	0,635
0,4	0,42
0,2	0,215
0,1	0,085
0,05	0,05

Figura B.1: Curva de calibração da concentração de glicose *versus* densidade ótica pelo método DNS, para uma concentração máxima de glicose de 2g/L.

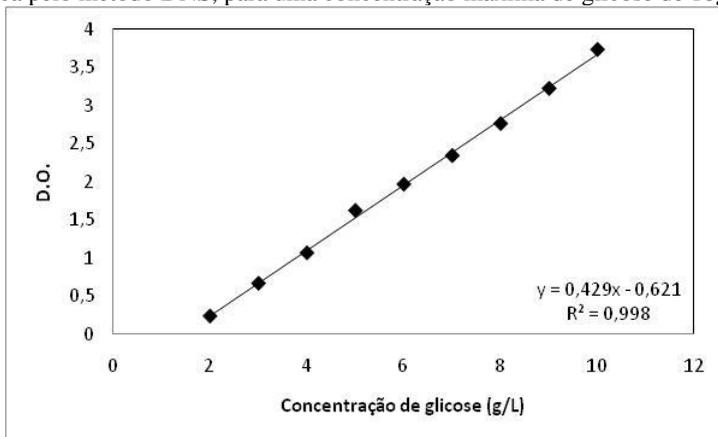


Na Tabela B.2 têm-se as médias dos dados utilizados para construir a curva de calibração da concentração de glicose (para concentrações de até 10g/L) *versus* densidade ótica (D.O), pelo método DNS. A curva de calibração construída através dos dados da Tabela B.2 é apresentada na Figura A.2.

Tabela B.2: Dados de concentração de glicose *versus* densidade ótica para a construção da curva de calibração do DNS.

Concentração de glicose (g/L)	D.O.
10	0,7467
9	0,6443
8	0,5523
7	0,4681
6	0,3930
5	0,3245
4	0,2137
3	0,1333
2	0,0475

Figura B.2: Curva de calibração da concentração de glicose *versus* densidade ótica pelo método DNS, para uma concentração máxima de glicose de 10g/L.



APÊNDICE C

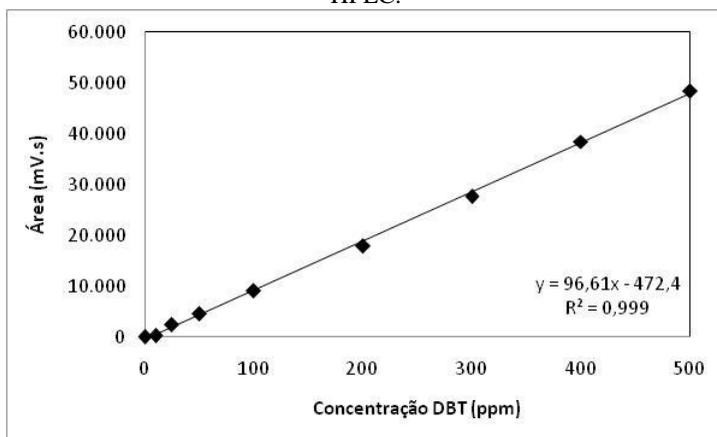
CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS COMPOSTOS DE DBT E 2-HBP EM HPLC.

Na Tabela C.1 têm-se as médias dos dados utilizados para construir a curva de calibração da concentração de DBT *versus* área, no HPLC. A curva de calibração construída através dos dados da Tabela C.1 é apresentada na Figura C.1.

Tabela C.1: Dados de concentração DBT *versus* área para a construção da curva de calibração no HPLC.

Concentração de DBT (ppm)	Área (mV·s)
500	48.450,17(±10,0199)
400	38.470,11(±8,1648)
300	27.746,08(±1,6854)
200	17.841,27(±1,2549)
100	9.028,01(±3,3126)
50	4.598,14(±1,8193)
25	2.409,25(±1,2179)
10	341,40(±8,6386)

Figura C.1: Curva de calibração da concentração de DBT *versus* área no HPLC.

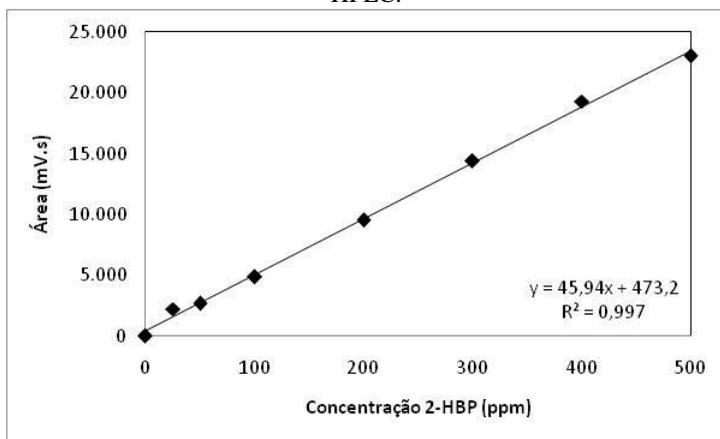


Na Tabela C.2 têm-se as médias dos dados utilizados para construir a curva de calibração da concentração de 2-HBP *versus* área, no HPLC. A curva de calibração construída através dos dados da Tabela C.2 é apresentada na Figura C.2.

Tabela C.2: Dados de concentração 2-HBP *versus* área para a construção da curva de calibração no HPLC.

Concentração de 2-HBP (ppm)	Área (mV·s)
500	23.033,89(±1,1845)
400	19.326,35(±9,2057)
300	14.422,63(±7,9656)
200	9.524,41(±3,4891)
100	4.894,64(±2,8448)
50	2.689,44(±9,4792)
25	2.260,75(±3,0091)

Figura C.2: Curva de calibração da concentração de 2-HBP *versus* área no HPLC.



ANEXO A

MÉTODO NÚMÉRICO APRESENTADO POR BORZANI et al. (2008) PARA O CÁLCULO DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO, CONSUMO DE SUBSTRATO E DE PRODUÇÃO.

No Quadro 01, são apresentadas as equações de uma planilha que executa o cálculo de velocidades específicas. Após a entrada das equações (conforme Quadro 01), pode-se iniciar a utilização da planilha, devendo-se utilizar apenas as colunas A, B e C para entrada de dados numéricos. A velocidade específica para cada instante aparecerá automaticamente na coluna E.

Quadro 01: Organização da planilha para cálculo de uma determinada velocidade específica.

Célula da Planilha	Dados de entrada	Tipo
A8	<i>tempo (h)</i>	texto
B8	<i>X (g/L)</i>	texto
C8	<i>M (g/L)</i>	texto
D8	<i>dM/dt</i>	texto
E8	μ_M	texto
F8	<i>i</i>	texto
G8	<i>mAB</i>	texto
H8	<i>mBC</i>	texto
I8	<i>dCX</i>	texto
J8	<i>mNO</i>	texto
K8	<i>nNO</i>	texto
L8	<i>mMO</i>	texto
M8	<i>nMO</i>	texto
N8	<i>t (c)</i>	texto
O8	<i>cxcr</i>	texto
P8	<i>dX/dt</i>	texto

Para os cálculos relativos ao primeiro ponto, o método obtém a derivada traçando uma reta entre o segundo e o primeiro ponto, devendo-se, portanto, entrar com os seguintes dados na linha 9:

Célula da Planilha	Dados de entrada	Tipo
A9	tempo inicial	número
B9	concentração celular inicial	número
C9	concentração inicial do composto M	número
D9	$= +(C10 - C9) / (A10 - A9)$	equação
E9	$= +D9/B9$	equação
F9	1	número

Para os demais pontos, o cálculo é feito através das equações abaixo (estão indicadas as entradas da linha 10). Quando a utilização da planilha, após a entrada dos dados numéricos (resultantes do alisamento) nas colunas A, B e C, deve-se preencher as colunas D a P copiando as células da linha 10 até a última linha de entrada de dados:

Célula da Planilha	Dados de entrada	Tipo
A10	segundo dado de tempo	número
B10	segundo dado de conc. celular	número
C10	segundo dado de conc. do composto M	número
D10	$=SE (ABS (G10-H10) <=0,001 ; I10;P10)$	equação
E10	$=+D10/B10$	equação
F10	$=+F9+1$	equação
G10	$=+ (C10-C9) / (A10-A9)$	equação
H10	$=+ (C11-C10) / (A11-A10)$	equação
I10	$=SE (A11<>0;0,5* (G10+H10) ; (C10-C9) / (A10-A9))$	equação
J10	$=SE ((C11-C10)>0; (A10-A11) / (C11-C10) ;99000000000)$	equação
K10	$=0,5* (C10+C11) - (J10*0,5* (A10+A11))$	equação
L10	$=SE ((C10-C9) <>0; (A9-A10) / (C10-C9) ; 99000000000)$	equação
M10	$=0,5* (C9+C10) - (L10*0,5* (A9+A10))$	equação
N10	$= (K10-M10) / (L10-J10)$	equação
O10	$=+L10*N10+M10$	equação
P10	$=SE (A11<>0; (N10-A10) / (C10-O10) ; (C10-C9) / (A10-A9))$	equação