

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GUSTAVO SILVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS: USO
DIDÁTICO, NOVO BIOCATALISADOR E NOVO MODELO DE ARQUITETURA

Alfenas/MG

2018

GUSTAVO SILVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS: USO
DIDÁTICO, NOVO BIOCATALISADOR E NOVO MODELO DE ARQUITETURA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.

Co-orientador: Dr. Masaharu Ikegaki.

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Silveira, Gustavo.

D587d Desenvolvimento de biocélulas a combustível microbianas: uso didático, novo biocatalisador e novo modelo de arquitetura / Gustavo Silveira. – Alfenas-MG, 2018.
145 f.: il. --

Orientador: José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Células à combustível. 2. Energia não Convencional. 3. Educação -- Química. 4. Metabolismo. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. 6. Reação do Azul da Prússia. 7. Corrosão – Técnica. I. Silva, José Maurício Schneedorf Ferreira da. II. Título.

CDD-541

GUSTAVO SILVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS: USO
DIDÁTICO, NOVO BIOCATALISADOR E NOVO MODELO DE ARQUITETURA

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.

Co-orientador: Dr. Masaharu Ikegaki.

Aprovado em: 27/02/18


Prof. Dr. José Maurício S. Ferreira da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

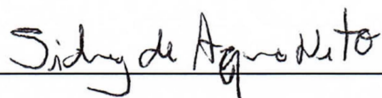
Profa. Dra. Alzira Maria Serpa Lucho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 


Prof. Dr. Gabriel Gerber Hornink
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Sidney de Aquino Neto
Instituição: Universidade de São Paulo – USP

Assinatura: 

Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baeta
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto -
UFOP

Assinatura: 

*Dedico essa Tese ao Sagrado
Coração de Jesus e ao
Imaculado Coração de Maria.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus Pai, pela Beleza da Criação, fonte inesgotável de fascínio e mistério, os quais, como químicos, somos chamados a desvendar;

Ao meu orientador, professor Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva pela grande amizade e apoio irrestrito à minha formação acadêmica e profissional;

Ao meu co-orientador, professor Dr. Masaharu Ikegaki, modelo oriental de paciência e perseverança para a realização de um trabalho de excelência;

A todos os meus familiares, em especial à minha esposa Marília e meus filhos João Pedro e Luís Filipe, pelo amor e alegria que dão sentido a cada dia. A meus pais, Mauro e Cirene, por todo amor dedicado durante toda minha vida. Aos meus irmãos Tiago e Gabriel pela amizade e à minha sogra, D. Victória, exemplo de bondade;

Aos professores da banca do exame de qualificação, Dr^a. Alzira Maria Serpa Lucho, Dr. Fábio Luiz Pissetti e Dr. Gabriel Gerber Hornink pelas valiosas sugestões;

Ao Departamento de Química da USP de Ribeirão Preto, em especial ao prof. Dr. Sidney de Aquino Neto, que gentilmente providenciou a realização das análises de MEV e EDS;

Aos professores e colegas de trabalho, Dr. Adriano, Dr^a. Daniela, Dr. Ernandes, Dr^a. Jaine, Dr^a. Joelise, Dr. Masaharu, Dr. Thiago e D. Daniela, pelo ótimo ambiente de trabalho;

Ao meu colega de grupo de eletroquímica, George, pela convivência, e aos servidores Marco Aurélio e Gabriel que viabilizaram a implementação do PROQUALITAE na Unifal/MG;

A querida amiga Bernadete, pelo carinho e orações desde a época de minha graduação;

À Cervejaria Senhorita, na pessoa da Dr^a. Kamila Leite Rodrigues, que prontamente forneceu amostras de levedura cervejeira para a realização dos testes de aplicação;

Ao técnico em eletrônica da Unifal/MG, Ronaldo, pelo fornecimento de resistores e prontidão para consertar meus multímetros sempre que precisei;

Ao PPGQ da Unifal/MG por toda minha trajetória acadêmica na pós-graduação;

À Unifal/MG e Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de capacitação e flexibilização do horário de trabalho.

“Aprendamos a sonhar, senhores, pois então talvez nos apercebamos da verdade.”

Friedrich August Kekulé, 1865.

RESUMO

A proposta central desse trabalho foi a construção e caracterização de biocélulas a combustível microbianas (MFC) empregando materiais de baixo custo, novo biocatalisador e novo modelo de arquitetura de uma câmara. Foram desenvolvidos três sistemas distintos, alterando-se o biocatalisador anódico (*Saccharomyces cerevisiae* ou microbiota de kefir), a arquitetura (uma ou duas câmaras) e o tipo de acceptor de elétrons no cátodo (ferricianeto de potássio ou o composto de coordenação azul da prússia). Todas as MFCs usaram azul de metileno como mediador e foram testadas/caracterizadas por meio de curvas de potência e polarização. Na primeira parte do trabalho foi feita uma abordagem do uso didático de MFCs com o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e arquitetura de duas câmaras, e propostos experimentos para avaliar o efeito da presença/ausência de mediador, diferentes substratos, inibidores, viabilidade celular e oxigênio sobre a resposta da MFC. Na segunda parte foi empregada a mesma arquitetura para a avaliação do consórcio microbiano kefir como biocatalisador anódico. A fermentação foi monitorada em intervalos de 24h até o tempo de 72h com as técnicas de voltametria linear (para construção das curvas de potência e polarização), voltametria cíclica, interrupção de corrente, espectrofotometria, contagem total de micro-organismos, e medidas dos parâmetros físico-químicos de pH, acidez total titulável, viscosidade e consumo de carboidratos. A última parte do trabalho foi voltada para a arquitetura e o cátodo, na qual foi desenvolvida uma MFC de uma câmara utilizando conexões hidráulicas e um filme de azul da prússia eletrodepositado sobre malha de carbono como acceptor de elétrons. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva confirmaram a formação do filme eletroativo. Foi demonstrada a possibilidade de obtenção de energia elétrica a partir de resíduo de cervejaria empregando-se esse terceiro dispositivo. A potência gerada foi usada como parâmetro comum de comparação do desempenho de cada um dos sistemas, obtendo-se os valores máximos de, 41 mWm⁻² (duas câmaras, *S. cerevisiae*), 54 mW m⁻² (duas câmaras, cultura de kefir), 136 mW m⁻² (uma câmara, *S. cerevisiae*) e 68 mW m⁻² (uma câmara, resíduo de cervejaria).

Palavras-chave: Biocélula a combustível. Energia limpa. Educação em Química. Metabolismo. *Saccharomyces cerevisiae*. Azul da prússia. Curvas de polarização.

ABSTRACT

The central proposal of this work was the construction and characterization of Microbial Fuel Cells (MFC) using low cost materials, new biocatalyst and new model of single chamber architecture. Three different systems were developed by altering the anodic biocatalyst (*Saccharomyces cerevisiae* or kefir microbiota), the architecture (one or two chambers) and the type of electron acceptor at the cathode (potassium ferricyanide or the prussian blue coordination compound). All MFCs used methylene blue as a mediator and were tested / characterized by means of power and polarization curves. In the first part of the work an approach was taken on the didactic use of MFCs with the use of *Saccharomyces cerevisiae* and two chamber architecture, and proposed experiments to evaluate the effect of presence / absence of mediator, different substrates, inhibitors, cell viability and oxygen over the MFC response. In the second part, the same architecture was used for the evaluation of the microbial consortium kefir as an anodic biocatalyst. The fermentation was monitored at intervals of 24h to 72h with the techniques of linear voltammetry (for the construction of power and polarization curves), cyclic voltammetry, current interruption, spectrophotometry, total microorganism counts, and measurements of the parameters physical-chemical pH, titratable total acidity, viscosity and carbohydrate consumption. The last part of the work was focused on the architecture and the cathode, in which a one chamber MFC was developed using hydraulic connections and a prussian blue film electrodeposited on carbon cloth as an electron acceptor. Images obtained by scanning electron microscopy and dispersive energy spectroscopy confirmed the formation of the electroactive film. It was demonstrated the possibility of obtaining electric energy from the brewery residue using this third device. The power generated was used as a common parameter to compare the performance of each of the systems, obtaining maximum values of 41 mW m⁻² (two chambers, *S. cerevisiae*), 54 mW m⁻² (two chambers, kefir culture), 136 mW m⁻² (one chamber, *S. cerevisiae*) and 68 mW m⁻² (one chamber, brewery residue).

Keywords: Biofuel cell. Sustainable clean energy. Chemical education. Metabolism. *Saccharomyces cerevisiae*. Prussian blue. Power curves.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação de uma biocélula a combustível de duas câmaras. Exemplos de reações: anódica - $C_6H_{12}O_6 + 6 H_2O \rightarrow 6 CO_2 + 24 H^+ + 24 e^-$; catódica - $4 H^+ + O_2 + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$. Fonte: Do autor. 20
- Figura 2 - Ilustração original do experimento de Galvani. Fonte: GALVANI (1791, p.418). (28) 22
- Figura 3 - Representação do experimento de Potter considerada a primeira biocélula a combustível microbiana. Fonte: POTTER (1911, p. 261). (31)..... 23
- Figura 4 - Ilustração simplificada das rotas bioquímicas do metabolismo de açúcares. Fonte: adaptado de VOET e VOET (2011, p.594) (39) 26
- Figura 5 - Nanofios produzidos por diferentes micro-organismos. Fonte: GORBY *et al* (2006, p. 11359, 11361) (49)..... 28
- Figura 6 - Mecanismos de transferência eletrônica. Transferência indireta via mediadores endógenos ou exógenos (A); transferência direta via citocromos presentes na superfície celular (B); transferência direta via nanofios (C). Fonte: SANTORO *et al* (2017, p. 230) (56)..... 29
- Figura 7 - Fórmulas estruturais do azul de metileno no estado oxidado (MB^+) e reduzido (Leuco-MB), e respectivas reações redox em função do pH. Fonte: HOFFMANN *et al* (2008, p. 945). (60) 30
- Figura 8 - Curvas de polarização (sigmoide) e de potência (parábola) características de uma biocélula a combustível em funcionamento, mostrando as regiões das curvas de polarização onde ocorrem as diferentes perdas no sistema: ativação (a), ôhmicas (b) e concentração (c). Fonte: adaptado de OSMAN *et al* (2011, p. 3089). (5)..... 34
- Figura 9 - Aspecto habitual dos grãos de kefir d'água. Fonte: Do autor..... 37
- Figura 10 - Materiais usados como eletrodos em biocélulas: (A) papel carbono; (B) placa de grafite; (C) tecido de carbono; (D) malha de carbono; (E) grafite granular; (F) grânulos de carvão ativado; (G) feltro de carbono; (H) carbono vítreo reticulado; (I) escova de carbono; (J) malha de aço inox. Fonte: WEI *et al* (2011, p. 9336).(36)..... 38
- Figura 11 - Estrutura química do Nafion. Fonte: Sigma-Aldrich. (111)..... 41
- Figura 12 - Biocélula a combustível de duas câmaras, em forma "H". Compartimento anódico (anaeróbio, à esquerda) e compartimento catódico (aeróbio, à direita), conectados por um tubo de vidro contendo uma membrana Nafion. Fonte: MIN *et al* (2005, p. 1677). (18)..... 44
- Figura 13 - Diferentes arquiteturas de biocélulas a combustível de uma câmara desenvolvidas pela equipe de Logan. À esquerda, modelo desenvolvido para

| | |
|--|----|
| se avaliar a influência da membrana sobre o desempenho do sistema; à direita, diagrama esquemático e protótipo de biocélula de uma câmara usado para produzir energia a partir de efluente doméstico. Fonte: LOGAN <i>et al</i> (2004, p. 4040; 2004, p. 2881). (16,22)..... | 45 |
| Figura 14 - Representação da estrutura cristalina do azul da prússia, destacando-se o tipo cúbico da célula unitária. Fonte: YAN <i>et al</i> (2016, p. 5137). (138)..... | 46 |
| Figura 15 - Diagrama esquemático e fotografia da biocélula a combustível em espiral. Fonte: JIA <i>et al</i> (2013, p. 895). (14)..... | 47 |
| Figura 16 - Diagrama esquemático da biocélula flutuante desenvolvida por Huang <i>et al</i> . Fonte (HUANG <i>et al</i> , 2012, p.309). (139) | 48 |
| Figura 17 - Montagem da MFC, mostrando as câmaras anódica (esquerda) e catódica (direita), preenchidas com seus respectivos eletrólitos. Fonte: Do autor. | 53 |
| Figura 18 - MFC em formato H empregada na segunda parte do trabalho. Câmaras anódica e catódica, separadas pela ponte salina. Fonte: Do autor. | 57 |
| Figura 19 - Frente/verso dos eletrodos e conexões hidráulicas usadas na construção da MFC (A). Passo a passo do processo de montagem: colagem dos eletrodos ao niple (ânodo, B; cátodo, C); prensagem e adição do ágar/KCl (D); vedação após solidificação do ágar (E); rosqueamento ao Joelho de 90° (F); medição de OCP da MFC recém montada, contendo o ânólito salina/PBS (G). Fonte: Do autor. | 63 |
| Figura 20 - Efeito da presença (●) e ausência (■) do mediador azul de metileno na geração de voltagem da biocélula a combustível. Fonte: Do autor. | 66 |
| Figura 21 - Mudanças na voltagem da biocélula obtida pela oxidação da glicose em diferentes concentrações de levedura (média ± SE). Fonte: Do autor..... | 67 |
| Figura 22 - Efeito do tampão citrato (■) comparado ao tampão fosfato (●) sobre a mudança de potencial na biocélula a combustível, usando glicose como fonte de carbono. Fonte: Do autor. | 69 |
| Figura 23 - Representação da via glicolítica da conversão de glicose e frutose a piruvato, destacando as enzimas com importante papel regulatório e pontos de inibição (**) por citrato. P = fosfato; P2 = bisfosfato. Fonte: adaptado de <i>Roche Biochemical Pathways</i> .(159)..... | 70 |
| Figura 24 - Micrografias (aumento de 400x) de lâminas preparadas com células intactas de <i>S. cerevisiae</i> (A) e com os produtos do fracionamento celular: sobrenadante (B) e fragmentos de membranas (C). Membranas e células coradas pelo azul de metileno, obtidas no final do experimento da biocélula a combustível inoculada com os fragmentos (D). Fonte: Do autor. | 72 |
| Figura 25 - Efeito dos fragmentos celulares e do conteúdo intracelular sobre a produção de voltagem pela biocélula a combustível. Amostras de levedura (controle – | |

| | |
|---|----|
| ●), sobrenadante (■) e de fragmentos de membranas (▲) foram usadas como inóculo. Fonte: Do autor. | 73 |
| Figura 26 - Biocélulas a combustível operando com diferentes inóculos. Da esquerda para a direita: controle, sobrenadante e fragmentos de membranas (<i>pellet</i>). No detalhe, a seta mostra a formação de bolhas no grupo controle. Fonte: Do autor. | 74 |
| Figura 27 - Curvas de polarização (■) e densidade de potência (●) da biocélula a combustível, obtida usando resistores na faixa de 18 kΩ a 2.2 kΩ. Os carboidratos empregados foram: A – glicose, B – frutose, C – sacarose, D – glicose (em tampão citrato), E – glicose, (aeróbio, por saturação com O ₂), F – glicose (anaeróbio, por saturação com N ₂). Fonte: Do autor..... | 75 |
| Figura 28 - Curvas de densidade de potência (A) e polarização (B) obtidas por LSV a 1 mV s ⁻¹ em intervalos fixos de tempo, sem a presença do mediador azul de metileno. Fonte: Do autor. | 79 |
| Figura 29 - Curvas de densidade de potência (A) e polarização (B) obtidas por LSV a 1 mV s ⁻¹ na presença de azul de metileno (0,48 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹), sem agitação do anólito. Fonte: Do autor. | 80 |
| Figura 30 - Curvas de densidade de potência (A) e de polarização obtidas por LSV a 1 mV s ⁻¹ na presença de azul de metileno (0,48 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , e agitação do anólito a 100 rpm. Fonte: Do autor. | 81 |
| Figura 31 - Perfil dos voltamogramas cíclicos do anólito contendo azul de metileno a 0,48 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ , obtido com eletrodo de trabalho de platina e velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 e 400 mV s ⁻¹ (A). Relação linear entre I _p vs. v ^{1/2} . R ² > 0.992 para todos os intervalos de tempo (B). Fonte: Do autor. | 83 |
| Figura 32 - Potencial de circuito aberto (OCP) como função do tempo de operação da MFC. A seta indica o momento da adição da amostra de kefir em ambos os experimentos. Fonte: Do autor. | 84 |
| Figura 33 - Cromatograma em papel feito com amostras coletadas em diferentes tempos de operação da MFC. Pontos: 1 - 3 (0h); 4-6 (24h); 7-9 (48h); 10-12 (72h). As amostras 3, 6, 9, 12 foram coletadas da MFC sem mediador. Padrões: sacarose (S); glicose (G); frutose (F). Fonte: Do autor. | 86 |
| Figura 34 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de trabalho de platina no anólito em intervalos fixos de tempo, entre -800 mV e +1400 mV a 50 mV s ⁻¹ . Anólito: solução de açúcar mascavo (5% m v ⁻¹) contendo 0,9% de NaCl e 0,48 x 10 ⁻³ mol de azul de metileno. Curva controle: solução de açúcar mascavo (5% m v ⁻¹) contendo 0,9% de NaCl. Fonte: Do autor. | 89 |
| Figura 35 - Espectro UV - Vis, de 200 a 800 nm, registrado imediatamente após a diluição de 10x do anólito, nos tempos de fermentação especificados. Fonte: Do autor. | 91 |

- Figura 36 - Variação do perfil dos voltamogramas cíclicos (A) e I_{pa} , I_{pc} e razão de correntes (B) ao longo de 100 ciclos voltamétricos. Condições: eletrodo de trabalho – malha de carbono modificada com AP; Contra-eletrodo – bastão de grafite; eletrodo de referência - Ag/AgCl. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , eletrólito $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Fonte: Do autor. 94
- Figura 37 - Voltamogramas cíclicos obtidos após a aplicação de corrente de $-2,5 \text{ mA}$ por 10 min (1ª redução), mais 10 min (2ª redução), mais 15 min (3ª redução) e mais 15 min (4ª redução), ao eletrodo de malha de carbono modificada com azul da prússia (controle). Condições: eletrodo de trabalho – malha de carbono modificada com AP; Contra-eletrodo – bastão de grafite; eletrodo de referência - Ag/AgCl. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , eletrólito $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Fonte: Do autor. 96
- Figura 38 - Fotografias dos eletrodos modificados com azul da prússia, mostrando a mudança de coloração do filme de azul da prússia obtida após o tempo total de 50 minutos de aplicação de corrente de $-2,5 \text{ mA}$ (A, antes e depois). Restauração parcial da cor azul inicial após o processo de reativação do eletrodo (B). Fonte: Do autor..... 97
- Figura 39 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de malha de carbono modificada com AP, obtidos em eletrólito $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 e 400 mV s^{-1} (A). Relação linear entre I_p vs. $v^{1/2}$ (B). Fonte: Do autor. 98
- Figura 40 - Voltamogramas cíclicos da malha de carbono como eletrodo de trabalho, sem modificação (malha) ou modificada com azul da prússia (malha/AP) em eletrólito saturado de N_2 ou O_2 . Condições: Contra-eletrodo – bastão de grafite; eletrodo de referência - Ag/AgCl. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , eletrólito $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Fonte: Do autor. 100
- Figura 41 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com AP em eletrólito de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e diferentes concentrações de H_2O_2 . Condições: contra-eletrodo – bastão de grafite; eletrodo de referência - Ag/AgCl. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , eletrólito $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Fonte: Do autor. 101
- Figura 42 - Corrente de pico anódica (entre 0,6 e 0,7V) e corrente catódica em 0,1V em função da concentração de peróxido, obtidas por voltametria cíclica empregando o eletrodo modificado com AP como eletrodo de trabalho. As retas ajustadas delimitam as faixas lineares entre concentração de peróxido e corrente. Fonte: Do autor..... 102
- Figura 43 - Imagens obtidas por MEV do eletrodo sem modificação (malha de carbono, coluna esquerda) e modificado com azul da prússia (coluna direita), em diferentes magnificações: 300x (A e B), 1000x (C e D) e 5000x (E e F). Fonte: Do autor. 104

- Figura 44 - Espectro de EDS da malha de carbono (A) e da malha eletrodepositada com azul da prússia (B). Fonte: Do autor..... 106
- Figura 45 - Curvas de polarização (■) e densidade de potência (●) da biocélula a combustível de uma câmara empregando um eletrodo novo (A) e reativado (B), obtidas usando resistores na faixa de 100 kΩ a 1 kΩ em (A) e de 100 kΩ a 215 Ω em (B). Dados registrados após 30s (marcadores preenchidos) e 60s (marcadores sem preenchimento). Fonte: Do autor. 108
- Figura 46 - Curvas de polarização (■) e densidade de potência (●) da biocélula a combustível de uma câmara empregando resíduo de cervejaria (levedura) como inóculo, obtidas usando resistores na faixa de 100 kΩ a 1 kΩ. Dados registrados após 30s (marcadores preenchidos) e 60s (marcadores sem preenchimento). Fonte: Do autor..... 115

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Características operacionais de algumas MFCs encontradas na literatura. | 49 |
| Tabela 2 - Variação do potencial da biocélula a combustível (teste) causada pela acidificação do anólito com HCl | 65 |
| Tabela 3 - Resultados quantitativos do questionário aplicado..... | 76 |
| Tabela 4 - Propriedades físico-químicas das MFCs em diferentes tempos de fermentação e presença ou ausência do mediador..... | 85 |
| Tabela 5 - Resultados de I_p , E_p , razão de correntes e ΔE_p obtidos em diferentes velocidades de varredura. | 99 |
| Tabela 6 - P_{max} e I_{max} da MFC de uma câmara. | 109 |
| Tabela 7 - Características experimentais obtidas de alguns trabalhos publicados empregando leveduras como biocatalisadores em MFC. | 110 |
| Tabela 8 - Resumo dos resultados obtidos com as biocélulas desenvolvidas nesta tese. | 117 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------|---|
| A | - ampére |
| Å | - angstron |
| ACNQ | - 2-amino-3-dicarboxi-1,4-naftoquinona |
| ADP | - adenosina difosfato |
| AEM | - membrana trocadora de ânion (do inglês Anion Exchange Membrane) |
| AM | - azul de metileno |
| ANOVA | - análise de variância |
| AP | - azul da prússia |
| atm | - atmosfera |
| ATP | - trifosfato de adenosina |
| CEM | - membrana trocadora de cátion (do inglês Cation Exchange Membrane) |
| CFU | - unidades formadoras de colônias |
| CI | - interrupção de corrente |
| CV | - voltametria cíclica |
| DC | - arquitetura de duas câmaras |
| DNS | - ácido 3,5-dinitrosalicílico |
| DQO | - demanda química de oxigênio |
| E | - potencial elétrico |
| E^0 | - potencial elétrico padrão |
| E_{an} | - potencial do ânodo |
| E_{cat} | - potencial do cátodo |
| E_{cel} | - potencial total da célula |
| ECS | - eletrodo de calomelano saturado |
| EDS | - espectroscopia de energia dispersiva |
| E_{pa} | - potencial de pico anódico |
| E_{pc} | - potencial de pico catódico |
| eV | - elétron-Volt |
| F | - constante de Faraday ($\sim 96\,485\text{ C mol}^{-1}$) |
| HNQ | - 2-hidroxi-1,4-naftoquinona |
| I | - corrente |
| i_{max} | - corrente máxima |
| I_{pa} | - corrente de pico anódica |

| | |
|------------|--|
| I_{pc} | - corrente de pico catódica |
| j | - densidade de corrente |
| Leuco-MB | - forma reduzida do azul de metileno |
| LSV | - voltametria linear |
| MB^+ | - forma oxidada do azul de metileno |
| MEV | - microscopia eletrônica de varredura |
| MFC | - biocélula a combustível microbiana (do inglês Microbial Fuel Cell) |
| min | - minuto |
| mPa | - miliPascal |
| n | - número de elétrons transferidos |
| NAD^+ | - nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado) |
| NADH | - nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido) |
| NADPH | - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| OCP | - potencial de circuito aberto |
| ORR | - reação de redução do oxigênio (do inglês Oxygen Reduction Reaction) |
| P | - potência |
| PANI | - polianilina |
| PBS | - tampão fosfato (do inglês Phosphate Buffer Solution) |
| PFK-1 | - fosfofrutoquinase-1 |
| P_i | - fosfato inorgânico |
| p_{max} | - potência máxima |
| PTFE | - politetrafluoretileno |
| R | - constante universal dos gases ($\sim 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) |
| R_{ext} | - resistência externa |
| R_f | - fator de retenção |
| rpm | - rotação por minuto |
| R_Ω | - resistência ôhmica |
| SC | - arquitetura de uma câmara |
| SE | - erro padrão |
| T | - temperatura (em kelvin) |
| US\$ | - dólar americano |
| UV | - ultravioleta |
| v | - velocidade de varredura |
| Vis | - visível |

| | |
|------------------|--|
| <i>vs.</i> | - <i>versus</i> |
| W | - watt |
| ΔE | - variação de potencial |
| ΔE_p | - separação do potencial de pico |
| ΔG_r | - variação da energia de Gibbs de reação |
| ΔS_{red} | - variação de entropia de redução |
| Γ | - concentração de espécies eletroativas |
| ~ | - aproximadamente |
| η_{an} | - sobrepotencial do ânodo |
| η_{cat} | - sobrepotencial do cátodo |
| Σ | - somatório |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 22 |
| 2.1 | HISTÓRICO..... | 22 |
| 2.2 | EXOeletrogênese | 25 |
| 2.2.1 | Mecanismos de transferência de elétrons | 27 |
| 2.3 | POTENCIAL, CORRENTE E POTÊNCIA GERADA POR BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL..... | 32 |
| 2.4 | MICROBIOTA..... | 36 |
| 2.5 | ELETRODOS..... | 38 |
| 2.6 | SEPARADORES E MEMBRANAS | 40 |
| 2.6.1 | Membrana trocadora de cátions (CEM) | 40 |
| 2.6.2 | Membrana trocadora de ânions (AEM) | 42 |
| 2.6.3 | Ponte salina | 42 |
| 2.7 | ARQUITETURA..... | 43 |
| 2.7.1 | Arquitetura de duas câmaras | 43 |
| 2.7.2 | Arquitetura de uma câmara | 44 |
| 2.7.3 | Outras arquiteturas | 46 |
| 3 | OBJETIVOS | 51 |
| 3.1 | GERAIS..... | 51 |
| 3.2 | ESPECÍFICOS | 51 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 52 |
| 4.1 | PRIMEIRA PARTE | 52 |
| 4.1.1 | Materiais e equipamentos | 52 |
| 4.1.2 | Soluções e reagentes | 52 |
| 4.1.3 | Montagem da biocélula | 52 |
| 4.1.4 | Fracionamento celular | 54 |
| 4.1.5 | Estudos de polarização | 54 |
| 4.1.6 | Aplicação em aula prática de graduação | 55 |
| 4.2 | SEGUNDA PARTE | 56 |
| 4.2.1 | Cultivo do kefir e preparação do inóculo | 56 |
| 4.2.2 | Operação da MFC | 56 |
| 4.2.3 | Ensaio eletroquímico | 57 |
| 4.2.4 | Absorção molecular | 58 |
| 4.2.5 | Determinações físico-químicas | 58 |
| 4.2.6 | Cromatografia em papel | 59 |
| 4.2.7 | Contagem de Unidades Formadoras de Colônias | 59 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.3 | TERCEIRA PARTE..... | 60 |
| 4.3.1 | Materiais..... | 60 |
| 4.3.2 | Soluções e reagentes | 60 |
| 4.3.3 | Eletrodeposição..... | 61 |
| 4.3.4 | Estudos eletroquímicos | 61 |
| 4.3.5 | Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva.... | 62 |
| 4.3.6 | Construção da MFC de uma câmara | 62 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 64 |
| 5.1 | PRIMEIRA PARTE | 64 |
| 5.1.1 | Mecanismo de funcionamento..... | 64 |
| 5.1.2 | Efeito da concentração do inóculo e de diferentes substratos | 66 |
| 5.1.3 | Efeito do oxigênio e do citrato | 68 |
| 5.1.4 | Fração celular responsável pela geração de eletricidade..... | 71 |
| 5.1.5 | Caracterização da biocélula a combustível..... | 74 |
| 5.1.6 | Resultado da aplicação em aula prática | 76 |
| 5.1.7 | Conclusão parcial | 77 |
| 5.2 | SEGUNDA PARTE | 78 |
| 5.2.1 | Curvas de potência e polarização..... | 78 |
| 5.2.2 | Mudanças físico-químicas..... | 84 |
| 5.2.3 | Contagem de Unidades Formadoras de Colônias | 87 |
| 5.2.4 | Atividade eletroquímica..... | 88 |
| 5.2.5 | Absorção molecular..... | 90 |
| 5.2.6 | Conclusão parcial | 91 |
| 5.3 | TERCEIRA PARTE..... | 92 |
| 5.3.1 | Mecanismo de funcionamento da MFC de uma câmara | 92 |
| 5.3.2 | Estabilidade do eletrodo | 93 |
| 5.3.3 | Estudos voltamétricos adicionais | 97 |
| 5.3.4 | Avaliação da atividade catalítica..... | 99 |
| 5.3.5 | Caracterização morfológica do eletrodo | 104 |
| 5.3.6 | Desempenho da biocélula a combustível de uma câmara..... | 107 |
| 5.3.7 | Aplicação | 114 |
| 5.3.8 | Conclusão parcial | 115 |
| 6 | CONCLUSÕES | 117 |
| 7 | PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 123 |
| | REFERÊNCIAS | 124 |
| | APÊNDICES | 140 |

1 INTRODUÇÃO

Fontes alternativas de energia têm sido buscadas em todo o mundo devido a crescente demanda e preocupações ambientais. Como exemplo, a tecnologia para produção de energia solar e eólica encontra-se bem consolidada e já inserida na matriz energética de vários países, enquanto outras ainda têm grande potencial de desenvolvimento. Nesse grupo enquadram-se as células a combustível biológicas como alternativa biotecnológica sustentável para produção de energia elétrica e tratamento de efluentes. (1)

As células a combustível biológicas, mais comumente chamadas de biocélulas a combustível, são dispositivos que fazem analogia às células a combustível convencionais. A diferença fundamental consiste no fato de que as biocélulas utilizam catalisadores biológicos para a conversão da energia química em energia elétrica. (2) Como em toda célula galvânica, a produção de trabalho elétrico ocorre mediante o fluxo de elétrons a partir do ânodo para o cátodo. No caso das biocélulas a combustível, os elétrons liberados pela oxidação de um substrato orgânico no compartimento anódico causam a redução de um agente oxidante no compartimento catódico, como oxigênio ou ferricianeto, entre outros. (3,4) O circuito é completado pela migração dos prótons gerados através do eletrólito, de forma a garantir o equilíbrio de cargas. A Figura 1 é uma representação geral de uma biocélula, em que micro-organismos ou enzimas presentes na câmara anódica promovem a oxidação do substrato (S) a produtos (P), liberando elétrons que fluem pelo circuito externo e causam a redução do católito, representado pelo oxigênio. Os prótons gerados permeiam o eletrólito, que pode constituir-se de uma membrana, um polímero ou uma ponte salina.

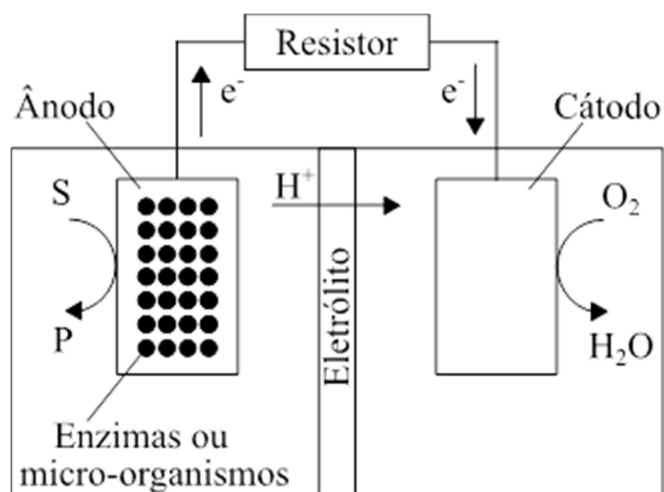


Figura 1 - Representação de uma biocélula a combustível de duas câmaras. Exemplos de reações: anódica - $C_6H_{12}O_6 + 6 H_2O \rightarrow 6 CO_2 + 24 H^+ + 24 e^-$; catódica - $4 H^+ + O_2 + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$.

Fonte: Do autor.

Esses dispositivos podem ser classificados de acordo com o biocatalisador, sendo chamados de biocélulas a combustível enzimáticas ou microbianas. No primeiro grupo, os eletrodos são modificados com enzimas a fim de catalisar a reação de oxidação de substratos específicos, (5,6) embora a oxidação completa de um substrato possa ser conseguida mediante a combinação de várias enzimas. (7) Nas biocélulas a combustível microbianas (MFC, do inglês *Microbial Fuel Cell*), bactérias ou fungos são responsáveis por toda a maquinaria enzimática necessária para oxidação do substrato. Como são sistemas biológicos vivos, são capazes de utilizar uma ampla gama de enzimas de modo a metabolizar por completo o substrato. (2,8,9) O mecanismo de interação dos micro-organismos com o eletrodo pode ser classificado de acordo com sua natureza: transferência eletrônica direta - quando ocorre diretamente entre a membrana celular do micro-organismo e o eletrodo; e transferência eletrônica mediada - quando requer a presença de uma molécula que faça o transporte dos elétrons gerados pelo metabolismo para o eletrodo. (2,8,10,11)

As principais aplicações das biocélulas a combustível são no tratamento de efluentes, construção de biossensores, fontes de energia implantáveis e geração de energia elétrica. (2,12-14) Entretanto, essa última aplicação ainda é um desafio, requerendo mais estudos a fim de melhorar o desempenho desses sistemas. Nesse sentido, pesquisas envolvendo a arquitetura, (4,15-17) os eletrólitos, (18-21) as fontes de matéria orgânica (22-25) e a comunidade microbiana (26-28) são fundamentais para um maior conhecimento desses sistemas.

O presente trabalho foi composto por três partes relacionadas ao estudo e desenvolvimento de biocélulas a combustível microbianas. Os estudos foram conduzidos de forma a avaliar as seguintes hipóteses: i) os materiais empregados na construção de biocélulas a combustível podem ser substituídos por materiais de baixo custo encontrados no comércio local, em substituição aos componentes habitualmente empregados? ii) há correlação entre o potencial elétrico obtido em biocélulas a combustível microbianas e a atividade metabólica dos micro-organismos? iii) a microbiota do kefir pode ser empregada como biocatalisador anódico em biocélulas? iv) é possível substituir a platina empregada como catalisador em biocélulas de uma câmara por um composto de baixo custo que atue como catalisador ou acceptor de elétrons no cátodo?

Foi realizada uma revisão e discussão da literatura pertinente ao desenvolvimento histórico, conceitos envolvidos e principais aplicações relacionadas às MFCs. A metodologia empregada e os resultados e discussões pertinentes foram apresentadas separadamente para cada parte para uma maior clareza. Ao final da discussão de cada parte do trabalho seguiu-se uma conclusão parcial contendo uma síntese dos principais achados. A conclusão final do trabalho expôs de forma resumida todos os resultados, fazendo uma correlação entre eles. Por fim, as perspectivas futuras de novas pesquisas e trabalhos que poderão se desenvolver a partir dessa linha de pesquisa ora iniciada foram brevemente discutidas, terminando com a apresentação das referências que fundamentaram a elaboração dessa tese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nessa seção foram abordados aspectos históricos do desenvolvimento e conceitos importantes relacionados às biocélulas a combustível, tais como os diferentes mecanismos de transferência eletrônica, a geração potencial e corrente elétrica, e os constituintes fundamentais ao funcionamento desses dispositivos.

2.1 HISTÓRICO

A interação entre eletricidade e seres vivos é atribuída a Luigi Galvani em 1791 (29) com sua descoberta de que eletricidade estática causava a contração dos músculos da perna de rãs, fato que ele denominou “eletricidade animal”, ganhando ampla divulgação no meio científico da época. Apresenta-se na Figura 2 uma das várias ilustrações presentes no artigo original.



Figura 2 - Ilustração original do experimento de Galvani.
 Fonte: GALVANI (1791, p.418). (29)

Embora grande admirador de Galvani, Alessandro Giuseppe Anastasio Volta estabeleceu uma famosa controvérsia ao questionar a existência da “eletricidade animal”.

Estudando o efeito do contato de diferentes metais com tecidos musculares, Volta propôs que a geração de corrente elétrica se devia ao contato entre dois metais diferentes separados por um eletrólito. Anos mais tarde, essas descobertas levaram ao desenvolvimento das primeiras pilhas elétricas e a uma verdadeira revolução na eletroquímica nascente. (30) Cinquenta anos mais tarde, Willian Grove, empregando eletrodos de platina obteve energia elétrica a partir da reação de hidrogênio e oxigênio no que seria considerada a primeira célula a combustível. (31) Seu funcionamento era baseado na espontaneidade da reação química entre esses dois gases, em que a platina atuava como catalisador. Assim como as pilhas elétricas, a célula a combustível de então utilizava somente compostos inorgânicos para o seu funcionamento. A geração de potencial elétrico a partir da oxidação de matéria orgânica causada pela ação de micro-organismos só foi relatada na literatura em 1911 pelo professor de Botânica M. C. Potter, da Universidade de Durham. (32) Uma ilustração do aparato empregado originalmente é apresentada na Figura 3.

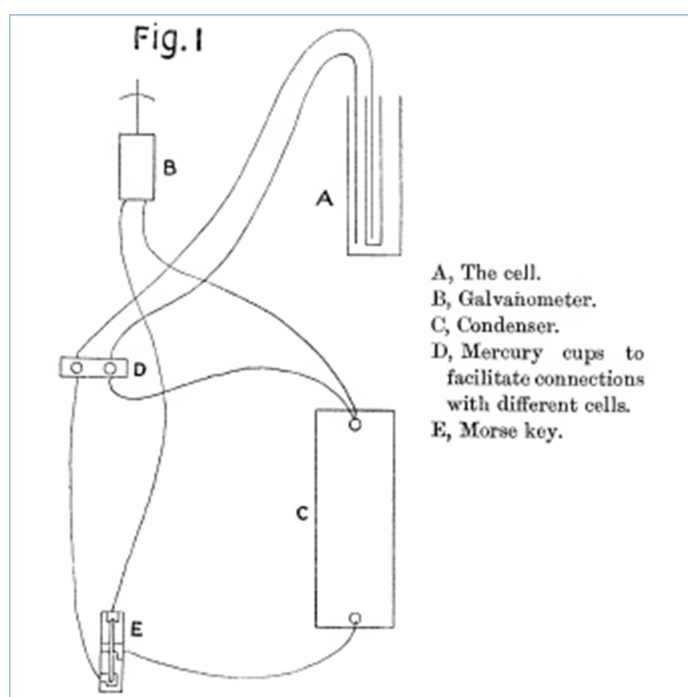


Figura 3 - Representação do experimento de Potter considerada a primeira biocélula a combustível microbiana.

Fonte: POTTER (1911, p. 261). (32)

Nesse trabalho, empregando diferentes micro-organismos – *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coli communis*, *B. fluorescens*, *B. violaceus* e *Sarcina lutea* – o professor Potter relatou pela primeira vez que a oxidação de matéria orgânica por micro-organismos foi capaz de causar uma deflexão nos ponteiros de um galvanômetro, indicando a geração de

corrente elétrica. Ele foi pioneiro em relacionar os efeitos elétricos diretamente à atividade dos micro-organismos e avaliar algumas das condições experimentais que afetavam esse potencial: temperatura, concentração do caldo nutriente e o número de micro-organismos presentes. Com o aparato empregado, Potter não obteve mais que 0,5 V em nenhum dos experimentos avaliados. Talvez por isso suas descobertas não tenham sido muito difundidas entre os pesquisadores da época, de modo que apenas em 1931, B. Cohen, professor do Departamento de Química Fisiológica da Escola Médica Johns Hopkins, em Baltimore (EUA), conseguiu construir uma bateria de células a combustível bacteriana que atingiu 35 V e 2 mA. (33) No seu resumo de apenas duas páginas, Cohen informou as cepas utilizadas e argumentou que o pequeno potencial gerado por cada célula a combustível bacteriana se deveu à limitação difusional dos compostos oriundos do processo redox; propôs como solução a adição de mediadores como o ferricianeto de potássio e benzoquinona, sendo, portanto, a primeira indicação do uso de mediadores nesses dispositivos.

O programa espacial norte-americano da década de 1960 retomou o interesse pela tecnologia das MFCs, devido a possibilidade de geração de energia elétrica a partir da degradação da matéria orgânica produzida durante as viagens espaciais. Naquela época foram lançados dispositivos que produziam energia para o funcionamento de rádios receptores, sinalizadores luminosos e outros dispositivos, porém sem sucesso comercial devido principalmente ao desenvolvimento simultâneo de outras tecnologias que produziam maior quantidade de energia, como as células fotovoltaicas. (14) Mesmo assim, as biocélulas a combustível continuaram sendo objeto de estudo e na década de 1980 surgiram os primeiros trabalhos que sistematizaram os conhecimentos desenvolvidos até então. O trabalho de revisão de Wingard *et al* (34) aborda a teoria envolvida, delimita a divisão entre as biocélulas a combustível microbianas e enzimáticas e explora o efeito dos mediadores sobre os eletrodos. A partir de então, o interesse pelo assunto começou a expandir-se. Foram publicados vários trabalhos abordando as diferentes biocélulas a combustível enzimáticas e microbianas já desenvolvidas, as técnicas eletroquímicas utilizadas para o estudo desses sistemas, e a construção de biossensores passou a ser um interesse constante dos pesquisadores. (35)

A partir dos anos 2000, o interesse por fontes alternativas de energia e tratamento de efluentes (9) causou um aumento significativo do número de trabalhos dedicados ao estudo das biocélulas e a organização dos conhecimentos teóricos sobre o assunto se tornaram bastante frequentes, como por exemplo, a busca de um maior entendimento dos mecanismos de transferência eletrônica, (36) da influência dos sobrepotenciais anódicos e catódicos sobre

a microbiota, (16) do efeito das membranas separadoras dos compartimentos anódicos e catódicos, (20) dos diferentes tipos de eletrodos (37) e das cepas utilizadas na produção de energia, (38) entre outros assuntos fundamentais para o contínuo desenvolvimento dessa tecnologia.

Dessa forma, desde os pioneiros trabalhos de Galvani, Groove, Potter e Cohen, a interface entre a biologia e eletroquímica tem passado por sucessivos progressos, seja do ponto de vista técnico-operacional, seja do ponto de vista teórico. A necessidade de utilização de catalisadores metálicos (em geral platina) em células a combustível convencionais sempre será um fator econômico e ambiental limitante para a disseminação dessa tecnologia, ao passo que a versatilidade proporcionada pelas células a combustível biológicas, tais como funcionamento em condições brandas de temperatura (20-40 °C), pH (próximo a 7,0), ampla variedade de catalisadores (enzimas e micro-organismos) e substratos renováveis servindo como combustível para o funcionamento desses dispositivos são vantagens que garantem um interesse contínuo para o aperfeiçoamento desses sistemas.

2.2 EXOELETROGÊNESE

A energia obtida pelos seres vivos decorrente da oxidação da matéria orgânica durante o metabolismo celular é armazenada nas ligações químicas do trifosfato de adenosina (ATP). Durante a glicólise, uma molécula de glicose é metabolizada ao longo de uma série de reações produzindo duas moléculas de piruvato e duas moléculas de ATP. Nesse processo há a redução de duas moléculas de NAD^+ (formando duas moléculas de NADH), que devem ser regeneradas para que a glicólise prossiga. Isso ocorre por meio do metabolismo do piruvato, em pelo menos quatro rotas metabólicas: (39)

- a) *fermentação láctica*: a enzima lactato desidrogenase catalisa a redução do piruvato pelo NADH, formando lactato;
- b) *fermentação alcoólica*: na primeira etapa, o piruvato é descarboxilado mediante a ação da enzima piruvato descarboxilase, formando acetaldeído. Na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido pelo NADH, formando etanol. A enzima envolvida é a álcool desidrogenase.

Nesses dois casos, a redução do piruvato a lactato ou etanol regenera o NAD^+ e permite a continuidade da glicólise.

- c) *fermentação acética*: descarboxilação direta do piruvato por ação do complexo da piruvato desidrogenase, resultando em acetato;

d) *ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa*: o complexo enzimático piruvato desidrogenase catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato produzindo acetil coenzima A, que inicia essa rota metabólica. O NAD^+ consumido na oxidação do gliceraldeído 3-fosfato é regenerado através de uma série de carreadores de elétrons presentes na membrana mitocondrial. Ao final, somente nessa via metabólica há um saldo de até 38 moléculas de ATP produzidas durante a completa oxidação da glicose.

Apresenta-se na Figura 4 uma ilustração simplificada da glicólise, fermentação e oxidação aeróbica da glicose.

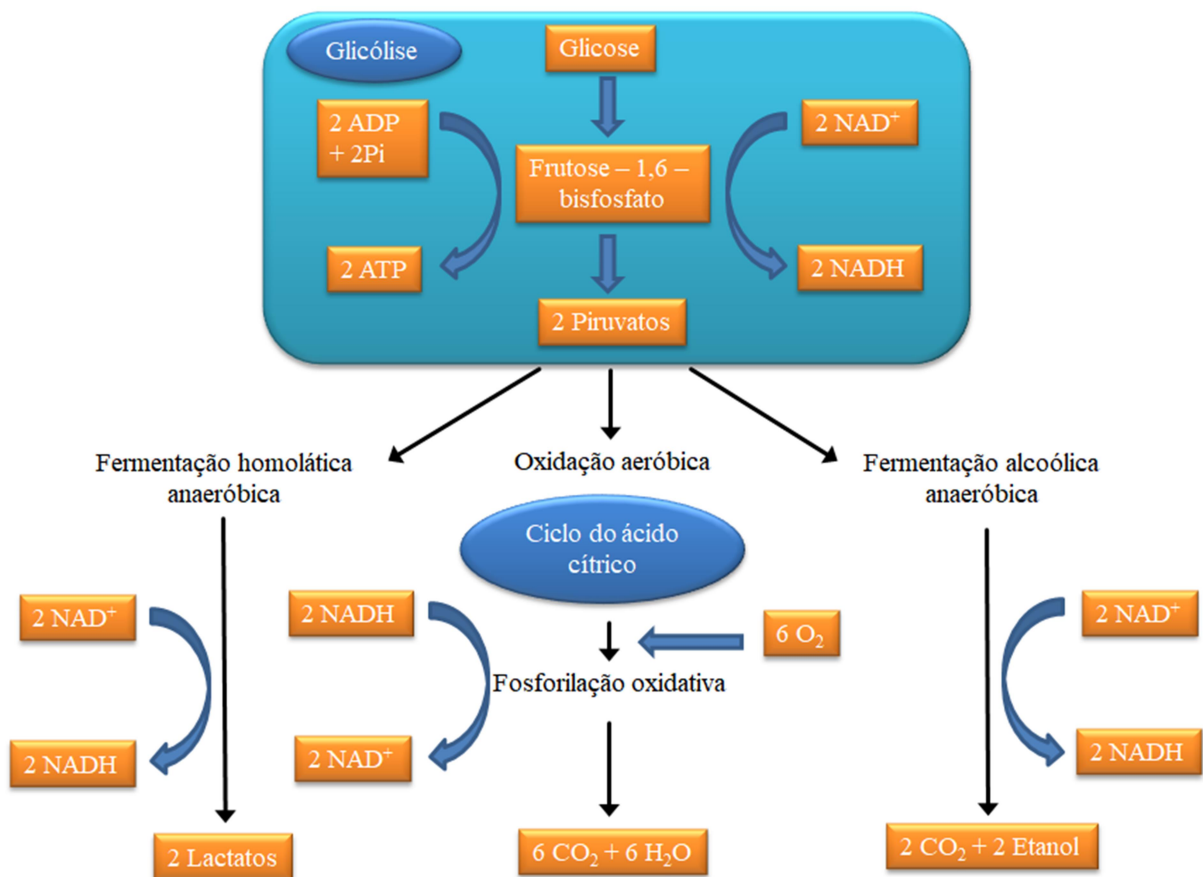


Figura 4 - Ilustração simplificada das rotas bioquímicas do metabolismo de açúcares.
Fonte: adaptado de VOET e VOET (2011, p.594) (40)

Nessas vias metabólicas podem ser identificados diferentes aceptores de elétrons: o piruvato ou o acetaldeído nas rotas fermentativas, e o oxigênio na rota oxidativa aeróbia. Existem também exemplos de micro-organismos anaeróbios capazes de utilizar aceptores finais de elétrons tais como sulfato (41) ou nitrato (42) para a produção de energia pela célula. Entretanto, alguns tipos de bactérias e fungos formam filmes eletroquimicamente ativos (9)

capazes de realizar reações de oxidação ou redução sobre depósitos minerais causando sua dissolução ou complexação. (38,42) Esses micro-organismos, quando inseridos num dispositivo eletroquímico tal como uma biocélula a combustível, são capazes de transferir elétrons diretamente para os eletrodos através de diferentes mecanismos de transferência, num fenômeno conhecido como *exoeletrogênese*. (9,38) O termo se originou da expressão “bactérias eletroquimicamente ativas”, (43) a partir de estudos com cepas de *Shewanella* sp., reconhecidamente capazes de utilizar óxidos de Fe^{3+} como aceptores de elétrons sob condições anaeróbicas. (44) O grupo de pesquisa de Kim *et al.* (44,45) foi um dos pioneiros no emprego desse tipo de micro-organismo em MFCs a fim de melhorar o desempenho desses dispositivos.

2.2.1 Mecanismos de transferência de elétrons

A transferência dos elétrons gerados durante o metabolismo microbiano para os eletrodos de uma biocélula a combustível pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na transferência eletrônica direta, macromoléculas presentes na membrana celular dos micro-organismos tais como enzimas (8) ou citocromos (10,38) são responsáveis pelas reações redox. O contato físico do eletrodo com enzimas ou citocromos presentes na membrana celular é fundamental para que a transferência eletrônica direta ocorra. Inoue *et al* (46) conseguiram mais de 200% de aumento na densidade de corrente de uma biocélula a combustível otimizando o contato do micro-organismo *Geobacter sulfurreducens* com um eletrodo nanoestruturado, havendo uma relação linear entre a área do eletrodo colonizada e a produção de corrente. Conclusão semelhante foi obtida por Chaudhuri e Lovley (47) que, empregando o micro-organismo *Rhodoferrax ferrireducens*, construíram uma biocélula que converteu até 80% dos elétrons produzidos pela oxidação da glicose em corrente elétrica. Bactérias dos gêneros *Rhodoferrax* sp. (47) *Geobacter* sp. (48) e *Shewanella* sp. constituem os exemplos mais comuns desse tipo de mecanismo. Kim *et al* (49) utilizaram voltametria cíclica para caracterizar a biocélula construída empregando *Shewanella putrefaciens*, mostrando que a atividade eletroquímica só se desenvolve na ausência de oxigênio. Uma possível explicação para essa observação, segundo os autores, é que a quantidade de citocromos presentes na membrana externa é afetada quando o crescimento celular é feito aerobicamente.

Estruturas chamadas nanofios também podem ser consideradas uma forma de transferência eletrônica direta. De acordo com Logan, (38) nanofios são anexos filamentosos da membrana celular de bactérias que apresentam condutividade elétrica, capazes de conduzir

elétrons a partir da célula para superfícies como óxidos metálicos ou eletrodos. Segundo Gorby *et al*, (50) os nanofios permitem a transferência eletrônica da bactéria para óxidos metálicos confinados em ambientes porosos inacessíveis às células microbianas. Esse grupo de pesquisa demonstrou em 2005 que *Shewanella oneidensis* e *Pelotomaculum thermopropionicum* cultivados em meio deficiente de oxigênio produzem anexos da membrana celular na forma de fios, variando entre 50–150 nm de diâmetro e dezenas de micrômetros de comprimento. A formação dessas estruturas filamentosas foi revelada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme apresentado na Figura 5. A confirmação da condutividade dessas estruturas foi realizada com técnicas de microscopia e espectroscopia de tunelamento por varredura e por engenharia genética, com a qual foram criados mutantes sem os genes responsáveis pela produção de citocromos essenciais (MtrC e OmcA) para a transferência de elétrons para fora da célula. Esses mutantes produziram os nanofios, mas estes foram pouco condutores, além de terem diminuída sua capacidade de reduzir óxido férrico e pior desempenho de geração de corrente elétrica quando empregados em MFC. (9,50)

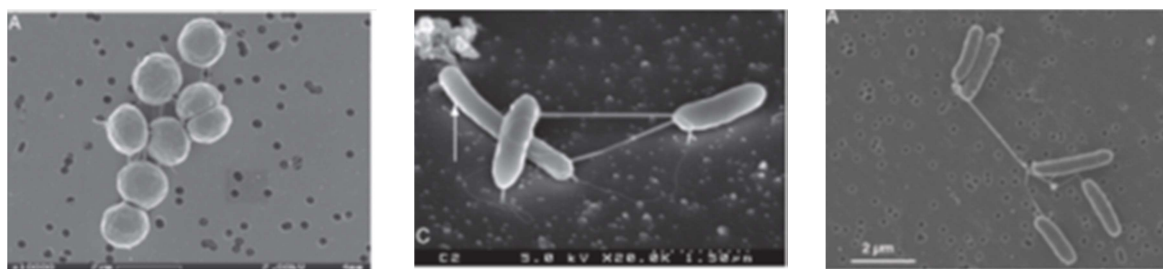


Figura 5 - Nanofios produzidos por diferentes micro-organismos.
Fonte: GORBY *et al* (2006, p. 11359, 11361) (50)

A segunda forma de transferência eletrônica em MFCs ocorre pela presença de compostos químicos que atuam transferindo elétrons do metabolismo microbiano para o eletrodo. O uso de mediadores artificiais adicionados às biocélulas aumenta a eficiência de sistemas nos quais os micro-organismos não produzem seus próprios mediadores. Moléculas comumente empregadas são o vermelho neutro, (11,51,52) vermelho e alaranjado de metila, (11,53) azul de metileno, (11,54,55) tionina, (56) entre outros. (2,8) A Figura 6 apresenta de forma ilustrativa os diferentes mecanismos de transferência eletrônica.

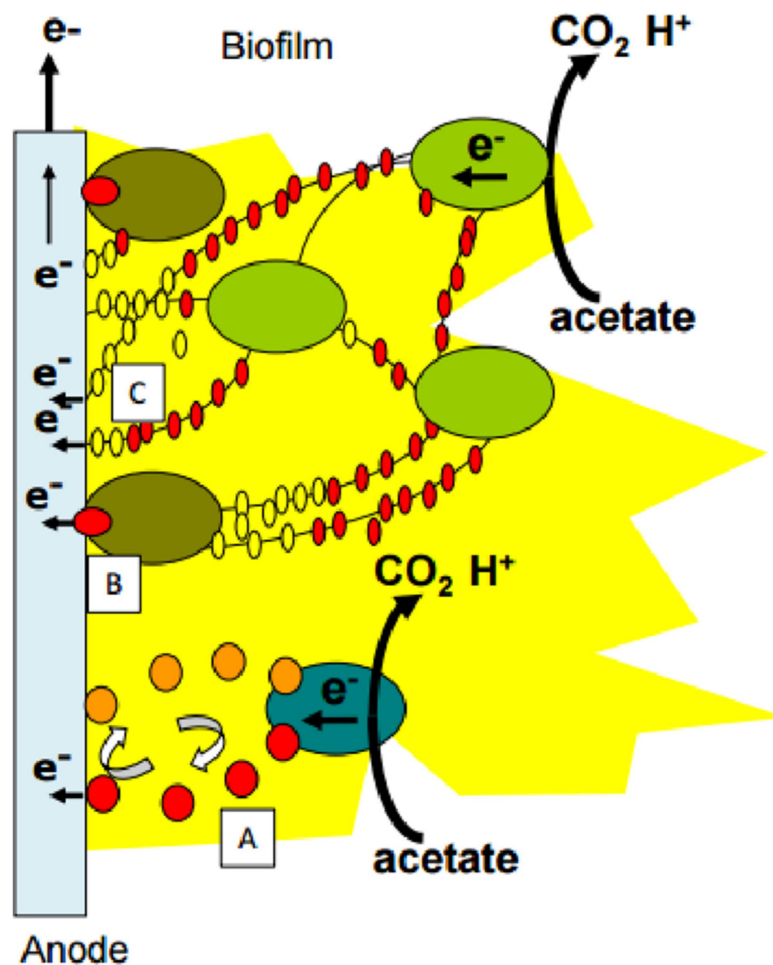


Figura 6 - Mecanismos de transferência eletrônica. Transferência indireta via mediadores endógenos ou exógenos (A); transferência direta via citocromos presentes na superfície celular (B); transferência direta via nanofios (C).

Fonte: SANTORO *et al* (2017, p. 230) (57).

Lin *et al* (52) constataram o efeito positivo dos mediadores vermelho neutro e ferricianeto de potássio sobre o desempenho de uma biocélula a combustível inoculada com uma cultura mista de bactérias para o tratamento de efluentes. No caso do mediador orgânico, os pesquisadores argumentam que o vermelho neutro tem um potencial redox de -325 mV, semelhante ao do NAD^+/NADH (-320 mV), favorecendo a ocorrência da reação redox. Essa informação é corroborada por Babanova *et al* (11) em um estudo sobre a influência de diferentes mediadores sobre o desempenho de uma biocélula de duas câmaras inoculadas com *Candida melibiosica*. Foram testados o vermelho neutro, verde de bromocresol, azul de metileno, vermelho e alaranjado de metila por meio de voltametria cíclica, comprovando-se que os dois primeiros interagem com o sistema NAD^+/NADH , ao passo que azul de metileno, vermelho e alaranjado de metila interagem preferencialmente com o sistema

fumarato/succinato. Como conclusão, o azul de metileno foi o mediador que apresentou o melhor resultado de densidade de potência da biocélula de todos os mediadores estudados.

O azul de metileno é uma das moléculas mais empregadas como mediadores em MFC (11,24,54,58) devido sua maior eficiência na transferência eletrônica, atribuída a adequada relação entre os requisitos termodinâmicos e cinéticos para obtenção de energia pelos micro-organismos e produção de energia pela biocélula a combustível. (11,59) Classificado como um corante orgânico fenotiazínico, é capaz de sofrer reações de oxidação e redução de forma reversível conforme as reações apresentadas na Figura 7. De acordo com a literatura, (60) a forma oxidada do azul de metileno (simbolizada por MB^+) tem coloração azul, ao passo que a forma reduzida, também chamada de leuco-forma, é incolor.

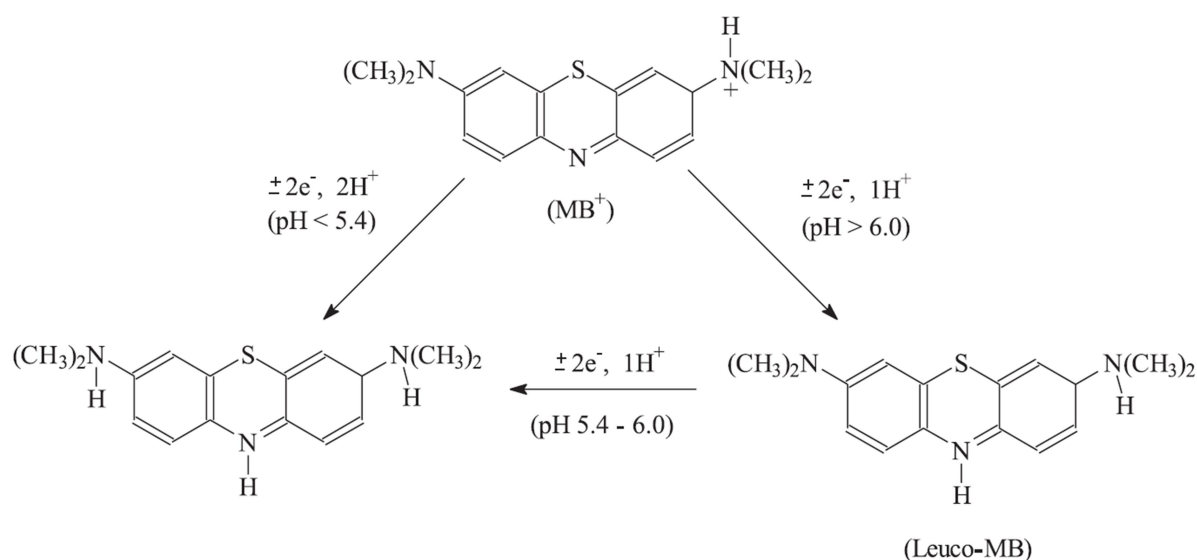


Figura 7 - Fórmulas estruturais do azul de metileno no estado oxidado (MB^+) e reduzido (Leuco-MB), e respectivas reações redox em função do pH.

Fonte: HOFFMANN *et al* (2008, p. 945). (61)

Alguns micro-organismos são capazes de produzir e secretar seus próprios mediadores, como por exemplo, bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., (26,62–64) que produzem piocianinas e fenazinas capazes de atuar como transportadores de elétrons do metabolismo microbiano para o eletrodo. Sabe-se que esses compostos são antibióticos naturais capazes de solubilizar óxidos de ferro e manganês, conferindo vantagens competitivas para sua sobrevivência. (9,65) Freguia *et al*, (18) investigando o comportamento metabólico e eletroquímico de *Lactococcus lactis*, identificaram que esse micro-organismo catalisa a oxidação de glicose em um ânodo de grafite por meio da liberação de quinonas solúveis.

As propriedades desejáveis para ação eficiente dos mediadores em biocélulas a combustível são descritas por Shukla *et al.* (66) Dentre elas, enumera-se: i) capacidade do mediador de permear a membrana celular; ii) estabilidade química, solubilidade e potencial redox compatível com o das espécies eletroquimicamente ativas geradas pelo metabolismo; iii) rapidez na transferência eletrônica do mediador reduzido para o eletrodo. Além dessas propriedades, Ieropoulos *et al* (67) ainda afirmam que um mediador anódico eficiente tem um potencial redox padrão maior que o transportador de elétrons biológico (por exemplo, citocromos ou NADH), e menor que o potencial do ânodo, para ser oxidado em sua superfície.

De acordo com Babanova *et al* (11) e Ieropoulos *et al*, (67) os mediadores penetram na célula na sua forma oxidada e interagem com agentes redutores tais como NADH e NADPH, passando então para a forma reduzida. Esta, por sua vez, sai da célula e se difunde até o eletrodo, onde sofre oxidação, podendo reiniciar o ciclo. Entretanto torna-se pertinente uma breve discussão sobre essa afirmação. Em geral, a forma oxidada desses mediadores apresenta-se eletricamente carregada, o que dificulta sua passagem através da membrana celular. (39) Por sua vez, a leuco-forma desses mediadores tem maior probabilidade de atravessar a membrana celular por ser eletricamente neutra. Se a reação de redução ocorrer na superfície celular, devido a presença de redutases e mediante a ação de cofatores como NADH e NADPH, o processo redox pode então continuar conforme sugerido por Babanova *et al* (11) e Ieropoulos *et al.* (67) Tal questionamento se fundamenta no trabalho de May *et al*, (68) no qual avaliou-se a redução e absorção de azul de metileno causadas por eritrócitos humanos. Os autores mostraram que a redução do azul de metileno ocorre na região exofacial da superfície celular e que somente a leuco-forma do azul de metileno atravessa a membrana celular, não encontrando evidências de que a forma oxidada do azul de metileno seja absorvido pelas células. Embora haja diferenças na estrutura das membranas celulares de bactérias, fungos e eritrócitos, (39) elas são essencialmente compostas por uma bicamada fosfolipídica que regula as trocas gasosas, de substratos e íons, de modo que a analogia entre os diferentes tipos de células permanece válida e, por isso, torna-se um ponto a ser considerado quanto ao mecanismo de transferência eletrônica promovido pelos mediadores.

2.3 POTENCIAL, CORRENTE E POTÊNCIA GERADA POR BIOCÉLULAS A COMBUSTÍVEL

O potencial elétrico gerado por uma biocélula a combustível pode ser calculado a partir da energia de Gibbs, de acordo com a Equação 1: (4,69)

$$E = - \frac{\Delta G_r}{nF} \quad (1)$$

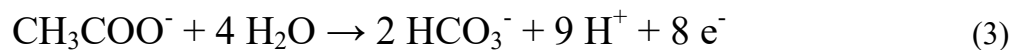
(onde E é o potencial elétrico, ΔG_r a variação da energia de Gibbs de reação, n o número de elétrons envolvidos na reação e F a constante de Faraday).

Essa equação pode ser usada para o cálculo teórico do potencial das meia-reações que acontecem no cátodo e no ânodo e que, combinadas, resultam na Equação de Nernst: (70)

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C]^c [D]^d \dots}{[A]^a [B]^b \dots} \quad (2)$$

Como o potencial E resultante de uma MFC em operação é positivo, decorre que a energia de Gibbs associada é negativa, significando que a reação é espontânea e que eletricidade pode ser produzida. Usando o acetato como exemplo, tem-se: (69)

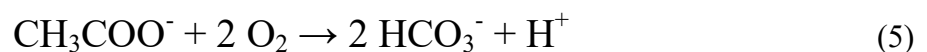
Meia-reação anódica:



Meia-reação catódica:



Reação global:



O cálculo do E^0 das meias-reações empregando a equação de Nernst resulta em:

$$E_{An} = E_{An}^0 - \frac{RT}{8F} \ln \frac{[CH_3COO^-]}{[HCO_3^-]^2[H^+]^9} \quad (6)$$

$$E_{cat} = E_{cat}^0 - \frac{RT}{4F} \ln \frac{1}{pO_2[H^+]^4} \quad (7)$$

Essas equações permitem o cálculo do limite máximo de potencial gerado pela biocélula. No exemplo citado da oxidação do acetato / redução do oxigênio, teríamos:

$$E_{cel} = E_{cat} - E_{an} \quad (8)$$

$\Delta G_r = -847.60 \text{ kJ mol}^{-1}$; $E_{cel} = 0,805 \text{ V} - (-0,296) = 1,101 \text{ V}$ (condições: $[CH_3COO^-] = [HCO_3^-] = 5 \text{ mM}$, pH 7, 298,15 K, $pO_2 = 0,2 \text{ atm}$). (4)

Entretanto, o valor de potencial produzido em uma MFC usualmente se situa entre 0,3 e 0,7 V. (9) Bond e Lovley (71) reportaram a produção de energia elétrica exclusivamente por células aderidas diretamente ao eletrodo. Para isso, empregaram o micro-organismo *Geobacter sulfurreducens*, acetato como fonte de carbono e oxigênio como acceptor de elétrons em uma biocélula a combustível de duas câmaras, obtendo um potencial de até 0,5 V. Essa diferença entre o valor teórico e o valor obtido experimentalmente se deve à soma dos sobrepotenciais do ânodo (η_{an}) e do cátodo (η_{cat}) e às perdas ôhmicas do sistema IR_{Ω} , de acordo com a Equação 9: (4,6,9)

$$E_{cel} = E^0 - (\sum \eta_{an} + |\sum \eta_{cat}| + IR_{\Omega}) \quad (9)$$

Essa equação indica que o potencial da célula é dado pela diferença entre o máximo potencial teórico (calculado a partir das semi-reações) e o somatório das perdas de voltagem devido aos sobrepotenciais dos eletrodos e as perdas ôhmicas decorrentes da corrente (I) gerada e a resistência do sistema (R_{Ω}). Os sobrepotenciais dos eletrodos têm origem a partir

de três tipos de perdas, dependentes da corrente que flui pelo sistema, comumente classificadas como: (4,6,9)

- a) *perdas de ativação*: decorrentes da barreira de energia para a transferência de elétrons provenientes do metabolismo microbiano (seja por mecanismo direto ou indireto). Essa perda ocorre em baixas densidades de corrente, e pode ser atenuada pelo favorecimento da transferência eletrônica através do uso de catalisadores, otimização das condições reacionais e aumento da área dos eletrodos;
- b) *perdas ôhmicas*: surgem a partir das resistências elétricas presentes no sistema. Estas incluem a resistência para a transferência de carga para os eletrodos, a resistência dos eletrólitos e membranas ao transporte de íons e a resistência existente entre as conexões elétricas.
- c) *perdas relacionadas ao transporte de massa (perdas de concentração)*: são bastante evidentes em maiores densidades de corrente e ocorrem devido à limitação difusional de reagentes e produtos da reação, principalmente nas vizinhanças do eletrodo. Isso causa um desbalanço entre a quantidade de espécies reduzidas e oxidadas na superfície do eletrodo, gerando o sobrepotencial. A agitação do sistema pode diminuir esse problema.

Um gráfico ilustrativo dessas regiões e respectivas perdas pode ser visualizado na Figura 8.

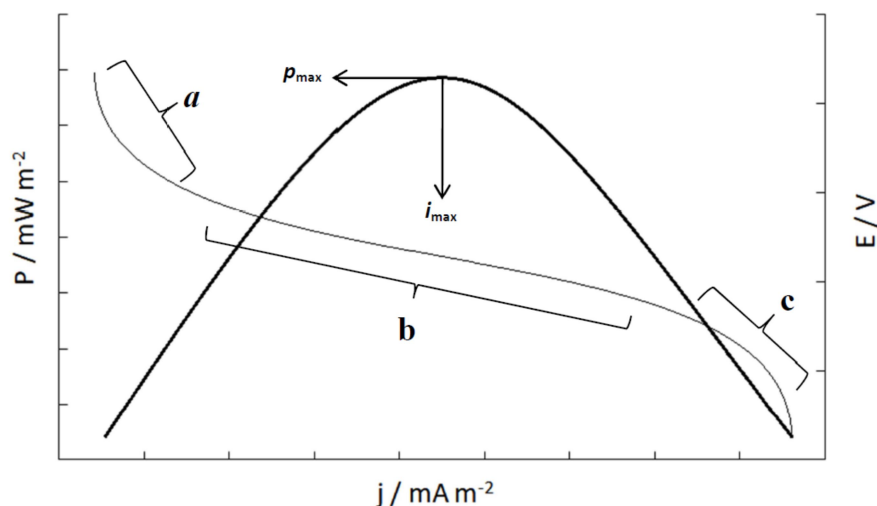


Figura 8 - Curvas de polarização (sigmoide) e de potência (parábola) características de uma biocélula a combustível em funcionamento, mostrando as regiões das curvas de polarização onde ocorrem as diferentes perdas no sistema: ativação (a), ôhmicas (b) e concentração (c).

Fonte: adaptado de OSMAN *et al* (2011, p. 3089). (6)

Gráficos como o apresentado na Figura 8 são conhecidos como curvas de polarização e curvas de potência, sendo uma das mais importantes ferramentas para caracterização dos sistemas galvânicos. (4,9) Esses gráficos permitem observar como a voltagem e potência da biocélula variam em função da densidade de corrente e as perdas associadas às diferentes regiões. As curvas de polarização podem ser obtidas por meio do controle de potencial (modos potenciocinético e potenciostático) ou controle de corrente (modos galvanocinético ou galvanostático).

Nos modos cinéticos, há uma variação contínua de E (primeiro caso) e I (segundo caso) em função do tempo, e o registro imediato de I e E, respectivamente. Nos modos estáticos, E e I são variados ponto a ponto, registrando-se I e E, respectivamente, após sua estabilização. (72) Esses dados podem ser obtidos empregando-se um potenciostato, através de uma varredura de potencial que registra I e E utilizando tanto uma configuração de dois ou três eletrodos - modo potenciocinético - ou variando-se a resistência externa e medindo o potencial elétrico correspondente - modo galvanostático. Quando um potenciostato é usado, uma velocidade de varredura de 1 mVs^{-1} é geralmente adequada. (9) Quando a curva de polarização é obtida variando-se a resistência externa, o valor de potencial deve ser registrado após o estabelecimento de um estado pseudo-estacionário. (4) A partir dos valores de R_{ext} e E, a corrente e a potência são calculadas pela Lei de Ohm (Equação 10) e Lei de Joule (Equação 11), respectivamente:

$$I = \frac{E}{R_{ext}} \quad (10)$$

$$P = I \cdot E \quad (11)$$

A potência máxima gerada é habitualmente empregada para a comparação entre diferentes dispositivos. Na Figura 8, esse valor é representado pelo termo “ p_{max} ”. De acordo com a Lei de Jacobi (Teorema da máxima transferência de potência), (73,74) “a potência máxima é transferida quando a resistência interna da fonte é igual a resistência externa, desde que a resistência externa possa ser variada e a resistência interna seja constante”. Isso significa que no ponto “ p_{max} ” a resistência interna (somatório das resistências do ânodo, do cátodo, do eletrólito e da membrana, quando presente) (75) iguala-se à resistência externa, (4,9) permitindo uma avaliação aproximada desse somatório.

2.4 MICROBIOTA

Os micro-organismos empregados no compartimento anódico definem o tipo de mecanismo responsável pela transferência dos elétrons produzidos durante o metabolismo para o eletrodo. Nesse ponto, as MFCs são bastante versáteis, pois podem utilizar uma ampla variedade de micro-organismos adaptados a diversos tipos de substratos. (76) Pelo menos três dezenas de diferentes espécies têm sido empregadas em MFCs com diferentes arquiteturas, (2,8,57,59,77) com destaque para os gêneros *Shewanella* spp., (78–81) *Geobacter* spp., (19,23,67,82) *Escherichia*, (67,83) *Proteus*, (84,85) *Pseudomonas* spp., (63,86) *Rhodospirillum rubrum*, (47,87) *Candida* (11,24,88) e *Saccharomyces*, (54,55,89,90) utilizados muito frequentemente.

Quando se considera a utilização de leveduras como biocatalisadores anódicos em MFCs, as espécies dos gêneros *Candida* e *Saccharomyces* estão entre as mais utilizadas. São micro-organismos eucarióticos pertencentes ao Reino Fungi, amplamente utilizados em processos biotecnológicos da indústria alimentícia e farmacêutica. (59) Apresentam aspectos favoráveis para o uso em MFCs, tais como facilidade de cultivo, metabolização de ampla gama de substratos e rápido crescimento. Entretanto, os mecanismos de transferência eletrônica relacionados a esses tipos de micro-organismos são menos claros que para as bactérias, devido a compartimentalização e organização das organelas celulares e mais rico genoma, características de células eucarióticas. (59)

O uso de cepas de culturas mistas de micro-organismos não isolados também constitui presença constante na literatura, (27,91,92) embora, nesse caso, não se possa definir com clareza qual tipo de mecanismo de transferência eletrônica prevalece (direto ou indireto). (57) Um interessante exemplo de cultura mista é o kefir, (92) um consórcio microbiano de leveduras e bactérias lácticas e acéticas encapsuladas por uma matriz de exopolissacarídeos, em forma de grãos gelatinosos (2-5 mm de tamanho) capazes de produzir uma bebida ligeiramente alcoólica com alegadas propriedades medicinais. (93,94) Nesse sentido, o kefir apresenta propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, (95,96) antineoplásicas e antioxidantes, dentre outras. (97,98)

Tradicionalmente, os grãos de kefir são utilizados para fermentar leite ou soluções de açúcar mascavo. Os tipos de cepas microbianas presentes no kefir podem variar, dependendo das fontes de nutrientes, preparação e até mesmo do país ou região em que seus grãos iniciais foram adquiridos. Não obstante, os micro-organismos comuns encontrados no kefir incluem algumas bactérias lácticas (por exemplo, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, (94,99) bactérias do ácido acético do gênero *Acetobacter* (100) e várias cepas

de levedura (por exemplo, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspota*, *Kazachstania*, *Lachancea* e *Yarrowia*. (101) Além da *Candida* e *Saccharomyces*, alguns desses micro-organismos foram utilizados isoladamente no desenvolvimento de MFCs, como por exemplo o *Lactococcus lactis*, (18) *Acetobacter aceti* (102) e *Kluyveromyces marxianus*. (3)



Figura 9 - Aspecto habitual dos grãos de kefir d'água.
Fonte: Do autor.

Em paralelo, os grãos de kefir (Figura 9) podem ser facilmente obtidos no comércio ou mesmo por doações, um hábito comum de pessoas que cultivam kefir. O kefir pode ser cultivado sem necessidade de condições assépticas, exibe uma alta taxa metabólica (10-20 g de biomassa produzida diariamente a partir de 100-200 g de grãos iniciais), (103) e pode crescer por meses apenas com a substituição de soluções nutricionais. (93) Além disso, os grãos podem se desenvolver em uma grande faixa de temperatura (~3-45°C), sendo facilmente recuperados com peneiras plásticas comuns. Podem ser armazenados sob congelamento por meses e até anos, e reativados para metabolismo de açúcares em poucos dias. (93) Todas essas características sugerem a possibilidade de emprego de kefir como um novo biocatalisador anódico em biocélulas a combustível.

2.5 ELETRODOS

Os materiais empregados como eletrodos nas biocélulas a combustível determinam o desempenho e os custos desses dispositivos. Os eletrodos devem apresentar boa condutividade, estabilidade química e mecânica, além de baixo custo. Os materiais mais comumente empregados para a construção desses dispositivos são apresentados na Figura 10.

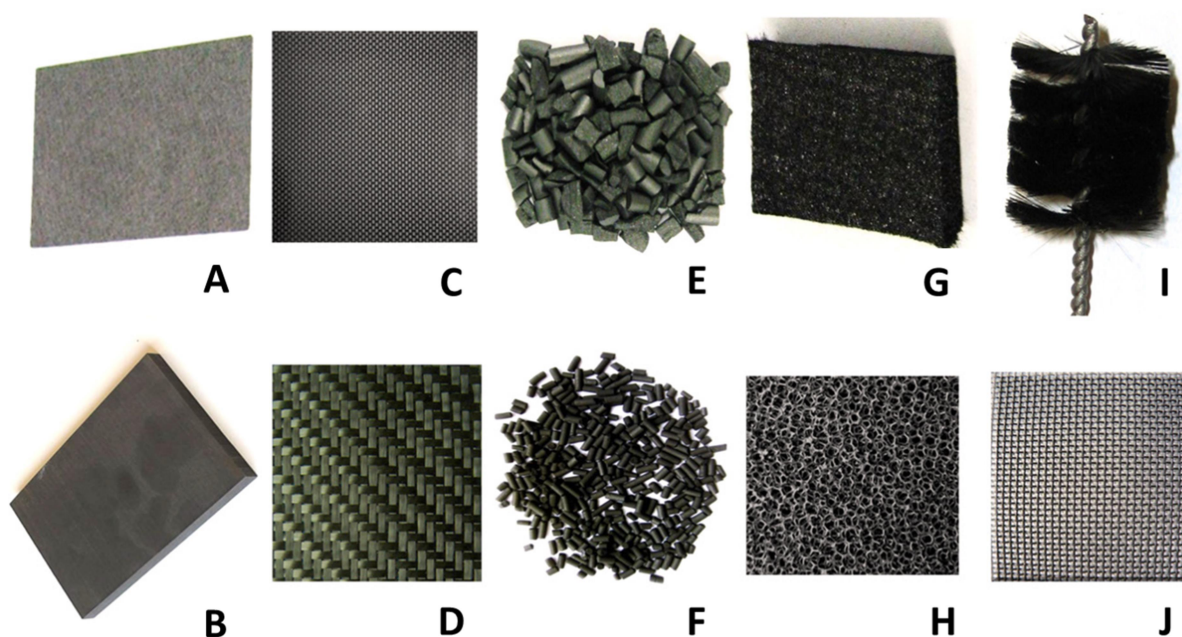


Figura 10 - Materiais usados como eletrodos em biocélulas: (A) papel carbono; (B) placa de grafite; (C) tecido de carbono; (D) malha de carbono; (E) grafite granular; (F) grânulos de carvão ativado; (G) feltro de carbono; (H) carbono vítreo reticulado; (I) escova de carbono; (J) malha de aço inox.
Fonte: WEI *et al* (2011, p. 9336).(37)

Num amplo artigo de revisão, Wei *et al* (37) descreveram as características, desempenho, custos, aplicações e métodos de modificação de superfícies de eletrodos empregados como ânodos ou cátodos em biocélulas a combustível microbianas.

Eletrodos de carbono estão entre os mais empregados por terem alta condutividade e serem adequados para a adesão e crescimento microbiano. Chaudhuri e Lovley (47) compararam a geração de corrente elétrica por *Rhodospirillum rubrum* em biocélulas a combustível de duas câmaras construídas com diferentes tipos de eletrodos de carbono: bastões, feltro ou espuma. Os resultados mostraram que as biocélulas construídas com bastões de carbono e feltro de carbono produziram densidades de corrente aproximadamente iguais ($28 - 31 \text{ mA m}^{-2}$), mas a biocélula construída empregando eletrodos de espuma de carbono produziu uma densidade de corrente aproximadamente 2,4 vezes maior (74 mA m^{-2}), o que é

explicável pelo maior número de células aderidas a esse tipo de eletrodo altamente poroso. Esse resultado mostra que a otimização da área dos eletrodos pode aumentar significativamente a energia gerada.

Os eletrodos à base de fibra de carbono oferecem elevada área superficial e porosidade. Escovas de carbono podem ser fabricadas empregando-se um fio de metal inerte (como o titânio) para agrupar as fibras, como na Figura 10 I. Logan (9) apresenta um exemplo de escova de carbono (dimensões 5 cm de largura e 7 cm de comprimento) construída com fibras de 7,2 mm de diâmetro, que fornece uma área de 1,06 m² e 98% de porosidade. Esse tipo de eletrodo foi apresentado pela primeira vez pela equipe de Logan *et al*, (104) sendo desde então, rotineiramente empregado nos trabalhos desenvolvidos por esse grupo de pesquisa, tal como no estudo do efeito de eletrólito sobre a eficiência e resistência de biocélulas, (92) posicionamento dos eletrodos, (105) e na minimização do fenômeno denominado *power overshoot*. (106)

Aço inox e titânio são metais também utilizados como eletrodos em biocélulas, embora sejam preteridos em relação aos eletrodos de carbono. São eletrodos com condutividade maior que o carbono, mas geralmente a superfície dos metais não são tão adequadas para a adesão dos micro-organismos. (37) Heijne *et al* (107) utilizaram curvas de polarização e impedância eletroquímica para comparar eletrodos de carbono (plano ou rugoso) e metálicos (Pt/Ti ou Ti) sob as mesmas condições operacionais. Os resultados mostraram que o melhor desempenho do bioânodo foi alcançado com o eletrodo de carbono (rugoso), seguido por Pt/Ti e carbono (plano). O eletrodo de titânio não apresentou bons resultados, sendo considerado pelos autores inadequado para o uso em biocélulas. Em geral, os micro-organismos formam filmes preferencialmente sobre superfícies hidrofílicas e positivamente carregadas. As propriedades físicas do eletrodo afetam a comunidade microbiana que forma o biofilme, porém essa relação ainda precisa ser melhor compreendida. (108)

O uso de eletrodos metálicos não-nobres é algo incomum nos trabalhos sobre biocélulas a combustível. Por exemplo: Logan (9) admite a possibilidade do uso de eletrodos de cobre nesses dispositivos, mas afirma que a corrosão e a toxicidade dos íons Cu²⁺ são problemas que devem ser evitados. Entretanto, o recente trabalho de Baudler *et al* (109) parece promissor ao rever a questão dos eletrodos metálicos. Eles avaliaram a aplicação de eletrodos de ouro, prata, cobre, níquel, cobalto, titânio e aço inox como ânodos de biocélulas a combustível microbianas. Destes, apenas cobalto e titânio não favoreceram a formação de biofilmes eletroquimicamente ativos e, surpreendentemente, os eletrodos de cobre foram os

que tiveram melhor desempenho em termos de densidade de corrente gerada ($1,5 \text{ mA m}^{-2}$) contra $1,1 \text{ mA m}^{-2}$ (prata) e $1,0 \text{ mA m}^{-2}$ (grafite, usado como material de referência).

2.6 SEPARADORES E MEMBRANAS

A função primária dos separadores e membranas em uma biocélula a combustível é manter o ânodo e o cátodo em seus respectivos compartimentos. Outra função é garantir a neutralidade de cargas do sistema permitindo que os prótons produzidos no ânodo possam migrar para o cátodo e impedir o fluxo de substrato do ânodo para o cátodo ou de oxigênio do cátodo para o ânodo. (9) Apesar dessas peculiaridades, o uso de separadores também causa problemas: retarda a transferência de prótons do ânodo para o cátodo, (17) aumenta a resistência interna (110) e geralmente têm alto custo. (20) Entretanto, por se tratar de um componente importante nas biocélulas, as vantagens e desvantagens de cada tipo de separador devem ser avaliadas. Existem inúmeros tipos de separadores que podem ser utilizados, como por exemplo, membranas trocadoras de cátions ou de ânions, membrana de microfiltração ou ultrafiltração, fibra de vidro ou pontes salinas, com dezenas de tipos e modelos diferentes para cada um desses exemplos citados. A seguir, são apresentados alguns tipos frequentemente usados.

2.6.1 Membrana trocadora de cátions (CEM)

Nafion é um tipo de membrana trocadora de prótons desenvolvida e comercializada pela DuPont. É um co-polímero perfluorado sulfonado, que apresenta uma cadeia de fluorocarbono ($-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$) à qual são ligados grupos sulfonato ($-\text{SO}_3^-$). É formado pela reação de copolimerização de um éter vinílico perfluorado com tetrafluoretileno, e um precursor termoplástico contendo grupos sulfonil fluoreto ($-\text{SO}_2\text{F}$). (111) A estrutura química resultante é apresentada na Figura 11.

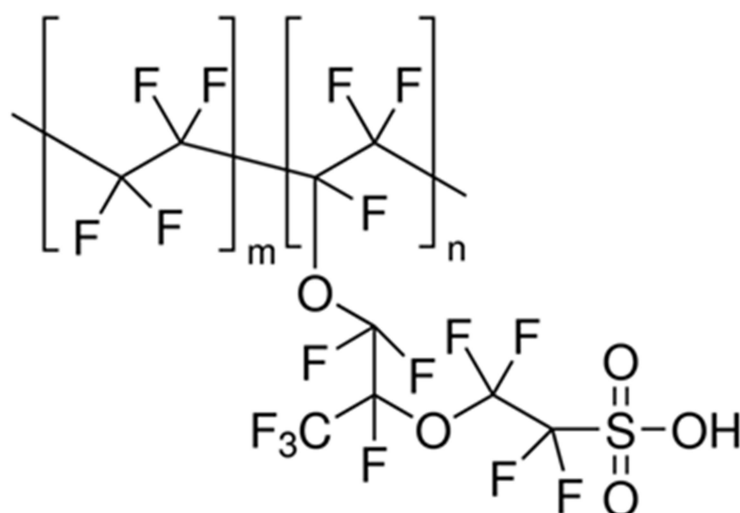


Figura 11 - Estrutura química do Nafion.
Fonte: Sigma-Aldrich. (112)

Nafion apresenta uma condutividade de prótons e cátions devido a presença do grupo sulfonato negativamente carregado. (20,113) O transporte de prótons através dessa membrana pode ser prejudicado pelo efeito da alta concentração de cátions (Na^+ , K^+ , NH_4^+), usualmente muito superior à concentração de H^+ em pH próximo à neutralidade, causando a acidificação do anólito e prejudicando o desempenho da biocélula. (9) Outros problemas, comuns às membranas trocadoras de cátions, são a difusão do oxigênio, perda de substrato e a formação de um biofilme que prejudica a permeação das espécies carregadas. (113)

Oh e Logan (114) avaliaram o efeito da área dos eletrodos e da membrana sobre a potência máxima produzida por uma biocélula a combustível de duas câmaras. Foram empregadas 3 áreas (medida da seção transversal) da membrana Nafion: 3,5; 6,2 e 30,6 cm^2 . A densidade de potência gerada, normalizada pela área do ânodo (22,5 cm^2) foi, respectivamente, 45 mW m^{-2} , 68 mW m^{-2} e 190 mW m^{-2} , o que mostra que área da membrana limita a potência gerada quando é menor que a área dos eletrodos. Esse trabalho ainda apresentou os efeitos da força iônica e do uso de ferricianeto como acceptor de elétrons sobre a potência gerada.

2.6.2 Membrana trocadora de ânions (AEM)

O problema encontrado nas CEMs de acúmulo de H^+ no compartimento anódico pode ser minimizado pelo uso de uma membrana trocadora de ânions. Essas membranas são polímeros eletrólitos que contêm grupos catiônicos ligados covalentemente à estrutura, seja por cadeias laterais ou diretamente na cadeia carbônica. (115) Varcoe *et al* (115) analisaram vários trabalhos sobre biocélulas a combustível que empregaram membranas trocadoras de ânions e constataram que esse tipo de membrana traz vantagens como aumento na densidade de corrente e eficiência coulômbica e maior estabilidade ao longo do tempo quando comparadas às CEMs. Segundo os autores, isso se deve à: i) menor permeabilidade do oxigênio do cátodo para o ânodo, favorecendo a anaerobiose; ii) favorecimento da transferência de H^+ , diminuindo o problema de acidificação do anólito; iii) menor formação de biofilme sobre a membrana; iv) maior condutividade e conseqüentemente menor resistência interna.

Essas propriedades das AEMs conferem vantagens sobre outros tipos de membranas. Ao comparar a potência gerada em biocélulas a combustível microbianas construídas com diferentes membranas (trocadoras de cátions, trocadoras de ânions ou de ultrafiltração), Kim *et al* (116) constataram que a AEM empregada (AMI-7001, Membrane International Inc., NJ) produziu a maior densidade de potência (acima de 610 mW m^{-2}) e maior eficiência coulômbica (72%), seguida pelo Nafion (514 mW m^{-2}), CEM (CMI-7000, Membrane International Inc., NJ) (480 mW m^{-2}), e UF-1K (DIVFLO ultrafiltration, Amicon, Inc., MA) (462 mW m^{-2}).

Apesar dessas características favoráveis, as membranas trocadoras de ânions também têm algumas desvantagens: são mais permeáveis aos substratos e mais susceptíveis à deformação (são mais frágeis). (20)

2.6.3 Ponte salina

Pontes salinas são os separadores mais baratos utilizados em biocélulas. São constituídas de um tubo de vidro preenchido com um eletrólito inerte (geralmente KCl) em um meio gelatinoso (ágar de 2 a 10%), que permite a condução de íons entre as duas câmaras e dificulta a difusão do oxigênio. (20) Vários trabalhos relatam o uso de ponte salina em biocélulas. Por exemplo: estudo de novas cepas aptas a atuarem como biocatalisadores anódicos, (24) geração de eletricidade com simultâneo tratamento de resíduos, (25,117)

comparação entre o desempenho de biocélulas construídas com ponte salina ou com Nafion. (19,25) Nos dois casos (19,25) a ponte salina levou a uma menor geração de corrente elétrica, principalmente devido à elevada resistência interna. Embora a utilização de ponte salina como separador leve geralmente a um desempenho inferior em termos de geração de energia quando comparado ao uso de membranas, a melhoria do desempenho de biocélulas que empregam esse tipo de separador pode ser feita mudando o tipo e a concentração do eletrólito, bem como aumentando área de contato com as câmaras. (20)

2.7 ARQUITETURA

A arquitetura de uma biocélula a combustível tem influência muito significativa sobre o desempenho do sistema em termos de energia gerada e eficiência coulômbica. Existe na literatura uma variedade significativa de arquiteturas desenvolvidas para os mais diversos tipos de estudos e aplicações. Em todas elas há, obrigatoriamente, a presença de um compartimento anódico, no qual ocorrem as reações de oxidação da matéria orgânica pelos micro-organismos, e um cátodo onde ocorrem as reações de redução. A presença de um compartimento catódico que contenha o cátodo e um eletrólito depende do modelo de arquitetura desenvolvido. Por exemplo: em uma biocélula de duas câmaras, o cátodo fica imerso em uma solução que contém o agente oxidante (O_2 , íons ferricianeto, etc), ao passo que em uma biocélula de câmara simples, o cátodo fica exposto diretamente ao ar, não havendo necessidade da presença do eletrólito. A seguir são apresentadas algumas arquiteturas.

2.7.1 Arquitetura de duas câmaras

Esse tipo de arquitetura é muito empregado em laboratórios, (118) devido a facilidade de construção e aplicabilidade desse modelo para a avaliação inicial de novos materiais eletródicos, tipos de micro-organismos e substratos. (4) O formato conhecido como “H”, consiste de dois compartimentos interligados por um tubo contendo um separador, que pode ser uma membrana como o Nafion ou uma ponte salina. Um exemplo dessa arquitetura é apresentado na Figura 12.

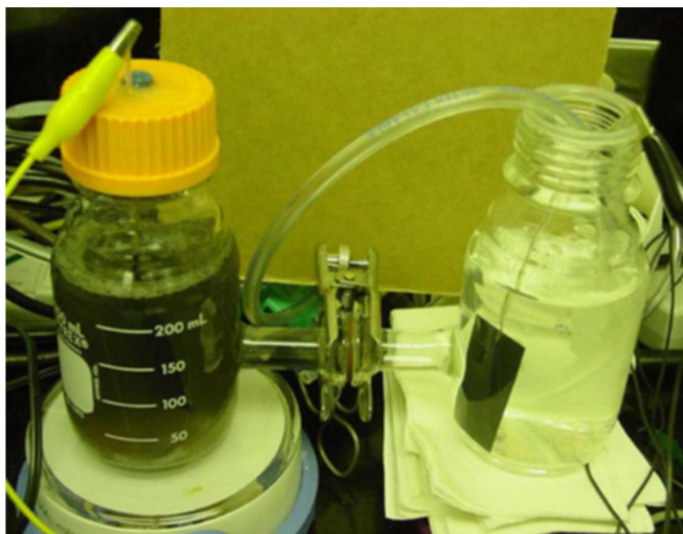


Figura 12 - Biocélula a combustível de duas câmaras, em forma “H”. Compartimento anódico (anaeróbio, à esquerda) e compartimento catódico (aeróbio, à direita), conectados por um tubo de vidro contendo uma membrana Nafion.

Fonte: MIN *et al* (2005, p. 1677). (19)

Apesar da alta resistência interna característica desse formato que acarreta, geralmente, baixas densidades de potência, esse tipo de arquitetura tem diversas aplicações, como por exemplo, para avaliação de novo tipo de biocatalisador anódico, (24) substratos (25,119) e material eletrodico, (58,102) investigação dos mecanismos de transferência eletrônica, (120,121) uso como biosensor, (122) entre outros. (123,124)

2.7.2 Arquitetura de uma câmara

Esse modelo surgiu como um aperfeiçoamento da arquitetura de duas câmaras. Em um sistema de duas câmaras, o compartimento catódico deve fornecer continuamente a espécie química que sofrerá a reação de redução. Durante o funcionamento de uma biocélula de duas câmaras há o consumo de espécies químicas no compartimento catódico, que sofrem reação de redução. Entre essas, o oxigênio é uma das mais comuns, pois pode ser fornecido mediante a aeração do eletrólito. Outra alternativa é o íon ferricianeto, que apresenta um desempenho bastante superior ao do oxigênio, como resultado da maior eficiência de transferência de massa de íons ferricianeto do que oxigênio dissolvido. (114) A necessidade de reposição das espécies químicas constitui uma limitação ao contínuo funcionamento desse tipo sistema. Para evitar esse problema, a equipe de Logan (17,23) foi uma das primeiras a desenvolver a arquitetura de uma câmara, na qual o cátodo fica diretamente exposto ao ar, fornecendo

continuamente oxigênio para a ocorrência da reação de redução. Consistiu em um progresso importante, sendo a tendência a ser seguida para o desenvolvimento de sistemas com alimentação contínua. Dois exemplos de biocélulas a combustível de uma câmara são apresentados na Figura 13.

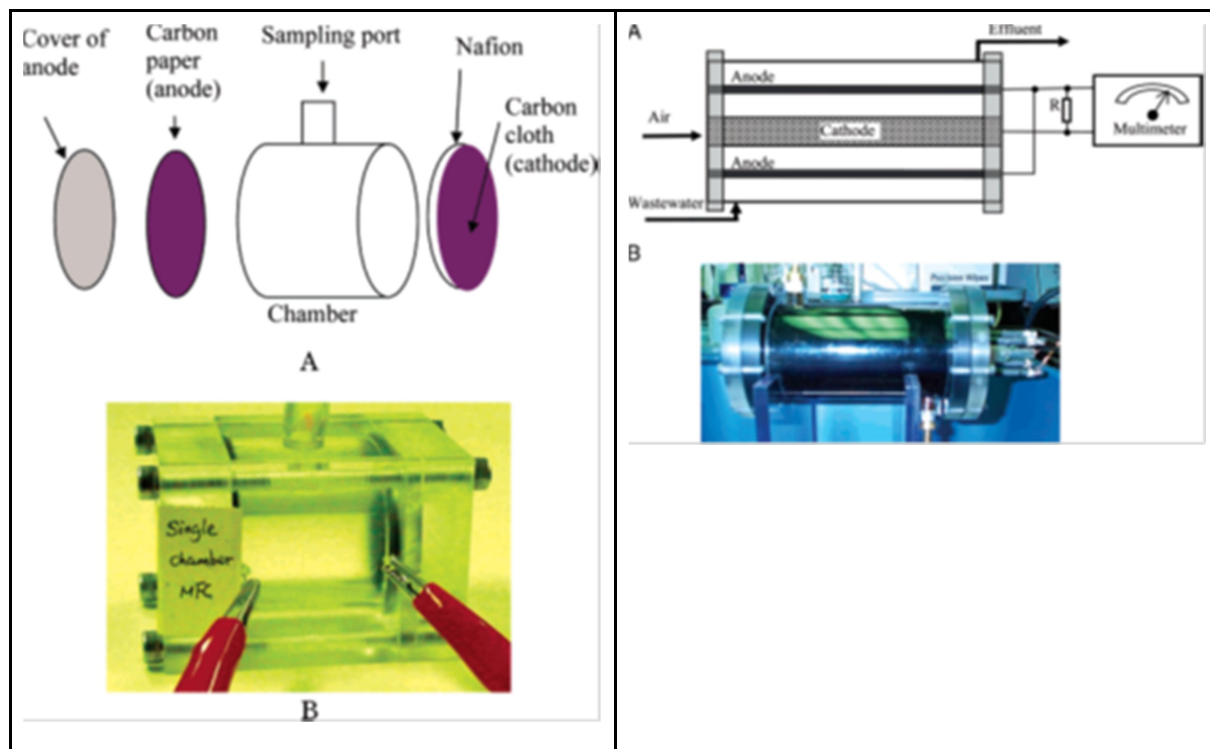


Figura 13 - Diferentes arquiteturas de biocélulas a combustível de uma câmara desenvolvidas pela equipe de Logan. À esquerda, modelo desenvolvido para se avaliar a influência da membrana sobre o desempenho do sistema; à direita, diagrama esquemático e protótipo de biocélula de uma câmara usado para produzir energia a partir de efluente doméstico.

Fonte: LOGAN *et al* (2004, p. 4040; 2004, p. 2881). (17,23)

A grande vantagem que contribuiu para a disseminação desse tipo de arquitetura foi a simplificação do dispositivo por meio da eliminação do compartimento catódico, de modo a permitir o fornecimento contínuo de oxigênio proveniente do ar diretamente sobre a superfície do cátodo. O uso do oxigênio como aceptor de elétrons é muito conveniente em MFCs devido a ausência de custo, alto potencial redox, disponibilidade e sustentabilidade. (125) A reação de redução do oxigênio (ORR) pode ocorrer por mecanismos que envolvem 2 ou 4 elétrons, (126) dependendo das propriedades da superfície do eletrodo e do pH da solução. (127) A cinética da ORR é lenta devido o grande sobrepotencial de redução do oxigênio, sendo a platina um dos catalisadores mais empregados para o favorecimento da reação. (17,23,128) Embora muito útil, os altos custos desse catalisador limitam sua aplicação. Nesse sentido, novos tipos de catalisadores catódicos ou aceptores de elétrons têm sido buscados, como por exemplo, metaloporfirinas de cobalto, (129) metais (Fe^{3+} e Cr^{+6}), (130) óxidos metálicos

(AgO₂ (131) e MnO₂ (9)) e hexacianoferratos de cromo (132) e ferro. (125,133–135) O hexacianoferrato de ferro, (Fe⁺³₄[Fe⁺²(CN)₆]₃), também conhecido como Azul da Prússia (AP), é um composto de coordenação (136) no qual os átomos de Fe⁺³ (alto spin) e Fe⁺² (baixo spin) encontram-se coordenados ao nitrogênio e ao carbono, respectivamente, que tem se mostrado um promissor catalisador da ORR, entre outras propriedades. (137,138) Uma representação da estrutura cristalina do azul da prússia é apresentada na Figura 14.

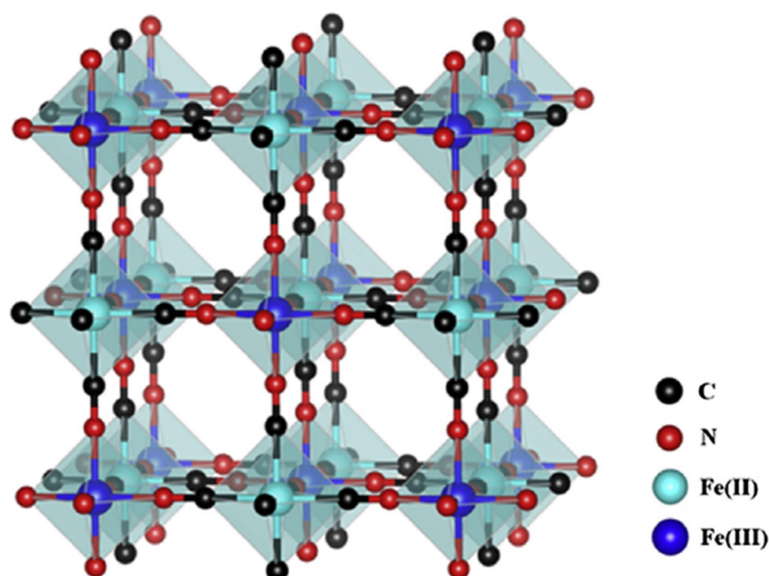


Figura 14 - Representação da estrutura cristalina do azul da prússia, destacando-se o tipo cúbico da célula unitária.

Fonte: YAN *et al* (2016, p. 5137). (139)

Uma das formas de obtenção do azul da prússia é a eletrodeposição sobre superfícies de eletrodos, a partir de soluções ácidas contendo uma mistura de Fe³⁺ e [Fe(CN)₆]³⁻, aplicando-se +0,4 V vs. ECS, que causa a redução dos íons ferricianeto e a consequente formação de um filme. (136,138) Esse filme contém em média 14 moléculas de água e pode ser reduzido a “branco da prússia” ou oxidado a “verde berlim”, dependendo do potencial aplicado. (136,138) Esses análogos apresentam atividade catalítica para a redução de oxigênio e peróxido de hidrogênio, (136–138) bem como para a oxidação desse último. (137)

2.7.3 Outras arquiteturas

As duas arquiteturas anteriormente apresentadas são as mais comuns e delas derivam todos os outros modelos, construídos de acordo com o propósito de aplicação, parâmetros a

serem avaliados e criatividade do grupo de pesquisa. (118). Para finalizar essa revisão, são apresentadas a seguir duas arquiteturas incomuns.

Jia *et al* (15) construíram uma MFC em espiral, que tem como característica a grande área da membrana quando comparada ao volume da biocélula. Segundo os autores, essa arquitetura, além de ser compacta e mais adequada como fonte portátil de energia, reduz a resistência interna e ocasiona um melhor desempenho que o modelo tradicional de duas câmaras. O dispositivo construído é apresentado na Figura 15.

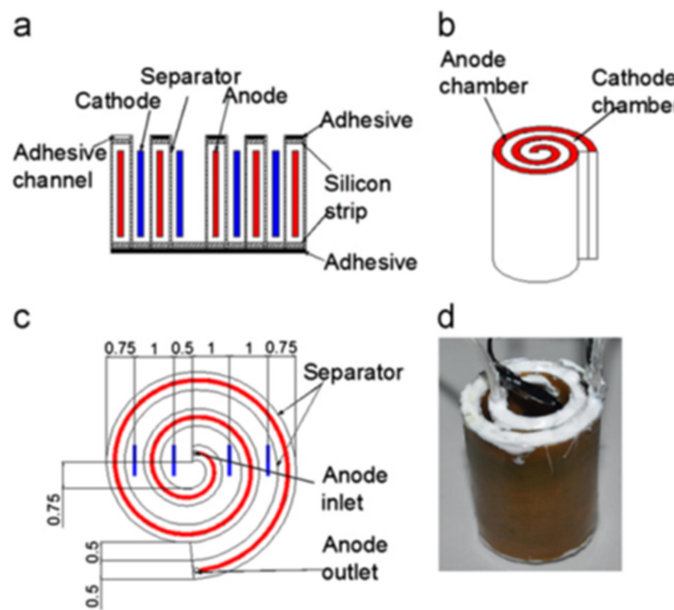


Figura 15 - Diagrama esquemático e fotografia da biocélula a combustível em espiral.
Fonte: JIA *et al* (2013, p. 895). (15)

Sensores ou outros dispositivos requerem o contínuo fornecimento de energia para o seu funcionamento. Quando em locais remotos, sua manutenção pode tornar-se inviável. Por isso, fontes de energia auto-sustentáveis estão sempre sendo desenvolvidas para atender a essa demanda. Uma alternativa é a MFC flutuante proposta por Huang *et al* (Figura 16). (140).

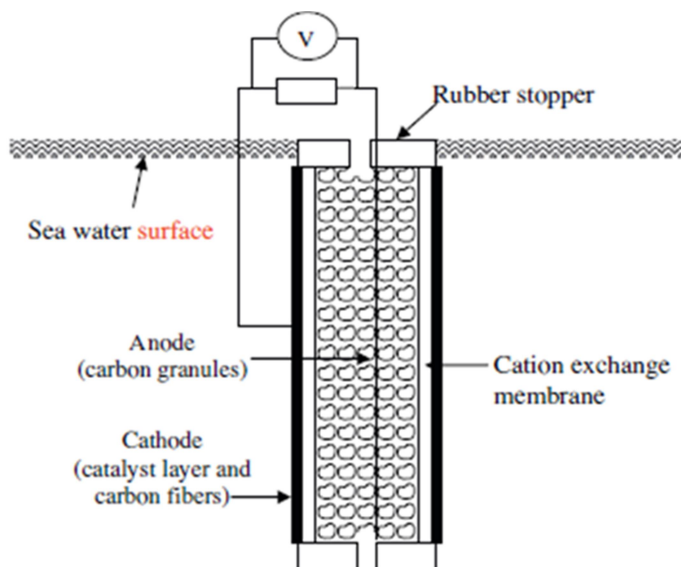


Figura 16 - Diagrama esquemático da biocélula flutuante desenvolvida por Huang *et al.*
 Fonte (HUANG *et al.*, 2012, p.309). (140)

Nesse dispositivo, as rolhas de borracha servem como bóias e para diminuir a entrada de oxigênio no compartimento anódico. Neste, os grânulos de carbono servem como suporte para o crescimento dos micro-organismos, que colonizam todo o compartimento. A corrente é coletada por fios de titânio, que interligam o sistema até o cátodo, revestido por um catalisador de Pt e Ni que reduz o oxigênio dissolvido, completando o sistema. Segundo os autores, esse foi o primeiro trabalho que avaliou esse tipo de biocélula por longo tempo (153 dias) em ambiente marinho, mostrando-se como uma fonte de energia viável para uso em equipamentos de baixo consumo de energia.

Em síntese, apresenta-se na Tabela 1 informações relevantes sobre algumas das biocélulas a combustível citadas nessa revisão de literatura.

Tabela 1 - Características operacionais de algumas MFCs encontradas na literatura.

(continua)

| Micro-organismo / arquitetura | Ânodo | Membrana | Cátodo | Potência | Ref. |
|---|------------------------------|---------------|------------------------|-------------------------|------|
| <i>Geobacter sulfurreducens</i> / 2 câmaras | Au/Cr nano estruturado | Nafion | Au/Cr nano estruturado | 36 mW m ⁻² | (46) |
| <i>Rhodoferrax ferrireducens</i> / 2 câmaras | Grafite | Nafion | Grafite | Não informada | (47) |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> / 2 câmaras | Feltro de carbono | CEM | Feltro de carbono | Não informada | (49) |
| <i>Candida melibiosica</i> / 2 câmaras | Feltro de carbono | Nafion | Feltro de carbono | 640 mW m ⁻² | (11) |
| Cultura mista (lodo ativado anaeróbico) / 2 câmaras | Tecido de carbono | CEM | Tecido de carbono + Pt | 11,3 W m ⁻³ | (51) |
| Cultura mista (esgoto) / 2 câmaras | Tecido de carbono | Nafion | Tecido de carbono + Pt | 2,7 mW m ⁻² | (52) |
| Cultura mista (esgoto) / 2 câmaras | Placa de grafite | CEM (Flemion) | Pt | 2070 mW m ⁻² | (53) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / 2 câmaras | Grafite | Nafion | Grafite | 2 mW m ⁻² | (54) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / 2 câmaras | Feltro de carbono | Nafion | Feltro de carbono | 1500 mW m ⁻² | (55) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / 2 câmaras | Placa de grafite | Nafion | Placa de grafite | 60 mW m ⁻² | (56) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / 2 câmaras | Suporte cerâmico grafitizado | CEM | Papel carbono | 130 mW m ⁻² | (58) |
| <i>Geobacter metallireducens</i> / 2 câmaras | Papel carbono | Nafion | Papel carbono + Pt | 40 mW m ⁻² | (19) |
| Cultura mista (lodo ativado) / 2 câmaras | Bastão de grafite | Nafion | Bastão de grafite | Não informada | (25) |

Tabela 1 - Características operacionais de algumas MFCs encontradas na literatura.

(conclusão)

| Micro-organismo / arquitetura | Ânodo | Membrana | Cátodo | Potência | Ref. |
|--|-------------------------------|----------------|--|-------------------------|-------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / 2 câmaras | Bastão de grafite | Ponte salina | Bastão de grafite | 41 mW m ⁻² | (124) |
| Cultura mista (esgoto) / 1 câmara | Tecido de carbono | Nafion ou PTFE | Tecido de carbono + Pt ou CoTMPP | 480 mW m ⁻² | (129) |
| Cultura mista (esgoto) / 1 câmara | Escova de carbono | Sem membrana | Tecido de carbono + Pt | 658 mW m ⁻² | (130) |
| Cultura mista (esgoto) / 2 câmaras | Grafite granular | Nafion | Carvão ativado + grafeno + azul da prússia | 16 W m ⁻³ | (125) |
| <i>Acetobacter aceti</i> e <i>Gluconobacter roseus</i> / 2 câmaras | Feltro de carbono + quitosana | Nafion | Feltro de carbono + azul da prússia | 3,87 W m ⁻³ | (133) |
| Cultura mista / 1 câmara | Tecido de carbono | Sem membrana | Tecido de carbono + azul da prússia | Não informada | (134) |
| Cultura mista (esgoto) / 2 câmaras | Grafite granular | Nafion | Carvão ativado + polianilina + azul da prússia | 13,12 W m ⁻³ | (135) |
| Cultura mista (esgoto) / 2 câmaras – espiral | Tecido de carbono | CEM | Papel carbono + Pt | 1414 mW m ⁻² | (15) |
| Cultura mista (esgoto) / 2 câmaras | Grafite granular | Nafion | Fibra de carbono + Ni e Pt | 390 mW m ⁻³ | (140) |

Fonte: Do autor.

Nota: CoTMPP = tetrametilfenil porfirina de cobalto.

3 OBJETIVOS

Os objetivos gerais e específicos dessa tese são descritos a seguir.

3.1 GERAIS

Os objetivos gerais desse trabalho foram o planejamento, construção, e caracterização de diferentes MFCs empregando materiais de baixo custo, nova proposta de biocatalisador e uma nova arquitetura, o uso de MFCs como ferramenta didática de ensino, e sua avaliação para obtenção de energia a partir de resíduo industrial.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) elaborar e simplificar biocélulas a combustível de uma ou duas câmaras a partir da utilização de materiais e reagentes de fácil aquisição;
- b) empregar *Saccharomyces cerevisiae* e grãos de kefir como inóculo para a ocorrência das reações metabólicas e geração de corrente;
- c) construir um roteiro de aula prática sobre biocélulas a combustível para uso didático;
- d) avaliar o composto azul da prússia como catalisador catódico em substituição a platina;
- e) demonstrar a possibilidade de geração de energia elétrica utilizando resíduo industrial de cervejaria como inóculo na biocélula de uma câmara desenvolvida;
- f) caracterizar cada uma das biocélulas desenvolvidas por curvas de polarização e de potência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais empregados na construção das biocélulas e os métodos utilizados para caracterização dos sistemas são descritos separadamente para cada uma das três partes que compõem essa tese.

4.1 PRIMEIRA PARTE

Biocélula a combustível de baixo custo como ferramenta de ensino.

4.1.1 Materiais e equipamentos

Minas de grafite comum (HB), com dimensões de 2.0 mm x 10 cm e adquiridas no comércio local foram usadas como eletrodos. Multímetros digitais com resolução de 1 mV \pm 0.5% comprados no comércio local foram utilizados para as medidas de potencial. Medidas prévias apresentaram diferença inferior a 1% nas leituras de potencial entre os diferentes multímetros.

4.1.2 Soluções e reagentes

Todas as soluções foram preparadas usando água destilada. O ânólito consistiu de tampão fosfato de sódio $50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 em salina (cloreto de sódio 0,9%); o católito empregado foi uma solução de ferricianeto de potássio $25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada no mesmo tampão. Para o estudo de inibição enzimática o ânólito utilizado foi tampão citrato $50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em salina. Levedura de padaria liofilizada comercial foi usada com fonte de *S. cerevisiae*, e uma solução estoque de azul de metileno (Vetec, Brasil) foi preparada com a concentração de $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Glicose, frutose e sacarose (Vetec, Brasil) foram usadas como combustível em diferentes experimentos. Os eletrodos foram limpos com uma solução álcool etílico/acetona (1:1 vv^{-1}).

4.1.3 Montagem da biocélula

Dois béqueres de 25 mL foram empregados para a montagem da biocélula a combustível de duas câmaras, composta pelas câmaras anódica e catódica separadas por uma

ponte salina em formato tradicional (tubo de vidro em forma de U, com comprimento entre 10 e 15 cm e 0,4 cm de diâmetro, preenchido com uma solução de 2% de ágar em KCl 1,5 mol L⁻¹). O compartimento catódico foi preenchido com 20 mL da solução do católito.

O compartimento anódico foi preenchido com 20 mL do anólito, 2 mL da solução estoque de azul de metileno e 1 mL de solução de glicose (0,4 g mL⁻¹). Os eletrodos foram inseridos em cada compartimento e conectados aos terminais do multímetro (ponta de prova preta - ânodo; ponta de prova vermelha - cátodo; Figura 17), selecionando-se a faixa de até 2 V de leitura no multímetro. Depois da estabilização, 2 mL de uma suspensão de levedura (previamente preparada pela homogeneização de 0,8 g de levedura com 2 mL do respectivo anólito por 5 minutos) foram adicionados, seguindo-se a leitura de potencial em intervalos de 5 minutos, desde o tempo 0 (imediatamente antes da inoculação da suspensão de levedura), até o final do experimento (70 - 80 minutos, aproximadamente). O anólito foi mantido em repouso durante os experimentos para minimizar a difusão de O₂ na solução, exceto nos estudos da influência do O₂. Para estes experimentos, gás N₂ (Praxair Inc., SP) ou O₂ (atmosférico, empregando uma bomba de aquário) foram borbulhados na câmara anódica desde 30 minutos antes do início do experimento, seguindo-se até o final das medidas. Os dados foram normalizados pela subtração do valor de potencial elétrico no tempo zero dos valores de potencial em cada intervalo de tempo. Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados são apresentados como a média ± desvio-padrão dos valores obtidos, exceto quando especificado. A diferença entre os grupos de experimentos foi avaliada por análise de variância, considerando como significativo um valor de p<0,05.



Figura 17 - Montagem da MFC, mostrando as câmaras anódica (esquerda) e catódica (direita), preenchidas com seus respectivos eletrólitos.

Fonte: Do autor.

4.1.4 Fracionamento celular

A fim de se avaliar a fração celular responsável pela geração de potencial elétrico na biocélula, foi realizado um fracionamento celular para obtenção das frações de membranas e de conteúdo intracelular de levedura. O procedimento para ruptura celular por abrasão foi feito a partir da adaptação do método proposto por Medeiros *et al.* (141) A quantidade de 1,2 g de levedura foi pulverizada em um almofariz de porcelana por 30 minutos e então ressuspensa com 6 mL de tampão fosfato $50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. O homogenato foi centrifugado a 3600 rpm por 10 minutos. A fração sobrenadante foi separada e armazenada em geladeira. A fração contendo membranas e células (*pellet*) foi ressuspensa em tampão fosfato e centrifugada a 3600 rpm por 10 minutos. A ressuspensão e centrifugação do pellet foi feita 3 vezes. Lâminas preparadas com as frações finais (sobrenadante e *pellet* contendo os fragmentos das membranas) foram observadas num microscópio óptico Primo Star (Zeiss, SP, Brasil) com lente objetiva de 40x e ocular de 10x (aumento de 400x) e fotografadas com uma câmera digital Sony Cyber-shot DSC-W710. As frações finais foram usadas como inóculo na biocélula a combustível imediatamente após o término do procedimento de fracionamento celular.

4.1.5 Estudos de polarização

As medidas de polarização foram feitas depois da estabilização dos valores de potencial (cerca de 30 minutos após a adição da suspensão de levedura ao anólito), variando a resistência externa da biocélula de 18 k Ω a 2.2 k Ω com resistores. Medidas empregando soluções contendo diferentes fontes de carbono na concentração de 0,4 g mL⁻¹ (glicose, frutose ou sacarose, como acima), glicose em tampão citrato, glicose saturada com O₂ ou deaerada com N₂ foram feitas para caracterizar a biocélula a combustível, em termos de potência e corrente geradas. Para cada resistor (resistência externa - R_{ext}), o potencial da biocélula foi registrado depois do estabelecimento de um estado pseudo-estacionário (3 - 5 minutos). (4) Densidades de corrente e potência foram calculadas empregando a Lei de Ohm (Equação 10) e Lei de Joule (Equação 11), respectivamente, e os dados foram normalizados pela área geométrica do ânodo determinada com uso de paquímetro. Finalmente, curvas de polarização (E vs. j) e as correspondentes curvas de potência (P vs. j) foram construídas e analisadas.

4.1.6 Aplicação em aula prática de graduação

Por se tratar de um assunto ainda pouco explorado nos cursos de graduação do país, e para verificar a aceitação pelos alunos do estudo de metabolismo celular com auxílio de biocélulas, os experimentos acima descritos de viabilidade celular, inibição por citrato e efeito de diferentes substratos sobre o potencial da biocélula foram desenvolvidos junto à disciplina de Bioquímica do 6º período de Bacharelado em Química da Universidade Federal de Alfenas (15 alunos, duas aulas práticas de 2 h cada). Aos alunos foram disponibilizadas as soluções e materiais necessários para a construção das biocélulas, ficando cada grupo (2 ou 3 alunos) responsável por uma condição diferente. Ao final, os dados foram tabelados na lousa para a construção de gráficos, e auxílio na interpretação e discussão em grupo das seguintes questões:

Questões da 1ª aula prática:

- a) *quais as meias-reações que acontecem nas câmaras anódicas e catódicas?*
- b) *quais as possíveis explicações para a geração de potencial?*
- c) *quais são os mecanismos envolvidos na transferência eletrônica?*
- d) *quais as possíveis aplicações para biocélulas?*

Questões da 2ª aula prática:

- a) *considerando que o potencial seja uma estimativa da atividade metabólica, qual dos açúcares é metabolizado mais rapidamente? Por quê?*
- b) *e qual é metabolizado mais lentamente? Por quê?*
- c) *os grupos 1 e 2 utilizaram o mesmo combustível (glicose), mas tipos diferentes de tampões. Houve diferença nos resultados? Explique as possíveis causas levando em consideração as vias metabólicas.*
- d) *os resultados obtidos estão de acordo com o esperado sob o ponto de vista bioquímico?*
- e) *observe as cores dos béqueres contendo a suspensão contendo o anólito (com leveduras). O que você pode concluir sobre a causa dessa observação?*

A dificuldade apresentada para a resolução das questões da segunda aula prática foi intencional, com a finalidade de estimular os alunos a um maior aprofundamento sobre o tema.

Por fim, os alunos foram convidados a responder as perguntas de um questionário sobre as contribuições que essas aulas práticas trouxeram para o aprendizado. As alternativas para cada pergunta foram: Muito; Pouco; Razoavelmente ou Não.

Perguntas do questionário:

- a) você acha que a prática o ajudou a entender sobre o funcionamento da produção de energia nos seres vivos?*
- b) você acha que a prática acrescentou informações que foram vistas de relance nas aulas teóricas?*
- c) você acha que a prática trouxe informações que não foram vistas nas aulas teóricas?*
- d) você achou a execução da prática difícil?*
- e) você acha que a prática pode ser aplicada em outra área que não a bioquímica?*

4.2 SEGUNDA PARTE

Avaliação do consórcio microbiano kefir como novo biocatalisador anódico em MFC.

4.2.1 Cultivo do kefir e preparação do inóculo

Grãos de kefir foram obtidos em nosso laboratório, no departamento de Bioquímica da Unifal/MG. A amostra de kefir armazenada a -20°C foi descongelada e cultivada continuamente em solução de açúcar mascavo ($5\% \text{ mV}^{-1}$) a 28°C durante 10 dias. O substrato foi renovado a cada dois dias. Depois da reativação, os grãos foram coletados e usados como inóculo na câmara anódica da MFC. O perfil microbiano dos grãos de kefir foi identificado previamente pelo nosso grupo. (103)

4.2.2 Operação da MFC

A MFC de duas câmaras (formato H, Figura 18) consistiu de duas câmaras cilíndricas (tubos Falcon de 50 mL) conectadas por um tubo (3 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro) contendo a ponte salina (2% de ágar em $\text{KCl } 1,5 \text{ mol L}^{-1}$). Bastões de grafite (área geométrica igual a $13,6 \text{ cm}^2$; Carbono Americana, SP, Brasil) previamente polidos com uma lixa até um aspecto especular e enxaguados com água Milli-Q foram usados como ânodo e

como cátodo. O católito consistiu de uma solução de ferricianeto de potássio $25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Uma amostra de 3,0 gramas de grãos de kefir foi assepticamente transferida para 40 mL de anólito (solução de açúcar mascavo a $5\% \text{ mv}^{-1}$, contendo 0,9% de NaCl previamente esterilizada por autoclavagem). Azul de metileno (concentração final de $48 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi usado como mediador. Depois da inoculação, amostras do anólito foram coletadas em períodos fixos (0, 24, 48, 72h) para análises físico-químicas e microbiológicas. A MFC foi operada a temperatura ambiente ($25 - 28^\circ\text{C}$).

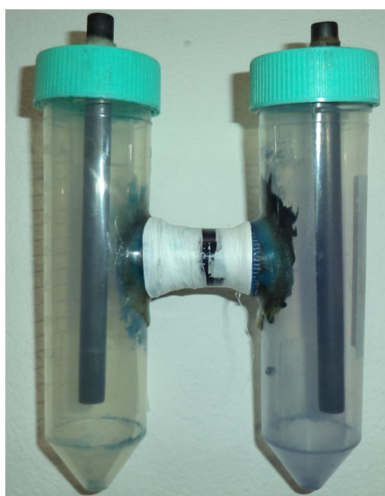


Figura 18 - MFC em formato H empregada na segunda parte do trabalho. Câmaras anódica e catódica, separadas pela ponte salina.

Fonte: Do autor.

4.2.3 Ensaios eletroquímicos

Os ensaios eletroquímicos foram realizados para várias finalidades, como por exemplo, quantificar a resistência interna da biocélula, acompanhar a variação de potencial elétrico ao longo da fermentação e para avaliar a produção de mediadores endógenos pelas cepas do kefir. Um potenciostato-galvanostato PG-39MCSV (Omni Metra Instr. Cientif. Ltda, RJ, Brasil) foi usado em todas as medidas eletroquímicas (voltametria linear - LSV, voltametria cíclica - CV e interrupção de corrente - CI), as quais foram conduzidas em intervalos fixos de fermentação (0, 24, 48 e 72h). A variação do potencial de circuito aberto (OCP) com o tempo foi monitorada usando um multímetro digital Protek 506 True RMS. Curvas de polarização foram feitas por LSV em uma velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} entre o maior valor de OCP obtido, 0,4 V, e 0 V, usando a configuração de dois eletrodos. O

eletrodo de trabalho foi conectado ao ânodo e o contraeletrodo e eletrodo de referência foram ligados ao cátodo. As curvas de polarização foram obtidas tanto com o anólito sem agitação quanto sob agitação a 100 rpm usando um agitador magnético (Fisatom, modelo 753A). A partir das curvas de polarização (E vs. j), curvas de potência (P vs. j) foram calculadas usando a Equação 11.

Os valores de corrente e potência foram normalizados pela área superficial do ânodo. Os experimentos de voltametria cíclica foram feitos com o anólito sem agitação, com uma configuração de três eletrodos composta por um eletrodo de trabalho de disco de platina (1 mm de diâmetro), eletrodo de referência de Ag/AgCl, e um fio de platina como contraeletrodo (0,05 x 1,5 cm). A varredura foi feita no intervalo de -800 mV a +1400 mV (vs. Ag/AgCl) a 50 mVs^{-1} para avaliar o estado redox do azul de metileno e a presença de possíveis mediadores produzidos pelo kefir. A relação entre corrente de pico e velocidade de varredura conduzida por voltametria cíclica ($10 - 400 \text{ mV s}^{-1}$) foi expressa como os valores médios de 5 medidas. O método de interrupção de corrente (9) foi usado para avaliar a resistência interna da MFC operando em condições estacionárias e com uma corrente estável (I_0) antes da interrupção. Para essas medidas o circuito elétrico foi aberto, anulando a corrente e provocando um aumento correspondente no potencial elétrico (E). A resistência ôhmica foi obtida a partir do valor médio de 4 medidas, através da Lei de Ohm ($R = E/I_0$). O intervalo de tempo de registro de corrente e potencial foi de 50 μs .

4.2.4. Absorção molecular

A análise espectrofotométrica do anólito foi realizada a fim de se avaliar o estado redox do azul de metileno ao longo da fermentação e para detectar se as cepas do kefir produziram mediadores endógenos. O espectro na região ultravioleta e visível (comprimento de onda entre 200 e 800 nm e resolução de 2 nanômetros) foi registrado em um espectrofotômetro Biochrom Libra S22 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK), empregando-se uma cubeta de quartzo de 10 mm. A varredura espectral foi feita nos tempos de fermentação de 0, 24, 48 e 72h, com uma alíquota do anólito diluída 1:10 em água.

4.2.5 Determinações físico-químicas

As medidas físico-químicas de pH, acidez total titulável, viscosidade e quantidade total de açúcares foram realizadas para acompanhar as mudanças ocorridas ao longo da

fermentação, tanto na presença quanto na ausência do mediador, para assim estabelecer uma correlação entre a potência gerada e essas propriedades. As medidas de pH foram realizadas usando um pHmetro Del Lab (modelo DLA-pH, SP, Brasil) a 25°C. A acidez total titulável foi determinada potenciométricamente, usando uma solução padronizada de NaOH de concentração $19 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para titulação e ponto final em pH 8,1. (142) O consumo de carboidratos pelos micro-organismos foi determinado pela quantificação dos açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), (143) após a hidrólise da sacarose em meio ácido para produção de glicose e frutose. A viscosidade absoluta foi medida usando um viscosímetro rotacional (Quimis, modelo Q860A21, SP, Brasil), *spindle* número 0 e velocidade de 60 rpm. Os valores das medidas foram anotados depois de 3 minutos da operação do *spindle*, feito pelo menos com 4 replicatas.

4.2.6 Cromatografia em papel

A cromatografia em papel foi realizada para se avaliar o perfil dos açúcares formados ao longo da fermentação. Cromatografia descendente uni-dimensional em papel foi feita usando papel Whatman nº 1 para avaliar o perfil dos carboidratos durante o metabolismo do kefir até 72h. Uma amostra de 4 µL do caldo fermentado foi retirada nos intervalos de 0, 24, 48 e 72h, e aplicada ao papel. A eluição foi feita por 24h com um sistema solvente composto por acetato de etila: isopropanol: água (6:3:1, vv⁻¹). (144) As bandas dos açúcares foram visualizadas usando o revelador anilina-difenilamina-ácido fosfórico seguido por aquecimento a 100°C em estufa. (145) Sacarose, glicose e frutose foram reconhecidos por comparação com seus respectivos padrões.

4.2.7 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias

O perfil de da curva de crescimento microbiano foi construído a partir da contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) a fim de se identificar em qual fase da curva de crescimento se observa maior geração de potência. Diluições seriadas decimais (100–1000 µL) de 10^1 – 10^4 foram preparadas a partir de amostras do anólito coletadas após 0, 24, 48 e 72h de fermentação em tubos de 1,5 mL contendo salina estéril. A contagem total de bactérias e leveduras foi feita por cultivo em placas, com o plaqueamento em duplicata de 100 µL das diluições 10^3 e 10^4 em placas de Petri contendo ágar extrato de malte a 2%. Depois da inoculação, as placas foram incubadas a 28°C por 48-72h e as unidades formadoras de colônia

(log CFU mL⁻¹) foram quantificadas como o produto da contagem de colônias x 10^{d+1}, sendo “d” o fator de diluição da amostra. (146,147)

4.3 TERCEIRA PARTE

Desenvolvimento de novo modelo de arquitetura de uma câmara e estudo do catalisador catódico.

4.3.1 Materiais

Malha de carbono (Torayca[®], Toray Carbon Fibers America Inc., Califórnia, EUA) foi usada na construção do ânodo e do cátodo (geometria apresentada na Figura 19, com área geométrica de 2,27 cm² e 4 cm², respectivamente). No cátodo foi eletrodepositado um filme de azul da prússia, conforme procedimento descrito no item 4.3.3. Conexões hidráulicas de ½ polegada adquiridas no comércio local foram utilizadas para a montagem da MFC. Complementarmente, foram utilizadas fita crepe e cola de cianoacrilato (TekBond[®]) para fixação dos eletrodos, uma ponte salina contendo 2% de agar em KCl 1,5 mol L⁻¹, e fita vedadora de PTFE para vedação das juntas.

4.3.2 Soluções e reagentes

As soluções foram preparadas usando água destilada. O anólito consistiu de tampão fosfato de sódio 50 x 10⁻³ mol L⁻¹ pH 7,0 em salina (cloreto de sódio 0,9%). Levedura de padaria liofilizada comercial foi usada como fonte de *S. cerevisiae* para o funcionamento do sistema. Nos testes de aplicação, utilizou-se uma amostra de levedura cervejeira obtida durante a etapa de fermentação, cedida pela Cervejaria Senhorita Ltda, Paraguaçu, MG. A solução estoque de azul de metileno (Vetec, Brasil) foi preparada com concentração de 10 x 10⁻³ mol L⁻¹. Glicose (Vetec, Brasil) foi usada como combustível nos experimentos. Quando não em uso, o compartimento anódico era mantido preenchido com o anólito e o cátodo vedado com filme plástico para evitar desidratação da ponte salina.

A solução para eletrodeposição do filme de azul da prússia foi preparada contendo FeCl₃.6H₂O (Dinâmica, SP, Brasil) e K₃Fe[CN]₆ (Neon, Brasil) a 2 x 10⁻³ mol L⁻¹, em KCl e HCl 0,1 mol L⁻¹. Solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ e HCl 10 x 10⁻³ mol L⁻¹ foi usada nos estudos

voltamétricos. Por fim, alíquotas de peróxido de hidrogênio (Sigma) foram empregadas em diferentes experimentos.

4.3.3 Eletrodeposição

A eletrodeposição do azul da prússia no cátodo foi feita a partir do método proposto por Karyakin e colaboradores, (148) com pequenas modificações, em uma célula eletroquímica de 3 eletrodos, composta pelo eletrodo de trabalho (malha de carbono), Ag/AgCl como eletrodo de referência e um bastão de grafite (Carbono Americana, SP, Brasil) como contraeletrodo. O eletrodo de trabalho foi imerso na solução eletrolítica, seguindo-se a aplicação de um potencial constante de 0,4 V vs. Ag/AgCl por 600s. Depois da eletrodeposição, o filme foi ativado na mesma solução usada para a formação do filme, com a ciclagem de potencial entre -0,3 e 0,6 V a 50 mVs⁻¹. O eletrodo assim preparado foi utilizado para a construção da MFC e, em alguns casos, passou por um processo de reativação que consistiu na imersão em uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 1 hora, seguida por lavagem com água destilada.

4.3.4 Estudos eletroquímicos

Um potenciostato-galvanostato PG-39MCSV (Omni Metra Instr. Cientif. Ltda, RJ, Brasil) foi usado em experimentos de voltametria cíclica e eletrólise. Os experimentos de voltametria cíclica foram feitos com o eletrólito suporte KCl 0,1 mol L⁻¹ + HCl 10 x 10⁻³ mol L⁻¹ e configuração de três eletrodos composta pelo eletrodo de trabalho de malha de carbono modificado com azul da prússia, eletrodo de referência de Ag/AgCl, e um bastão de grafite como contraeletrodo. A varredura foi feita em diferentes intervalos de potencial e velocidades de varredura, dependendo do teste realizado. A relação entre corrente de pico e velocidade de varredura conduzida por voltametria cíclica (10 - 400 mVs⁻¹) foi expressa como os valores médios de 5 medidas. Os estudos eletrolíticos foram realizados com a mesma configuração acima, em que o eletrodo de trabalho foi submetido a correntes catódicas (-2,5 x 10⁻³ A) por determinado tempo, seguindo-se então a avaliação de I_{pa} e I_{pc} através de voltametria cíclica.

As medidas de polarização foram monitoradas com um multímetro digital DT 830B, depois da estabilização dos valores de potencial (cerca de 30 minutos após a adição da suspensão de levedura ao anólito), e variando-se a resistência externa da biocélula de 100 kΩ a 1 kΩ com resistores. Para cada resistor, o potencial da biocélula foi registrado após 30s e

60s. Depois do registro, o resistor era retirado do circuito, seguindo-se um período de 5 minutos para a ligação do próximo resistor. As medidas foram feitas em duplicata, exceto quando especificado. Os valores de corrente e potência foram calculados empregando-se a Lei de Ohm (Equação 10) e Lei de Joule (Equação 11), respectivamente, e os dados foram normalizados pela área geométrica do ânodo. Finalmente, curvas de polarização (E vs. j) e as correspondentes curvas de potência (P vs. j) foram construídas e analisadas.

4.3.5 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva

As mudanças morfológicas e de composição química ocorridas com os eletrodos (cátodos) antes e após a eletrodeposição do azul da prússia foi feita por MEV e EDS, respectivamente. Para a obtenção de micrografias do material foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura Leica-Zeiss modelo LEO 440, operando com uma voltagem de aceleração de 20 kV. As amostras foram dispersas sobre uma fita condutora dupla face colada a um suporte de cobre e recobertas com uma camada de ouro usando um metalizador Bal-Tec MD20. As imagens foram obtidas a partir dos elétrons secundários. A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi usada para mapear os elementos químicos presentes na amostra com um analisador Oxford 7060.

4.3.6 Construção da MFC de uma câmara

A MFC de uma câmara foi construída empregando-se materiais de baixo custo facilmente encontrados no comércio local. A Figura 19 apresenta o formato dos eletrodos, as conexões hidráulicas utilizadas e o passo a passo para a construção da MFC.

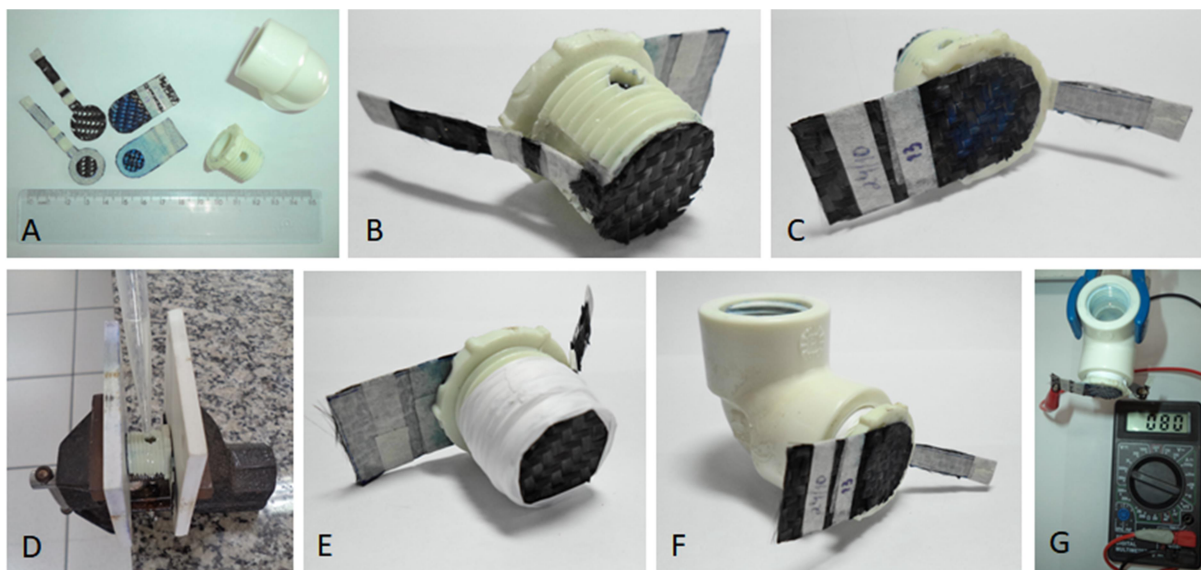


Figura 19 - Frente/verso dos eletrodos e conexões hidráulicas usadas na construção da MFC (A). Passo a passo do processo de montagem: colagem dos eletrodos ao niple (ânodo, B; cátodo, C); prensagem e adição do ágar/KCl (D); vedação após solidificação do ágar (E); rosqueamento ao Joelho de 90° (F); medição de OCP da MFC recém montada, contendo o anólito salina/PBS (G).

Fonte: Do autor.

O tecido de carbono empregado como eletrodo foi lavado com acetona e em seguida com água destilada. Após a secagem, ao tecido foi colada uma fita crepe para possibilitar o recorte mais preciso. Foi utilizada cola de cianoacrilato entre as duas fitas mais estreitas dos eletrodos a fim de evitar o problema de capilaridade. O formato final dos eletrodos pode ser visto na Figura 19 A. Em seguida, os eletrodos foram colados com cianoacrilato às extremidades de um *niple* (2 cm de comprimento x 1,7 cm de diâmetro) previamente adaptado com um orifício central e um corte na rosca (Figura 19 (B e C)). O conjunto foi prensado (para evitar vazamento) e através do orifício central foi adicionado o ágar/KCl até o preenchimento total do volume interno. Após o resfriamento e solidificação do ágar, a MFC foi cuidadosamente vedada com fita de PTFE (veda-rosca) (Figura 19 E) e rosqueada em um Joelho de 90°, que serviu como compartimento anódico (Figura 19 F). O custo dos componentes para a construção de uma MFC nessas dimensões, no mercado brasileiro, é de R\$ 0,70 para os eletrodos, R\$ 2,00 para as conexões hidráulicas e R\$ 0,20 para a ponte salina, de modo que o custo atual de fabricação foi menor que US\$ 1,00 (cotação da época – Jan/2018).

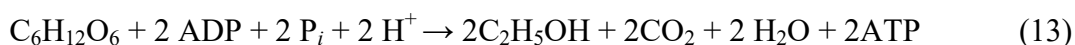
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRIMEIRA PARTE

Nesta seção, os resultados obtidos na primeira parte do trabalho, “Biocélula a combustível de baixo custo como ferramenta de ensino”, são apresentados e discutidos.

5.1.1 Mecanismo de funcionamento

O princípio de operação de uma biocélula a combustível é baseado na produção de energia por micro-organismos a partir das reações metabólicas de oxidação da matéria orgânica. As Equações 12 e 13 representam a oxidação da glicose em condições aeróbias e anaeróbias, respectivamente: (39,40)



Para que ocorra a conversão de energia química em energia elétrica a partir das reações acima em uma célula galvânica, é necessário que os agentes oxidantes e redutores estejam fisicamente separados por um eletrólito, de modo a permitir o fluxo de elétrons através do circuito externo para completar as reações. As Equações 12 e 13 mostram que, sob condições ideais, a oxidação aeróbica da glicose produz cerca de 16 vezes mais ATP que o processo anaeróbio. Entretanto, a presença de oxigênio na câmara anódica inibe a geração de eletricidade (9) e reduz a eficiência do sistema, (17,19) porque o O₂ age como acceptor final dos elétrons. Embora alguns pesquisadores tenham mostrado certas biocélulas a combustível inoculadas com *S. cerevisiae* com capacidade de transferir elétrons para os eletrodos sem a necessidade de mediadores, (89,149) a presença deste pode melhorar o desempenho do sistema e simplificar a interpretação dos resultados pelo estudante. De acordo com Babanova *et al*, (11) estes compostos podem permear a célula e serem reduzidos pelos elétrons liberados pelo catabolismo; na forma reduzida, os mediadores saem da célula e chegam até o eletrodo (ânodo) onde sofrem oxidação, promovendo dessa forma a transferência de carga. Esse processo gera a diferença de potencial observada nesses dispositivos.

Embora o potencial formal do azul de metileno seja influenciado pelo pH da solução, (61,150) as mudanças observadas nesse trabalho não podem ser atribuídas a esse mecanismo. Se o funcionamento da biocélula fosse governado apenas pela acidificação do meio causada pelo metabolismo microbiano, o potencial do ânodo seria deslocado para valores menos negativos, (151) o que reduziria o potencial da célula medido pelo multímetro ($E_{\text{cel}} = E_{\text{cat}} - E_{\text{an}}$). Testes conduzidos com a biocélula a combustível em que o anólito foi acidificado com HCl (pH final 4,5) embasam esse fato, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 2 - Variação do potencial da biocélula a combustível (teste) causada pela acidificação do anólito com HCl

| Tempo / min | Teste | | Controle | |
|-------------|-------|------|----------|------|
| | E/mV | pH | E/mV | pH |
| 0 | 49 | 6,98 | 55 | 6,97 |
| 5 | 53* | 6,98 | 57 | 6,98 |
| 10 | 54 | 6,89 | 50 | 7,00 |
| 15 | 55 | 6,80 | 50** | 7,00 |
| 20 | 55 | 6,72 | 413 | 6,71 |
| 25 | 55 | 6,64 | 426 | 6,44 |
| 30 | 55 | 6,56 | 429 | 6,17 |
| 35 | 54 | 6,47 | 429 | 6,05 |
| 40 | 54 | 6,37 | 429 | 5,95 |
| 45 | 54 | 6,28 | 429 | 5,85 |
| 50 | 54 | 6,18 | 429 | 5,78 |
| 55 | 53 | 6,06 | 431 | 5,72 |
| 60 | 53 | 5,91 | 432 | 5,69 |
| 65 | 52 | 5,76 | 432 | 5,65 |
| 70 | 51 | 5,53 | 435 | 5,60 |
| 75 | 50 | 5,20 | 436 | 5,58 |
| 80 | 49 | 4,46 | 437 | 5,54 |

Fonte: Do autor.

Notas: *início da acidificação com HCl; **adição de *S. cerevisiae*.

Em anos recentes, alguns trabalhos têm apresentado a importância do azul de metileno como mediador exógeno de transferência eletrônica em biocélulas a combustível usando *S. cerevisiae*. (59) A esse respeito, a Figura 20 apresenta os resultados obtidos com a biocélula a combustível, demonstrando o efeito da presença do mediador no meio reacional. Na ausência

do azul de metileno, a variação de potencial medida não ultrapassou 25 mV, enquanto o potencial subiu continuamente até mais de 400 mV até 50 minutos na presença do corante.

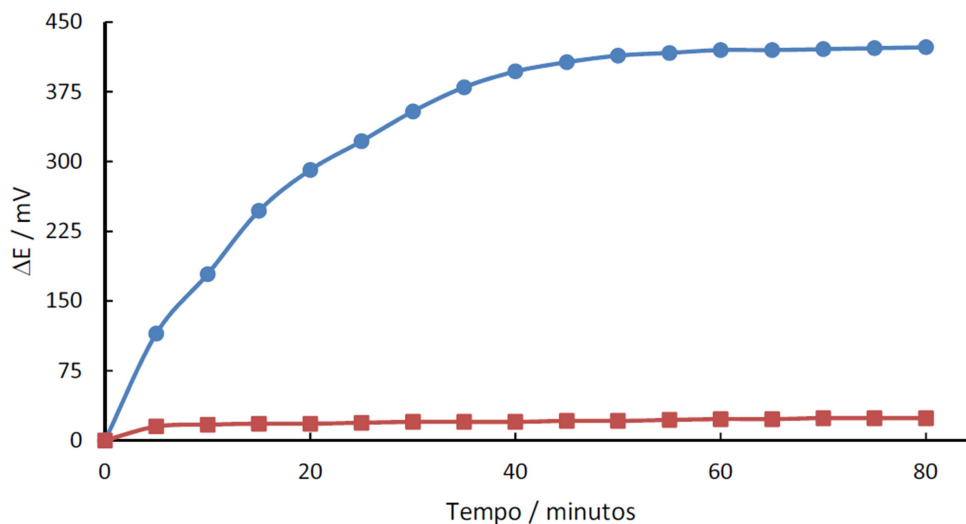


Figura 20 - Efeito da presença (●) e ausência (■) do mediador azul de metileno na geração de voltagem da biocélula a combustível.

Fonte: Do autor.

Sugestões de experimentos para ilustrar o uso da biocélula a combustível como ferramenta didática no ensino de Química e Bioquímica.

Dada a simplicidade da arquitetura e implementação da biocélula a combustível descrita nessa parte do trabalho, as diferentes condições experimentais propostas a seguir podem ser facilmente testadas no período de uma aula experimental, para avaliar mudanças químicas e bioquímicas causadas pela influência de inóculos, substratos, agentes inibitórios e viabilidade celular.

5.1.2 Efeito da concentração do inóculo e de diferentes substratos

A levedura de padaria *S. cerevisiae* é um micro-organismo muito atrativo para propósitos educacionais, uma vez que é inofensivo para o corpo humano, tem um baixo custo, é fácil de encontrar, cultivar e armazenar, e apresenta um crescimento rápido. Além disso, *S. cerevisiae* é capaz de oxidar diferentes substratos (89,90) e, pelo menos para o período de uma experiência comum em sala de aula (50 - 60 min), não há necessidade de condições assépticas para os materiais e reagentes.

Para testar o efeito da concentração do inóculo, quantidades apropriadas de levedura foram hidratadas com o anólito para obter as concentrações do micro-organismo de 8, 20, 32 e 42 mg mL⁻¹ na câmara anódica. A Figura 21 mostra as variações de potencial obtidas após 80 minutos de experiência usando glicose como fonte de carbono.

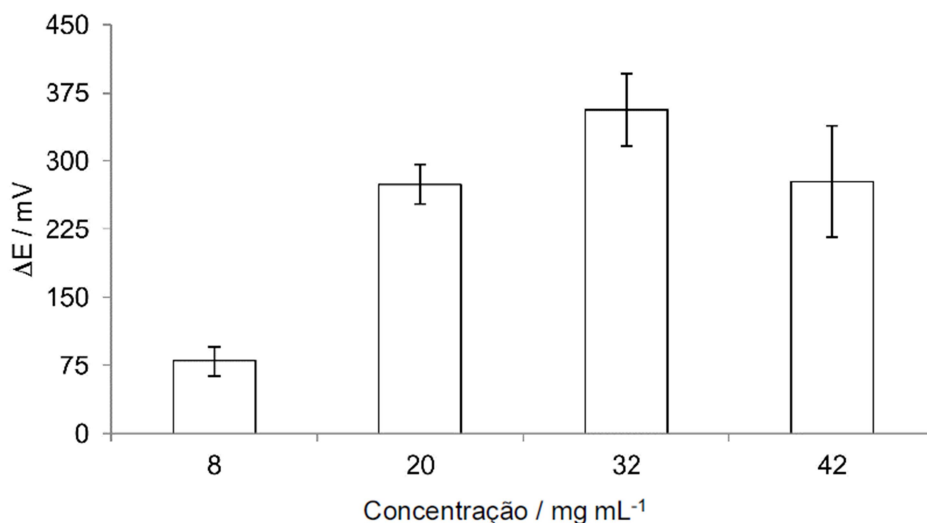


Figura 21 - Mudanças na voltagem da biocélula obtida pela oxidação da glicose em diferentes concentrações de levedura (média ± SE).

Fonte: Do autor.

Os dados mostrados na Figura 21 sugerem um valor de 32 mg mL⁻¹ como a concentração de levedura mais adequada ao experimento. Além disso, esta quantidade foi capaz de descolorir o azul de metileno da mesma maneira que a maior concentração avaliada no experimento. Os valores de potenciais observados na Figura 21 foram semelhantes aos obtidos em outros estudos, (3,55,90) apesar de uma maior faixa de concentração de inóculo relatada (1-150 mg mL⁻¹).

Embora *S. cerevisiae* seja capaz de metabolizar diferentes carboidratos, a glicose é certamente a mais utilizada. (3,54–56,89,90,152) Para comparar o desempenho do sistema que utiliza glicose com sistemas que utilizam outras fontes de carbono, frutose e sacarose foram avaliadas como substratos alternativos. Para estes experimentos, a massa de frutose e sacarose foi calculada de modo a assegurar a mesma quantidade de carbono. Os resultados mostraram uma variação de potencial de 380 ± 16 mV para frutose, 354 ± 6 mV para glicose e 342 ± 20 mV para sacarose (ANOVA, p <0,05) após 80 minutos de experimento, sugerindo a possibilidade de uso de qualquer uma dessas fontes de carbono na biocélula a combustível.

As maiores variações de potencial registradas para frutose indicam que o metabolismo desse carboidrato favoreceu a transferência eletrônica na biocélula a combustível em

comparação com a glicose ou sacarose. No entanto, é bem conhecido que *S. cerevisiae* metaboliza preferencialmente a glicose, quando em misturas contendo ambos os substratos, (153,154) devido a alguns mecanismos conhecidos, tais como o efeito *Crabtree* e o seqüestro de fosfato.

Durante a glicólise, o acúmulo de hexoses-fosfato na célula altera o metabolismo mitocondrial de produção de energia, mudando a taxa de consumo de O₂ mitocondrial. A α -D-glicose-6-fosfato causa um aumento dessa taxa e a β -D-frutose 1, 6-bisfosfato uma diminuição. (155,156) Entretanto, de acordo com Rosas-Lemus *et al* (155) o efeito inibitório da β -D-frutose 1, 6-bisfosfato prevalece. Esse composto inibe a respiração celular agindo diretamente sobre os complexos III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, (156) deslocando o metabolismo para a via fermentativa e favorecendo dessa forma o efeito *Crabtree*. (155–158) Esse efeito consiste em um mecanismo regulatório (*upregulation*) da glicólise caracterizado como uma supressão da respiração pela fermentação, causado por um excesso de substrato mesmo na presença de oxigênio. (158,159) O segundo mecanismo está relacionado à capacidade do excesso de frutose sequestrar fosfato na forma de ATP na via glicolítica, reduzindo o efeito inibitório da PFK-1. (39,40)

5.1.3 Efeito do oxigênio e do citrato

S. cerevisiae é um micro-organismo aeróbico facultativo, em que o piruvato derivado do processo de fermentação é oxidado a CO₂ e H₂O na presença de oxigênio, pelo ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória. Em condições anaeróbicas, no entanto, o piruvato é convertido em etanol pela ação de algumas enzimas tais como piruvato descarboxilase, álcool e aldeído desidrogenase. (39,40,160) A presença de oxigênio inibe a geração de eletricidade devido à competição com o mediador pelos elétrons gerados.

A influência do oxigênio sobre a produção de eletricidade foi avaliada em duplicata e em diferentes condições. Os resultados apresentaram os valores médios de variação de voltagem (ΔE) de 367 ± 11 mV para a biocélula a combustível controle (sem agitação), 287 ± 1 mV para a biocélula a combustível anaeróbia (sob fluxo de N₂ ao longo de todo o experimento) e 184 ± 2 mV para a biocélula a combustível aeróbia (sob fluxo de ar). No último caso, o azul de metileno reduzido pelo metabolismo microbiano foi reoxidado pela molécula de oxigênio, interrompendo a transferência de carga para a superfície do eletrodo e, assim, reduzindo a variação de potencial. (90) As condições estritamente anaeróbicas mostraram um desempenho intermediário em comparação com as outras duas biocélulas a

combustível. Uma possível explicação reside no fato de que uma pequena quantidade de oxigênio é essencial para a síntese de esteróis e ácidos graxos insaturados necessários ao crescimento da *S. cerevisiae*. (161) Portanto, o oxigênio presente na biocélula a combustível usada como controle garantiu o equilíbrio adequado entre o crescimento da levedura e a redução do azul de metileno necessária para a geração de potencial. (8,90) Com a continuidade das reações metabólicas, o meio torna-se anaeróbico devido ao consumo de O_2 e à produção de CO_2 , como evidenciado pela descoloração do mediador.

A redução da voltagem observada em biocélulas a combustível sob oxigenação sugeriu a possibilidade de seu uso como ferramenta de ensino para avaliação de compostos inibidores da via glicolítica, como por exemplo citrato, um conhecido inibidor da PFK-1. Para o estudo do efeito inibitório causado pelo citrato, o tampão fosfato na câmara anódica foi substituído por tampão citrato de mesmo pH e concentração, conforme descrito na metodologia. Os resultados apresentados na Figura 22 indicam que o citrato foi capaz de diminuir a voltagem da biocélula a combustível em torno de 55% (ANOVA, $p < 0,05$) após 80 minutos, com valores de 148 ± 27 mV para o sistema com citrato, em comparação com o controle (336 ± 23 mV).

Estes resultados mostram que a resposta do sistema é dependente da atividade regulatória enzimática dos micro-organismos, abrindo a possibilidade de outras aplicações tais como o desenvolvimento de biosensores. (162)

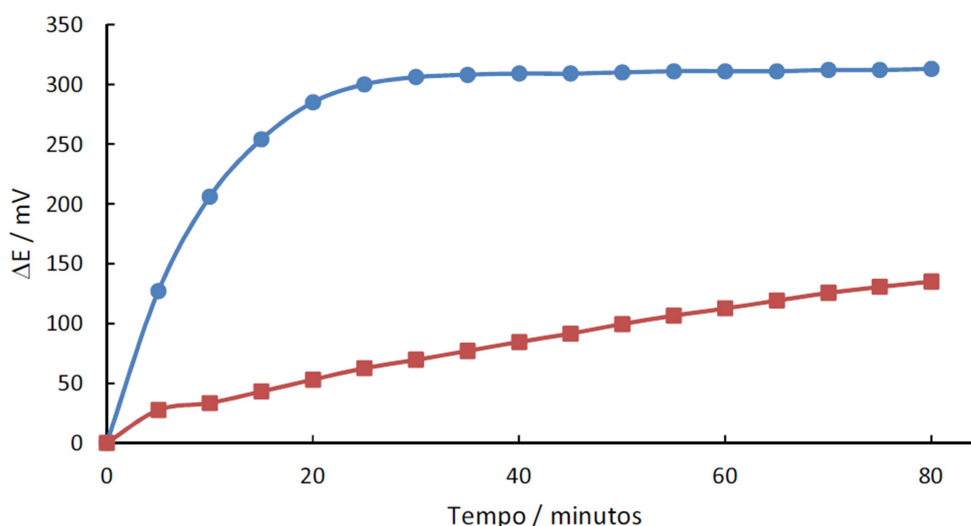


Figura 22 - Efeito do tampão citrato (■) comparado ao tampão fosfato (●) sobre a mudança de potencial na biocélula a combustível, usando glicose como fonte de carbono.

Fonte: Do autor.

Os pontos de controle da via glicolítica pelo citrato podem ser vistos na Figura 23. Durante a glicólise em eucariotos, as enzimas hexoquinase, PFK-1 e piruvato quinase catalisam reações que são praticamente irreversíveis, tendo um importante papel regulatório. (39,40) A atividade enzimática pode ser controlada primariamente por fornecimento de substrato, ação hormonal, regulação alostérica ou modificação covalente. (39,40) Por exemplo, altos níveis de ATP na célula inibem alostericamente a PFK-1, através da ligação a sítios regulatórios específicos, reduzindo sua afinidade pelo substrato β -D-frutose 6-fosfato. O citrato, sendo um intermediário do ciclo do ácido cítrico, é um sinalizador das necessidades energéticas da célula. Altos níveis de citrato sinalizam alta disponibilidade de energia química na forma de moléculas de ATP, inibindo a ação da PFK-1 pelo aumento do efeito inibitório causado pelo ATP. (39,40) A hexoquinase catalisa a primeira reação da glicólise, produzindo α -D-glicose 6-fosfato. Por outro lado, a inibição da PFK-1 leva a um aumento na concentração de β -D-frutose 6-fosfato e α -D-glicose 6-fosfato, que diminui a ação enzimática da hexoquinase. Em outras palavras, o citrato promove uma regulação indireta (*downregulation*) sobre a atividade da hexoquinase.

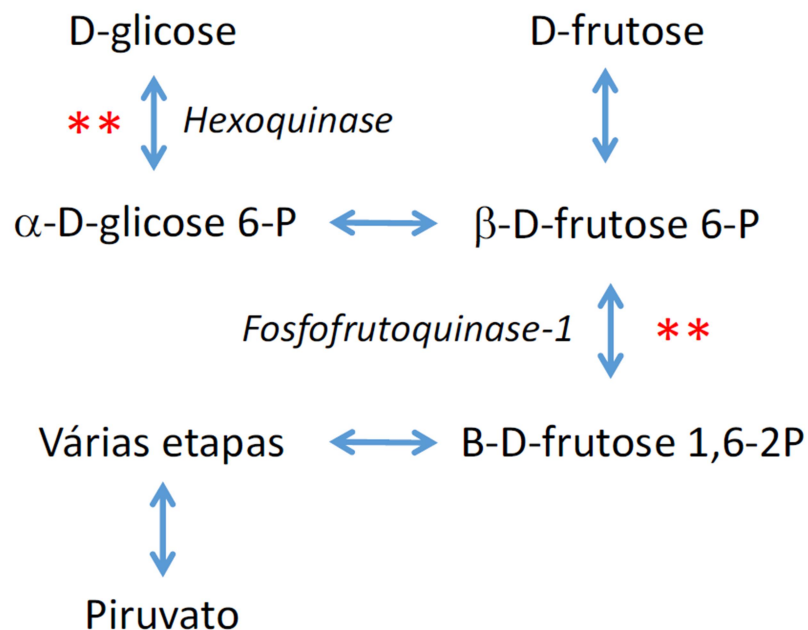


Figura 23 - Representação da via glicolítica da conversão de glicose e frutose a piruvato, destacando as enzimas com importante papel regulatório e pontos de inibição (**) por citrato. P = fosfato; P₂ = bisfosfato.

Fonte: adaptado de *Roche Biochemical Pathways*.(160)

5.1.4 Fração celular responsável pela geração de eletricidade

Células vivas e inativadas por calor úmido foram usadas para estudar o efeito da viabilidade celular na produção de voltagem da biocélula a combustível. O desempenho do sistema inoculado com células vivas (controle) mostrou uma diferença de potencial $\Delta E = 317 \pm 49$ mV depois de 70 minutos, enquanto o sistema com células inativadas apresentou $\Delta E = 29 \pm 21$ mV. A inativação da suspensão de levedura (0,8g de levedura em 2 mL de anólito) foi realizada por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Resultados semelhantes foram obtidos usando-se água em ebulição para inativação celular, o que facilita a aplicação do ensaio em laboratório escolar. No fim desse experimento, a completa redução do azul de metileno, caracterizada pelo desaparecimento da coloração azul do meio, foi observada para o sistema com células vivas. Na biocélula a combustível inoculada com leveduras inativadas, não se observou nenhuma mudança de coloração do meio e houve a decantação de células fortemente coradas de azul, indicando sua inviabilidade celular. (163)

Alguns autores atribuem a resposta elétrica desses sistemas a compostos confinados na superfície da membrana celular, (89,149) enquanto outros afirmam que as enzimas intracelulares são as responsáveis pela variação de potencial nas biocélulas a combustível. (164) A fim de localizar a fração celular responsável pelo potencial gerado pelo sistema, fragmentos de membranas e conteúdo intracelular foram fracionados antes dos ensaios. Depois desse procedimento, a ressuspensão do *pellet* revelou a presença de poucas células viáveis (Figura 24 C) e uma grande quantidade de fragmentos, enquanto a fração do sobrenadante não apresentou células, tal como observado na Figura 24 B.

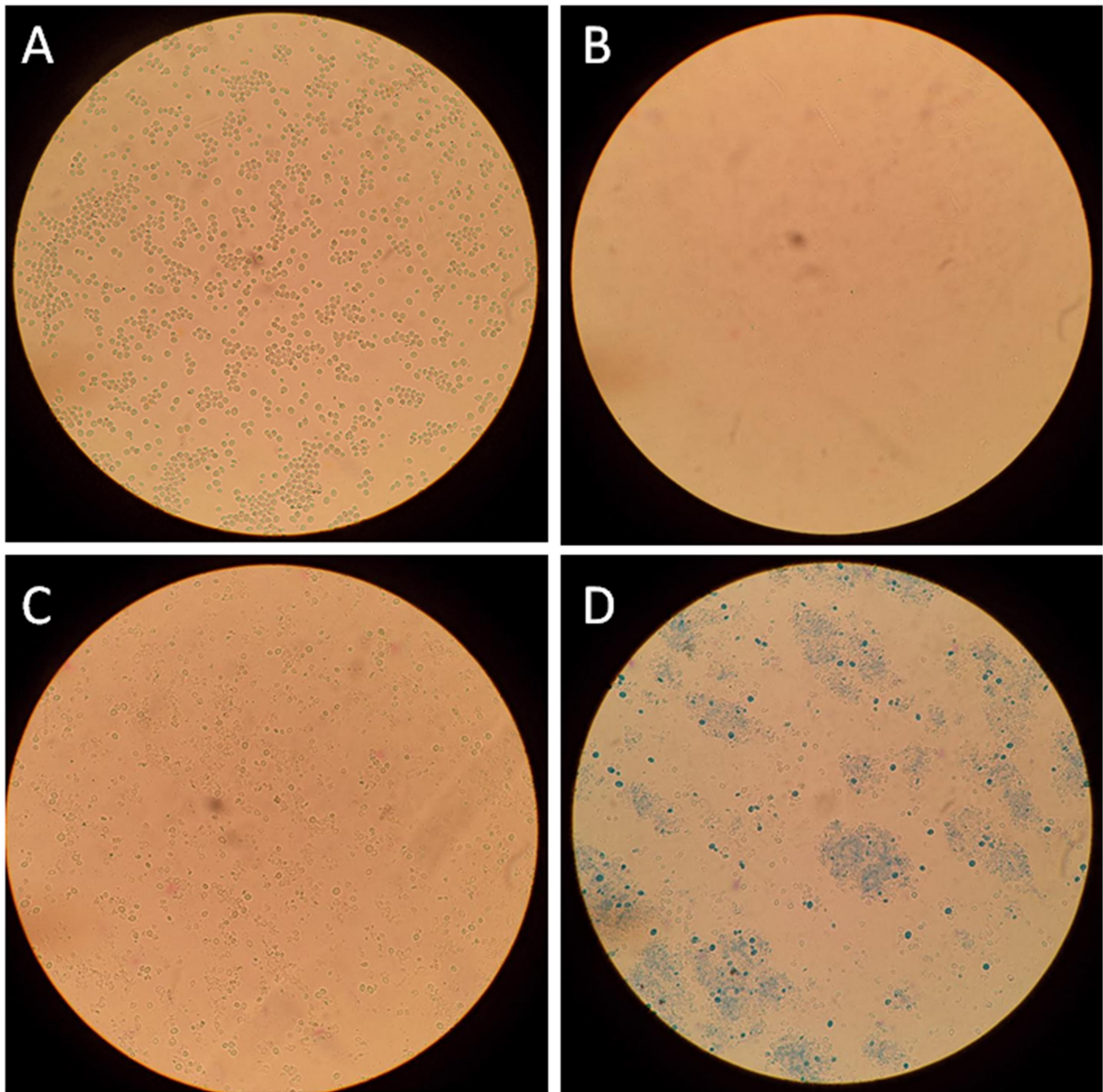


Figura 24 - Micrografias (aumento de 400x) de lâminas preparadas com células intactas de *S. cerevisiae* (A) e com os produtos do fracionamento celular: sobrenadante (B) e fragmentos de membranas (C). Membranas e células coradas pelo azul de metileno, obtidas no final do experimento da biocélula a combustível inoculada com os fragmentos (D).

Fonte: Do autor.

As frações finais (sobrenadante e *pellet*) foram usadas como inóculo para a biocélula a combustível. Os resultados apresentados na Figura 25 revelaram apenas uma pequena mudança no potencial obtido com o *pellet* (isto é, fragmentos celulares), descartando a presença de compostos confinados à superfície responsáveis pela redução do azul de metileno, nas condições avaliadas.

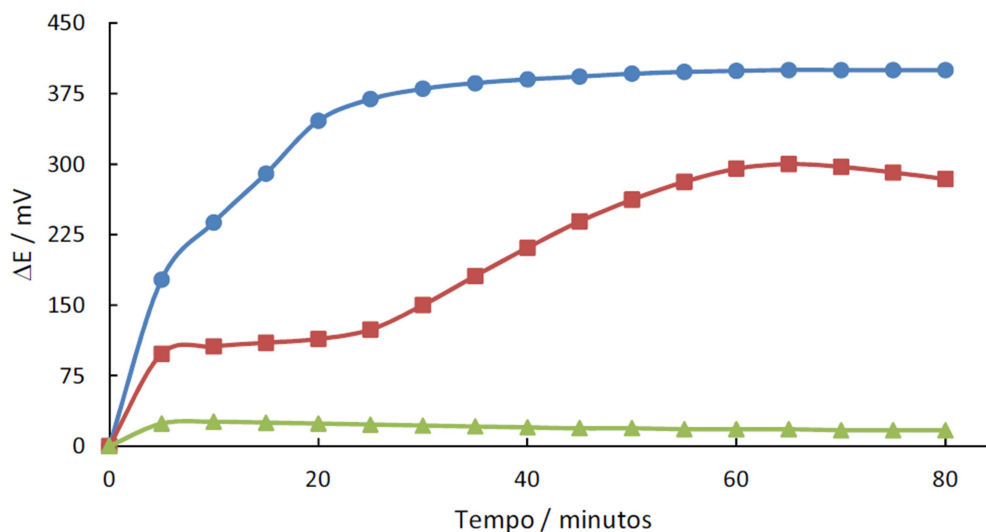


Figura 25 - Efeito dos fragmentos celulares e do conteúdo intracelular sobre a produção de voltagem pela biocélula a combustível. Amostras de levedura (controle – ●), sobrenadante (■) e de fragmentos de membranas (▲) foram usadas como inóculo.

Fonte: Do autor.

Entretanto, a adição do sobrenadante ao compartimento anódico causou um aumento no potencial da biocélula, confirmando o efeito catalítico previamente apresentado por Sayed *et al.* (164) Este resultado pode estar relacionado às reações redox do azul de metileno catalisadas por enzimas, como descrito por Babanova *et al.* (11) De fato, enquanto a câmara anódica do controle apresentou a formação de bolhas e descoloração do azul de metileno durante a fermentação do açúcar, o sistema inoculado com o sobrenadante apresentou apenas a descoloração do corante, e o sistema inoculado com os fragmentos celulares não apresentou descoloração nem a formação de bolhas (Figura 26). Assim, a descoloração do azul de metileno parece estar relacionada à capacidade das enzimas em reduzir o mediador. Quando comparado ao grupo controle, a diminuição nos valores de voltagem observada com o sobrenadante pode estar relacionada a perdas ocorridas durante o procedimento de fracionamento, bem como à perda de parte da maquinaria enzimática essencial à síntese de proteínas, necessária para manter o funcionamento da via glicolítica.

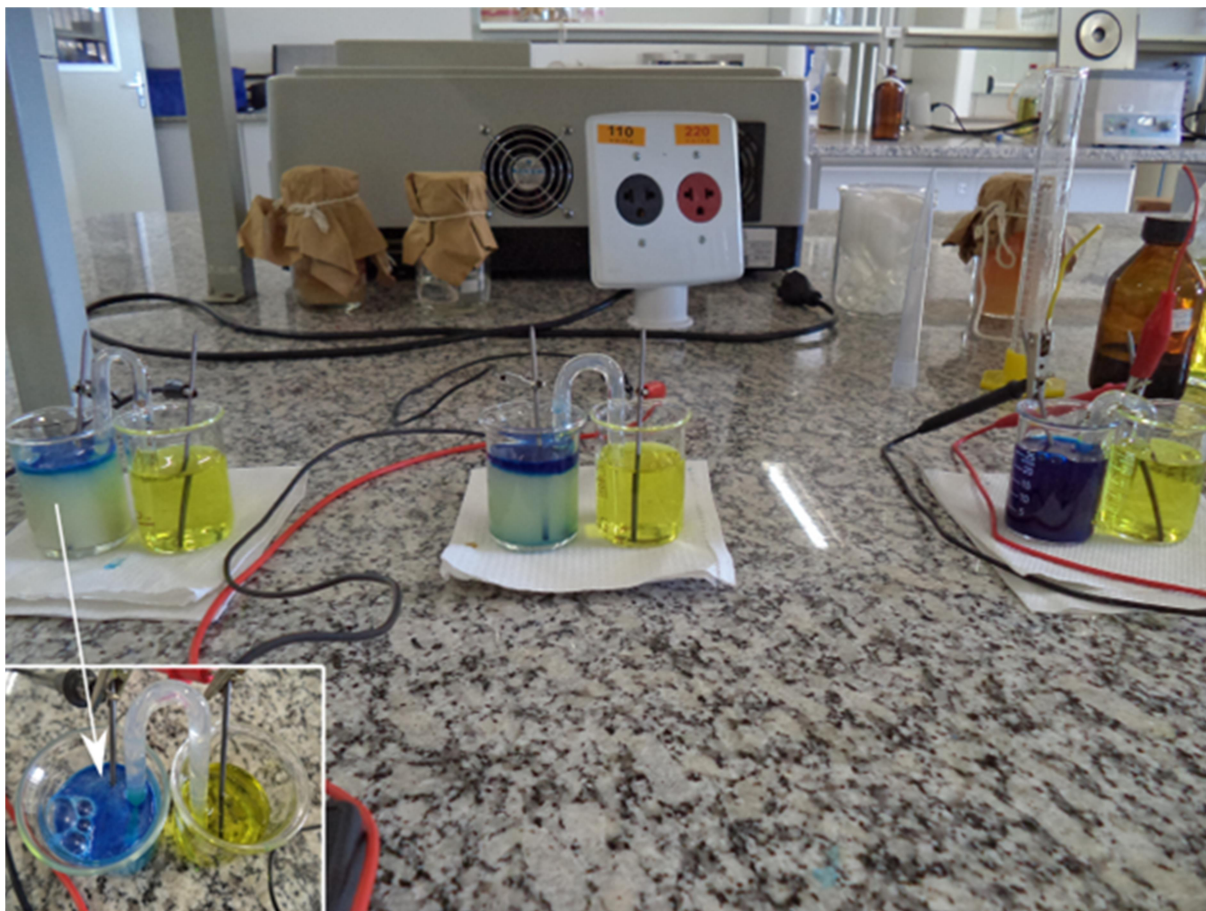


Figura 26 - Biocélulas a combustível operando com diferentes inóculos. Da esquerda para a direita: controle, sobrenadante e fragmentos de membranas (*pellet*). No detalhe, a seta mostra a formação de bolhas no grupo controle.

Fonte: Do autor.

5.1.5 Caracterização da biocélula a combustível

A potência gerada por uma biocélula a combustível é um dos parâmetros mais comuns usados para avaliar seu desempenho. Mudando a resistência externa, um novo valor de potencial elétrico é obtido e a corrente elétrica é calculada pela Lei de Ohm. (9) Esse método clássico para construção de curvas de polarização foi escolhido nesse estudo, mas os dados podem também ser obtidos por outros métodos. (4,9,106) A partir dos dados de voltagem e corrente, curvas de polarização (E vs. j) e curvas de potência (P vs. j) podem ser construídas, em que a corrente I é geralmente normalizada pela área do ânodo, a fim de permitir a comparação com diferentes dispositivos. A Figura 27 apresenta a caracterização da biocélula a combustível através de curvas de polarização e potência sob diferentes condições experimentais (fontes de carboidrato, influência do O_2). Nessa representação gráfica, o ponto de máximo na curva de potência representa o limite da potência gerada, e permite estimar a resistência interna da biocélula a combustível, (9), como descrito na seção 2.3.

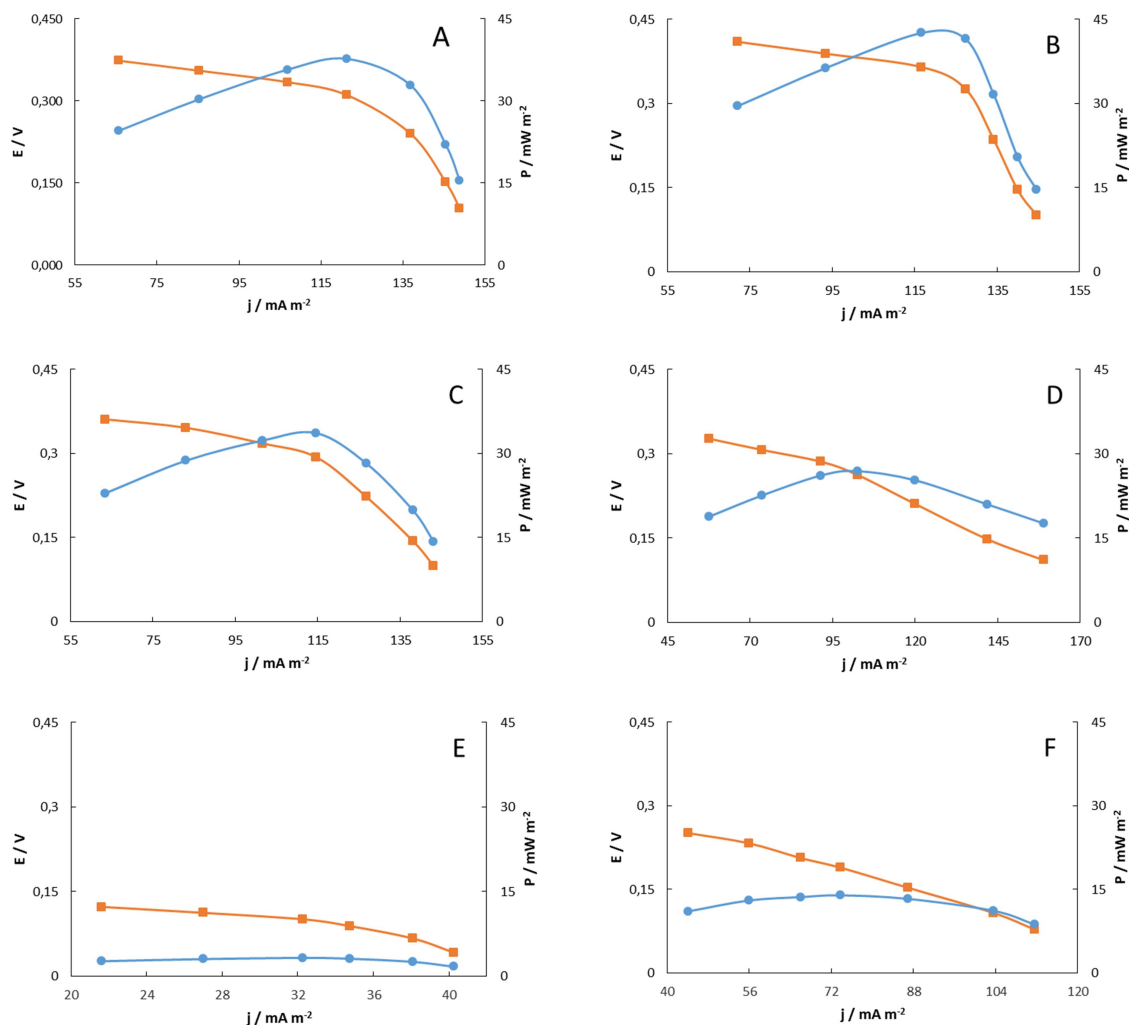


Figura 27 - Curvas de polarização (■) e densidade de potência (●) da biocélula a combustível, obtida usando resistores na faixa de 18 kΩ a 2.2 kΩ. Os carboidratos empregados foram: A – glicose, B – frutose, C – sacarose, D – glicose (em tampão citrato), E – glicose, (aeróbico, por saturação com O₂), F – glicose (anaeróbico, por saturação com N₂).

Fonte: Do autor.

A partir das curvas de polarização, pode-se observar uma queda mais acentuada do potencial em maiores densidades de corrente nos sistemas contendo glicose (Figura 27 A) e frutose (Figura 27 B). Essa queda pode ser atribuída a um efeito de transferência de massa, isto é, uma redução do potencial causada pelo maior fluxo de reagentes e produtos, (4,9) decorrentes da metabolização preferencial desses açúcares pela levedura. (153,154)

Uma menor influência decorrente do efeito de transferência de massa foi encontrada nas outras condições testadas (sacarose, citrato, O₂). Em ordem decrescente, os máximos nas curvas de potência encontrados para as diferentes fontes de carbono foram $41 \pm 0,3 \text{ mW m}^{-2}$ (frutose, Figura 27 B), $38 \pm 1,0 \text{ mW m}^{-2}$ (glicose, Figura 27 A) e $34 \pm 0,5 \text{ mW m}^{-2}$ (sacarose, Figura 27 C). As outras condições testadas reforçam a constatação dos efeitos inibitórios do citrato e do oxigênio, obtendo-se, para o citrato $27 \pm 0,1 \text{ mW m}^{-2}$ (Figura 27 D), desaeração

com N_2 $14 \pm 0,2 \text{ mW m}^{-2}$ (Figura 27 F) e O_2 saturado $3,3 \pm 0,3 \text{ mW m}^{-2}$ (Figura 27 E). Os valores de pico das curvas de polarização obtidas nas Figuras 27 A-C estão de acordo com os valores compilados por Hubenova e Mitov (151) para biocélulas a combustível contendo *S. cerevisiae* e azul de metileno. Ao considerar os materiais de baixo custo utilizados, a ausência de catalisadores metálicos (Pt) e a simplicidade da arquitetura proposta, (37) o valor alcançado reforça a robustez do sistema para uso como ferramenta de ensino sobre biocélulas a combustível e química verde.

5.1.6 Resultado da aplicação em aula prática

Os resultados obtidos com a aplicação do questionário descrito na seção 4.1.6 são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados quantitativos do questionário aplicado.

| Questões | Muito | Pouco | Razoavelmente | Não |
|----------|-------|-------|---------------|-----|
| a | 14 | 0 | 1 | 0 |
| b | 12 | 2 | 1 | 0 |
| c | 6 | 7 | 2 | 0 |
| d | 0 | 0 | 0 | 15 |
| e | 8 | 3 | 4 | 0 |

Fonte: Do autor.

Como um todo, e ainda que preliminarmente, esses resultados sugerem que 1) o uso de biocélulas auxiliou na compreensão do metabolismo celular (questões 1 e 2), 2) que os alunos não tiveram dificuldade para a execução da aula prática (questão 4), e que a abordagem teórica das biocélulas a combustível deve ser melhor explorada para maior compreensão de seus princípios e aplicações (questões 3 e 5).

Ao repensar a aplicação do tema para o Ensino Médio, algumas adaptações foram sugeridas frente a uma redução ainda maior de custos e seleção de reagentes encontrados no comércio local, já testadas em bancada:

- substituição de solução de ferricianeto de potássio como católito por água oxigenada 10 volumes (3%);
- aquisição de azul de metileno em farmácia (1%, 30 mL);
- substituição de ágar para ponte salina por um chumaço delgado de algodão hidrófilo embebido em solução salina;
- solução salina composta por sal de cozinha comum ao invés de cloreto de potássio.

5.1.7 Conclusão parcial

Nessa parte do trabalho foi avaliada a construção e caracterização de uma biocélula a combustível para o ensino de Química e Bioquímica, utilizando materiais de baixo custo (arquitetura de duas câmaras, levedura de padaria e eletrodos de grafite). Entre as vantagens do uso da biocélula a combustível apresentada pode-se destacar a utilização de reagentes não tóxicos ou de baixa toxicidade (azul de metileno, glicose, tampão fosfato e ferricianeto de potássio) e a utilização de *S. cerevisiae*, um micro-organismo de fácil obtenção e amplamente estudado, comprovando a hipótese i.

Os efeitos de diferentes substratos, inibidores, viabilidade celular e fração celular responsável pela geração de potencial observado na biocélula a combustível foram avaliados, mostrando que a resposta elétrica da biocélula é uma função da atividade metabólica dos micro-organismos, o que comprova a hipótese ii. Os experimentos são simples e acessíveis, tornando a biocélula a combustível didaticamente interessante para o ensino de Química e Bioquímica e atraindo a atenção de jovens estudantes (futuros pesquisadores) para novas fontes de energia renováveis.

Os resultados oriundos da 1ª parte deste trabalho foram publicados no periódico *Green Chemistry Letters and Reviews* (v. 10:1, p. 32-41, 2017 - APÊNDICE A), com uma adaptação de seu conjunto classificada em 2º lugar na primeira edição do Prêmio Nacional de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular Bayardo Baptista Torres e publicada no periódico *Revista de Ensino de Bioquímica* (v. 15, Esp / 2017, 155-161 - APÊNDICE B). Complementarmente, um desenho experimental sobre o tema “biocélulas a combustível” foi aplicado durante as atividades de Estágio Supervisionado junto aos alunos do 6º período do Curso de Química da UNIFAL-MG – APÊNDICE C, passando a integrar o conjunto de aulas práticas de Bioquímica na Unifal/MG também para outras turmas.

5.2 SEGUNDA PARTE

Nesta seção, os resultados obtidos na segunda parte do trabalho, “Avaliação do consórcio microbiano kefir como novo biocatalisador anódico em MFC”, são apresentados e discutidos.

5.2.1 Curvas de potência e polarização

Curvas de potência e polarização obtidas para a MFC com kefir como biocatalisador anódico são mostradas nas Figuras 28, 29 e 30. De acordo com Logan *et al*, (4) embora a arquitetura em forma “H” produza baixas densidades de potência, seu uso é útil para avaliação de novos tipos de comunidades microbianas, como visado nesse trabalho. Além disso, a eficiência e baixo custo do ferricianeto de potássio como acceptor de elétrons no compartimento catódico quando comparada a catalisadores de platina (4) justifica seu uso como católito na MFC. (11,26,55,84,165)

Na Figura 28 (A e B) são apresentadas as curvas de potência e polarização obtidas para a MFC sem a presença de nenhum mediador de transferência de carga exógeno, em diferentes tempos de fermentação e velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} . Sem a presença de azul de metileno como mediador eletroquímico, a potência obtida foi muito baixa (Figura 28 A). A potência máxima obtida sem o uso de azul de metileno foi $2,7 \text{ mW m}^{-2}$ após 48h de fermentação. Esse valor é próximo daquele obtido por Sayed *et al* (89) com uma MFC sem mediadores inoculada com *S. cerevisiae*, levedura também encontrada nas amostras de kefir. (103) Os autores (89) atribuem esses resultados à adesão das células à superfície do ânodo, responsáveis pela transferência eletrônica por meio de compostos confinados à superfície celular. Essa afirmação pode consistir uma possível explicação para a baixa geração de energia pelo kefir na MFC sem a presença de mediadores.

Baseado nesses resultados, o mediador azul de metileno foi utilizado para melhorar a transferência eletrônica entre as células microbianas e o eletrodo. Esse mediador redox foi escolhido devido sua vasta aplicabilidade em MFC, como previamente reportado. (11,24,54,58)

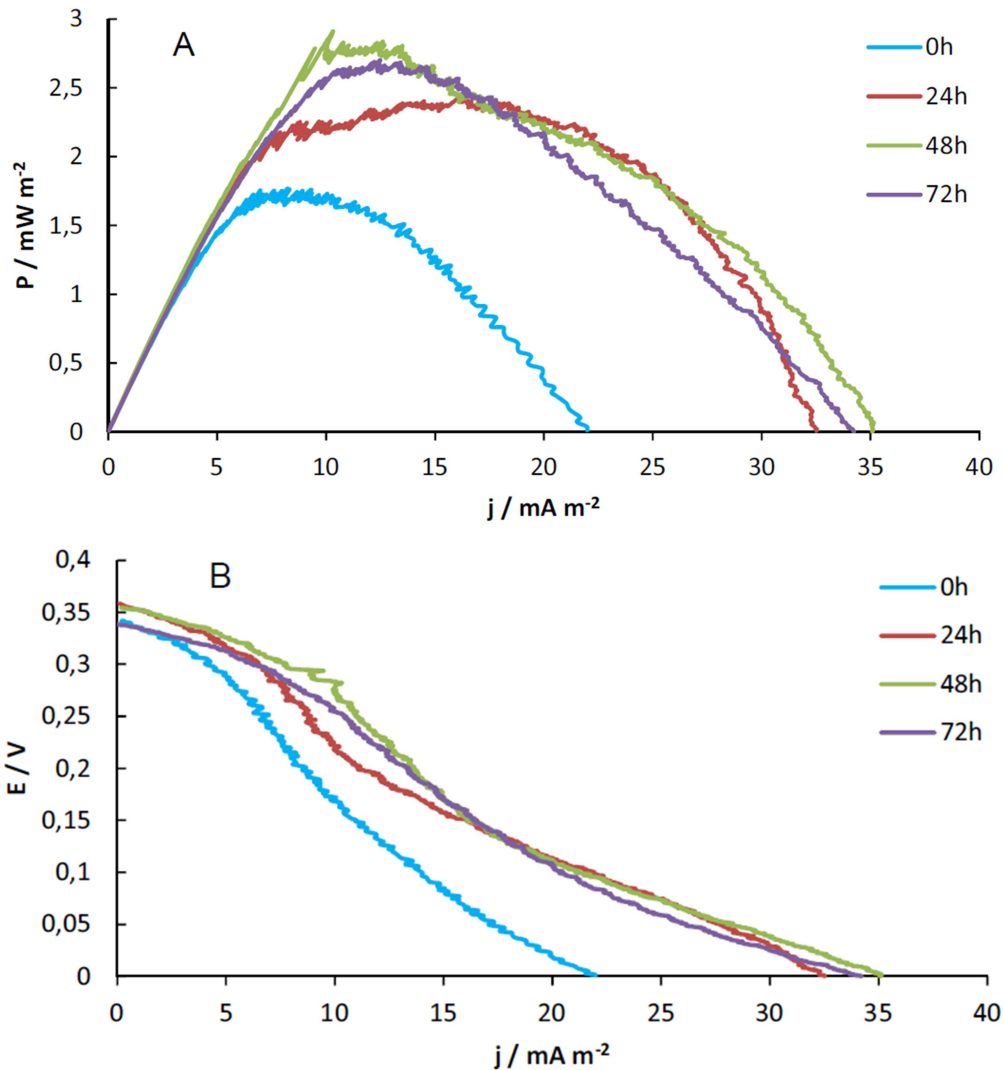


Figura 28 - Curvas de densidade de potência (A) e polarização (B) obtidas por LSV a 1 mV s⁻¹ em intervalos fixos de tempo, sem a presença do mediador azul de metileno.

Fonte: Do autor.

Quando no meio fermentativo, os grãos do consórcio de kefir decantam. Assim, comparou-se as curvas de polarização com o anólito em repouso e sob agitação magnética a 100 rpm. As Figuras 29 e 30 mostram as curvas de potência e polarização obtidas sem agitação e com a agitação do anólito, respectivamente. Mesmo sob agitação de 100 rpm, as curvas de polarização apresentam uma limitação de transferência de massa em maiores densidades de corrente (Figura 30 B). (4) Por outro lado, quando a agitação não foi usada, tanto as curvas de potência quanto de polarização (Figuras 29 A e B, respectivamente) apresentaram o chamado efeito *power overshoot* (28,106,166) ao longo de 72h de operação.

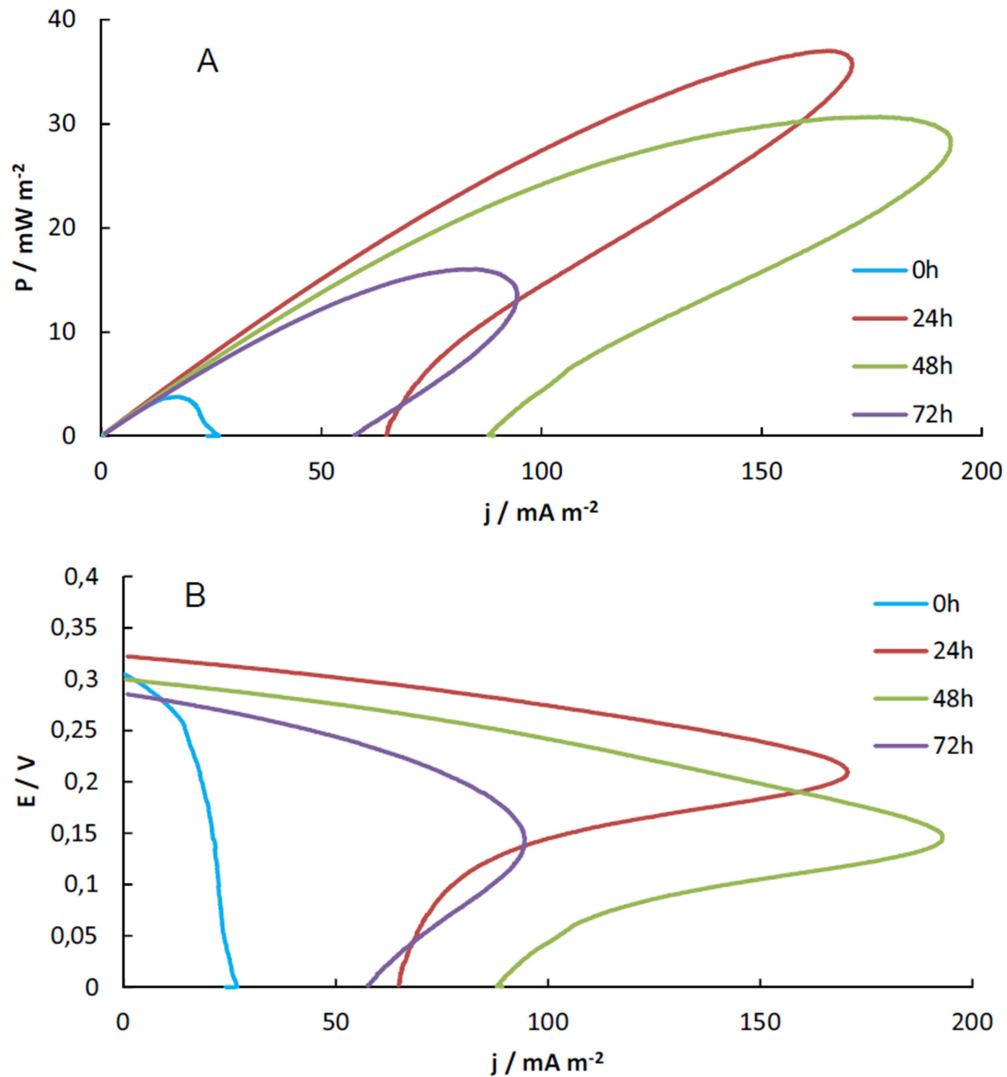


Figura 29 - Curvas de densidade de potência (A) e polarização (B) obtidas por LSV a 1 mV s^{-1} na presença de azul de metileno ($0,48 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), sem agitação do anólito.

Fonte: Do autor.

O efeito *power overshoot* é caracterizado por uma queda repentina nos valores de corrente e potencial observada nas curvas de potência e polarização em altas densidades de corrente. (106) Embora seja um problema comum encontrado em estudos de polarização das MFCs, suas causas não são completamente compreendidas. Parece haver um consenso de que se trata de um fenômeno anódico, (28,167,168) ocasionado por diferentes fatores, como por exemplo, depleção elétrica e iônica, (28) resistência à transferência eletrônica extracelular, (167) desenvolvimento de biofilmes anódicos e condições de operação, (28) taxa de amostragem (28,106) e limitações de transporte de massa. (165,169)

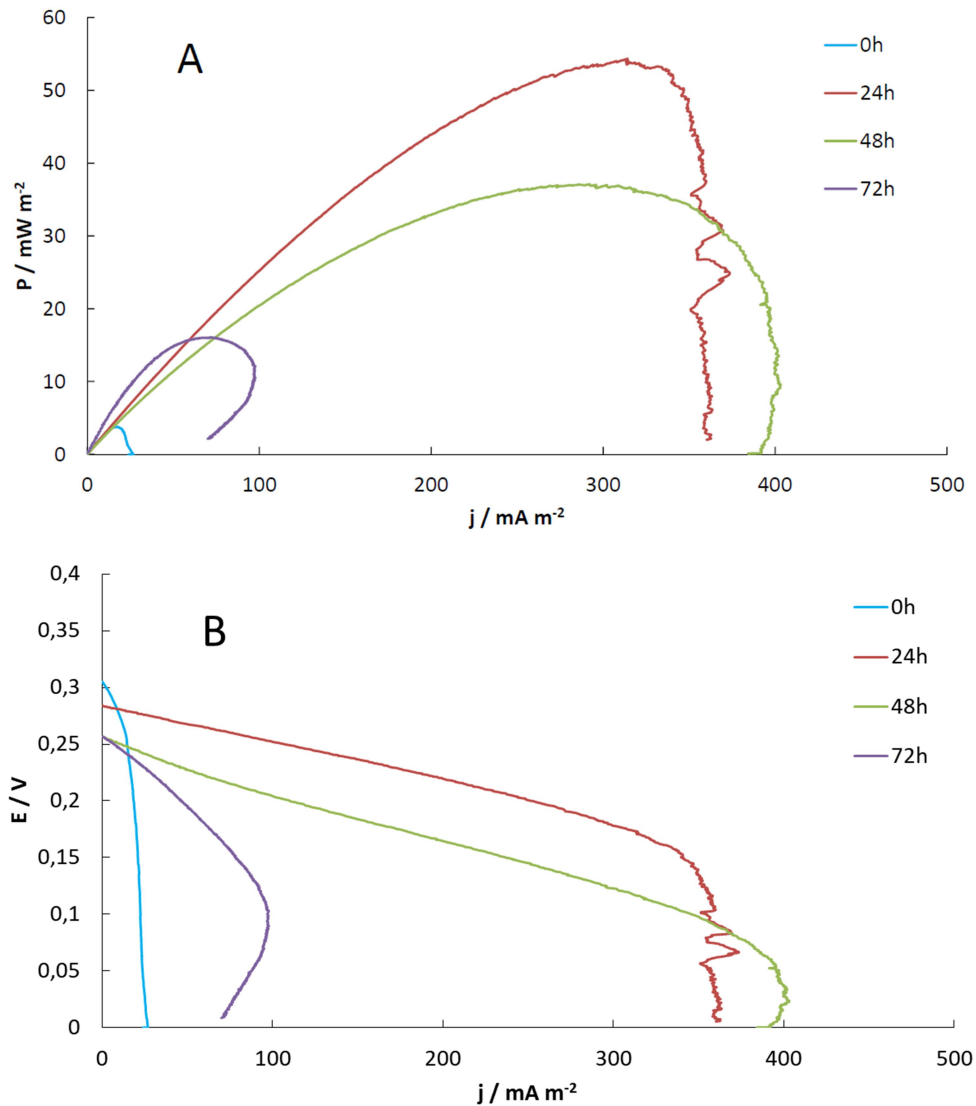


Figura 30 - Curvas de densidade de potência (A) e de polarização obtidas por LSV a 1 mV s⁻¹ na presença de azul de metileno ($0,48 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, e agitação do anólito a 100 rpm.

Fonte: Do autor.

Como pode ser visto na Figura 30 A, a densidade de potência produzida imediatamente depois da inoculação do kefir (0h) foi 3,8 mW m⁻² e uma densidade de corrente de 18 mA m⁻². Depois de 24h de fermentação, a potência máxima foi de 54,3 mW m⁻² e corrente de 314 mA m⁻². Foi observado um decréscimo nos valores de corrente e potência depois de 48h de fermentação (37,1 mW m⁻² e 292 mA m⁻², respectivamente), atingindo o menor valor depois de 72h de fermentação (11,9 mW m⁻² e 83 mA m⁻², respectivamente) e um pronunciado efeito *power overshoot*. A densidade de potência obtida com o inóculo de kefir na MFC foi próximo dos valores compilados por Hubenova e Mitov, (59) Hidalgo *et al* (58) e Jung e Regan, (121) o que indica a aplicabilidade do kefir em tais dispositivos. O uso de mediadores e da arquitetura de duas câmaras apresenta algumas limitações, (4,123) porém não

deixa de ser presença constante na literatura atual (2009-2017), como na avaliação de novos biocatalisadores microbianos, (24) investigação dos mecanismos de transferência eletrônica, (120,121,170,171) geração de energia usando efluentes industriais como substrato, (25,119), biosensores, (122) desenvolvimento de novos materiais anódicos, (58,102) uso como ferramenta didática (124) e outros, (123) o que mostra o contínuo interesse e aplicabilidade desse tipo de arquitetura.

Experimentos de voltametria cíclica com o anólito nos tempos de 0, 24, 48 e 72h de fermentação, em diferentes velocidades de varredura (Figura 31) apresentaram uma dependência linear entre as correntes de pico anódico e catódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), típico de sistemas controlados por difusão. (172,173) Este resultado corrobora a afirmação de que o efeito *power overshoot* observado se deve a uma limitação de transporte de massa.

A agitação do anólito claramente favoreceu o fluxo de reagentes e produtos à superfície do eletrodo, (4,9) diminuindo o efeito *power overshoot* (Figura 30), quando comparado ao sistema sem agitação (Figura 29). Como apontado por Nien *et al*, (167) a agitação do anólito foi capaz de diminuir a resistência de transferência de massa, o que favorece a transferência eletrônica e aumenta a densidade de corrente. Além disso, os valores de potência da MFC agitada foram significativamente maiores que aqueles obtidos com o sistema sem agitação.

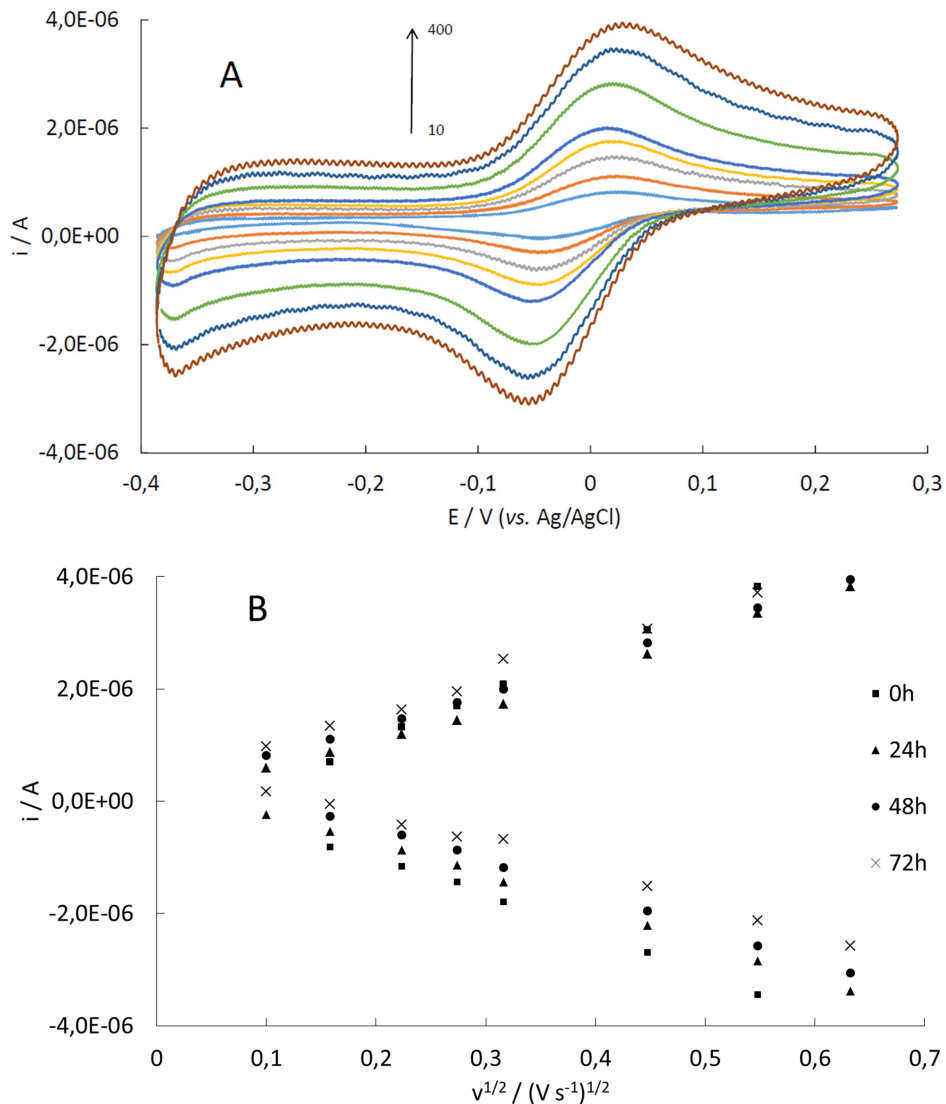


Figura 31 - Perfil dos voltamogramas cíclicos do anólito contendo azul de metileno a $0,48 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, obtido com eletrodo de trabalho de platina e velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 e 400 mV s^{-1} (A). Relação linear entre i_p vs. $v^{1/2}$. $R^2 > 0,992$ para todos os intervalos de tempo (B).

Fonte: Do autor.

Apresenta-se na Figura 32 os valores de OCP encontrados na presença e na ausência do mediador durante os ensaios. O maior valor de OCP foi encontrado no sistema contendo o azul de metileno após aproximadamente 17h a 22h de fermentação enquanto a MFC sem o mediador mostrou um pequeno pico entre 21h e 28h, seguindo-se para os dois casos uma queda lenta do valor de OCP até o final dos experimentos. Comparativamente, a queda de OCP da MFC contendo azul de metileno foi maior, como resultado da completa redução do mediador. Esses resultados estão em concordância com os dados anteriores, sugerindo uma correlação entre o potencial alcançado pela MFC e a atividade metabólica das cepas de kefir, como proposto por Hubenova e Mitov. (24)

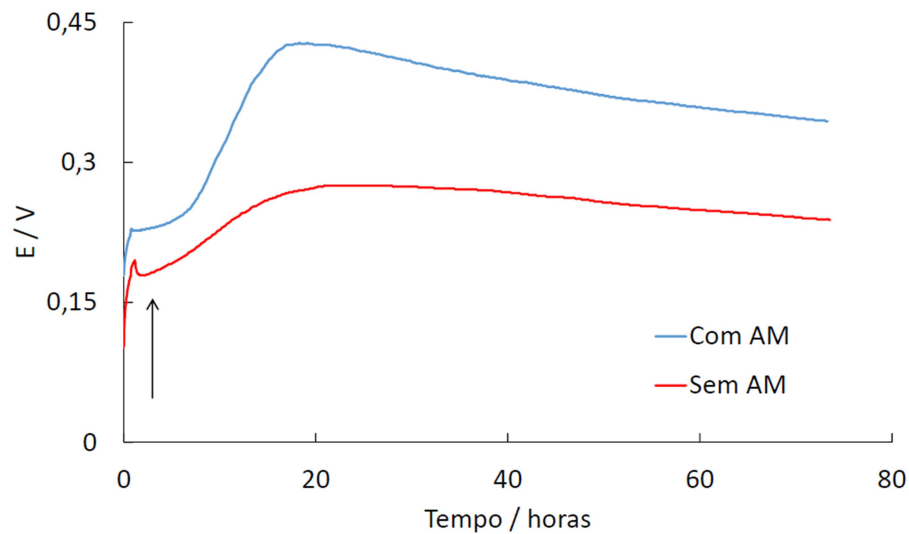


Figura 32 - Potencial de circuito aberto (OCP) como função do tempo de operação da MFC. A seta indica o momento da adição da amostra de kefir em ambos os experimentos.

Fonte: Do autor.

5.2.2 Mudanças físico-químicas

Para avaliar a influência das mudanças físico-químicas ocorridas durante o metabolismo dos açúcares sobre o funcionamento da MFC, foram determinados o pH, a acidez total titulável, a viscosidade absoluta e a variação da concentração de carboidratos, a partir de alíquotas retiradas do anólito em tempos fixos (Tabela 4). Os valores de viscosidade estão em concordância com valores previamente reportados, (174) mas não se observou diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as amostras ao longo de 72h de fermentação. Essas pequenas mudanças na viscosidade devem estar relacionadas ao consumo relativamente baixo (12-15%) dos açúcares pelo kefir, como determinado quantitativamente pelo método DNS e qualitativamente por cromatografia em papel, acarretando apenas pequenas mudanças na viscosidade do meio.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas das MFCs em diferentes tempos de fermentação e presença ou ausência do mediador.

| Mediador | Tempo de fermentação / h | pH | Acidez total titulável / mmol L ⁻¹ | Viscosidade / mPa.s | Concentração total de carboidratos / g L ⁻¹ |
|----------|--------------------------|------|---|---------------------|--|
| Sim | 0 | 5.56 | 2.1 ± 0.3 | 1.270 ± 0.025 | 46.6 ± 0.075 |
| | 24 | 4.32 | 5.3 ± 0.3 | 1.285 ± 0.019 | 45.0 ± 0.086 |
| | 48 | 3.63 | 11.8 ± 0.6 | 1.273 ± 0.025 | 41.4 ± 0.064 |
| | 72 | 3.33 | 20.5 ± 0.7 | 1.365 ± 0.012 | 39.3 ± 0.054 |
| Não | 0 | 5.60 | 1.9 ± 0.2 | 1.325 ± 0.007 | 48.2 ± 0.107 |
| | 24 | 4.15 | 5.9 ± 0.3 | 1.195 ± 0.007 | 47.3 ± 0.128 |
| | 48 | 3.35 | 15.4 ± 0.1 | 1.310 ± 0.014 | 44.6 ± 0.118 |
| | 72 | 3.09 | 28.0 ± 0.2 | 1.340 ± 0.057 | 42.7 ± 0.118 |

Fonte: Do autor.

A cromatografia em papel é empregada tradicionalmente para resolver pequenas moléculas tais como glicose, frutose ou sacarose. (40,175) Sacarose é a principal fonte de carbono presente na solução de açúcar mascavo, passível de ser hidrolisada em glicose e frutose na presença de β -D-frutofuranosidase (EC 3.2.1.26). (176,177) Essas moléculas podem ser diferenciadas no cromatograma pelos diferentes fatores de retenção (R_f) (sacarose < glicose < frutose) e coloração das bandas. (144,145) Embora a cromatografia em papel seja considerada uma técnica de identificação qualitativa, (175) os dados revelaram a ausência de glicose após 48h de fermentação. Além disso, um contínuo decréscimo na intensidade da banda de sacarose em paralelo ao aumento da banda de frutose podem ser observados na Figura 33. Um resultado similar foi encontrado por Laureys e De Vuyst (178) no estudo do processo fermentativo do kefir, o que sugere o consumo preferencial de glicose pelas cepas de kefir. Resultados semelhantes foram também observados em outros sistemas fermentativos. (153,154)

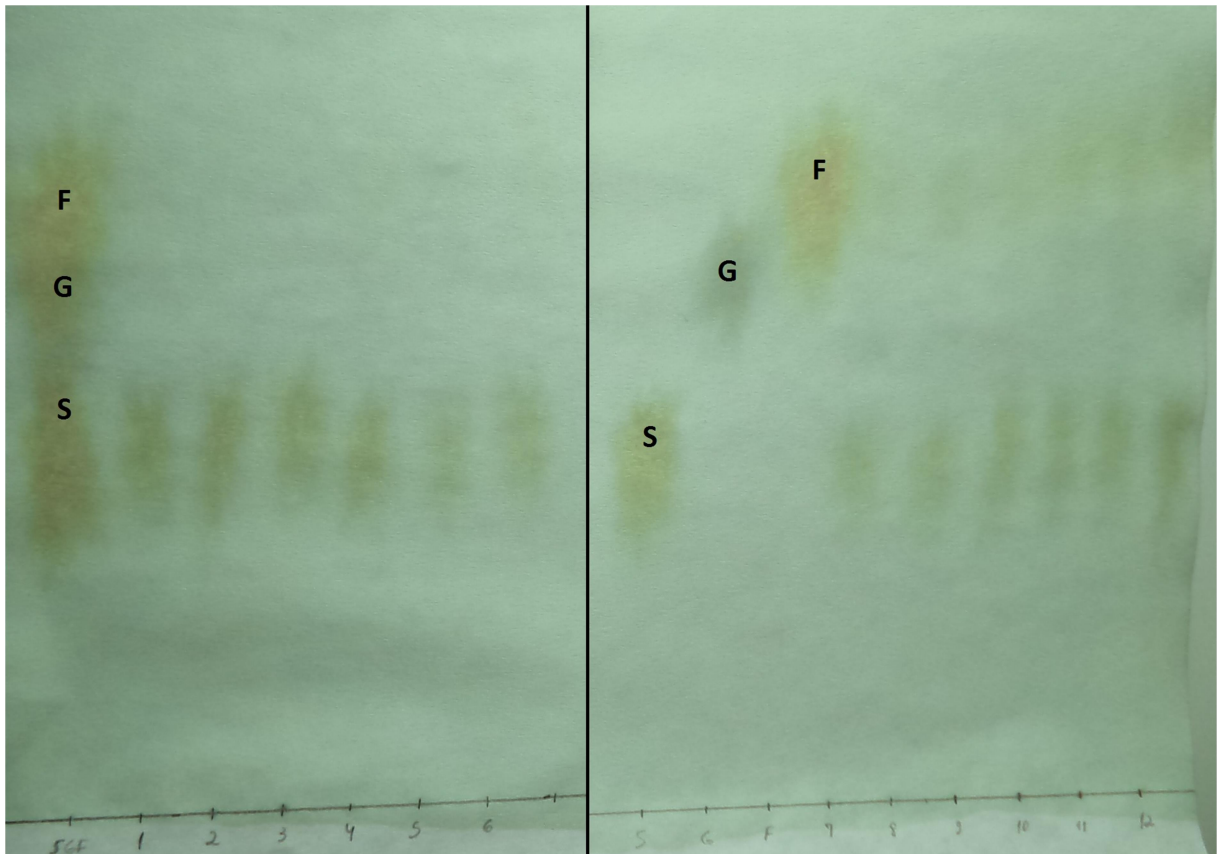


Figura 33 - Cromatograma em papel feito com amostras coletadas em diferentes tempos de operação da MFC. Pontos: 1 - 3 (0h); 4-6 (24h); 7-9 (48h); 10-12 (72h). As amostras 3, 6, 9, 12 foram coletadas da MFC sem mediador. Padrões: sacarose (S); glicose (G); frutose (F).

Fonte: Do autor.

A Tabela 4 também apresenta os resultados obtidos com as MFCs operando na presença e na ausência do mediador. A análise de variância dos grupos de dados mostrou diferença estatística ($p < 0,05$) para o pH, acidez total titulável e concentração de carboidratos. O valor de pH no começo da fermentação foi condizente aos usualmente encontrados para o kefir cultivado com diferentes fontes de carbono. (178,179) A queda no pH foi mais acentuada nas primeiras 24h de fermentação, atingindo valores similares de bebidas a base de kefir. (146,179,180) Essa diminuição no pH foi seguida pelo aumento na acidez total titulável, relacionada à produção de ácidos orgânicos, etanol, dióxido de carbono e outros compostos voláteis pelo metabolismo do kefir. (181,182) A queda de pH e aumento da acidez são mais pronunciados no sistema operando sem o mediador, apesar de o consumo de açúcares ser menor (Tabela 2). Isso sugere que o sistema sem mediador tem um metabolismo dos açúcares mais eficiente quando comparado ao sistema com azul de metileno. Embora a presença do mediador aumente a potência gerada pelo sistema, o uso do corante provoca um efeito deletério sobre o metabolismo das cepas do inóculo. Visto que se encontra bem estabelecido na literatura o efeito catalítico do azul de metileno sobre a oxidação do NADH, (183) esses

resultados parecem concordar com Hubenova *et al* (11) e Ieropoulos *et al* (67) a respeito do mecanismo de funcionamento da MFC.

As moléculas de NADH produzidas na oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato devem ser continuamente reoxidadas a NAD^+ para garantir o balanço redox e a continuação da glicólise. (40,184) Como explicado na Revisão de Literatura, isso é realizado através do metabolismo do piruvato por quatro vias metabólicas principais: (39,40) *i*) fermentação láctica, em que o NADH reduz o piruvato a lactato; *ii*) fermentação alcoólica, pela descarboxilação do piruvato e redução do acetaldeído a etanol; *iii*) descarboxilação oxidativa do piruvato sob condições aeróbicas pelo complexo piruvato desidrogenase para produzir acetil-CoA necessária ao ciclo de Krebs; *iv*) transferência eletrônica do NADH ao O_2 pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. Portanto, como o balanço redox citosólico é altamente organizado e regulado, (184) o resultado global da oxidação do NADH pelo azul de metileno pode ter sido prejudicial para o metabolismo do kefir, já que a presença do mediador pode afetar a via fermentativa e a cadeia respiratória das células.

5.2.3 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias

O procedimento de contagem celular é uma técnica microbiológica muito empregada para avaliação da atividade fermentativa de bebidas a base de kefir. Zanirati *et al* (99) obteve uma população bacteriana em amostras de kefir variando entre 6.08 ± 0.05 e 7.73 ± 0.13 log CFU g^{-1} depois de 24h de fermentação. A contagem em placas do total de micro-organismos mesofílicos presentes em substratos de sucos de vegetais fermentados com kefir feita por Corona *et al* (179) resultou entre 7,8 e 9,1 log CFU mL^{-1} , depois de 72h de fermentação a 30°C. Em geral, as condições de fermentação podem afetar o crescimento microbiano em bebidas a base de kefir. (185) Nesse estudo, a contagem total de micro-organismos foi feita para avaliar a influência do crescimento microbiano sobre a potência gerada pela MFC. A contagem celular de amostras do anólito imediatamente após a inoculação do kefir foi de 6,04 log CFU mL^{-1} . Depois de 24h, entretanto, a contagem celular mais que triplica na MFC (6,59 log CFU mL^{-1}), valor diretamente relacionado à potência máxima encontrada no período (Figura 30 A). A influência do número de células sobre a potência gerada pode estar relacionada ao excesso de NADH gerado no citosol durante o crescimento do consórcio. (184) Depois de 48h de fermentação, entretanto, o crescimento estabilizou em 6,74 log CFU mL^{-1} , sugerindo que as leveduras e bactérias presentes se adaptaram bem ao meio nutricional, mesmo na presença do azul de metileno a $0,48 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} . Esses resultados, juntamente

com os dados de potência, polarização e OCP (Figuras 29, 30 e 32), parecem indicar um papel importante da cinética de crescimento microbiano na produção de energia pela MFC a base de kefir. O crescimento celular dentro da câmara anódica se estabilizou em torno de 48h de fermentação, atingindo no fim dos ensaios, um aumento da biomassa de kefir de aproximadamente 25%. Os dados de contagem celular obtidos são corroborados por Laureys e De Vuyst, (178) que encontrou um aumento na contagem total de células durante as primeiras 48h de fermentação com kefir e variação semelhante da biomassa ao longo do experimento.

5.2.4 Atividade eletroquímica

Considerando que a fermentação de kefir pode levar à produção de dezenas de compostos após alguns dias de fermentação, (179) a presença de mediadores redox solúveis foi analisada por voltametria cíclica. A obtenção de voltamogramas cíclicos do anólito em função do tempo de fermentação permite correlacionar as mudanças nos potenciais de pico redox com a geração de energia na MFC.

Os voltamogramas obtidos com o meio nutricional estéril não apresentou nenhum sinal redox importante (Figura 34). Esse sinal permaneceu praticamente inalterado ao longo da fermentação conduzida sem a adição do mediador azul de metileno, sugerindo que nenhum mediador redox solúvel foi produzido pelas cepas presentes no kefir ao longo de 72h de fermentação. Esse resultado pode relacionar-se à influência do meio fermentativo sobre os produtos do metabolismo da comunidade microbiana. (186) Por exemplo, embora os grãos de kefir sejam capazes de fermentar diferentes substratos, o meio fermentativo empregado não continha os nutrientes necessários para as cepas previamente identificadas por nosso grupo de pesquisa (103) produzirem e liberarem uma quantidade detectável daquele mediador endógeno. (18)

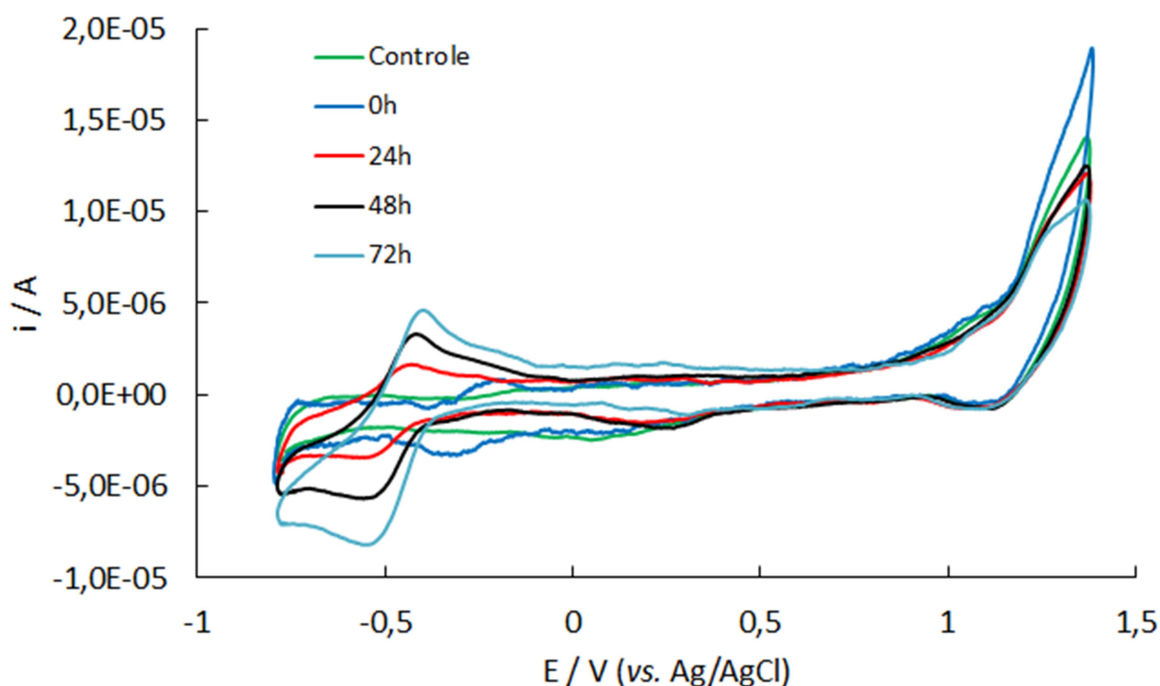


Figura 34 - Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de trabalho de platina no anólito em intervalos fixos de tempo, entre -800 mV e +1400 mV a 50 mV s^{-1} . Anólito: solução de açúcar mascavo ($5\% \text{ m v}^{-1}$) contendo 0,9% de NaCl e $0,48 \times 10^{-3} \text{ mol}$ de azul de metileno. Curva controle: solução de açúcar mascavo ($5\% \text{ m v}^{-1}$) contendo 0,9% de NaCl.

Fonte: Do autor.

Na presença do mediador de transferência de carga, entretanto, os voltamogramas apresentaram um deslocamento nos potenciais de pico para menores valores (deslocamento catódico). Isso pode ser atribuído a adsorção do mediador sobre a superfície do eletrodo. (187,188) Os potenciais de pico anódico e catódico no começo da fermentação foram -200 mV e -315 mV (vs. Ag/AgCl), respectivamente, valores próximos aos já reportados na literatura. (11,55) De acordo com Ju *et al*, (187) pode ser observado um deslocamento de 87 mV por unidade de pH abaixo de pH 5,4, o que sugere a participação de 3 H^+ no processo eletródico nessa faixa de pH. Durante a fermentação, a separação nos potenciais de pico aumentou de 110 mV (24h) a 125 mV (48h) e 140 mV (72h), valores próximos ao relatado por Hasnat *et al* (189) para o processo redox quasi-reversível das moléculas de azul de metileno. Os dados voltamétricos encontrados nesse trabalho sugerem que o metabolismo microbiano pode reduzir o azul de metileno à sua leuco-forma, aumentando sua concentração na câmara anódica da MFC. Consequentemente, a forma reduzida do azul de metileno age como um transportador de elétrons entre as bactérias/leveduras e o eletrodo, (64) sendo a responsável pelo aumento da potência gerada pela MFC.

Entretanto, o valor máximo de potência foi observado após 24h de fermentação, embora a concentração da leuco-forma do azul de metileno tenha aumentado continuamente ao longo de todo o experimento (Figura 34). Três fatores podem ser considerados para analisar essa aparente contradição: *i*) o aumento da leuco-forma do azul de metileno favorece a transferência de carga na interface ânodo/anólito (menores perdas de ativação), (4,170) e eleva a potência gerada; *ii*) o aumento da acidez do meio (Tabela 4) ao longo da fermentação, (166) e *iii*) o aumento das resistências ôhmicas e de polarização causadas pelo crescimento microbiano, (170) prejudicando o desempenho da MFC. A partir dos dados obtidos, pode-se supor que o efeito da concentração da leuco-forma do mediador predomina nas primeiras 48h de fermentação, de modo que houve um aumento da potência gerada, com máximo em 24h; após esse período, os efeitos da maior acidez e do aumento das resistências ôhmicas e de polarização passam a prevalecer, causando a queda acentuada na potência após 72h. De fato, as medidas de interrupção de corrente na MFC apresentaram valores de resistência interna em 0, 24, 48 e 72h de fermentação de, respectivamente, $103.00 \pm 1.20 \Omega$, $135.40 \pm 1.55 \Omega$, $156.50 \pm 2.80 \Omega$, e $158.30 \pm 1.44 \Omega$.

5.2.5 Absorção molecular

Alíquotas do caldo fermentativo contendo o mediador foram avaliadas por espectrofotometria na região UV-Vis a fim de se avaliar as mudanças espectroscópicas do anólito ao longo da fermentação. Mudanças significativas nos valores de absorbância em função dos tempos de fermentação podem ser observadas na Figura 35. O perfil espectral obtido no início da fermentação (0h) é característico da forma oxidada do azul de metileno, (60,190) com picos máximos em 600 e 660 nm. Esses picos estão relacionados à formação de dímeros e monômeros, respectivamente, usualmente observados em soluções de corantes fenotiazínicos. (191,192) Na região UV, o pico em 294 nm também está associado à forma oxidada do mediador, enquanto o pico em 256 nm corresponde à leuco-forma do azul de metileno. (60,193)

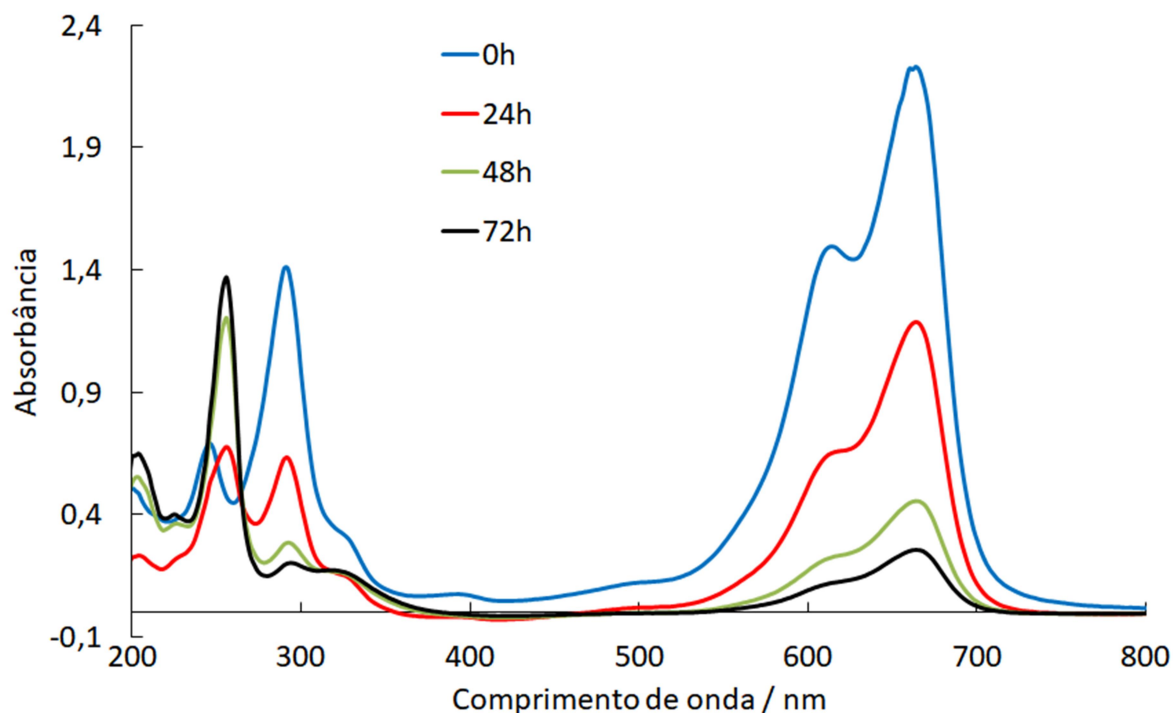


Figura 35 - Espectro UV - Vis, de 200 a 800 nm, registrado imediatamente após a diluição de 10x do anólito, nos tempos de fermentação especificados.

Fonte: Do autor.

À medida que o tempo de fermentação avança, pode ser observado na Figura 35 um decréscimo nos sinais espectrais observados em 660, 600 e 294 nm, relacionados à forma oxidada do mediador, juntamente com um aumento da banda correspondente à leuco-forma do azul de metileno, em 256 nm. Segundo Bapat *et al*, (163) a redução do azul de metileno ocorre na superfície celular via enzimas redutases presentes na membrana celular, o que indica alta atividade microbiana, embora o mecanismo de redução do corante continue sendo discutido na literatura. (2,68,194) Finalmente, não foi observado nenhum sinal espectroscópico de outros possíveis mediadores excretados pelos micro-organismos presentes na microbiota do kefir, em concordância com os dados obtidos por voltametria cíclica.

5.2.6 Conclusão parcial

Na segunda parte do trabalho, a cultura simbiótica do kefir foi empregada como biocatalisador anódico de MFC pela primeira vez, confirmando a hipótese iii do trabalho. Curvas de potência e polarização realizadas por voltametria linear resultaram no valor de potência máxima de 54 mW m^{-2} depois de 24h de fermentação do substrato contendo o mediador azul de metileno. Esse composto claramente aumentou a densidade de potência da

MFC embora tenha causado também um prejuízo no balanço redox do NADH citosólico. Não foram identificados mediadores endógenos durante os experimentos, indicando a redução do azul de metileno como responsável pelo aumento da potência elétrica na MFC. Os resultados parecem indicar que a produção de energia na MFC foi dependente do balanço entre o aumento da concentração da leuco-forma do mediador e os aumentos da acidez e resistências ôhmicas/polarização causados pelo metabolismo microbiano da suspensão de kefir. O uso de culturas de kefir como fonte alternativa para MFCs mostrou-se promissor, devido à facilidade para obter os grãos iniciais e cultivo, alto rendimento de biomassa após alguns dias e sem necessidade de condições estéreis, simplicidade para a recuperação de seus grãos e uma geração de energia equivalente àqueles obtidos por dispositivos mais sofisticados e/ou outros micro-organismos ou culturas mistas.

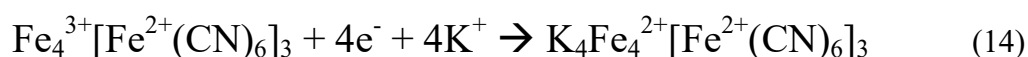
Os resultados advindos dessa 2^a parte do trabalho foram publicados no periódico *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Silveira, G. & Schneedorf, J.M. Appl Biochem Biotechnol (2018). <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2718-2>) – APÊNDICE D.

5.3 TERCEIRA PARTE

Nesta seção, os resultados obtidos na terceira parte do trabalho, “Desenvolvimento de novo modelo de arquitetura de uma câmara e estudo do catalisador catódico”, são apresentados e discutidos.

5.3.1 Mecanismo de funcionamento da MFC de uma câmara

Durante o funcionamento de uma biocélula a combustível os elétrons gerados pelo metabolismo microbiano no compartimento anódico são transferidos para o compartimento catódico, causando a redução da espécie química empregada como acceptor de elétrons, como por exemplo o oxigênio, óxido de manganês, ferricianeto, entre outros. (4,131) No presente trabalho, os elétrons provenientes do metabolismo da *S. cerevisiae* são transferidos para o eletrodo através da molécula de azul de metileno, que atua como mediador. Os elétrons atravessam o circuito e causam a redução do filme de azul da prússia eletrodepositado sobre o cátodo, formando o branco da prússia, conforme a Equação 14: (136)



O equilíbrio de cargas é garantido pela permeação dos íons através da ponte salina. O azul da prússia atua então como um católito de estado sólido, um tipo relativamente novo de cátodo usado em MFC de uma câmara. (131,134) A seguir são apresentados diferentes testes realizados com a finalidade de caracterizar o eletrodo.

5.3.2 Estabilidade do eletrodo

A quantidade total de azul da prússia eletrodepositada, Γ , foi calculada empregando-se a Equação 15: (195)

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \quad (15)$$

Onde Q é a carga integrada sobre a onda voltamétrica cíclica, n é o número de elétrons envolvidos, F é a constante de Faraday, e A é a área do eletrodo. O resultado do cálculo foi de $\sim 13 \text{ nmol cm}^{-2}$, assumindo a transferência de 4 elétrons por cela unitária ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$) (137,148) e uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

A fim de se avaliar a estabilidade dos eletrodos modificados com azul da prússia, a resposta voltamétrica de eletrodos recentemente preparados foi avaliada por voltametria cíclica ao longo de 100 ciclos. A Figura 36 A apresenta o perfil do 2º, 25º, 50º 75º e 100º voltamogramas cíclicos do eletrodo de malha de carbono modificado com azul da prússia, obtido a 100 mV s^{-1} em solução de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas exibem uma curvatura com possíveis valores para o pico anódico em $0,440 \text{ V}$ e para o pico catódico no potencial de $-0,270 \text{ V}$, correspondentes às reações de oxidação e redução do filme, conforme a Equação 14.

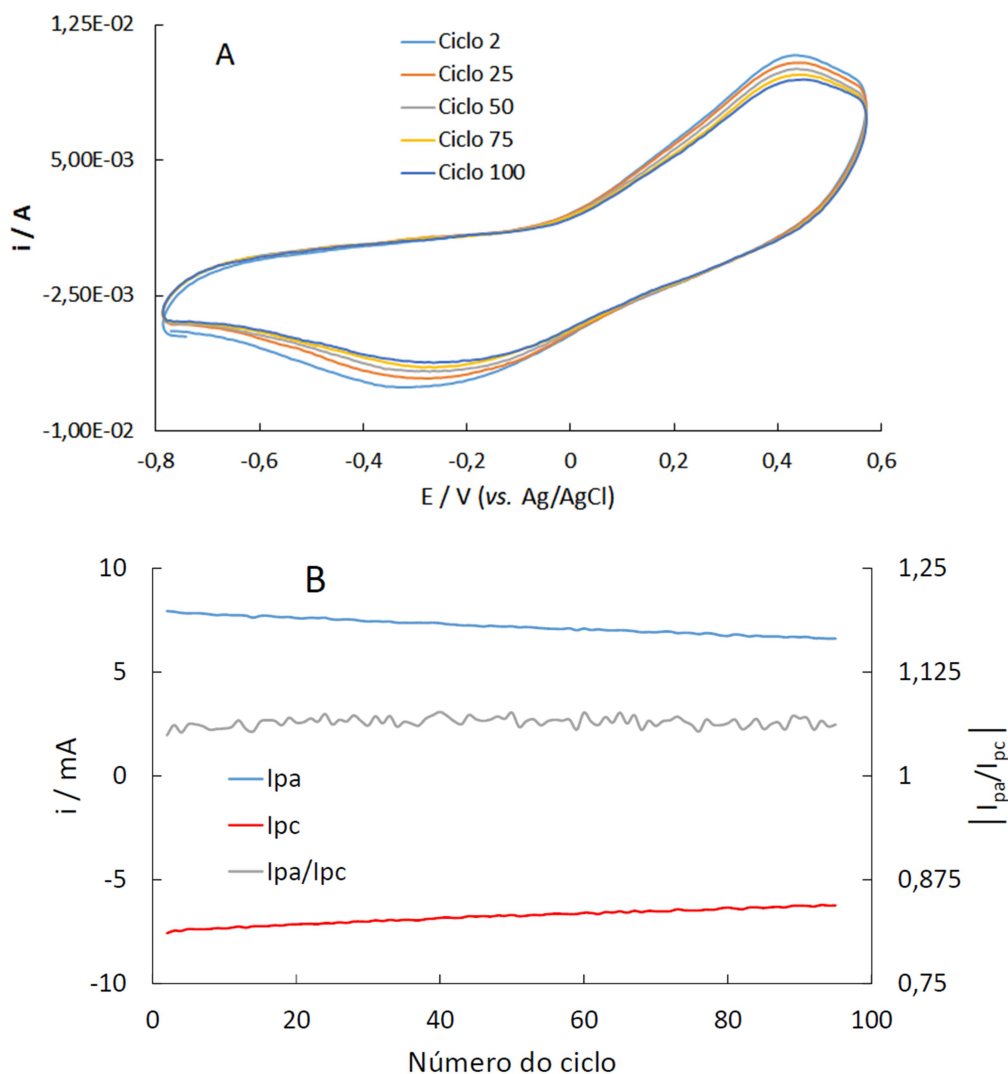


Figura 36 - Variação do perfil dos voltamogramas cíclicos (A) e I_{pa} , I_{pc} e razão de correntes (B) ao longo de 100 ciclos voltamétricos. Condições: eletrodo de trabalho – malha de carbono modificada com AP; Contra-eleto-rodo – bastão de grafite; eletrodo de referência - Ag/AgCl. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , eletrólito $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Fonte: Do autor.

De acordo com Karyakin, (136) o formato dos picos redox de filmes de hexacianoferratos obtidos por voltametria cíclica são um indicador da qualidade do filme, sendo fortemente dependentes do eletrólito suporte e do tipo de eletrodo utilizados. Levando em consideração que o pH e o potencial empregados na eletrodeposição foram os mais adequados para a formação de uma estrutura regular do azul da Prússia, a diferença observada nos valores de E_{pa} e E_{pc} (136,137,196,197) podem ser atribuídas principalmente ao eletrodo usado para eletrodeposição. Comparando-se diferentes tipos de eletrodos modificados com azul da prússia, como por exemplo carbono vítreo, (127,137,197,198) platina e ouro, (199,200) feltro de carbono, (133) pasta de carbono, (196) entre outros, (125) pode-se notar

significativas diferenças nos voltamogramas em decorrência do método empregado para modificação do eletrodo, do tipo de superfície eletródica e do eletrólito suporte utilizado. (70,173)

A Figura 36 B mostra a variação das correntes de pico (I_{pa} e I_{pc}) e da razão de correntes ao longo do experimento. Embora os filmes de hexacianoferratos em geral apresentem boa estabilidade sobre eletrodos, os sucessivos ciclos de oxidação e redução inerentes à técnica de voltametria cíclica causam uma evidente diminuição nas correntes anódicas e catódicas. O sinal voltamétrico é causado pelo par redox azul da prússia/branco da prússia, de modo que a diminuição dos valores de correntes anódicas e catódicas é causada pela menor estabilidade termodinâmica do branco da prússia sobre a superfície eletródica. (136,201) Ozeki *et al* (201) mostraram que a redução do azul da prússia a branco da prússia é acompanhada de uma redução de entropia da ordem de $108 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ($\Delta S_{\text{red}} = -108 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Em termos de correntes de pico, há uma redução de 13% na corrente anódica e de 18% na corrente catódica no final dos 100 ciclos. Para efeitos de comparação, Zhang *et al* (197) mostraram uma diminuição na corrente catódica de eletrodos de carbono vítreo modificados com azul da prússia de 47% após 250 ciclos; eletrodos de grafite pirolítico modificados com nanotubos de carbono e azul da prússia apresentaram uma queda de cerca de 30% nas correntes anódicas e catódicas iniciais após 100 ciclos voltamétricos, conforme relatado por Li *et al.* (202)

A estabilidade dos eletrodos modificados com azul da prússia foi também avaliada por ensaios de eletrólise. O eletrodo foi submetido a uma corrente de -2,5 mA por 10, 10, 15 e 15 minutos, seguindo-se entre cada intervalo de tempo, uma voltametria cíclica para se avaliar as mudanças ocorridas com o filme eletroativo. Os resultados são apresentados na Figura 37.

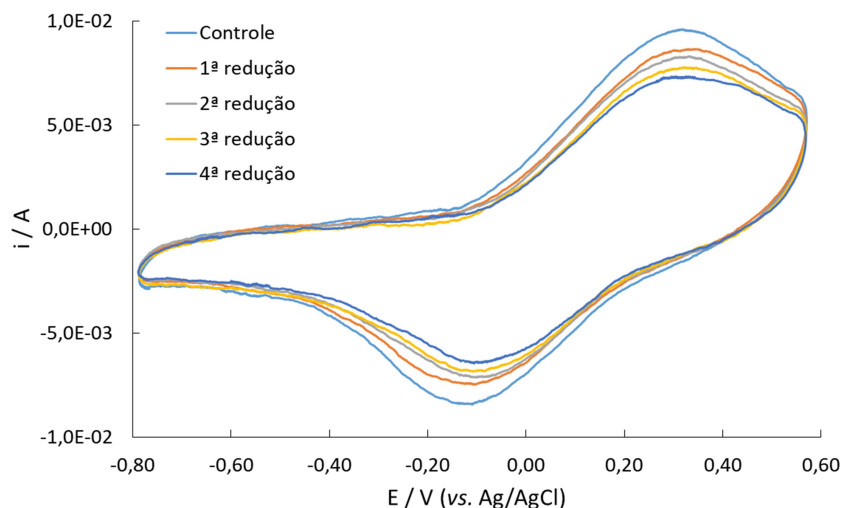


Figura 37 - Voltamogramas cíclicos obtidos após a aplicação de corrente de -2,5 mA por 10 min (1ª redução), mais 10 min (2ª redução), mais 15 min (3ª redução) e mais 15 min (4ª redução), ao eletrodo de malha de carbono modificado com azul da prússia (controle). Condições: eletrodo de trabalho – malha de carbono modificada com AP; Contra-eletrodo – bastão de grafite; eletrodo de referência - Ag/AgCl. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , eletrólito $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Fonte: Do autor.

Esse conjunto de experimentos pretendeu simular a corrente gerada no compartimento anódico, a fim de se verificar o comportamento eletroquímico do filme de azul da prússia. A análise do perfil voltamétrico dos voltamogramas da Figura 37 evidencia a queda nas correntes de pico após a aplicação da corrente catódica, diminuindo em cerca de 25% dos valores iniciais de I_{pa} e I_{pc} . Ao final do experimento, pode-se notar uma perda da coloração inicial azul do eletrodo, conforme mostrado na Figura 38.

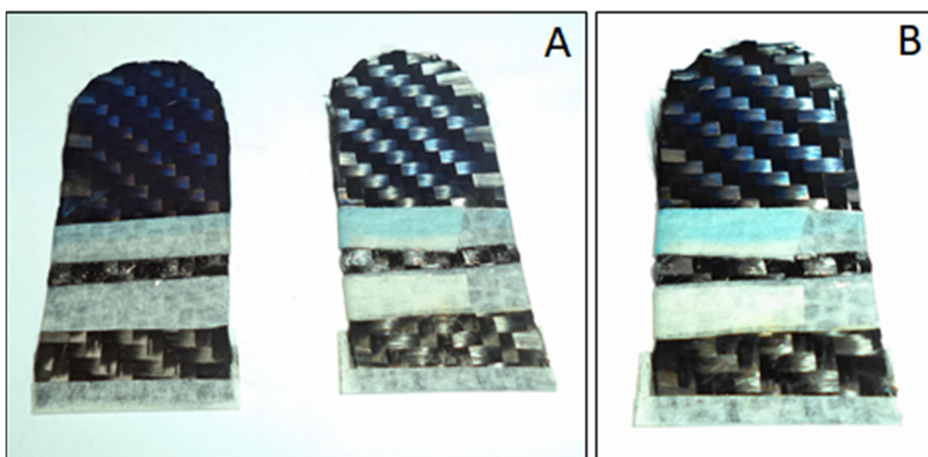


Figura 38 - Fotografias dos eletrodos modificados com azul da prússia, mostrando a mudança de coloração do filme de azul da prússia obtida após o tempo total de 50 minutos de aplicação de corrente de $-2,5$ mA (A, antes e depois). Restauração parcial da cor azul inicial após o processo de reativação do eletrodo (B).

Fonte: Do autor.

Essa observação está de acordo com a afirmação de Karyakin (136) de que a formação do branco da prússia a partir da redução do azul da prússia é acompanhada por uma perda da coloração azul inicial. A diminuição das correntes de pico pode ser entendida a partir da redução causada pela aplicação da corrente catódica (tempo total de 50 minutos), bem como a perda de sítios eletroativos decorrente da menor estabilidade termodinâmica do branco da prússia, (201) causada pela capacidade dos íons hidróxido (formado durante a eletrólise) em quebrar a ligação Fe-(CN)-. (136,148) Assim sendo, apesar de se observar uma redução considerável nas correntes de pico, o eletrodo modificado com azul da prússia apresentou estabilidade satisfatória para a montagem e operação da biocélula de uma câmara.

5.3.3 Estudos voltamétricos adicionais

O estudo cinético das reações redox que ocorrem na superfície do eletrodo modificado com azul da prússia foi conduzido com a técnica de voltametria cíclica, avaliando-se a corrente de pico anódica e catódica em diferentes velocidades de varredura, conforme apresentado na Figura 39 A.

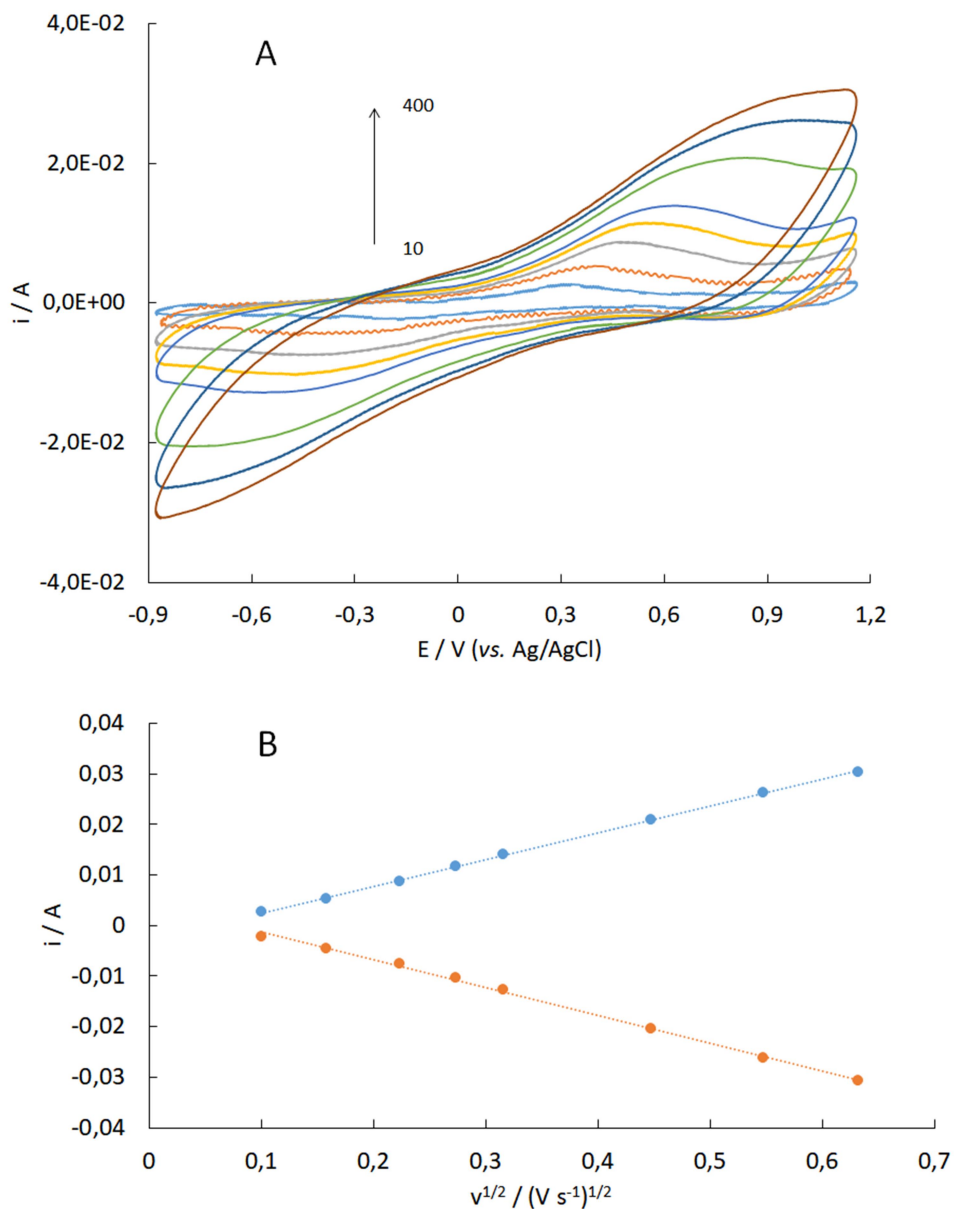


Figura 39 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de malha de carbono modificado com AP, obtidos em eletrólito KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ + HCl $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 e 400 $mV s^{-1}$ (A). Relação linear entre I_p vs. $v^{1/2}$ (B).

Fonte: Do autor.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 39 A mostram um aumento na separação dos potenciais de pico anódico e catódico com o aumento da velocidade de varredura. A relação linear entre as correntes de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura apresentada na Figura 39 B sugere um processo redox controlado por difusão, (173,203) que pode ser atribuído à intercalação dos íons K^+ na rede de azul da prússia, como observado também por outros autores. (136,197,204)

A razão das correntes de pico, I_{pa}/I_{pc} , e a separação dos potenciais de pico, ΔE_p ($E_{pa} - E_{pc}$), são mais dois parâmetros que podem ser obtidos a partir do estudo da velocidade de varredura, úteis para o diagnóstico da reversibilidade do sistema. (173) A Tabela 5 apresenta esses valores.

Tabela 5 - Resultados de I_p , E_p , razão de correntes e ΔE_p obtidos em diferentes velocidades de varredura.

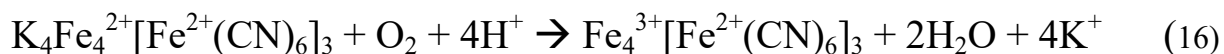
| v | I_{pa}/mA | E_{pa}/V | I_{pc}/mA | E_{pc}/V | I_{pa}/I_{pc} | $\Delta E_p/V$ |
|-----|-------------|------------|-------------|------------|-----------------|----------------|
| 10 | 2,68 | 0,314 | -2,1362 | -0,221 | 1,25 | 0,535 |
| 25 | 5,31 | 0,403 | -4,6264 | -0,333 | 1,15 | 0,736 |
| 50 | 8,81 | 0,495 | -7,486 | -0,448 | 1,18 | 0,943 |
| 75 | 11,65 | 0,555 | -10,331 | -0,484 | 1,13 | 1,039 |
| 100 | 14,03 | 0,615 | -12,772 | -0,533 | 1,10 | 1,148 |
| 200 | 20,83 | 0,828 | -20,436 | -0,761 | 1,02 | 1,589 |
| 300 | 26,19 | 0,984 | -26,283 | -0,832 | 0,996 | 1,816 |
| 400 | 30,43 | 1,080 | -30,602 | -0,857 | 0,994 | 1,937 |

Fonte: Do autor.

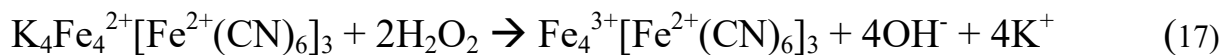
Embora exista alguma imprecisão na medida das correntes de pico (173) decorrente da dificuldade de se definir a corrente faradaica correspondente (como se pode deduzir a partir do perfil dos voltamogramas), a Tabela 5 permite observar que a razão de correntes variou em função da velocidade de varredura, aproximando-se do valor unitário, bem como um aumento significativo na separação dos potenciais de pico em maiores velocidades de varredura. Em linhas gerais, esses parâmetros - I_p proporcional a $v^{1/2}$, I_{pa}/I_{pc} e ΔE_p dependentes da velocidade de varredura - tal como encontrados, sugerem um comportamento quasi-reversível do sistema. (173,203)

5.3.4 Avaliação da atividade catalítica

É bem conhecido na literatura que eletrodos modificados com azul da prússia apresentam atividade eletrocatalítica nas reações de redução de O_2 e H_2O_2 . (127,135,137). O branco da prússia formado a partir da redução do azul da prússia no cátodo (Equação 14) catalisa as reações de redução do oxigênio a água (127,137) e a redução do peróxido a hidroxila, (148,200) como descrito nas Equações 16 e 17 a seguir:



(Oxidação do branco da prússia a azul da prússia por oxigênio, com a simultânea formação de água).



(Oxidação do branco da prússia a azul da prússia por peróxido de hidrogênio, levando a formação de hidroxila).

A avaliação da atividade eletrocatalítica de redução do O_2 e H_2O_2 pelo eletrodo de malha de carbono modificado com azul da prússia foi feita por voltametria cíclica. A Figura 40 apresenta os voltamogramas cíclicos do eletrodo de malha de carbono (com ou sem azul da prússia) em eletrólito de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ saturado de N_2 ou O_2 .

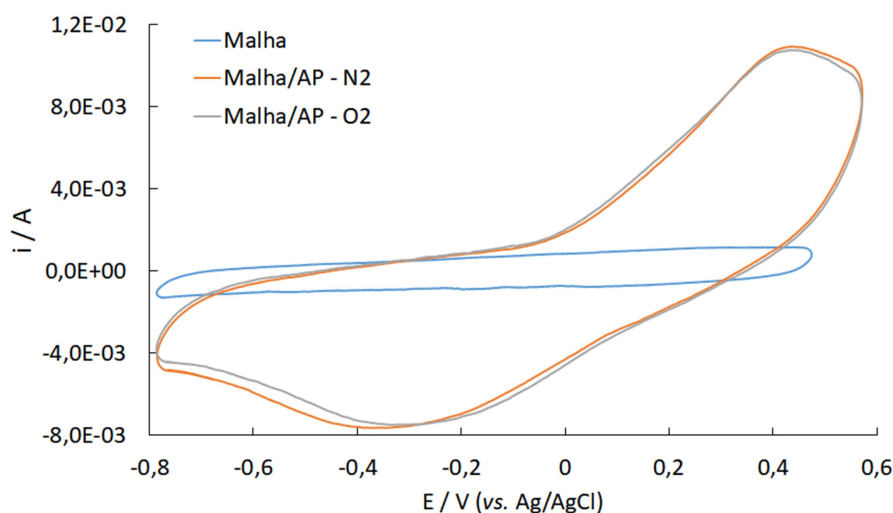


Figura 40 - Voltamogramas cíclicos da malha de carbono como eletrodo de trabalho, sem modificação (malha) ou modificado com azul da prússia (malha/AP) em eletrólito saturado de N_2 ou O_2 . Condições: Contra-eletrodo – bastão de grafite; eletrodo de referência - Ag/AgCl . Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , eletrólito $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1} + \text{HCl } 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Fonte: Do autor.

O resultado apresentado na Figura 40 evidencia a diferença da resposta voltamétrica entre a malha de carbono e o eletrodo modificado com azul da prússia. Nos intervalos de potencial elétrico avaliados podem ser observados, para o primeiro eletrodo (malha) apenas a chamada corrente residual ou capacitiva, decorrente da atração e repulsão entre os íons em solução e os elétrons no eletrodo. (70) O segundo eletrodo apresenta, por sua vez, sinais redox

nos potenciais de 0,40 V e -0,3 V correspondentes ao azul da prússia e branco da prússia respectivamente (como discutido anteriormente na seção 5.3.2). Não se observa diferença nos voltamogramas realizados na presença ou na ausência de oxigênio, o que indica que o filme eletrodepositado não possui atividade catalítica de redução do oxigênio. Segundo Karyakin, (136) a reação electrocatalítica de redução do oxigênio é fortemente dependente da estrutura do azul da prússia. Itaya *et al* (137) afirmam que o azul da prússia age como um catalisador tridimensional devido aos poros com diâmetro de 3.2 Å presentes em sua estrutura zeolítica, que permitem a difusão do oxigênio através do cristal e são fundamentais para a reação catalítica de redução.

Visto que o filme de azul da prússia obtido não apresentou atividade electrocatalítica de redução do oxigênio, procurou-se avaliar a atividade do filme frente ao peróxido de hidrogênio, por sua conhecida capacidade electrocatalítica relacionada a este composto. A Figura 41 apresenta o gráfico com os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo modificado com azul da prússia em eletrólito de KCl 0,1 mol L⁻¹ + HCl 10 x 10⁻³ mol L⁻¹ e concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio.

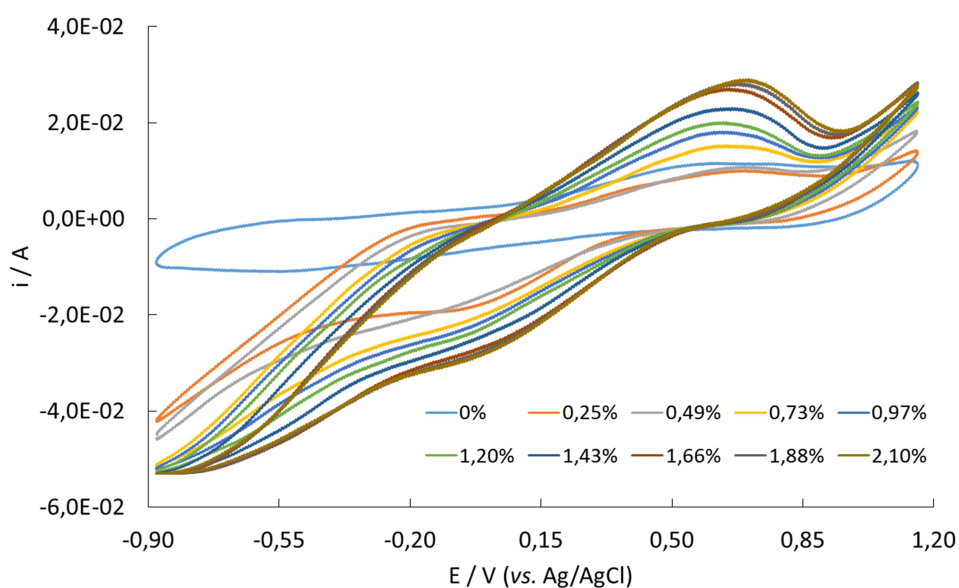


Figura 41 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com AP em eletrólito de KCl 0,1 mol L⁻¹ + HCl 10 x 10⁻³ mol L⁻¹ e diferentes concentrações de H₂O₂. Condições: contra-eletrodo – bastão de grafite; eletrodo de referência - Ag/AgCl. Velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, eletrólito KCl 0,1 mol L⁻¹ + HCl 10 x 10⁻³ mol L⁻¹.

Fonte: Do autor.

A partir da análise do gráfico apresentado na Figura 41, verificam-se duas mudanças significativas no perfil dos voltamogramas, quando comparados ao sinal voltamétrico na

ausência de peróxido de hidrogênio. Pode ser observado um aumento na corrente de oxidação entre 0,6 e 0,7 V, formando um sinal relativamente definido, e uma diminuição expressiva na corrente de redução, a partir de 0,5 V aproximadamente. A corrente de pico anódica foi proporcional à concentração de peróxido entre 0,49% e 1,66%, e a corrente catódica, avaliada no valor de -100 mV vs. Ag/AgCl (devido à não formação de um pico catódico) foi proporcional à concentração de peróxido entre 0,73% e 1,88%, conforme representado na Figura 42.

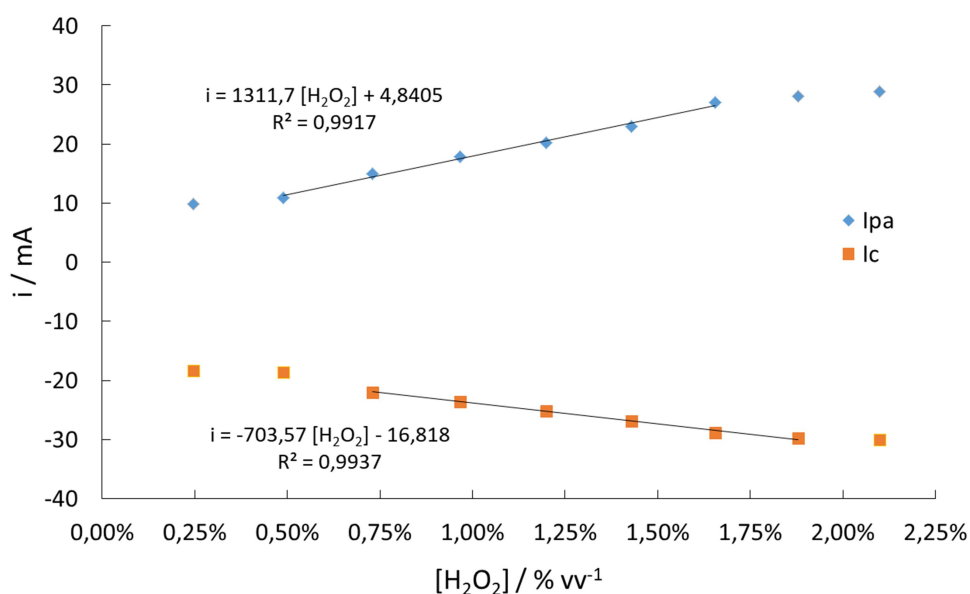


Figura 42 - Corrente de pico anódica (entre 0,6 e 0,7V) e corrente catódica em 0,1V em função da concentração de peróxido, obtidas por voltametria cíclica empregando o eletrodo modificado com AP como eletrodo de trabalho. As retas ajustadas delimitam as faixas lineares entre concentração de peróxido e corrente.

Fonte: Do autor.

Esses resultados são interessantes, pois revelaram um aumento das correntes anódicas e catódicas com a concentração de peróxido, quando o mais comum é o aumento em apenas uma das correntes. Nesse sentido, os resultados voltamétricos obtidos por Xu *et al* com diferentes tipos de eletrodos modificados com um nanocompósito de azul da prússia e grafeno (125,127) mostraram um aumento na corrente catódica relacionada à atividade electrocatalítica do nanocompósito para redução de O₂ e H₂O₂ em meio ácido; Zhang *et al*, (197) avaliando a atividade electrocatalítica de eletrodos de carbono vítreo modificados com azul da prússia e líquidos iônicos mostraram que a adição de H₂O₂ à cela electroquímica causou um grande aumento na corrente de redução e um correspondente decréscimo no pico de oxidação; Matos *et al* (199) mostram um aumento de 25% e 10% na corrente de pico catódica obtida com

eletrodos de ouro e platina modificados com azul da prússia, respectivamente, quando na presença de peróxido, acompanhado de uma diminuição nas correntes anódicas de 20% e 30%, respectivamente.

Assim sendo, os resultados obtidos mostram que as condições experimentais utilizadas para a eletrodeposição do azul da prússia na malha de carbono permitiram a obtenção de um filme que tem atividade catalítica tanto na oxidação quanto na redução do peróxido de hidrogênio. Segundo Itaya *et al.*, (137) o estado oxidado do azul da prússia apresenta atividade catalítica para a oxidação do peróxido de hidrogênio e o branco da prússia apresenta atividade catalítica para a redução do peróxido de hidrogênio em meio ácido. De acordo com esses autores, a redução do peróxido inicia-se em 0,5V vs. SCE, sendo catalisada pelos centros de íons Fe^{2+} alto spin (isto é, íons ferro coordenados ao nitrogênio (200)), tornando-se Fe^{3+} . Por sua vez, a oxidação catalítica do peróxido inicia-se num potencial de aproximadamente 0,7V vs. SCE, tendo o íon Fe^{3+} baixo spin (íons ferro coordenados ao carbono (200)) como centro catalítico. Dessa forma, os potenciais de oxidação e redução observados na Figura 41 estão em concordância com os valores apresentados, (137) salvo a pequena diferença relacionada aos diferentes eletrodos de referência.

Em suma, o método de eletrodeposição empregado (148) para a modificação da malha de carbono com azul da prússia possibilitou a obtenção de um filme seletivo ao peróxido de hidrogênio, mesmo na presença do oxigênio. De acordo com os autores, (148) o método de eletrodeposição foi otimizado efetivamente para que o filme de azul da prússia fosse sensível apenas ao peróxido de hidrogênio e não ao oxigênio. Idealmente, isso não era desejado para a utilização desse filme eletrocatalítico como cátodo em biocélulas a combustível, mas foi o único método entre os testados (199,205) que permitiu a obtenção de um filme com a estabilidade necessária para a realização dos diversos testes. De toda forma, o eletrodo desenvolvido foi aplicado com sucesso na construção de uma nova arquitetura de biocélula a combustível, em que a capacidade do filme de ser reoxidado pelo peróxido foi explorada para regenerar o cátodo e estender a vida útil do dispositivo, à semelhança de outros trabalhos com cátodos de estado sólido. (131,134)

5.3.5 Caracterização morfológica do eletrodo

A Figura 43 apresenta as micrografias eletrônicas de varredura obtidas a partir da malha de carbono antes (coluna esquerda) e depois (coluna direita) da eletrodeposição, em diferentes aumentos (300x, 1000x e 5000x).

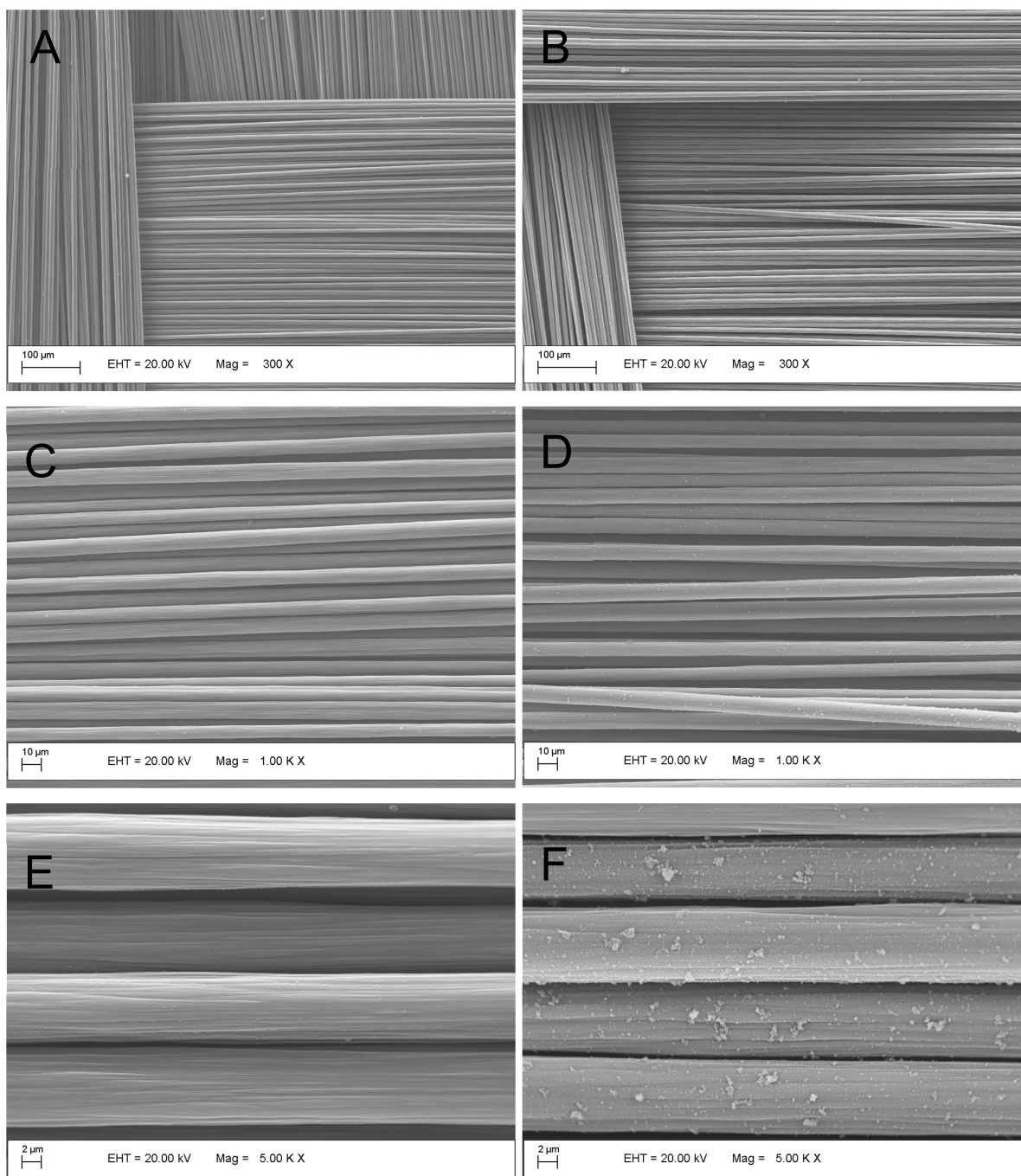


Figura 43 - Imagens obtidas por MEV do eletrodo sem modificação (malha de carbono, coluna esquerda) e modificado com azul da prússia (coluna direita), em diferentes magnificações: 300x (A e B), 1000x (C e D) e 5000x (E e F).

Fonte: Do autor.

As micrografias apresentadas na Figura 43 permitem observar a homogeneidade das fibras de carbono, característica das fibras de carbono a base de poliacrilonitrila. (206) A comparação das micrografias com maior ampliação evidencia claramente a diferença entre os eletrodos após a eletrodeposição. De modo semelhante a outras técnicas de modificação de cátodos com azul da prússia, (125,139,202) podem ser visualizados na Figura 43 F a presença de grânulos irregulares distribuídos de forma aleatória por toda a fibra de carbono. Além disso, dentro da ampliação utilizada, não se observou estruturas morfológicas regulares, como divulgado por outros autores. (127,134,196,207) O termo “filme” foi utilizado para designar a aparência macroscópica azul da superfície do eletrodo (Figura 38), embora a ampliação das micrografias apresentadas na Figura 43 não indiquem claramente a formação de um “filme” propriamente dito.

As imagens apresentadas na Figura 43 confirmam que o método de eletrodeposição empregado causou mudanças significativas na superfície do carbono. Para se avaliar a composição química desses grânulos que constituem o filme, foram realizadas medidas de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), cujos resultados são apresentados na Figura 44.

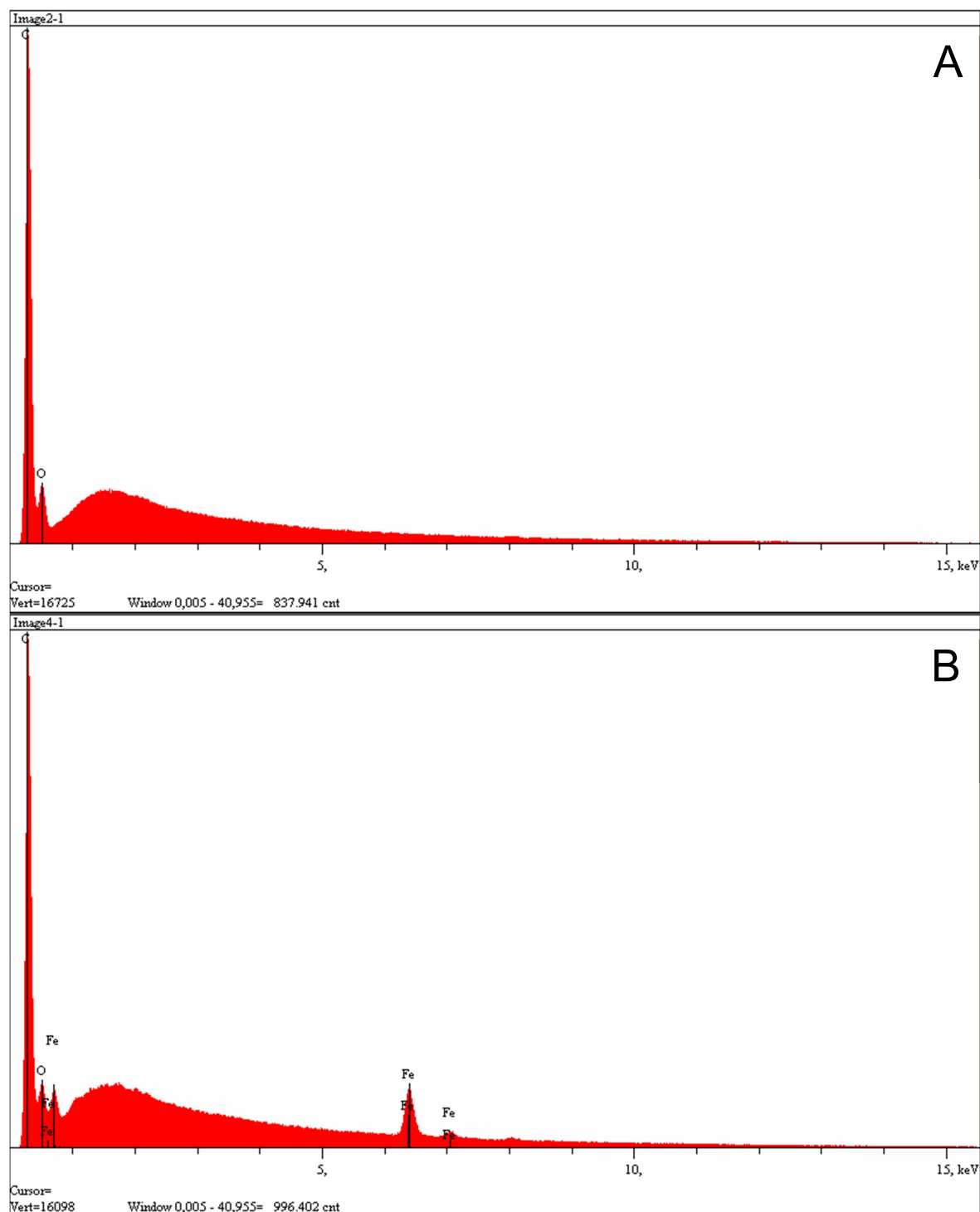


Figura 44 - Espectro de EDS da malha de carbono (A) e da malha eletrodepositada com azul da prússia (B).
Fonte: Do autor.

Os espectros de EDS apresentados na Figura 44 indicam a presença de picos característicos associados ao carbono ($K\alpha = 0,277$ keV), oxigênio ($K\alpha = 0,525$ keV) e ferro ($K\alpha = 6,405$ keV, $K\beta = 7,059$ keV, $L\alpha = 0,705$ keV). (208) Não se observa a presença de nitrogênio nem de potássio. No caso do nitrogênio, a ausência do sinal correspondente possivelmente deve-se à pequena quantidade desse elemento que acaba sendo mascarado pelo

sinal do carbono e do oxigênio, dada a proximidade de suas linhas espectrais (C = 0,277 keV; N = 0,392 keV; O = 0,525 keV). (208) Essa hipótese é corroborada pela comparação com o espectro de EDS de nanopartículas de azul da prússia apresentado por Pandey e Panday, (209) o qual apresenta a linha espectral do nitrogênio muito fraca e quase sobreposta à linha do carbono.

Segundo Mattos e Lo Gorton, (138) a espécie denominada na literatura como azul da prússia “insolúvel”, isto é, a forma férrico-ferricianeto $\text{Fe}^{3+}_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3$ apresenta em sua estrutura 14 moléculas de água em média, de forma que a presença do sinal correspondente ao oxigênio indica fortemente a presença de água na estrutura. A ausência do sinal referente ao potássio reforça a tese de que a forma eletrodepositada seja a supracitada. De fato, por meio de análises de EDS, Lundgren e Murray (210) mostraram que filmes de azul da prússia formados por eletrodeposição potenciostática não apresentam o K^+ em sua estrutura, o que é consistente com a forma “insolúvel” do azul da prússia. Ainda de acordo com esses autores, ciclos voltamétricos com eletrodos modificados com azul da prússia causam uma perda de sítios férricos e a incorporação de cátions de metais alcalinos. Assim sendo, os resultados espectroscópicos e voltamétricos obtidos no presente trabalho estão de acordo com as observações desses autores. (138,209,210) Desse modo, podemos concluir que a espécie eletrodepositada foi o azul da prússia “insolúvel”, $\text{Fe}^{3+}_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3$, passível de sofrer uma permuta entre íons férricos e cátions de metais alcalinos à medida que os sítios Fe^{3+} são reduzidos voltametricamente, (211,212) sendo o processo redox controlado pela difusão dos cátions do eletrólito na rede de azul da prússia ligado à superfície do eletrodo. (211)

5.3.6 Desempenho da biocélula a combustível de uma câmara

Os estudos de polarização da biocélula a combustível em estudo foram feitos através da variação da resistência externa (R_{ext}) e registro do potencial elétrico (E) correspondente. A partir de R e E, os valores de corrente e potência foram calculados por meio das Equações 10 e 11. As curvas de polarização construídas permitem uma avaliação do sistema a partir da visualização dos sobrepotenciais de eletrodos decorrentes de perdas de *i)* ativação, *ii)* ôhmicas e *iii)* concentração (6,9) como anteriormente apresentado.

A Figura 45 apresenta curvas de polarização e de potência representativas de várias medidas obtidas com a biocélula a combustível empregando-se o cátodo modificado com azul da prússia em duas diferentes condições: novo (após a eletrodeposição) e reativado (através do uso de peróxido de hidrogênio a 3% após a realização da curva de potência).

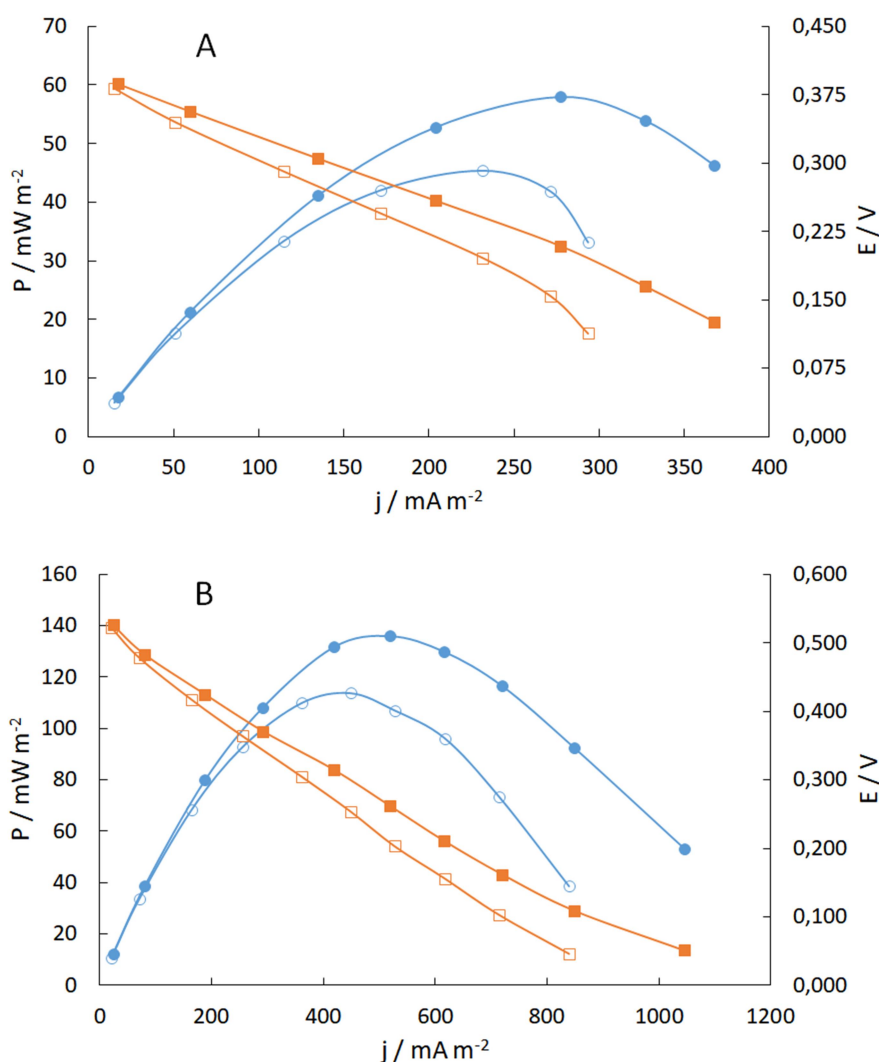


Figura 45 - Curvas de polarização (\square) e densidade de potência (\bullet) da biocélula a combustível de uma câmara empregando um eletrodo novo (A) e reativado (B), obtidas usando resistores na faixa de 100 $\text{k}\Omega$ a 1 $\text{k}\Omega$ em (A) e de 100 $\text{k}\Omega$ a 215 Ω em (B). Dados registrados após 30s (marcadores preenchidos) e 60s (marcadores sem preenchimento).

Fonte: Do autor.

Os gráficos apresentados na Figura 45 evidenciam uma diminuição do problema de perdas de concentração, observado nas duas primeiras partes do trabalho. Mesmo utilizando-se uma faixa mais ampla de resistências externas (100 $\text{k}\Omega$ a 1 $\text{k}\Omega$), a ocorrência do fenômeno *power overshoot* foi menos pronunciada que nos trabalhos anteriores. Essa observação, juntamente da maior potência gerada, indicam um melhor desempenho dessa arquitetura frente às duas anteriores e evidenciam um aperfeiçoamento da técnica de construção de MFCs ao longo do trabalho.

Os valores máximos de potência e corrente obtidos em diferentes testes realizados com as biocélulas a combustível estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 6 - P_{\max} e I_{\max} da MFC de uma câmara.

| MFC | $P_{\max}/\text{mW m}^{-2}$ | | $I_{\max}/\text{mA m}^{-2}$ | |
|---------------|-----------------------------|-----|-----------------------------|-----|
| | 30s | 60s | 30s | 60s |
| A | 70 | 47 | 304 | 181 |
| A | 117 | 81 | 481 | 311 |
| B | 77 | 54 | 320 | 254 |
| B | 58 | 45 | 277 | 232 |
| <i>Média</i> | 81 | 57 | 346 | 245 |
| Reativada - A | 136 | 114 | 519 | 448 |
| Reativada - B | 137 | 97 | 633 | 414 |
| <i>Média</i> | 137 | 106 | 576 | 431 |

Fonte: Do autor.

Considerando que os quatro primeiros testes com a biocélula a combustível foram repetições do mesmo experimento, os valores médios de potência e corrente foram respectivamente de $80,5 \pm 25,6 \text{ mW m}^{-2}$ e $345,5 \pm 92,1 \text{ mA m}^{-2}$, após 30s de funcionamento com cada resistor, e de $56,8 \pm 16,6 \text{ mW m}^{-2}$ e $244,5 \pm 53,9 \text{ mA m}^{-2}$, respectivamente, após 60s de funcionamento com cada resistor. A duplicata da biocélula após a reativação resultou em $136,5 \pm 0,71 \text{ mW m}^{-2}$ de potência e $576 \pm 80,6 \text{ mA m}^{-2}$ de corrente (30s) e $105,5 \pm 12,0 \text{ mW m}^{-2}$ de potência e $431,0 \pm 24,0 \text{ mA m}^{-2}$ de corrente (60s).

A fim de comparação, a Tabela 7 sumariza informações importantes da literatura pertinente em que se empregou leveduras como biocatalisadores.

Tabela 7 - Características experimentais obtidas de alguns trabalhos publicados empregando leveduras como biocatalisadores em MFC.

(continua)

| Biocatalisador | Substrato | Arquitetura / Ânodo / membrana / cátodo | Mediador / católito | $P_{\max} / \text{mW m}^{-2}$ | Ref. |
|---------------------------------|--|--|---|---|-------------|
| <i>Candida melibiosica</i> | Frutose, peptona e extrato de levedura | DC/feltro de carbono/ nafion 117/ feltro de carbono | Azul de metileno / $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 640 | (11) |
| <i>Candida melibiosica</i> | Frutose, peptona e extrato de levedura | DC/bastão de grafite/ ponte salina/ bastão de grafite | Azul de metileno / $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 185 | (24) |
| <i>Candida melibiosica</i> | Frutose | DC/feltro de carbono/ ponte salina/ feltro de carbono | Sem mediador/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 45 | (88) |
| <i>Candida melibiosica</i> | Frutose, peptona e extrato de levedura | DC/feltro de carbono+Ni/ nafion 117/ feltro de carbono | Sem mediador/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 720 | (213) |
| <i>Hansenula anomala</i> | Caldo nutriente | DC/grafite-PANI- Pt/Nafion 961/grafite | Sem mediador/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 2,9 W/m^3^* | (214) |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Glicose | DC/ fibra de carbono/ membrana catiônica/ fibra de carbono | HNQ/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 22 | (3) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | DC/feltro de carbono/ Nafion/ feltro de carbono | Azul de metileno (alta concentração)/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 1500 | (55) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | DC/ tecido de carbono/ nafion 117/ tecido de carbono | Azul de metileno/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 20 | (215) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | DC/ malha de platina/ nafion 117/ malha de platina | Azul de metileno/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 65 | (90) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Frutose | DC/ bastão de grafite/ ponte salina/bastão de grafite | Azul de metileno/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 41 | (124) |

Tabela 7 - Características experimentais obtidas de alguns trabalhos publicados empregando leveduras como biocatalisadores em MFC.

(conclusão)

| Biocatalisador | Substrato | Arquitetura / Ânodo / membrana / cátodo | Mediador / católito | $P_{\max} / \text{mW m}^{-2}$ | Ref. |
|---------------------------------|-----------|---|--|-------------------------------|-------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | DC/ suporte cerâmico grafiteado/ catiônica/ papel carbono | Azul de metileno/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 130 | (58) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | DC/ fibra de carbono/ catiônica/ fibra de carbono | HNQ/ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ | 22 | (3) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | DC/placa de grafite/ nafion 117/ placa de grafite | Azul de metileno/ O_2 | 2 | (54) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | DC/placa de grafite/ nafion 117/ placa de grafite | Tionina/ O_2 | 60 | (56) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Xilose | SC/placa de grafite/ teflon/ tecido de carbono + Pt | Azul de metileno/ O_2 | 39 | (216) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | SC/ papel carbono/ nafion 212/ papel carbono + Pt | Sem mediador/ O_2 | 3 | (89) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | SC/placa de grafite/ nafion 117/ placa de grafite | Sem mediador/ O_2 | 25 | (149) |

Fonte: Do autor.

Notas: HNQ: 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; DC: duas câmaras; SC: uma câmara; PANI: polianilín. Foram selecionados apenas os maiores valores de potência e os correspondentes substratos.*não fornece dados para conversão em mW m^{-2} .

A análise da Tabela 7 permite concluir que a grande maioria dos trabalhos utilizou uma arquitetura de duas câmaras, separadas por membranas catiônicas e com diferentes tipos de eletrodos de grafite. A potência gerada com essa arquitetura variou amplamente, desde 2 mW m^{-2} até 1500 mW m^{-2} . Apesar do bom desempenho observado pela potência gerada em alguns desses sistemas, a arquitetura de uma câmara ainda é mais interessante do ponto de vista de sua aplicabilidade prática. (4,17,23) Foi encontrado um número bem menor de trabalhos com arquitetura de uma câmara, com potência gerada variando entre 3 e 39 mW m^{-2} . Apesar da arquitetura mais simples, o funcionamento dessas biocélulas é sempre reportada utilizando-se

um catalisador de platina e/ou membrana catiônica, que são componentes de maior custo. Dessa forma, a comparação dos valores de potência obtidos com a biocélula de uma câmara desenvolvida no presente trabalho com os artigos de mesma arquitetura relacionados na Tabela 5 apresentou um desempenho consideravelmente superior, apesar da necessidade do mediador azul de metileno.

A esse respeito, uma questão importante deve ser considerada. Os resultados apresentados na Figura 45 e Tabela 6 mostram valores máximos de potência mais altos que os de outros trabalhos que utilizam o mesmo tipo de arquitetura. Isso se deve, em parte, às diferentes condições experimentais para a construção das curvas de polarização em todos os trabalhos. Segundo Logan *et al*, (4) quando a curva de polarização é obtida pela variação da resistência externa, os valores de potencial devem ser obtidos apenas quando um estado pseudo-estacionário tiver sido atingido, o que pode levar vários minutos. Nesse sentido, Watson e Logan (106) discutem sobre três diferentes métodos para obtenção das curvas de polarização; Winfield *et al* (166) mostram que a taxa de amostragem de 30s, 1 minuto ou 3 minutos (tempo em que a resistência externa fica ligada ao sistema) influencia de maneira muito significativa o resultado de potência gerado, fato também investigado por outros autores. (217) Dado que um tempo muito longo para obtenção do estado pseudo-estacionário pode levar a mudanças na concentração do substrato na câmara anódica, (4) nota-se na literatura que não há um consenso do tempo ideal de aplicação das diferentes resistências externas ao circuito da biocélula, variando desde 30s, (166) minutos, (11,28) até dias, (106) reforçando-se que muitos trabalhos nem fazem menção a tal informação. (17,24,67,84) Desse modo, com os dados de E e I registrados no intervalo de tempo de 30 ou 60 segundos para a construção das curvas de polarização, a potência gerada pela biocélula foi maximizada (Tabela 4) e as perdas de concentração (*power overshoot*) (28,106,166) previamente discutidas foram minimizadas (Figura 45).

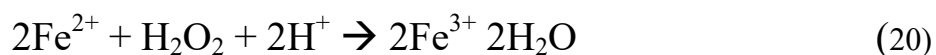
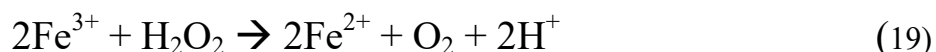
Os dados apresentados na Figura 45 e Tabela 6 mostraram um expressivo aumento de 70% na potência gerada pela biocélula após a reativação do cátodo com o peróxido. Esse aumento pode ser atribuído a dois fatores: *i*) a reoxidação do cátodo, e *ii*) incorporação do H₂O₂ ao ágar.

Sobre a reoxidação do cátodo, os estudos voltamétricos anteriormente apresentados mostraram a efetividade do filme de branco da prússia na redução do peróxido de hidrogênio a hidroxila, conforme a Equação 17. Por consequência, o filme de azul da prússia é regenerado, tornando-se apto novamente a receber os elétrons provenientes da reação anódica conforme explicado no item 5.3.1. A respeito do segundo fator, durante o processo de

reativação do eletrodo há, muito provavelmente, a absorção de peróxido pelo ágar aderido ao eletrodo, dada a propriedade do gel de ágar absorver até 20 vezes o seu próprio peso em água (218) de forma que o peróxido pode também atuar como católito, sendo reduzido a água ($E^0 = 1,78 \text{ V}$): (219)



Uma observação importante a ser feita é o desprendimento de um gás durante o processo de reativação do eletrodo. Evidentemente, esse gás é o oxigênio proveniente do peróxido de hidrogênio, e que pode ser atribuído a dois fatores: desproporcionamento do peróxido e ação do peróxido como agente redutor. De acordo com Shriver e Atkins, (219) o desproporcionamento do peróxido na presença de Fe^{3+} pode ser equacionado da seguinte maneira: (Equações 19 - 21)

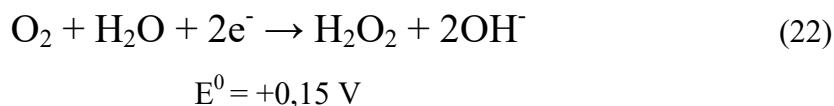


De forma que a reação global é a decomposição do H_2O_2 (Equação 21):



A reação de desproporcionamento é lenta, mas pode se tornar explosiva quando catalisada por uma superfície metálica ou por álcalis dissolvidos a partir do vidro do frasco de armazenagem. Esses mesmos autores (219) mostraram ainda, por meio de cálculos termodinâmicos, que o Fe^{3+} é um catalisador altamente efetivo para o desproporcionamento do H_2O_2 . Em concordância com Itaya *et al* (137) como previamente discutido, essa sequência de reações parecem bastante razoáveis para explicar o desprendimento de oxigênio.

O segundo fator, isto é, a ação do peróxido como agente redutor é uma hipótese menos provável, pois há a necessidade de meio alcalino para que a reação aconteça (Equação 22): (219,220)



Desse modo, como a oxidação do peróxido de hidrogênio em meio alcalino formando oxigênio e água possui potencial negativo, constitui um processo termodinamicamente desfavorável.

5.3.7 Aplicação

Devido aos resultados satisfatórios obtidos com a MFC de uma câmara, quando comparados à literatura (Tabela 7), foi avaliada a possibilidade de se usar levedura descartada durante a fase de fermentação do processo de produção de uma cervejaria local como biocatalisador.

A levedura cervejeira faz parte do efluente de cervejaria, que tem sido explorado como substrato para células a combustível microbianas (213,221–223) por suas características favoráveis à adaptação dos micro-organismos e produção de energia, tais como alta carga de matéria orgânica dissolvida (tipicamente entre 3000–5000 mg de DQO L⁻¹), baixa concentração de N amoniacal (que age como um inibidor) e a ausência de substâncias tóxicas para os micro-organismos. (76) O grupo de trabalho de Wang e Feng (221,223) relatou a produção de até 205 mW m⁻² (223) e 483 mW m⁻² (221) de potência e redução da carga orgânica do efluente empregando arquitetura de uma câmara com catalisador catódico de platina.

Nesse sentido, a produção de energia da biocélula a combustível com cátodo sólido utilizando resíduo de cervejaria foi avaliada por meio de curvas de polarização. O excesso de levedura descartado durante a fase de fermentação foi empregado como inóculo, nas mesmas condições experimentais dos testes anteriores. Os resultados são apresentados na Figura 46.

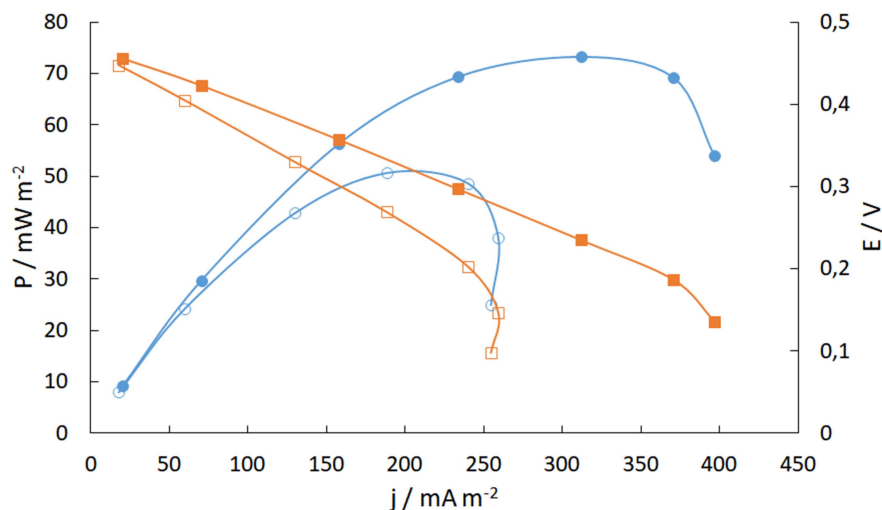


Figura 46 - Curvas de polarização (■) e densidade de potência (●) da biocélula a combustível de uma câmara empregando resíduo de cervejaria (levedura) como inóculo, obtidas usando resistores na faixa de $100 \text{ k}\Omega$ a $1 \text{ k}\Omega$. Dados registrados após 30s (marcadores preenchidos) e 60s (marcadores sem preenchimento).

Fonte: Do autor.

O resultado de potência obtido igual a $67,5 \pm 7,8 \text{ mW m}^{-2}$ mostra que a arquitetura de baixo custo desenvolvida tem potencial aplicação para geração de energia com esse tipo de efluente. Levando em consideração que a maior produção de energia relatada por outros trabalhos na literatura (221–223) requereu a utilização de platina como catalisador catódico, a nova arquitetura desenvolvida reduz significativamente o custo do sistema, de modo que a relação custo-benefício pode tornar-se muito vantajosa.

5.3.8 Conclusão parcial

A arquitetura desenvolvida eliminou os contatos elétricos metálicos, substituiu o catalisador catódico de platina pelo azul da prússia e as membranas por uma ponte salina, comprovando as hipóteses i e iv. Foram usados eletrodos de malha de carbono dispostos de forma a permitir a miniaturização do dispositivo e azul de metileno como mediador de transferência eletrônica. É essencialmente uma prova de conceito pois, diferentemente de outros dispositivos de baixo custo, (124,224) foi construída de tal forma a permitir uma fácil adaptação a diferentes condições experimentais, como por exemplo, outros tipos de micro-organismos e substratos. Devido o foco dessa terceira parte do trabalho ser a arquitetura e não a microbiota, utilizamos a levedura de padaria e o azul de metileno pela simplicidade de manipulação, e pela razoável quantidade de energia gerada nesse modelo. Os resultados

mostraram que o azul da prússia eletrodepositado no cátodo atuou como um satisfatório receptor de elétrons, passível de ser reoxidado por peróxido de hidrogênio, composto cujas reações catalíticas de oxidação e redução foram demonstradas. Não houve atividade catalítica de redução do oxigênio. Por fim, a potência gerada pelo novo sistema apresentou valores superiores aos relatados na literatura, quando considerados o tipo de micro-organismo e arquitetura. Quando aplicada à produção de energia a partir de resíduo de cervejaria, o resultado obtido foi menor que o de outros trabalhos, porém a relação custo-benefício ainda mostrou-se significativamente favorável à arquitetura desenvolvida, visto que dispensa a utilização de platina como catalisador catódico. Nesse sentido, adaptações ao modelo construído poderiam auxiliar em sistemas contínuos de tratamento de efluentes e geração de energia.

6 CONCLUSÕES

Nessa tese foram desenvolvidas três tipos de biocélulas a combustível independentes, porém estritamente relacionadas (Tabela 8).

Tabela 8 - Resumo dos resultados obtidos com as biocélulas a combustível desenvolvidas nesta tese.

| Biocélula | Arquitetura | Micro-organismo | Substrato | Potência / mW m^{-2} |
|-----------|--------------|---|---|--------------------------------|
| 1 | Duas câmaras | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Frutose | 41 |
| | | | Glicose | 38 |
| | | | Sacarose | 34 |
| | | | Glicose / citrato | 27 |
| | | | Glicose / N ₂ | 14 |
| | | | Glicose / O ₂ | 3,3 |
| 2 | Duas câmaras | Microbiota de kefir | Açúcar mascavo (predominantemente sacarose) | 54 (na presença de mediador) |
| | | | | 3 (na ausência de mediador) |
| 3 | Uma câmara | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glicose | 81 (30 s, eletrodo novo) |
| | | | | 137 (30 s, eletrodo reativado) |
| | | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (resíduo de cervejaria) | Glicose | 68 (30 s, eletrodo novo) |

Fonte: Do autor.

De maneira geral, os estudos foram conduzidos pelos princípios da Química Verde (225) e pela opção de materiais de baixo custo e fácil aquisição. Nessa linha, optou-se pela utilização de micro-organismos seguros (*S. cerevisiae* ou consórcio microbiano de kefir), eletrodos de grafite ou de malha de carbono, ponte salina a base de ágar e KCl, bem como arquitetura de duas câmaras (duas primeiras partes do trabalho) ou de uma câmara (terceira parte). Seguem-se as conclusões gerais.

Primeira parte: **Biocélula a combustível de baixo custo como ferramenta de ensino.**

- a) na primeira parte foi mostrado que a tecnologia de biocélulas a combustível pode ser uma ferramenta útil para o ensino de Química e Bioquímica;
- b) os experimentos foram elaborados de modo a permitir a realização dos testes dentro do tempo usual de uma ou duas aulas práticas experimentais. Através da monitoração da diferença de potencial elétrico ao longo da fermentação, vários parâmetros qualitativos químicos e bioquímicos puderam ser avaliados. Entre eles, a viabilidade celular e a presença do mediador azul de metileno tiveram um efeito muito significativo sobre o potencial gerado pelo sistema, sendo a concentração inicial de levedura na câmara anódica igual a 32 mg mL^{-1} a mais adequada para a condução dos experimentos;
- c) a avaliação de diferentes substratos (glicose, frutose e sacarose) utilizados como combustível mostrou que o metabolismo da frutose foi responsável pela maior diferença de potencial gerada, fato atribuído aos mecanismos bioquímicos chamados Efeito *Crabtree* e sequestro de fosfato;
- d) os resultados obtidos com esse conjunto de testes indicaram que a resposta elétrica da biocélula a combustível é dependente da atividade metabólica do micro-organismo;
- e) citrato e oxigênio causaram uma diminuição da variação de potencial elétrico da biocélula a combustível, atribuída ao efeito inibitório do citrato sobre a enzima fosfofrutoquinase-1 e à competição entre o oxigênio e o mediador pelos elétrons produzidos durante a atividade metabólica;
- f) os resultados experimentais relativos ao fracionamento celular mostraram que a fração sobrenadante (conteúdo intracelular) causou a descoloração do mediador azul de metileno e um aumento na resposta elétrica muito mais pronunciado que a fração contendo os fragmentos de membranas, sugerindo que redução do mediador

seja causada pela atividade enzimática intracelular e não por compostos redox confinados à superfície das membranas;

- g) os resultados obtidos com as curvas de potência e polarização foram concordantes com os resultados qualitativos sinalizados pelos ensaios anteriores. A maior potência ($41 \pm 0,3 \text{ mW m}^{-2}$) foi obtida utilizando frutose como substrato, seguida pelo resultado obtido com glicose ($38 \pm 1 \text{ mW m}^{-2}$). O efeito inibitório do citrato foi observado substituindo-se o sistema tamponante, evidenciado pelo resultado de $27 \pm 0,1 \text{ mW m}^{-2}$, e a menor potência gerada ($3,3 \pm 0,3 \text{ mW m}^{-2}$) ocorreu no sistema totalmente aeróbico, como teoricamente esperado.

Segunda parte: **Avaliação do consórcio microbiano kefir como novo biocatalisador anódico em MFC.**

- a) na segunda parte do trabalho foi empregada uma arquitetura semelhante para avaliação do kefir como biocatalisador anódico em biocélula a combustível ao longo de 72h de fermentação. O principal achado desse trabalho foi obtido através de medidas físico-químicas, que demonstraram o efeito do azul de metileno sobre o metabolismo microbiano, fato atribuído à interação mediador-NADH;
- b) o desempenho de biocélulas contendo ou não azul de metileno foram comparados por meio de curvas de potência e polarização, confirmando a necessidade do mediador para a maior geração de potência elétrica;
- c) o valor máximo obtido foi de 54 mW m^{-2} depois de 24h de fermentação, no sistema agitado (100 rpm) contendo mediador;
- d) a agitação do anólito favoreceu o fluxo de reagentes e produtos no eletrodo, reduzindo as perdas de transferência de massa, e com isso resultando no aumento da potência gerada;
- e) o mecanismo de transferência eletrônica do azul de metileno foi controlado por difusão (relação linear entre I_{pa} e $v^{1/2}$);
- f) nas curvas de potência e polarização obtidas no sistema estático foi observado um expressivo efeito “*power overshoot*”, caracterizado por uma queda acentuada do potencial em maiores densidades de corrente, que foi reduzido mas não eliminado com a agitação do anólito a 100 rpm durante a realização da curva de polarização;
- g) no sistema estático a potência gerada após 24h de fermentação foi praticamente a mesma obtida na primeira parte do trabalho com os substratos glicose e sacarose;

- h) a constatação de que variação da viscosidade ao longo de 72h de fermentação não apresentou diferença estatística significativa foi atribuída ao pequeno consumo de açúcares pelo kefir (12-15%) durante o tempo avaliado, conforme determinado quantitativamente pelo método DNS;
- i) a cromatografia em papel mostrou que a sacarose presente no caldo fermentativo foi hidrolisada pelas cepas dos micro-organismos presentes no kefir, produzindo frutose e glicose, sendo esta última consumida preferencialmente;
- j) como esperado, a queda do pH ao longo da fermentação foi acompanhada pelo aumento da acidez total titulável, em que o sistema sem mediador apresentou maior acidez e menor consumo de açúcares (evidenciado pelo método DNS), sugerindo maior eficiência de consumo de açúcares pelo metabolismo celular na ausência do mediador;
- k) a contagem total de micro-organismos revelou um perfil característico de crescimento microbiano, e a maior potência gerada foi obtida em paralelo ao maior aumento do número de colônias;
- l) os estudos voltamétricos não identificaram a presença de nenhum tipo de mediador exógeno, justificando a necessidade de adição do azul de metileno para se favorecer a transferência eletrônica;
- m) houve um aumento na concentração da leuco-forma do mediador em função do tempo de fermentação. A partir da variação dos potenciais de pico anódico e catódico, sugeriu-se um processo eletroquímico quasi-reversível para as moléculas de azul de metileno;
- n) os estudos espectrofotométricos confirmaram o aumento da concentração da leuco-forma do mediador ao longo da fermentação.

Terceira parte: Desenvolvimento de novo modelo de arquitetura de uma câmara e estudo do catalisador catódico.

Enquanto nos dois primeiros trabalhos os estudos avaliaram principalmente a microbiota e o ânodo/anólito, na terceira parte do trabalho o foco foi a arquitetura e o cátodo.

- a) as propriedades eletroquímicas do hexacianoferrato férrico (azul da prússia) foram exploradas pela eletrodeposição desse composto de coordenação sobre malha de carbono, o que permitiu a obtenção de um cátodo em estado sólido de baixo custo, de fácil preparo e reativação;

- b) a arquitetura de uma câmara empregou ainda conexões hidráulicas comerciais comuns para a montagem do compartimento anódico, reduzindo o custo dos materiais necessários para a construção do dispositivo;
- c) a eletrodeposição do azul da prússia com a aplicação de 0,4 V *vs.* Ag/AgCl por 600s ao eletrodo de trabalho imerso em uma solução contendo Fe^{3+} e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ resultou em eletrodos com boa estabilidade durante sucessivos ciclos voltamétricos, e em níveis comparáveis aos de outros trabalhos da literatura;
- d) os testes voltamétricos e eletrolíticos mostraram que o funcionamento da biocélula a combustível de uma câmara causa a redução do azul da prússia a branco da prússia;
- e) a avaliação qualitativa de aspectos cinéticos inerentes ao eletrodo modificado feita por voltametria cíclica revelou um mecanismo redox de controle difusional decorrente da intercalação dos íons K^+ na estrutura do azul da prússia e um comportamento quasi-reversível do sistema;
- f) a caracterização morfológica do eletrodo antes e depois da eletrodeposição confirmou a formação de um filme de $\text{Fe}^{3+}_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3$, em concordância com o método de eletrodeposição empregado;
- g) o azul da prússia eletrodepositado não apresentou atividade catalítica para a redução do oxigênio;
- h) por outro lado, os resultados voltamétricos mostraram que as reações de oxidação e redução do peróxido de hidrogênio podem ser catalisadas pelo eletrodo modificado;
- i) a catálise de oxi-redução do peróxido pelo azul da prússia foi explorada para reativação do eletrodo após o funcionamento da biocélula a combustível, resultando num aumento expressivo na potência gerada, causado provavelmente pela oxidação do branco da prússia a azul da prússia (renovando o eletrodo) e pela absorção de peróxido pelo ágar da ponte salina;
- j) o valor máximo de potência foi de $136,5 \text{ mW m}^{-2}$, obtido com o eletrodo reativado e tempo de leitura de 30s. Esse valor foi significativamente maior que de outros trabalhos na literatura empregando arquitetura de uma câmara e leveduras como biocatalisadores, com a ressalva da diferença dos tempos para a construção da curva de potência;
- k) os resultados obtidos com resíduo de cervejaria como inóculo para a MFC de uma câmara e cátodo sólido resultou na produção de $67,5 \pm 7,8 \text{ mW m}^{-2}$ sugerindo uma

aplicabilidade a se explorar para a nova arquitetura de MFC de baixo custo construída.

Em conjunto, os estudos realizados nesse trabalho mostraram a utilidade das biocélulas a combustível como ferramenta didática para o ensino, a possibilidade de uso do kefir como biocatalisador anódico e uma simplificação desenvolvida para arquitetura de uma câmara, valendo-se dos princípios da Química Verde (225) relacionados à “catálise”, “uso de fontes renováveis de energia” e “eficiência energética”, temas muito recorrentes e de grande interesse no contexto científico atual.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse trabalho iniciou uma linha de pesquisa junto ao Laboratório de Bioquímica da UNIFAL-MG. Nesse sentido, há diversas frentes de trabalho que poderão ser implementadas e melhoradas no futuro, como por exemplo, a arquitetura, o separador (eletrolito), a transferência eletrônica, a microbiota, e parâmetros de caracterização do sistema, além do valor de potência.

A arquitetura de uma câmara desenvolvida poderá ser melhorada através da otimização da eletrodeposição do catalisador de ferro. Uma vez que o catalisador de platina tem alto custo, espera-se que a modificação de parâmetros químicos e eletroquímicos permita a obtenção de uma estrutura química de azul da prússia que catalise a redução do oxigênio (125,127) para o funcionamento contínuo e por mais tempo da biocélula a combustível. O ágar/KCl utilizado como separador apresenta baixa resistência mecânica e pode sofrer desidratação na ausência de anólito, causando vazamentos. Essas características constituem uma limitação à utilização desse tipo de arquitetura em sistemas contínuos de tratamento de efluentes e geração de energia, (23,165) mas podem ser corrigidas com a utilização de outros tipos de separadores, como por exemplo, membranas cerâmicas de baixo custo. (224)

A utilização do mediador azul de metileno favorece a transferência eletrônica e confere um apelo didático muito interessante, devido às mudanças de coloração sofridas durante o funcionamento e à simplificação da interpretação do fenômeno ao estudante, porém sua utilização constitui uma limitação à utilização da biocélula a combustível nos sistemas supracitados. Dessa forma, o emprego de meios fermentativos que favoreçam a produção de mediadores endógenos pelas cepas poderá contribuir para o aumento da potência gerada e simplificação do sistema que utilizou o kefir, por exemplo.

A capacidade que alguns tipos de micro-organismos têm de promover a transferência eletrônica direta também é um campo de pesquisa muito promissor, que, entretanto, não foi explorado nesse trabalho. Mesmo colônias mistas obtidas a partir de amostras retiradas de efluentes domésticos ou de estações de tratamento apresentam essa propriedade, (17,166) sendo uma alternativa muito atraente para os estudos futuros, quando comparada a micro-organismos reconhecidamente capazes de promover a transferência eletrônica direta. (49,71)

Por fim, os parâmetros relativos à remoção de carbono total, as demandas química e bioquímica de oxigênio, bem como a eficiência coulômbica, deverão fazer parte dos protocolos de caracterização dos futuros sistemas.

REFERÊNCIAS

- 1 SHLEEV, S.; BERGEL, A.; GORTON, L. Biological fuel cells, divergence of opinion. **Bioelectrochemistry**, v. 106, p. 1–2, 2015.
- 2 BULLEN, R. A. *et al.* Biofuel cells and their development. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 11, p. 2015–2045, 2006.
- 3 KANESHIRO, H. *et al.* A milliliter-scale yeast-based fuel cell with high performance. **Biochemical Engineering Journal**, v. 83, p. 90–96, fev. 2014.
- 4 LOGAN, B. E. *et al.* Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 17, p. 5181–5192, set. 2006.
- 5 AQUINO NETO S.; ANDRADE A. R. D. New Energy Sources, The Enzymatic Biofuel Cell. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1891 – 1912, 2013.
- 6 OSMAN, M. H.; SHAH, A. A.; WALSH, F. C. Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 7, p. 3087–3102, mar. 2011.
- 7 SOKIC-LAZIC, D.; MINTEER, S. D. Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 4, p. 939–944, dez. 2008.
- 8 OSMAN, M. H.; SHAH, A. A.; WALSH, F. C. Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part II: Microbial. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 3, p. 953–963, 15 nov. 2010.
- 9 LOGAN B. E. **Microbial fuel cells**. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2008.
- 10 HUANG, L.; REGAN, J. M.; QUAN, X. Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. **Bioresourc Technology**, v. 102, n. 1, p. 316–323, jan. 2011.
- 11 BABANOVA, S.; HUBENOVA, Y.; MITOV, M. Influence of artificial mediators on yeast-based fuel cell performance. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 379–387, out. 2011.
- 12 DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Biofuel cells—Recent advances and applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 7, p. 1224–1235, fev. 2007.
- 13 GARJONYTE, R., MELVYDAS, V., MALINAUSKAS, A. Mediated amperometric biosensors for lactic acid based on carbon paste electrodes modified with baker’s yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 68, p. 191-196, 2006.
- 14 RACHINSKI, S. *et al.* Pilhas de combustíveis microbianas utilizadas na produção de eletricidade a partir de rejeitos orgânicos: uma perspectiva de futuro. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1773–1778, 2010.
- 15 JIA, B. *et al.* Increased power density from a spiral wound microbial fuel cell. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 894–897, mar. 2013.

- 16 RABAEY, K.; VERSTRAETE, W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 291–298, jun. 2005.
- 17 LIU, H.; LOGAN, B. E. Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton Exchange Membrane. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 14, p. 4040–4046, jul. 2004.
- 18 FREGUIA, S. *et al.* *Lactococcus lactis* catalyses electricity generation at microbial fuel cell anodes via excretion of a soluble quinone. **Bioelectrochemistry**, v. 76, n. 1–2, p. 14–18, set. 2009.
- 19 MIN, B.; CHENG, S.; LOGAN, B. E. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. **Water Research**, v. 39, n. 9, p. 1675–1686, maio 2005.
- 20 LI, W.-W. *et al.* Recent advances in the separators for microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 244–252, jan. 2011.
- 21 WANG, Y.-F. *et al.* Electrochemical regulation of the end-product profile in *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 with an endogenous mediator. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 579–586, 15 out. 2008.
- 22 AHMAD, F. *et al.* A review of cellulosic microbial fuel cells: Performance and challenges. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 179–188, set. 2013.
- 23 LIU, H.; RAMNARAYANAN, R.; LOGAN, B. E. Production of Electricity during Wastewater Treatment Using a Single Chamber Microbial Fuel Cell. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 7, p. 2281–2285, abr. 2004.
- 24 HUBENOVA, Y.; MITOV, M. Potential application of *Candida melibiosica* in biofuel cells. **Bioelectrochemistry**, v. 78, n. 1, p. 57–61, abr. 2010.
- 25 PATIL, S. A. *et al.* Electricity generation using chocolate industry wastewater and its treatment in activated sludge based microbial fuel cell and analysis of developed microbial community in the anode chamber. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5132–5139, nov. 2009.
- 26 RABAEY, K. *et al.* Biofuel Cells Select for Microbial Consortia That Self-Mediate Electron Transfer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5373–5382, 1 set. 2004.
- 27 CATAL, T. *et al.* Electricity production from twelve monosaccharides using microbial fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 175, n. 1, p. 196–200, jan. 2008.
- 28 IEROPOULOS, I.; WINFIELD, J.; GREENMAN, J. Effects of flow-rate, inoculum and time on the internal resistance of microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3520–3525, maio 2010.
- 29 GALVANI, L. **De bononiensi scientiarum et artium instituto atque academia comentarrii**, v. 7, p. 363–418, 1791.
- 30 TOLENTINO, M.; ROCHA-FILHO, R. C. O bicentenário da invenção da pilha elétrica. **Química Nova na Escola**, v. 11, p. 35–39, 2000.

- 31 GROVE, W. R. On voltaic series and the combination of gases by platinum. **Philosophical Magazine**, v. 3, n. 14, p. 127-130, 1839.
- 32 POTTER, M. C. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 84, p. 260–276, 1911.
- 33 COHEN, B. The Bacterial Culture as an Electrical Half-Cell. **Journal of Bacteriology**, v. 21, p. 18, 1931.
- 34 WINGARD, L. B.; SHAW, C. H.; CASTNER, J. F. Bioelectrochemical fuel cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n. 3, p. 137–142, 1982.
- 35 PALMORE, G. T. R.; WHITESIDES, G. M. Microbial and enzymatic biofuel cells. **ACS Publications**, p. 271-290, 1994
- 36 HABERMÜLLER, K.; MOSBACH, M.; SCHUHMANN, W. 315 Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 366, n. 6–7, p. 560–568, 2000.
- 37 WEI, J.; LIANG, P.; HUANG, X. Recent progress in electrodes for microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9335–9344, out. 2011.
- 38 LOGAN, B. E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 375–381, 2009.
- 39 BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**, 5. ed., New York: W. H. Freeman, 2002.
- 40 VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**, 4. ed., NJ: John Wiley & Sons Hoboken, , 2011.
- 41 MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 441-454, 2008.
- 42 BENZ, M.; BRUNE, A.; SCHINK, B. Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 2, p. 159–165, 1998.
- 43 IN SEOP, C. *et al.* Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 163-177, 2006.
- 44 BYUNG-HONG, K. *et al.* Direct electrode reaction of Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 127-131, 1999.
- 45 KIM B.H. *et al.* Electrochemical activity of an Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. **Biotechnology Techniques**, v.13, n. 7, p. 475–478, 1999.
- 46 INOUE, S. *et al.* Structural optimization of contact electrodes in microbial fuel cells for current density enhancements. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 177, p. 30–36, abr. 2012.

- 47 CHAUDHURI, S. K.; LOVLEY, D. R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1229–1232, out. 2003.
- 48 SUN, J.-J. *et al.* A novel layer-by-layer self-assembled carbon nanotube-based anode: Preparation, characterization, and application in microbial fuel cell. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 9, p. 3041–3047, mar. 2010.
- 49 KIM, H. J. *et al.* A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 2, p. 145–152, 2002.
- 50 GORBY, Y. A. *et al.* Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11358–11363, 2006.
- 51 POPOV, A. L. *et al.* The effect of physico-chemically immobilized methylene blue and neutral red on the anode of microbial fuel cell. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 2, p. 361–370, abr. 2012.
- 52 LIN, C.-W. *et al.* Effects of different mediators on electricity generation and microbial structure of a toluene powered microbial fuel cell. **Fuel**, v. 125, p. 30–35, jun. 2014.
- 53 HOSSEINI, M. G.; AHADZADEH, I. Electrochemical impedance study on methyl orange and methyl red as power enhancing electron mediators in glucose fed microbial fuel cell. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 4, p. 617–621, jul. 2013.
- 54 RAHIMNEJAD, M. *et al.* Methylene blue as electron promoters in microbial fuel cell. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 20, p. 13335–13341, out. 2011.
- 55 GANGULI, R.; DUNN, B. S. Kinetics of Anode Reactions for a Yeast-Catalysed Microbial Fuel Cell. **Fuel Cells**, v. 9, n. 1, p. 44–52, fev. 2009.
- 56 RAHIMNEJAD, M. *et al.* Thionine increases electricity generation from microbial fuel cell using *Saccharomyces cerevisiae* and exoelectrogenic mixed culture. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 575–580, ago. 2012.
- 57 SANTORO, C. *et al.* Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. **Journal of Power Sources**, v. 356, p. 225–244, jul. 2017.
- 58 HIDALGO, D. *et al.* Streamlining of commercial Berl saddles: A new material to improve the performance of microbial fuel cells. **Energy**, v. 71, p. 615–623, jul. 2014.
- 59 HUBENOVA, Y.; MITOV, M. Extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cells: A review. **Bioelectrochemistry**, v. 106, p. 177–185, dez. 2015a.
- 60 LEE, S.-K.; MILLS, A. Novel photochemistry of leuco-Methylene Blue. **Chemical Communications**, n. 18, p. 2366, 2003a.

- 61 HOFFMANN, A. A. *et al.* Methylene blue immobilized on cellulose acetate with titanium dioxide: an application as sensor for ascorbic acid. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 943–949, 2008.
- 62 COURNET, A. *et al.* Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 4, p. 505–508, abr. 2010a
- 63 COURNET, A. *et al.* Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa*. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 17, p. 4902–4908, jul. 2010b.
- 64 RABAEY, K. *et al.* Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 9, p. 3401–3408, 2005.
- 65 HERNANDEZ, M. E.; KAPPLER, A.; NEWMAN, D. K. Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 921–928, 1 fev. 2004.
- 66 SHUKLA, A. K. *et al.* Biological fuel cells and their applications. **Current Science**, v. 87, n. 4, p. 455–468, 2004.
- 67 IEROPOULOS, I. A. *et al.* Comparative study of three types of microbial fuel cell. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 238–245, jul. 2005.
- 68 MAY, J. M. Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. **AJP: Cell Physiology**, v. 286, n. 6, p. C1390–C1398, 1 jun. 2004.
- 69 ROZENDAL, R. A. *et al.* Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 450–459, ago. 2008.
- 70 SKOOG, D. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8. ed. norte-americana. São Paulo: Thomsom, 2005. 1026 p.
- 71 BOND, D. R.; LOVLEY, D. R. Electricity Production by *Geobacter sulfurreducens* Attached to Electrodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1548–1555, 1 mar. 2003.
- 72 GENTIL, V. Corrosão. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- 73 JOHNSON, D. E.; HILBURN, J. L.; JOHNSON, J. R. **Fundamentos de análise de circuitos elétricos**. Tradução de Martins, O.A. e Santis, M.A.M. 4. ed. Rio de Janeiro: Prantice Hall, 1994.
- 74 MARTIN, E. *et al.* Electrochemical characterization of anodic biofilm development in a microbial fuel cell. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 43, n. 5, p. 533–540, maio 2013.
- 75 FAN, Y.; SHARBROUGH, E.; LIU, H. Quantification of the Internal Resistance Distribution of Microbial Fuel Cells. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 21, p. 8101–8107, nov. 2008.

- 76 PANT, D. *et al.* A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1533–1543, mar. 2010.
- 77 ROSENBAUM, M. *et al.* Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 324–333, jan. 2011.
- 78 MANOHAR, A. K. *et al.* The use of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the evaluation of the electrochemical properties of a microbial fuel cell. **Bioelectrochemistry**, v. 72, n. 2, p. 149–154, abr. 2008b.
- 79 PENG, L.; YOU, S.-J.; WANG, J.-Y. Carbon nanotubes as electrode modifier promoting direct electron transfer from *Shewanella oneidensis*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 1248–1251, 15 jan. 2010.
- 80 FREGUIA, S.; TSUJIMURA, S.; KANO, K. Electron transfer pathways in microbial oxygen biocathodes. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 3, p. 813–818, jan. 2010.
- 81 MANOHAR, A. K. *et al.* The polarization behavior of the anode in a microbial fuel cell. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 9, p. 3508–3513, mar. 2008a.
- 82 SEVDA, S. *et al.* High strength wastewater treatment accompanied by power generation using air cathode microbial fuel cell. **Applied Energy**, v. 105, p. 194–206, maio 2013.
- 83 PARK, D. H.; ZEIKUS, J. G. Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 348–355, 5 fev. 2003.
- 84 YUAN, Y. *et al.* Carbon nanoparticles-assisted mediator-less microbial fuel cells using *Proteus vulgaris*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 27, n. 1, p. 106–112, set. 2011.
- 85 ALLEN, R. M.; BENNETTO, H. P. Microbial fuel-cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 27–40, 1993.
- 86 TIMUR, S. *et al.* Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 7, p. 1810–1815, jul. 2007.
- 87 LIU, Z.-D.; LI, H.-R. Effects of bio- and abio-factors on electricity production in a mediatorless microbial fuel cell. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, n. 3, p. 209–214, out. 2007.
- 88 HUBENOVA, Y.; GEORGIEV, D.; MITOV, M. Enhanced phytate dephosphorylation by using *Candida melibiosica* yeast-based biofuel cell. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 10, p. 1993–1997, out. 2014.
- 89 SAYED, E. T.; TSUJIGUCHI, T.; NAKAGAWA, N. Catalytic activity of baker's yeast in a mediatorless microbial fuel cell. **Bioelectrochemistry**, v. 86, p. 97–101, ago. 2012.
- 90 WALKER, A. L.; WALKER, C. W. Biological fuel cell and an application as a reserve power source. **Journal of Power Sources**, v. 160, n. 1, p. 123–129, set. 2006.

- 91 LIU, H.; CHENG, S.; LOGAN, B. E. Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 2, p. 658–662, 2005.
- 92 AHN, Y.; LOGAN, B. E. Saline catholytes as alternatives to phosphate buffers in microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 436–439, mar. 2013.
- 93 SCHNEEDORF, JM. Kefir D’Aqua and Its Probiotic Properties. **Probiotic in Animals**. InTech, 2012. doi, 10.5772/50053.
- 94 MARSH, A. J. *et al.* Sequencing-Based Analysis of the Bacterial and Fungal Composition of Kefir Grains and Milks from Multiple Sources. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69371, 19 jul. 2013.
- 95 PRADO, M. R. M. *et al.* Anti-inflammatory and angiogenic activity of polysaccharide extract obtained from Tibetan kefir. **Microvascular Research**, v. 108, p. 29–33, nov. 2016.
- 96 RODRIGUES, K. L. *et al.* A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 58–69, mar. 2016.
- 97 CHEN, Z. *et al.* Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**, v. 43, p. 15–21, abr. 2015.
- 98 RODRIGUES, K. L. *et al.* Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 5, p. 404–408, maio 2005.
- 99 ZANIRATI, D. F. *et al.* Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70–76, abr. 2015.
- 100 GAO, J. *et al.* Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 3, p. 549–556, mar. 2013.
- 101 WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 1, p. 33–37, 2004.
- 102 KARTHIKEYAN, R. *et al.* Effect of composites based nickel foam anode in microbial fuel cell using *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter roseus* as a biocatalysts. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 113–120, out. 2016.
- 103 BERGMANN, R. S. DE O. *et al.* Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, n. 4, p. 1022–1026, 2010.
- 104 LOGAN, B. *et al.* Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air-Cathode Microbial Fuel Cells. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 9, p. 3341–3346, maio 2007.

- 105 ZHANG, F. *et al.* Reference and counter electrode positions affect electrochemical characterization of bioanodes in different bioelectrochemical systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 10, p. 1931-1939, 2014.
- 106 WATSON, V. J.; LOGAN, B. E. Analysis of polarization methods for elimination of power overshoot in microbial fuel cells. **Electrochemistry Communications**, v. 13, n. 1, p. 54–56, jan. 2011.
- 107 TER HEIJNE, A. *et al.* Performance of non-porous graphite and titanium-based anodes in microbial fuel cells. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 18, p. 5697–5703, jul. 2008.
- 108 SANTORO, C. *et al.* Influence of anode surface chemistry on microbial fuel cell operation. **Bioelectrochemistry**, v. 106, p. 141–149, dez. 2015.
- 109 BAUDLER, A. *et al.* Does it have to be carbon? Metal anodes in microbial fuel cells and related bioelectrochemical systems. **Energy & Environmental Science**, v. 8, n. 7, p. 2048–2055, 2015.
- 110 ZHANG, X. *et al.* Separator Characteristics for Increasing Performance of Microbial Fuel Cells. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 21, p. 8456–8461, nov. 2009b.
- 111 MAURITZ, K. A.; MOORE, R. B. State of Understanding of Nafion. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 10, p. 4535–4586, out. 2004.
- 112 SIGMA ALDRICH. Estrutura química do Nafion. 2018. Disponível em: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/292567?lang=pt®ion=BR Acesso em: 20 jan. 2018.
- 113 LEONG, J. X. *et al.* Ion exchange membranes as separators in microbial fuel cells for bioenergy conversion: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 28, p. 575–587, dez. 2013.
- 114 OH, S.-E.; LOGAN, B. E. Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 2, p. 162–169, mar. 2006.
- 115 VARCOE, J. R. *et al.* Anion-exchange membranes in electrochemical energy systems. **Energy & environmental science**, v. 7, n. 10, p. 3135–3191, 2014.
- 116 KIM, J. R. *et al.* Power Generation Using Different Cation, Anion, and Ultrafiltration Membranes in Microbial Fuel Cells. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 3, p. 1004–1009, fev. 2007.
- 117 KARGI, F.; EKER, S. Electricity generation with simultaneous wastewater treatment by a microbial fuel cell (MFC) with Cu and Cu–Au electrodes. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 7, p. 658–662, jul. 2007.
- 118 DU, Z.; LI, H.; GU, T. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 464–482, set. 2007.

- 119 KATURI, K. P. *et al.* Microbial analysis of anodic biofilm in a microbial fuel cell using slaughterhouse wastewater. **Bioelectrochemistry**, v. 87, p. 164–171, out. 2012.
- 120 HUBENOVA, Y.; MITOV, M. Mitochondrial origin of extracellular transferred electrons in yeast-based biofuel cells. **Bioelectrochemistry**, v. 106, p. 232–239, dez. 2015b.
- 121 JUNG, S.; REGAN, J. M. Influence of External Resistance on Electrogenesis, Methanogenesis, and Anode Prokaryotic Communities in Microbial Fuel Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 564–571, 15 jan. 2011.
- 122 RASMUSSEN, M.; MINTEER, S. D. Long-term arsenic monitoring with an *Enterobacter cloacae* microbial fuel cell. **Bioelectrochemistry**, v. 106, p. 207–212, dez. 2015.
- 123 YANG, W. *et al.* A hybrid microbial fuel cell stack based on single and double chamber microbial fuel cells for self-sustaining pH control. **Journal of Power Sources**, v. 306, p. 685–691, fev. 2016.
- 124 SILVEIRA, G.; IKEGAKI, M.; SCHNEEDORF, J. M. A low-cost yeast-based biofuel cell: an educational green approach. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 10, n. 1, p. 32–41, 2 jan. 2017.
- 125 XU, L. *et al.* Prussian blue/graphene-modified electrode used as a novel oxygen reduction cathode in microbial fuel cell. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 58, p. 374–380, jan. 2016.
- 126 STACY, J. *et al.* The recent progress and future of oxygen reduction reaction catalysis: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, p. 401–414, mar. 2017.
- 127 XU, L. *et al.* Spontaneous redox synthesis of Prussian blue/graphene nanocomposite as a non-precious metal catalyst for efficient four-electron oxygen reduction in acidic medium. **Journal of Power Sources**, v. 240, p. 101–108, out. 2013.
- 128 CRISTIANI, P. *et al.* Cathodic and anodic biofilms in Single Chamber Microbial Fuel Cells. **Bioelectrochemistry**, v. 92, p. 6–13, ago. 2013.
- 129 CHENG, S.; LIU, H.; LOGAN, B. E. Power Densities Using Different Cathode Catalysts (Pt and CoTMPP) and Polymer Binders (Nafion and PTFE) in Single Chamber Microbial Fuel Cells. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 1, p. 364–369, jan. 2006.
- 130 LI, Y. *et al.* Metals as electron acceptors in single-chamber microbial fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 269, p. 430–439, dez. 2014.
- 131 XIE, X. *et al.* Microbial battery for efficient energy recovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 40, p. 15925–15930, 2013.
- 132 AMUTHA, R. *et al.* Chromium hexacyanoferrate as a cathode material in microbial fuel cells. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, n. 11, p. 1985–1990, nov. 2010.

- 133 R, N. K. *et al.* Functionalization of electrochemically deposited chitosan films with alginate and Prussian blue for enhanced performance of microbial fuel cells. **Electrochimica Acta**, v. 112, p. 465–472, dez. 2013.
- 134 XIE, X. *et al.* Use of low cost and easily regenerated Prussian Blue cathodes for efficient electrical energy recovery in a microbial battery. **Energy Environment Science**, v. 8, n. 2, p. 546–551, 2015.
- 135 FU, L. *et al.* PB/PANI-modified electrode used as a novel oxygen reduction cathode in microbial fuel cell. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 1975–1979, jan. 2011.
- 136 KARYAKIN, A. A. Prussian blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications. **Electroanalysis**, v. 13, n. 10, p. 813–819, 2001.
- 137 ITAYA, K.; SHOJI, N.; UCHIDA, I. Catalysis of the reduction of molecular oxygen to water at Prussian blue modified electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 12, p. 3423–3429, 1984.
- 138 DE MATTOS, I. L.; GORTON, L. Filmes de metal-hexacianoferrato: uma ferramenta em química analítica. **Química Nova**, p. 200–205, 2001.
- 139 YAN, X. H. *et al.* A direct methanol–hydrogen peroxide fuel cell with a Prussian Blue cathode. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 9, p. 5135–5140, mar. 2016.
- 140 HUANG, Y. *et al.* Electricity generation from a floating microbial fuel cell. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 308–313, jun. 2012.
- 141 MEDEIROS, F. O. DE *et al.* Ultrasonic waves and glass pearls: a new method of extraction of beta-galactosidase for use in laboratory. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336–339, 2008.
- 142 BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. **Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.
- 143 VASCONCELOS N. M., PINTO G. A. S., ARAGÃO F. A. S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3, 5-Dinitrosalicílico, Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos, Boletim de Pesquisa, v. 88, p. 1-22, 2007. Sucrose Assay with DNS. Accessed May 18, 2017.
- 144 AKESON, W. R.; GORZ, H. J.; HASKINS, F. A. Sweetclover weevil feeding stimulants, Isolation and identification of glucose, fructose, and sucrose. **Crop Science**, v. 9, p. 810-812, 1969.
- 145 BUCHAN, J. L., SAVAGE, R. I. Paper chromatography of some starch conversion products. **Analyst**, v. 77, p. 401-406, 1952. doi 10.1039/AN9527700401.

- 146 MAGALHÃES, K. T. *et al.* Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 693–702, 2011.
- 147 THOMAS, P. *et al.* Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 45–55, dez. 2015.
- 148 KARYAKIN AA, KARYAKINA EE, GORTON L. On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 1, n. 2, p. 78–82, 1999.
- 149 RAGHAVULU, S. V. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* as anodic biocatalyst for power generation in biofuel cell: Influence of redox condition and substrate load. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2751–2757, fev. 2011.
- 150 HOFFMANN, A. A. **Imobilização de Corantes no Material Híbrido Acetato de Celulose-Óxido de Titânio Algumas Aplicações Eletroanalíticas**. 2006. 86 p. Dissertação Mestrado em Química – Instituto de Química. UFRGS, Porto Alegre, 2006.
- 151 FERREIRA, C. U. **Propriedades de troca iônica da silicatitaniofosfato e da silicatitanioantimonato e eletroquímicas do azul de metileno e azul de metileno imobilizados sobre estas matrizes**. 2000. 111p. Tese Doutorado em Química – Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2000.
- 152 OUITRAKUL, S. *et al.* Impedance analysis of bio-fuel cell electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 5, p. 721–727, dez. 2007.
- 153 ZINNAI, A. *et al.* Kinetics of d-glucose and d-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 43–49, jan. 2013.
- 154 BERTHEL, N. *et al.* Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, p. 683–689, maio 2004.
- 155 ROSAS-LEMUS, M. *et al.* In *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphate contributes to the Crabtree effect through closure of the mitochondrial unspecific channel. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 555–556, p. 66–70, ago. 2014.
- 156 DÍAZ-RUIZ, R. *et al.* Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Is Regulated by Fructose 1,6-Bisphosphate: a possible role in Crabtree effect induction? **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 40, p. 26948–26955, 3 out. 2008.
- 157 BARNETT, J. A.; ENTIAN, K.-D. A history of research on yeasts: regulation of sugar metabolism. **Yeast**, v. 22, n. 11, p. 835–894, ago. 2005.
- 158 DE DEKEN, R. H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **Journal of General Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 149–156, 1966.

- 159 MEIJER, M. M. *et al.* Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 37, p. 24102–24107, 1998.
- 160 METABOLIC PATHWAYS. Disponível em: <http://biochemical-pathways.com/#/map/1>. Acesso em: 20 Jan 2018.
- 161 PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. **Handbook of Brewing**, 2. ed., Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006.
- 162 DI LORENZO, M. *et al.* A small-scale air-cathode microbial fuel cell for on-line monitoring of water quality. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 182–188, dez. 2014.
- 163 BAPAT, P. *et al.* Quantification of metabolically active biomass using Methylene Blue dye Reduction Test (MBRT): Measurement of CFU in about 200 s. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 1, p. 107–116, abr. 2006.
- 164 SAYED, E. T. *et al.* Catalytic activity of yeast extract in biofuel cell. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 5, p. 521–525, nov. 2012.
- 165 AELTERMAN, P. *et al.* Continuous Electricity Generation at High Voltages and Currents Using Stacked Microbial Fuel Cells. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 10, p. 3388–3394, maio 2006.
- 166 WINFIELD, J. *et al.* The overshoot phenomenon as a function of internal resistance in microbial fuel cells. **Bioelectrochemistry**, v. 81, n. 1, p. 22–27, abr. 2011.
- 167 NIEN, P.-C. *et al.* Power overshoot in two-chambered microbial fuel cell (MFC). **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4742–4746, abr. 2011.
- 168 HONG, Y. *et al.* Adaptation to high current using low external resistances eliminates power overshoot in microbial fuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 71–76, out. 2011.
- 169 MOON, H.; CHANG, I. S.; KIM, B. H. Continuous electricity production from artificial wastewater using a mediator-less microbial fuel cell. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 4, p. 621–627, mar. 2006.
- 170 BARANOWSKA, I.; KOPER, M. Electrochemical behavior of Propranolol and its major metabolites, 4'-hydroxypropranolol and 4'-hydroxypropranolol Sulfate, on glassy carbon electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1601–1609, 2011.
- 171 BARD, A. J., FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: Fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 2001.
- 172 HUBENOVA, Y. *et al.* Mechanisms of electron transfer between a styrylquinolinium dye and yeast in biofuel cell. **Bioelectrochemistry**, v. 112, p. 158-165, 2016.

- 173 HUBENOVA, Y. *et al.* The glyoxylate pathway contributes to enhanced extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cell. **Bioelectrochemistry**, v. 116, p. 10–16, ago. 2017.
- 174 LIDE, D. R. *et al.* **CRC Handbook of Chemistry and Physics**, 84. ed., New York: CRC Press, 2004.
- 175 BRAITHWAITE, A.; SMITH, J. F. **Chromatographic methods**, 5. ed., Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.
- 176 STURM, A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant physiology**, v. 121, n. 1, p. 1–8, 1999.
- 177 GUIMARÃES, L. H. S. *et al.* Production and characterization of a thermostable extracellular β -d-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 1, p. 52–57, dez. 2007.
- 178 LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564–2572, 15 abr. 2014.
- 179 CORONA, O. *et al.* Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 572–581, mar. 2016.
- 180 FIORDA, F. A. *et al.* Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 690–697, maio 2016.
- 181 GUZEL-SEYDİM, Z. *et al.* Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. **International journal of dairy technology**, v. 58, n. 1, p. 25–29, 2005.
- 182 BESHKOVA, D. M. *et al.* Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 7, p. 529–535, jan. 2003.
- 183 RIBEIRO, E. S. *et al.* Electrochemical study of Meldola's blue, methylene blue and toluidine blue immobilized on a SiO₂/Sb₂O₃ binary oxide matrix obtained by the sol-gel processing method. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 7, n. 10, p. 665–670, 1 out. 2003.
- 184 RIGOULET, M. *et al.* Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 256, n. 1, p. 73–81, 2004.
- 185 ALTAY, F. *et al.* A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 44–56, out. 2013.
- 186 MIN, B.; ROMÁN, Ó. B.; ANGELIDAKI, I. Importance of temperature and anodic medium composition on microbial fuel cell (MFC) performance. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 7, p. 1213–1218, jul. 2008.

- 187 JU, H. *et al.* The electrochemical behavior of methylene blue at a microcylinder carbon fiber electrode. **Electroanalysis**, v. 7, n. 12, p. 1165–1170, 1995.
- 188 HEPEL, M.; JANUSZ, W. Study of leuco-methylene blue film growth and its reoxidation on sulphur-modified Au-EQCN electrode. **Electrochimica Acta**, v. 45, n. 22–23, p. 3785–3799, jul. 2000.
- 189 HASNAT, M. A. *et al.* Electrochemical decolorization of Methylene blue at Pt electrode in KCl solution for environmental remediation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 787–791, jan. 2015.
- 190 KURIAKOSE, S. *et al.* Structural, optical and photocatalytic properties of flower-like ZnO nanostructures prepared by a facile wet chemical method. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 4, p. 763–770, 18 nov. 2013.
- 191 DA SILVA, J. S.; JUNQUEIRA, H. C.; FERREIRA, T. L. Effect of pH and dye concentration on the n-octanol/water distribution ratio of phenothiazine dyes: a microelectrode voltammetry study. **Electrochimica Acta**, v. 144, p. 154–160, out. 2014.
- 192 MURAKAMI, K. Thermodynamic and kinetic aspects of self-association of dyes in aqueous solution. **Dyes and Pigments**, v. 53, n. 1, p. 31–43, 2002.
- 193 LEE, S.-K.; MILLS, A. Luminescence of leuco-thiazine dyes. **Journal of Fluorescence**, v. 13, n. 5, p. 375–377, 2003b.
- 194 MAY, J. M.; QU, Z.; WHITESELL, R. R. Generation of oxidant stress in cultured endothelial cells by methylene blue: protective effects of glucose and ascorbic acid. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 777–784, set. 2003.
- 195 WANG, J. **Analytical Electrochemistry**, 3. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. 250 p.
- 196 SOBHANMANESH, B.; NAJAFI, M. Selective Determination of Unsymmetrical Dimethylhydrazine on a Prussian Blue Modified Carbon Paste Electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 3, p. 451–457, 2015.
- 197 ZHANG, L. *et al.* Enhancement of the Electrochemical Performance of Prussian Blue Modified Electrode via Ionic Liquid Treatment. **Electroanalysis**, v. 21, n. 16, p. 1835–1841, ago. 2009a.
- 198 KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; GORTON, L. Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. **Talanta**, v. 43, n. 9, p. 1597–1606, 1996.
- 199 DE MATTOS, I. L.; GORTON, L.; RUZGAS, T. Sensor and biosensor based on Prussian Blue modified gold and platinum screen printed electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 2, p. 193–200, 2003.
- 200 MAŽEIKIENĖ, R.; NIAURA, G.; MALINAUSKAS, A. Electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at Prussian blue modified electrode: An in situ Raman

- spectroelectrochemical study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 660, n. 1, p. 140–146, set. 2011.
- 201 OZEKI, T.; WATANBE, I.; IKEDA, S. Study of the prussian blue/prussian white redox reaction by cyclic voltammetry. **Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry**, v. 236, n. 1–2, p. 209–218, 1987.
- 202 LI, Z. *et al.* Improved electrochemical properties of prussian blue by multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 603, n. 1, p. 59–66, maio 2007.
- 203 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica, princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1996. 471 p.
- 204 MALIK, M. A. *et al.* Countercation intercalation and kinetics of charge transport during redox reactions of nickel hexacyanoferrate. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 25, p. 4253–4258, out. 2004.
- 205 GARJONYTE, R.; MALINAUSKAS, A. Amperometric glucose biosensors based on Prussian Blue–and polyaniline–glucose oxidase modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 9, p. 445–451, 2000.
- 206 OH, S.-M. *et al.* Microstructural changes of polyacrylonitrile-based carbon fibers (T300 and T700) due to isothermal oxidation (1): focusing on morphological changes using scanning electron microscopy. **Carbon letters**, v. 18, p. 18–23, 30 abr. 2016.
- 207 SANETUNTIKUL, J.; SHANMUGAM, S. Prussian Blue-Carbon Hybrid as a Non-Precious Electrocatalyst for the Oxygen Reduction Reaction in Alkaline Medium. **Electrochimica Acta**, v. 119, p. 92–98, fev. 2014.
- 208 BRUKER. **Periodic Table of Elements and X-ray Energies**. 2013.
- 209 PANDEY, P. C.; PANDAY, D. Tetrahydrofuran and hydrogen peroxide mediated conversion of potassium hexacyanoferrate into Prussian blue nanoparticles: Application to hydrogen peroxide sensing. **Electrochimica Acta**, v. 190, p. 758–765, fev. 2016.
- 210 LUNDGREN, C. A.; MURRAY, R. W. Observations on the composition of Prussian blue films and their electrochemistry. **Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 933–939, 1988.
- 211 CRUMBLISS, A. L.; LUGG, P. S.; MOROSOFF, N. Alkali metal cation effects in a Prussian blue surface modified electrode. **Inorganic Chemistry**, v. 23, n. 26, p. 4701–4708, 1984.
- 212 IKESHOJI, T.; IWASAKI, T. In situ x-ray diffraction measurement of Prussian blue modified electrode. **Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1123–1124, 1988.
- 213 WEN, Q. *et al.* Electricity generation and brewery wastewater treatment from sequential anode-cathode microbial fuel cell. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 11, n. 2, p. 87–93, fev. 2010.

- 214 PRASAD, D. *et al.* Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 11, p. 2604–2610, 15 maio 2007.
- 215 SONG, Y.; NAYFEH, M. H.; YAU, S.-T. Electrostatically enhanced performance of a yeast-based microbial fuel cell. **RSC Advances**, v. 5, n. 25, p. 19203–19205, 2015.
- 216 GAL, I. *et al.* Yeast surface display of dehydrogenases in microbial fuel-cells. **Bioelectrochemistry**, v. 112, p. 53–60, dez. 2016.
- 217 VELASQUEZ-ORTA, S. B.; CURTIS, T. P.; LOGAN, B. E. Energy from algae using microbial fuel cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 1068–1076, 15 ago. 2009.
- 218 AGARGEL, Agar-Agar, Properties and Specifications. Disponível em: <http://www.agargel.com.br/agar-tec-en.html>. Acesso em: 2 Jan 2018.
- 219 ATKINS P. W. *et al.* **Shriver and Atkins Inorganic Chemistry**. 5. ed. Nova York: W. H. Freeman, 2010.
- 220 MATTOS, I. L. DE *et al.* Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química nova**, v. 26, n.3, p. 373–380, 2003.
- 221 WANG, X.; FENG, Y. J.; LEE, H. Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell. **Water Science & Technology**, v. 57, n. 7, p. 1117, abr. 2008.
- 222 WEN, Q. *et al.* Electricity generation and modeling of microbial fuel cell from continuous beer brewery wastewater. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4171–4175, set. 2009.
- 223 FENG, Y. *et al.* Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 5, p. 873–880, abr. 2008.
- 224 BEHERA, M.; JANA, P. S.; GHANGREKAR, M. M. Performance evaluation of low cost microbial fuel cell fabricated using earthen pot with biotic and abiotic cathode. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1183–1189, fev. 2010.
- 225 ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry Theory and Practice**, New York:Oxford University Press, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Primeira página do artigo publicado na revista Green Chemistry Letters and Reviews, 2017, v. 10, n.1, 32-41.

GREEN CHEMISTRY LETTERS AND REVIEWS, 2017
VOL. 10, NO. 1, 32-41
<http://dx.doi.org/10.1080/17518253.2016.1278280>



OPEN ACCESS

A low-cost yeast-based biofuel cell: an educational green approach

Gustavo Silveira^a, Masaharu Ikegaki^a and José Maurício Schneedorf^b

^aDepartment of Food and Drugs, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfnas, Alfnas, Brazil; ^bDepartment of Biochemistry, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfnas, Alfnas, Brazil

ABSTRACT

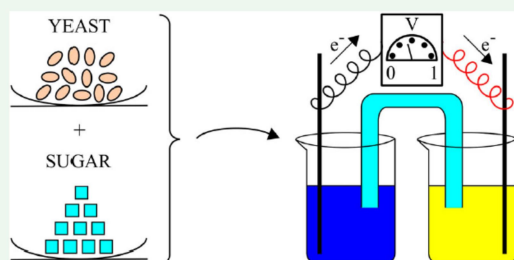
This paper describes the construction and characterization of a biofuel cell with low-cost materials. The system uses the baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as the microorganism responsible for the generation of voltage, whose interaction with the electrode is mediated by methylene blue. Simple experiments are proposed to evaluate the effects of different substrates, inhibitors and cell viability, improving both the knowledge of the system as well as metabolic pathway concepts to the student. The proposed device was able to generate a power density of $41 \pm 0.3 \text{ mW m}^{-2}$, similar to those obtained with yeast-based biofuel cells. The low cost and easily acquisition of materials described allow the introduction of biofuel cell theme in different teaching levels, from high school to the college level.

ARTICLE HISTORY

Received 5 August 2016
Accepted 20 December 2016

KEYWORDS

Biofuel cell; bioenergetics; glycolysis; Green chemistry; *Saccharomyces cerevisiae*

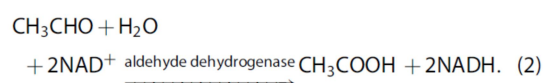
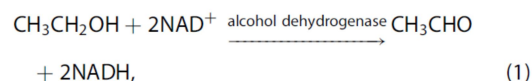


Introduction

Biological fuel cells, commonly named biofuel cells, are devices similar to conventional fuel cells, but use biocatalysts for the conversion of chemical energy into electrical energy (1) instead. As in any galvanic cell, the electrical work occurs whenever electrons flow from the anode to the cathode. In the case of two-chamber biofuel cell, electrons released by the oxidation of an organic substrate in the anode chamber causes a reduction of an oxidizing agent in the cathode compartment, such as oxygen or ferricyanide (2, 3). The circuit is completed by migration of generated protons through the electrolyte, to ensure charge balance. Figure 1 shows a general scheme of a biofuel cell.

These devices are classified according to the biocatalyst, as microbial or enzymatic biofuel cell. In the latter group, the electrodes are modified with enzymes to

catalyze the oxidation reaction of specific substrates (4, 5), although the complete oxidation of a substrate can be achieved by the combination of several enzymes. For instance, Sokic-Lazic and Minteer (6) modified an anode of a biofuel cell with 11 enzymes in order to mimic the citric acid cycle, and showed that there was an increased efficiency of enzyme biofuel cell whenever the enzymes involved in ethanol oxidation were immobilized in series, according to Equations (1) and (2):



CONTACT Gustavo Silveira gustavo.silveiraunifal@gmail.com

Supplemental data for this article can be accessed at <http://dx.doi.org/10.1080/17518253.2016.1278280>.

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

APÊNDICE B – Primeira página do artigo publicado na Revista de Ensino de Bioquímica, 2017, v. 15, Especial.



Journal of Biochemistry Education
Revista de Ensino de Bioquímica
Revista de Enseñanza de Bioquímica

V. 15, Esp / 2017
Submitted in: 13/03/2017
Published in: 10/10/2017

National Award

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

ISSN: 2318-8790
ISSN (until 2012): 1677-2318

Low-cost biofuel cell for investigation of energy metabolism

Biocélula a combustível de baixo custo para investigação do metabolismo energético

Gustavo Silveira*, Masaharu Ikegaki e José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

Universidade Federal de Alfenas – Unifal/MG, Alfenas/MG.

*e-mail: gustavo.silveiraunifal@gmail.com

Abstract

*This work describes the construction of a biofuel cell from low-cost materials and their use in college and undergraduate practical classes. The system employs the baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as micro-organism responsible for the generation of electric potential, whose interaction with the electrode is mediated by methylene blue. Simple experiments are proposed to evaluate the effects of different substrates, inhibitors and cell viability, improving both the knowledge of the system as metabolic pathway concepts. The concepts related to biofuel cells, such as applications, mechanisms and limitations were worked in four biochemical undergraduate classes for a Chemistry Course students at the Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG).*

Keywords: *biofuel cells; green chemistry; metabolic pathway.*

Resumo

Esse trabalho descreve a construção de uma biocélula a combustível a partir de materiais de baixo custo e seu uso em aulas práticas de graduação. O sistema emprega a levedura de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) como micro-organismo responsável pela geração de potencial, cuja interação com o eletrodo é mediada por azul de metileno. Foram propostos experimentos simples para avaliar os efeitos de diferentes substratos, inibidores e viabilidade celular, que permitiram maior conhecimento do sistema bem como conceitos relacionados a vias metabólicas. Conceitos relacionados às biocélulas a combustível tais como aplicações, mecanismos e limitações foram trabalhados em duas aulas práticas de bioquímica com estudantes do Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Palavras-chave: *biocélulas a combustível; química verde; vias metabólicas*

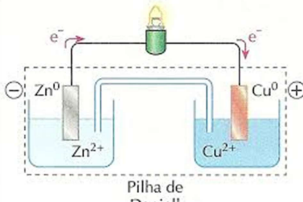
APÊNDICE C - Biocélulas a combustível - Elaboração e aplicação de roteiros de aulas práticas.

Alguns experimentos descritos no corpo desta tese (construção de uma MFC e produção de energia elétrica, viabilidade celular, efeito de citrato e de diferentes substratos sobre o potencial da biocélula) foram adaptados para potencial aplicação no Ensino sobre o tema. Nesse sentido, foram elaborados dois roteiros complementares para um período usual de uma aula prática cada (60 min), contendo materiais e reagentes, protocolos, esquemas e questionário, como segue:

Roteiro para aula prática 1:

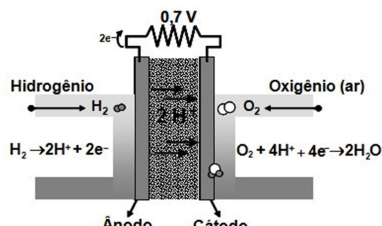
Aula prática de bioquímica
Professor: José Maurício S. F. Silva
Estagiário: Gustavo Silveira
Assunto: construção de uma biocélula a combustível de baixo custo.

Introdução
 Uma biocélula a combustível é um dispositivo eletroquímico que permite obter energia elétrica a partir da ação metabólica de micro-organismos. Semelhantemente a pilhas e baterias, essas engenhocas são constituídas por uma câmara anódica (onde ocorre a oxidação da matéria orgânica devido a ação dos micro-organismos), por uma câmara catódica (local de redução do receptor dos elétrons), e por uma membrana semipermeável, que permite o equilíbrio iônico nas duas câmaras.

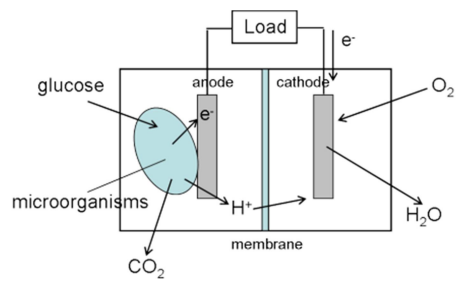


Pilha de Daniell

Pilha comum



Célula a combustível



Biocélula a combustível

Enquanto as células a combustível de O₂/H₂ requerem a catálise proporcionada por metais nobres e uma temperatura de operação próxima a 80°C, as biocélulas usam o efeito catalítico das enzimas produzidas pelos micro-organismos, além de trabalhar em temperaturas mais brandas.

Material necessário

| | |
|--|---------------------------------------|
| 2 eletrodos de grafite; | 1 ponte salina de KCl 1,5 M + Agar 2% |
| 2 béqueres de 25 mL | Glicose |
| <i>S. cerevisiae</i> (fermento biológico granulado) | Multímetro |
| Solução de azul de metileno (AM) 10 mM | Solução salina + PBS pH 7,0 |
| Solução de ferricianeto de potássio 25 mM em salina e PBS pH 7,0 | |

Montagem do experimento
 A configuração da célula eletroquímica será desenhada na lousa.
 Ordem dos experimentos: **a adição dos reagentes será feita sempre na câmara anódica. Entre os experimentos, aguardar entre 5 e 10 minutos a estabilização do potencial.**

| | |
|---|-----------------------------------|
| Grupo 1 (levedura viva) | Grupo 2 (levedura inativada) |
| a) Salina | a) Salina |
| b) Glicose 1% + 2 mL de AM 10 mM | b) Glicose 1% + 2 mL de AM 10 mM |
| c) <i>S. cerevisiae</i> ressuscitado em salina | c) <i>S. cerevisiae</i> inativada |
| Preparo da levedura: 0,8g + 2 mL de salina. Ressuscitar em salina e pipetar cuidadosamente 2 mL. | |
| Inativação: fazer a suspensão acima e ferver em banho-maria por 15 minutos. | |
| Questões para discussão: | |
| 1) Quais as meias-reações que acontecem nas câmaras anódicas e catódicas? | |
| 2) Quais as possíveis explicações para a geração de potencial? | |
| 3) Quais são os mecanismos envolvidos na transferência eletrônica? | |
| 4) Possíveis aplicações. | |
| Bibliografia sugerida: | |
| Pilhas de combustíveis microbianas utilizadas na produção de eletricidade a partir de rejeitos orgânicos: uma perspectiva de futuro. <i>Química nova</i> , v. 33, p. 1773-1778, 2010. | |
| Influence of artificial mediators on yeast-based fuel cell performance. <i>Journal of bioscience and bioengineering</i> , v. 112, p. 379-387, 2011. | |
| Performance of a Yeast-mediated Biological Fuel Cell. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , v. 9, 1893-1907, 2008. | |

Roteiro para aula prática 2:

| | | |
|---|--|--|
| <p>Aula prática de bioquímica Professor: José Maurício S. F. Silva Estagiário: Gustavo Silveira Assunto: estudo metabólico empregando uma biocélula de baixo custo.</p> | | |
| Introdução | | |
| Como visto na primeira aula prática sobre biocélula a combustível, podemos obter energia elétrica a partir da ação metabólica de microorganismos. Nessa aula prática, analisaremos o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de eletricidade a partir da biocélula. | | |
| <p>Ânodo</p> <ul style="list-style-type: none"> -Fonte de carbono; -Solução do eletrólito (20 mL) -2 mL de azul de metileno -2 mL de suspensão de fermento. | | <p>Cátodo</p> <ul style="list-style-type: none"> -Solução de ferricianeto (20 mL). |
| Biocélula a combustível | | |
| Material necessário (já preparado): | | |
| 2 eletrodos de grafite; | 1 ponte salina de KCl 1,5 M + Agar 2%, | |
| 2 béqueres de 25 mL | Solução de azul de metileno (AM) 10 mM | |
| Fermento biológico | Solução salina + tampão citrato pH 7,0 | |
| Glicose, frutose e sacarose | Solução salina + PBS pH 7,0 | |
| Solução de ferricianeto de potássio 25 mM em salina e PBS pH 7,0 | | |
| Multímetro | | |
| Procedimento: | | |

1. Montar a biocélula conforme a configuração eletroquímica desenhada acima.
2. Em um béquer, pesar a quantidade indicada de carboidrato abaixo (dependente do grupo de trabalho), e dissolver em 20 mL do eletrólito adequado.
3. Adicionar 2 mL de azul de metileno.

Grupos e fontes de carboidratos e soluções tampão:

Serão montados quatro experimentos diferentes, uma para cada grupo, variando-se a fonte de carbono ou o tampão:

- Grupo 1: glicose (tampão fosfato) – 0,400 g.
- Grupo 2: glicose (tampão citrato) – 0,400 g.
- Grupo 3: sacarose (tampão fosfato) – 0,381 g.
- Grupo 4: frutose (tampão fosfato) – 0,400 g.

4. No outro béquer, adicionar 20 mL de solução de ferricianeto de potássio.
5. Colocar a ponte salina.
6. Colocar os eletrodos e ligar as pontas de prova do multímetro (cabo preto no ânodo e cabo vermelho no cátodo).
7. Aguardar a estabilização do sinal elétrico por 3 min e anotar o potencial.
8. Adicionar 2 mL de uma suspensão de levedura a 40% na câmara anódica.
9. Anotar o potencial elétrico de 5 em 5 minutos até o tempo de 40 minutos.
10. Construir um gráfico de tempo (min) por diferença de potencial (mV).
11. De posse do mapa metabólico, tente interpretar os resultados globais (de todos os grupos).

Questões para discussão:


- 1) Considerando que o potencial seja uma estimativa da atividade metabólica, qual dos açúcares é metabolizado mais rapidamente? Por quê?
- 2) E qual é metabolizado mais lentamente? Por quê?
- 3) Os grupos 1 e 2 utilizaram o mesmo combustível (glicose), mas tipos diferentes de tampões. Houve diferença nos resultados? Explique as possíveis causas levando em consideração as vias metabólicas.
- 4) Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado sob o ponto de vista bioquímico?
- 5) Observe as cores dos béqueres contendo a suspensão contendo o anólito (com leveduras). O que você pode concluir sobre a causa dessa observação?

APÊNDICE D – Primeira página do artigo publicado na Revista Applied Biochemistry and Biotechnology. DOI: 10.1007/s12010-018-2718-2.

Appl Biochem Biotechnol
https://doi.org/10.1007/s12010-018-2718-2



Evaluation of Kefir as a New Anodic Biocatalyst Consortium for Microbial Fuel Cell

Gustavo Silveira¹  • José Maurício Schneedorf²

Received: 26 September 2017 / Accepted: 9 February 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract Kefir, a combined consortium of bacteria and yeast encapsulated by a polymeric matrix of exopolysaccharides, was used as anodic biocatalyst in a two-chamber microbial fuel cell (MFC). Fermentation was followed during 72 h and polarization curves were obtained from linear sweep voltammetry. The effect of methylene blue as charge-transfer mediator in the kefir metabolism was evaluated. UV/Vis spectrophotometry and cyclic voltammetry were applied to evaluate the redox state of the mediator and to characterize the electrochemical activity, whereas current interruption was used for internal resistance determination. Aiming to establish a relationship between the microbial development inside the anodic chamber with the generated power in the MFC, total titratable acidity, pH, viscosity, carbohydrate assimilation, and microbial counting were assayed. The kefir-based MFC demonstrated a maximum power density of 54 mW m⁻² after 24 h fermentation, revealing the potential use of kefir as a biocatalyst for microbial fuel cells.

Keywords Microbial fuel cell · Microbial consortia · Kefir · Methylene blue · Power curves

Introduction

Alternative sources of energy have been searched worldwide for centuries due to energy demands and environmental concerns. Solar and wind energies are inserted into the energetic matrix of several countries, whereas others have been applied more properly in lower scales of renewable energy, as biological fuel cells, both enzymatic or microbial. Microbial power devices hold great

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12010-018-2718-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gustavo Silveira
gustavo.silveira@unifal-mg.edu.br

¹ Department of Food and Drugs, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG 37130-001, Brazil

² Department of Biochemistry, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG 37130-001, Brazil