

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

ANDREW WAY MENG FUNG

**OTIMIZAÇÃO DA GERAÇÃO DE ENERGIA EM CÉLULA A
COMBUSTÍVEL MICROBIANA COM *Escherichia coli*
UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO POR
ELETRODEPOSIÇÃO DE POLIPIRROL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA

2016

ANDREW WAY MENG FUNG

**OTIMIZAÇÃO DA GERAÇÃO DE ENERGIA EM CÉLULA A
COMBUSTÍVEL MICROBIANA COM *Escherichia coli*
UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO POR
ELETRODEPOSIÇÃO DE POLIPIRROL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto

Co-orientadores: Prof. Dr. Pedro Ramos da Costa Neto
Prof. Dr. Luiz Marcus Lira Faria

CURITIBA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F981o Fung, Andrew Way Meng
2016 Otimização da geração de energia em célula a combustível microbiana com escherichia coli utilizando eletrodo modificado por eletrodeposição de polipirrol / Andrew Way Meng Fung.-- 2016.
80 f.: il.; 30 cm.

Texto em português, com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2016.
Bibliografia: p. 69-79.

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Células à combustível. 3. Escherichia coli. 4. Polímeros condutores. I.Couto, Gustavo Henrique. II.Costa Neto, Pedro Ramos da. III.Faria, Luiz Marcus Lira. IV.Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. V. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba

TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 072

OTIMIZAÇÃO DA GERAÇÃO DE ENERGIA EM CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA
COM *Escherichia coli* UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO POR ELETRODEPOSIÇÃO
DE POLIPIRROL

Por

ANDREW WAY MENG FUNG

Dissertação apresentada às 14:30 horas do dia 29 de julho de 2016, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, linha de pesquisa Avaliação de Bacias Hidrográficas, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto (Orientador)
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Profa. Dra. Susan Karp
Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia
Universidade Positivo – UP

Profa. Dra. Marlene Soares
Departamento de Química e Biologia – DAQBi
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof. Dr. João Batista Floriano
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Fernando Hermes Passig
Coordenador do PPGCTA

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa”

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Professor Gustavo Henrique Couto, por ter acolhido meu projeto e fazer com que se torne realidade.

Ao Professor Luiz Marcus Lira Faria, pela paciência, pelos conhecimentos tão preciosos para o projeto e pela dedicação e apoio.

Ao Professor Pedro Ramos da Costa Neto, por sempre acreditar em meu trabalho.

A Professora Marlene Soares, por ser uma grande amiga e por ter dado apoio ao projeto.

Ao Professor João Batista Floriano, por ceder o equipamento essencial para o desenvolvimento do projeto.

Ao Egon e o Fábio, por auxiliarem no desenvolvimento de importantes etapas do projeto.

Aos colegas de laboratório e mestrado, em especial a Aline Ianoski, Aline Bonato, Leonardo Wielewski, Luciana Westphal pelo apoio e companheirismo.

À minha namorada e companheira Maria Helena, pelas horas dedicadas de incentivo, zelo e preocupação.

À minha família pela compreensão que tiveram pelo tempo que despendi nesta minha fase de evolução de conhecimento.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

RESUMO

O desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de energias renováveis tem recebido crescente atenção nos dias atuais. Células a combustível microbianas (CCMs) são dispositivos bioeletroquímicos que utilizam microrganismos sob condições anaeróbicas para catalisar reações redox em compostos orgânicos visando geração de energia elétrica. Pesquisas recentes estão voltadas para otimizar o desempenho e a eficiência das CCMs. Um dos desafios é a necessidade de se testar novos materiais condutores como eletrodos visando aumentar o potencial elétrico destes dispositivos. O polipirrol é um polímero orgânico condutor que possui boa condutividade elétrica, elevada área superficial, biocompatibilidade e baixo custo. Neste trabalho foi construída uma CCM de dupla câmara para a geração de energia elétrica a partir da degradação de glucose por *Escherichia coli*. Foram avaliados 2 tipos de eletrodos: um de grafite, normalmente utilizado em estudos com CCMs, outro de grafite modificado pela eletrodeposição de polipirrol, obtido após síntese. A diferença de potencial foi verificada utilizando um multímetro data logger ligado em série com a CCM e conectado a um computador para a aquisição de dados em tempo real. Para avaliação da formação de biofilme na superfície dos eletrodos foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As CCMs apresentaram valores de densidade de potência que variaram entre 15 mW.m⁻², no experimento com eletrodo de grafite e 20 mW.m⁻², obtida no experimento utilizando eletrodo de grafite com polipirrol. Com a modificação da superfície de um eletrodo de grafite pela adição do polipirrol foi possível observar um incremento de atividade elétrica e aumento de área superficial do eletrodo. Em termos da eficiência da célula foi possível observar um acréscimo em termos de eficiência coulombica no sistema contendo polipirrol (17,18%) em relação ao sistema que não possuía (7,31%), o que representa um melhor aproveitamento dos elétrons do substrato que podem de fato ser convertidos em energia elétrica. Portanto, foi mostrado que o eletrodo de grafite modificado pela eletrodeposição de polipirrol pode ser uma alternativa viável e proveitosa para uso em CCMs.

Palavras-chave: Célula a combustível microbiana (CCM). *Escherichia coli*. Polipirrol.

ABSTRACT

The development of technologies to obtain renewable energy has received increasing attention nowadays. Microbial fuel cells (MFC) are chemical devices that uses microorganisms under anaerobic conditions to catalyze redox reactions in organic compounds for electricity generation. Recent research is focused to optimize the performance and efficiency of MFCs. One challenge is the need to test new conductive materials as electrodes in order to increase the electric potential in these devices. Polypyrrole is a conductive organic polymer which presents good electrical conductivity, high surface area, low cost and also biocompatibility. In this work, a double chamber MFC was built to generate electricity from glucose degradation by *Escherichia coli*. We assessed two types of electrodes: a graphite one, normally used in studies with MFCs, and graphite modified by electrodeposition of polypyrrole, obtained after synthesis. The potential difference was recorded using a data logger multimeter connected in series with the MFC and connected to a computer to obtain data in real time. For evaluation of biofilm formation on the surface of the electrodes scanning electron microscopy (SEM) was carried out. The MFCs had power density values ranging from 15 MW.m⁻², in the experiment using graphite electrode 20 and MW.m⁻² in the experiment using graphite electrode with polypyrrole. By the modification of the graphite surface with polypyrrole it was observed an increase in electrical activity and increased surface area of the electrode. In terms of cell efficiency, it was possible to observe an increased coulombic efficiency in the system containing polypyrrole (17.18%) compared with the system that lacked (7.31%), representing an improvement in flow of electrons from the substrate that can be converted into electricity. Therefore, it was shown in this work that the graphite electrode modified by electrodeposition of polypyrrole can be a viable and profitable alternative for use in MCC.

Keywords: Microbial fuel cell (MFC), *Escherichia coli*, Polypyrrole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Célula a combustível de hidrogênio convencional.	18
Figura 2. Esquema da célula a combustível microbiana de duas câmaras	22
Figura 3. Exemplos de eletrodos de carbono.....	24
Figura 4. Estrutura química do Nafion.....	26
Figura 5. Mecanismo de transferência indireta de elétrons por metabólitos	27
Figura 6. Mecanismo de transferência de elétrons por mediadores químicos externos	28
Figura 7. Tipos de transferência direta de elétrons para o eletrodo.	30
Figura 8 - Visão simplificada do metabolismo central da <i>E. coli</i> (ATCC 8739). No quadrado mostra a fosforilação oxidativa simplificada com a cadeia transportadora de elétrons (CTE) demonstrando a movimentação de prótons para fora da célula (externo) e seu retorno para o citoplasma (interno). Equivalentes redutores são mostrados como elétrons (e-) e ATP é ~ P para simplificar. Pi, fosfato inorgânico	32
Figura 9. Estrutura química de alguns polímeros condutores.	35
Figura 10. Vista superior da CCM com as câmaras anódica e catódica construída em acrílico.	38
Figura 11. Vista frontal-superior da CCM construída em acrílico com a configuração de seus componentes.....	39
Figura 12. Detalhe da membrana trocadora de prótons do tipo Nafion 117.....	39
Figura 13. Configuração das CCMs construídas em polipropileno e PVC.	40
Figura 14. Foto das duas CCMs construídas em polipropileno e PVC.....	40
Figura 15. Esquema simplificado da modificação do eletrodo de grafite por eletrodeposição de polipirrol.....	42
Figura 16. Procedimento de preparo do inóculo.....	43
Figura 17. Esquema de ligação da CCM com o multímetro <i>data logger</i>	44
Figura 18. Configuração e monitoramento do sistema com a CCM.	45
Figura 19. Determinação da curva de polarização da CCM.....	47
Figura 20. CCM construída em acrílico em operação durante um dos experimentos.....	51

Figura 21. Diferença de potencial obtida no decorrer do tempo em CCM com eletrodo de grafite.	52
Figura 22. Corrente calculada no decorrer do tempo em CCM com eletrodo de grafite.	52
Figura 23. Curva de potência (quadrados) e curva de polarização (triângulo invertido) no eletrodo de grafite plano.	53
Figura 24. Determinação da curva potencial x corrente em eletrodo de grafite.	54
Figura 25. Determinação da resistência interna em eletrodo de grafite.	54
Figura 26. Diferença de potencial obtida no decorrer do tempo em CCM com eletrodo de grafite com polipirrol.	55
Figura 27. Corrente obtida no decorrer do tempo em CCM com eletrodo de grafite.	55
Figura 28. Curva de potência (quadrados) e curva de polarização (triângulos) no eletrodo de grafite com polipirrol.	56
Figura 29. Determinação da curva potencial x corrente em eletrodo de grafite com polipirrol.	56
Figura 30. Determinação da resistência interna (potência x resistência) em eletrodo de grafite com polipirrol.	57
Figura 31. Perfil do pH ao longo do tempo nas CCMs com eletrodo de grafite e polipirrol (triplicatas).	58
Figura 32. Consumo de glucose durante 120h em CCM com eletrodo de grafite e grafite com polipirrol.	59
Figura 33. Variação da DO ₆₀₀ no meio de cultivo do ânodo no decorrer de 5 dias.	60
Figura 34. Experimento com CCM de 300 ml.	61
Figura 35. Densidade de potência no decorrer do tempo com CCMs com eletrodo de grafite e grafite com polipirrol – relação de volume pela área do eletrodo.	62
Figura 36. Densidade de potência considerando o volume da CCM no decorrer do tempo.	63
Figura 37. MEV da superfície do eletrodo de grafite recoberto com polipirrol. .	65
Figura 38. MEV da superfície do eletrodo de grafite recoberto com polipirrol contendo biofilme de <i>E. coli</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de CCMs utilizando <i>E. coli</i>	33
Tabela 2. Comparação entre os métodos de síntese de polímeros condutores.	36
Tabela 3. Meio sintético de efluente utilizado para <i>E. coli</i> nas CCMs.	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

CCM: Célula de Combustível Microbiana

DDP: Diferença de Potencial

DEET: *Direct extracellular transfer* – Transferência direta extracelular

DNS: Ácido 3,5 – dinitro salicílico

DO: Densidade ótica

DQO: Demanda química de oxigênio

EET: *Extracellular electron transfer* – Transferência de elétron extracelular

EMEPPy: Eletrodo modificado pela eletrodeposição de polipirrol

g/L: Gramas por litro

h: Horas

I: Intensidade de corrente

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MFC: *Microbial fuel cell*

min: Minutos

mL: Mililitro

mM: Milimolar

NASA : *National American Spacial Agency*

OCP: *Open Circuit Potencial* – Potencial de Circuito Aberto

PEM: *Proton Exchange Membrane* - Membrana trocadora de prótons

PPy: Polipirrol

R: Resistência

R_{ext}: Resistência externa

USB: *Universal serial bus*

VC: Voltametria cíclica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 BREVE HISTÓRICO DAS CÉLULAS A COMBUSTÍVEL	16
2.2 CÉLULAS A COMBUSTÍVEL	17
2.3 INTRODUÇÃO ÀS CÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS	18
2.3.1 Breve histórico das Células a Combustível Microbianas	19
2.3.2 Mecanismo das Células a Combustível Microbianas.....	20
2.4 COMPONENTES DAS CÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS	23
2.4.1 Eletrodos	23
2.4.2 Membrana trocadora de prótons (PEM)	25
2.5 MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS.....	26
2.5.1 Transferência indireta de elétrons por meio de metabólitos reduzidos com o ânodo	27
2.5.2 Transferência de elétrons por mediadores químicos externos ...	27
2.5.3 Transferência de elétrons por mediadores químicos produzidos pelo próprio microrganismo	29
2.5.4 Transferência direta de elétrons para os eletrodos.....	29
2.6 CÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS UTILIZANDO <i>E. coli</i>	31
2.7 POLÍMEROS CONDUTORES	34
2.7.1 O Polipirrol.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODO.....	38
3.1 CONSTRUÇÃO DAS CCMs.....	38
3.2 PREPARAÇÃO DO ELETRODO DE GRAFITE MODIFICADO POR ELETRODEPOSIÇÃO DE POLIPIRROL	41
3.3 CEPA DE <i>E. coli</i> UTILIZADA, MEIO DE CULTIVO E PREPARO DO INÓCULO.....	42

3.4 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO, pH e AÇÚCARES REDUTORES.....	44
3.5 CONFIGURAÇÃO E MONITORAMENTO DO SISTEMA.....	44
3.6 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	45
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 ELETRODO PLANO DE GRAFITE – ETAPA 1.....	51
4.2 ELETRODO PLANO DE GRAFITE COM POLIPIRROL – ETAPA 2	55
4.3 AVALIAÇÃO DO pH NAS CCMs	57
4.4 AVALIAÇÃO DA CONSUMO DE GLUCOSE, DENSIDADE OTICA E EFICIÊNCIA COULOMBICA.....	59
4.5 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE POTÊNCIA RELACIONANDO COM A ÁREA.....	61
4.6 RELAÇÃO DA DENSIDADE DE POTÊNCIA PELO VOLUME DA CCM	63
4.7 MORFOLOGIA DO ELETRODO COM POLIPIRROL.....	64
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

O déficit energético mundial vem preocupando a comunidade científica e governos de todos os países de forma significativa. Nos últimos 240 anos e ainda hoje, a matriz energética fundamental no mundo tem sido baseada nos combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural), quer pela indústria, pelo transporte ou mesmo uso doméstico. Até mesmo a energia elétrica gerada nas termoelétricas em diversos países tem como principal matéria prima combustíveis fósseis. Esta situação foi originada pelos preços acessíveis, facilidade de utilização e pelo aparente senso de inesgotabilidade desse recurso que se manteve ao longo dos anos. Como resultado de seu uso descontrolado se originam diversos impactos ambientais como, por exemplo, o aumento na temperatura global devido ao aumento das emissões de gases de efeito estufa. Esse aumento nas temperaturas globais e a nova composição da atmosfera desencadeiam alterações importantes em praticamente todos os sistemas químicos, físicos e biológicos, incluindo os ciclos naturais da Terra. Tais consequências desestruturam os ecossistemas em larga escala, gerando por consequência problemas sérios para a biodiversidade, para a produção de alimentos, suprimento de água e a produção de bens diversos para a humanidade.

O surgimento de fontes de energias renováveis tem importância fundamental no enfrentamento dessas questões, visando ao mesmo tempo diminuir a dependência dos combustíveis fósseis, ser sustentável e diminuir os impactos causados ao ambiente e sociedade em tempos de elevada demanda energética. Energia e ambiente são duas faces fundamentais do mesmo problema: a sustentabilidade. Conectar a geração energética com o meio ambiente vem sendo um desafio para as tecnologias emergentes. Nesse cenário a busca por alternativas energéticas renováveis tem sido uma constante. No Brasil, segundo Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL, 2016), a matriz energética se constitui principalmente em energia hídrica (61,32%), fóssil (17,47%), biomassa (8,87%), eólica (5,61%) e outras (6,76%), no qual se verifica nos últimos anos uma participação crescente das renováveis eólica, solar e biomassa. O mundo deve viver uma revolução na forma como

gera e consome energia elétrica. Como pilares dessa revolução estão à diversificação das energias renováveis e a geração descentralizada de energia. Dentro desse contexto, as células a combustível têm muitas características que as tornam desejáveis como dispositivos alternativos de conversão de energia, como eficiência e baixo impacto ambiental. A conversão direta da energia química em energia elétrica torna o processo mais eficiente e a reação entre hidrogênio e oxigênio na célula produz água como subproduto, além da conversão ser isenta de ruídos e com uma gama de possibilidades de aplicação.

Dentre as células a combustível, existe um tipo capaz de utilizar o metabolismo dos microrganismos para converter a energia química armazenada na matéria orgânica (carboidratos, proteínas, dentre outros) em energia elétrica, denominado célula a combustível microbiana (CCM). Com o entendimento dos mecanismos que relacionam o metabolismo microbiano e a geração de eletricidade, pesquisas recentes estão voltadas para um melhor entendimento da tecnologia para otimização do desempenho e eficiência das CCMs. Um dos desafios é a necessidade de se testar novos materiais condutores como eletrodos visando aumentar do potencial elétrico destes dispositivos. Materiais de carbono e metais não corrosivos apresentam tais características, sendo atualmente os mais utilizados como matéria-prima base desses eletrodos. O polipirrol é um polímero orgânico condutor que possui boa condutividade elétrica, elevada área superficial, biocompatibilidade e baixo custo. Neste trabalho foi construída uma CCM de dupla câmara para a geração de energia elétrica a partir da degradação de glucose por *Escherichia coli*. Foram avaliados 2 tipos de eletrodos: um de grafite, normalmente utilizado em estudos com CCMs, outro de grafite modificado pela eletrodeposição de polipirrol, obtido após síntese. Através da comparação dos dados obtidos será verificado a eficiência do uso de polipirrol como material recobrimo eletrodo de grafite para ser utilizado em CCMs.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Construir células a combustível microbianas (CCMs) de duas câmaras em escala de bancada utilizando culturas puras de *Escherichia coli*, sem mediadores químicos, a fim de comparar a eficiência energética obtida com eletrodo de grafite plano e eletrodo de grafite plano modificado com a eletrodeposição de polipirrol.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Construir duas células a combustível microbianas de dupla câmara, em escala de bancada, com eletrodo de grafite plano e com eletrodo de grafite modificado com a eletrodeposição de polipirrol;
- Monitorar os parâmetros pH, diferença de potencial, densidade de potência com relação à área do eletrodo, densidade de potência com relação ao volume e densidade de corrente nas CCMs;
- Avaliar através de curvas de polarização a eficiência energética, a densidade de potência máxima, a corrente limite e a resistência interna desenvolvida pelas CCMs;
- Comparar os potenciais e densidades de potência das CCMs com eletrodo plano de grafite em relação ao eletrodo plano de grafite modificado com a eletrodeposição de polipirrol;
- Avaliar a formação de biofilme microbiano no eletrodo plano de grafite revestido com polipirrol, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BREVE HISTÓRICO DAS CÉLULAS A COMBUSTÍVEL

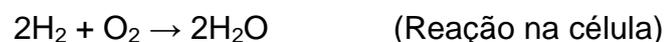
O princípio de funcionamento das células a combustível foi descoberto pelo químico suíço/alemão Christian Friedrich Schönbein em 1838, mas foi o químico William Robert Grove no ano seguinte que mostrou a aplicação prática deste princípio, a conversão direta de energia química do hidrogênio e oxigênio em energia elétrica na forma de corrente contínua, utilizando um ânodo e um cátodo de platina imersa em ácido sulfúrico (Fuel Cell Today, 2016). Passaram-se muitos anos até que em 1959 o britânico Francis Thomas Bacon construiu a primeira célula a combustível tipo alcalina (eletrólito de hidróxido de potássio – KOH), com as características das células atuais, no qual utilizando hidrogênio e oxigênio, teve capacidade de produzir 5 kW de energia elétrica (Fuel Cell Today, 2016). Nos anos 60 as células a combustível tiveram sua importância em aplicações aeroespaciais, uma vez que a NASA utilizou estes dispositivos para a geração de eletricidade e água nos projetos Gemini (célula a combustível de membrana trocadora de prótons, desenvolvidas pela empresa General Electric) e Apollo (células tipo alcalina fabricadas pela empresa Pratt & Whitney) (Fuel Cell Today, 2016).

A partir dos anos 1970, com a crise mundial do petróleo, as células a combustível passaram a ser consideradas em aplicações terrestres, juntamente com o hidrogênio, porém perderam importância quando os preços do petróleo voltaram a baixar no início dos anos 1980. Um maior interesse pelas células a combustível somente ocorreu durante os anos 1990, com a maior importância das questões ambientais que foram marcadas com o Protocolo de Quioto, um acordo internacional para redução da emissão dos gases que agravam o efeito estufa. Desde então, tanto as células a combustíveis quanto outras tecnologias energéticas menos impactantes ao meio ambiente, tem se mostrado alternativas tecnológicas viáveis para a questão energética e questões ambientais.

2.2 CÉLULAS A COMBUSTÍVEL

As células a combustível podem ser definidas como dispositivos eletroquímicos nos quais a energia química de um dado combustível é convertida diretamente em eletricidade. Seu princípio consiste em converter a energia livre de Gibbs, na oxidação isotérmica de um combustível, em trabalho elétrico. Células a combustível são divididas em duas câmaras, cada uma contendo um eletrodo; um ânodo e um cátodo. O doador de elétrons do lado do ânodo, que pode ser, por exemplo, o hidrogênio, é oxidado na superfície do ânodo, levando a formação de elétrons e prótons. Os elétrons ficam retidos no ânodo tornando-o eletronegativo e formando a corrente no circuito. Os prótons do lado do ânodo atravessam uma membrana seletiva de cátions (membrana trocadora de prótons) em direção ao cátodo, a fim de equalizar a carga transferida pelos elétrons formando assim uma diferença de potencial entre os eletrodos o que permite a circulação de corrente (elétrons) (BOCKRIS e SRINIVASAN, 1969).

Se uma resistência é colocada entre o ânodo e o cátodo, esses elétrons podem ser recuperados na forma de eletricidade. Os prótons que atravessaram para o cátodo reagem com oxigênio juntamente com os elétrons que atravessaram o circuito para formar água. Na maioria dos casos, ambos os eletrodos podem ser catalisados por platina ou paládio para aumentar a capacidade da célula. Uma representação do processo geral de uma célula a combustível com uma membrana trocadora de prótons é mostrada na Figura 1. Na célula a combustíveis duas meias reações ocorrem, a oxidação no ânodo do gás hidrogênio em prótons e elétrons, e a redução no cátodo do oxigênio na presença de prótons para formar água, conforme mostrado abaixo:



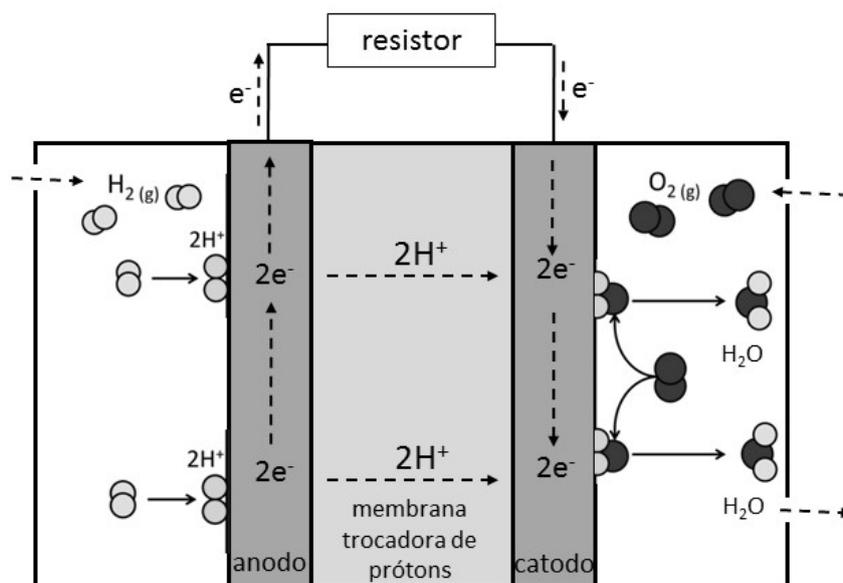


Figura 1. Célula a combustível de hidrogênio convencional.
Fonte: Adaptado a partir de Fuel Cell Today (2016).

2.3 INTRODUÇÃO ÀS CÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS

O desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de energias renováveis tem recebido atenção crescente entre os cientistas. As pesquisas estão voltadas para tecnologias que apresentem eficiência energética, promovam a proteção ambiental e a sustentabilidade da sociedade como um todo. CCMs têm atraído a atenção dos pesquisadores por terem um potencial de geração de energia limpa e renovável que pode ser obtida a partir de uma diversidade de resíduos e efluentes.

De forma geral, as células a combustível microbianas (CCMs) são dispositivos eletroquímicos, similares à maioria das células a combustível, com exceção que a energia gerada no caso das CCMs tem origem nos microrganismos que catalisam as reações redox a partir de compostos orgânicos (SWANSON *et al* 2008). Outra definição relaciona as CCMs a biorreatores nos quais há conversão de energia química presente nas ligações moleculares no substrato em eletricidade, através da atividade catalítica de bactérias associadas ao eletrodo (HOLMES *et al.*, 2004; RABAEY *et al.*, 2005).

CCMs geralmente são constituídas de um ânodo, um cátodo, um eletrólito (que pode ser na forma de uma membrana trocadora de prótons) e um circuito elétrico. Os microrganismos são colocados geralmente em um dos compartimentos (câmara anódica) utilizado para degradar e converter substratos orgânicos e/ou inorgânicos por meio do seu metabolismo.

2.3.1 Breve histórico das Células a Combustível Microbianas

O primeiro estudo científico correlacionando os organismos vivos com a eletricidade foi feito em 1790 por Luigi Galvani, através de experimentos nos quais se observou a “eletricidade animal” pela contração das pernas de rãs quando submetidas à descarga de corrente elétrica. Em 1911, Michael Cresse Potter, professor de botânica na Universidade de Durham, no Reino Unido, demonstrou que organismos podem gerar uma voltagem e entregar uma corrente (POTTER, 1911). Potter colocou um eletrodo de platina dentro de uma cultura de levedura de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) ou da bactéria *Escherichia coli*. O eletrodo atuou como um ânodo e gerou um potencial negativo em relação a um segundo eletrodo, que atuou como um cátodo, mergulhado dentro de um mesmo meio de cultura sem os respectivos microrganismos. Dessa forma, reconheceu intuitivamente que os elétrons originados desse aparato vieram da degradação dos nutrientes (meio de cultivo) colocados para a multiplicação desses microrganismos. Na época Potter não conseguiu interpretar esse resultado em termos bioquímicos do processo metabólico, o que enfraqueceu seu estudo perante a comunidade científica.

Passaram-se muitos anos para que microbiologistas e bioquímicos mostrassem como as enzimas presentes em bactérias oxidam o seu alimento. Em 1931 Cohen, um pesquisador de Cambridge, reavivou a ideia e os estudos de Potter, descrevendo um grupo de células combustíveis que juntas produziram mais de 35 V de tensão e corrente elétrica de 2 mA. Porém, o interesse nesse assunto diminuiu até o início da era espacial. Na década de 1960 a NASA (*National American Spacial Agency*) demonstrou interesse no desenvolvimento de célula a combustível microbiana a fim de ser uma alternativa à geração de energia e degradação de resíduos orgânicos em

viagens espaciais (LOGAN, 2007). Nesses estudos pesquisadores fermentavam leveduras e bactérias utilizando glucose, óleo de coco e outros substratos para produzir combustíveis secundários, tais como álcoois e hidrogênio. Protótipos de baterias convencionais de células a combustível eram então utilizadas para alimentar rádios transistorizados. Paralelamente o trabalho com as CCMs teve continuidade com pesquisadores japoneses, juntamente com um sólido desenvolvimento de um programa de pesquisa em células a combustível convencionais, que utilizam o hidrogênio, por exemplo.

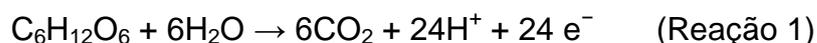
Outros cientistas nos Estados Unidos e América do Sul mantiveram os estudos de CCMs na década de 60. Um desses cientistas foi Milton Allen, que elucidou o comportamento metabólico da *E. coli* na degradação de compostos orgânicos. Outros grupos foram pioneiros na geração de eletricidade a partir do metano e hidrocarbonetos utilizando diferentes espécies de bactérias como *Nocardia* sp., *Pseudomonas methanica* e *Micrococcus cerificans*, que ao fim do processo produziram pequenas quantidades de eletricidade. O maior obstáculo visto na época era o fato de os microrganismos possuírem uma membrana formada de lipídios e uma parede celular, o que dificulta o acesso à fonte de elétrons. Assim estava claro que microbiologistas e eletroquímicos precisariam trabalhar juntos. Nos anos 80 começaram estudos com os mediadores, compostos adicionados às CCMs que possibilitavam melhor transferência dos elétrons dos microrganismos aos eletrodos.

No início da década de 90 ressurgiu um maior interesse nessa área e os estudos e artigos científicos relacionados às CCMs começaram a aumentar, inclusive passando de escala laboratorial para maiores escalas. Na Austrália, por exemplo, foi desenvolvida uma célula a combustível microbiana em escala piloto alimentada pelo efluente de uma cervejaria (LOGAN, 2007).

2.3.2 Mecanismo das Células a Combustível Microbianas

De forma mais detalhada, numa CCM os microrganismos oxidam compostos orgânicos presentes num meio (meio de cultivo ou um efluente, por exemplo) resultando na produção de elétrons que percorrem uma série de enzimas respiratórias do microrganismo para a produção de energia celular na

forma de ATP. Como exemplo é apresentado, a seguir, o processo de oxidação da glucose gerando: CO₂, prótons e elétrons (Reação 1).



Os elétrons são, então, liberados aos aceptores finais, que por sua vez recebem os elétrons e se tornam reduzidos. Muitos aceptores biológicos de elétrons (ex. oxigênio, nitrato, sulfato) se difundem dentro da célula, recebem esses elétrons formando produtos, que por sua vez são liberados para fora da célula. Por exemplo, o oxigênio pode ser reduzido a água através da catálise de uma reação de elétrons com prótons, que após é utilizada no próprio metabolismo da célula ou secretada para fora da célula de acordo com a sua necessidade. As CCMs se aproveitam desse processo natural de produção de elétrons para a “captura” destes direcionando-os para os eletrodos.

Conforme mostrado na Figura 2, durante a oxidação de compostos orgânicos, os elétrons produzidos pela célula são capturados por um ou mais mediadores de elétrons, que são conduzidos para exterior da célula e direcionados primeiramente ao ânodo e em seguida ao cátodo (LOGAN, 2007). Ao mesmo tempo, os prótons, produzidos pelo metabolismo microbiano dos compostos orgânicos atravessam a membrana trocadora de prótons da CCM em direção ao cátodo, completando desta forma o circuito. A bactéria cresce na câmara anódica oxidando o material orgânico e liberando elétrons para o ânodo e prótons para a solução.

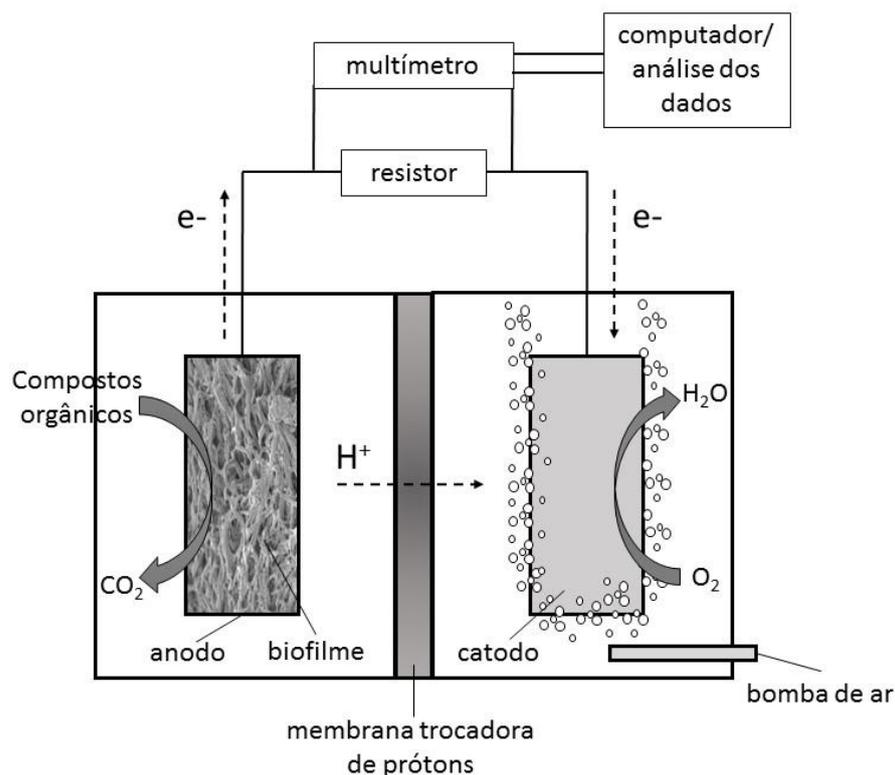


Figura 2. Esquema da célula a combustível microbiana de duas câmaras
Fonte: Adaptado de Logan (2007).

O cátodo é oxigenado por um dispersor de ar que promove a dissolução de oxigênio na solução para reações com elétrons e prótons resultando na formação de água (Reação 2).



O sistema é conectado a uma resistência externa para testes de diferença de potencial, medida por um multímetro ligado em paralelo ou a corrente elétrica se o multímetro for colocado em série ao circuito do sistema (LOGAN *et al.*, 2007). Os dados da corrente elétrica podem ser armazenados no decorrer do tempo para uma análise da geração de corrente sob diversas condições. A transferência dos prótons pela membrana trocadora de prótons mantém o pH neutro da câmara anódica para os microrganismos (SINGH *et al.*, 2010). Assim, microrganismos anaeróbios ou facultativos oxidam o material orgânico na câmara do ânodo, gerando dióxido de carbono, prótons e elétrons.

O compartimento do ânodo é mantido sob condições anóxicas ao passo que o cátodo pode ser exposto ao ar ou submerso sob aeração (LOVLEY, 2006).

Diversos fatores podem dar impulso adicional ao estudo de CCMs. Os microrganismos, adaptados para se alimentarem de praticamente todos os tipos de fontes de carbono disponíveis, são os principais catalisadores para a geração de energia elétrica nas CCMs, criando um leque quase infinito de possíveis substratos para produção elétrica (SCHOLZ, 2003).

2.4 COMPONENTES DAS CÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS

A fim de identificar os gargalos das CCMs e otimizar a geração de energia, um melhor entendimento de todos os seus componentes é necessário. As CCMs são geralmente constituídas de um ânodo, um cátodo, um eletrólito (que pode ser na forma de uma membrana trocadora de prótons) e um circuito elétrico.

Os principais componentes são melhor detalhados a seguir.

2.4.1 Eletrodos

Os eletrodos têm função importante nas CCMs, sendo responsáveis por receber os elétrons produzidos pela oxidação anaeróbia dos substratos orgânicos. O ânodo atua como um acceptor de elétrons artificial, já o cátodo recebe os elétrons que atravessaram o circuito sendo responsável por combinar os prótons com os elétrons e seu acceptor, como a molécula de oxigênio na presença de um catalisador como a platina. Eletrodos construídos com diferentes tipos de materiais variam suas propriedades químicas e físicas (área superficial, condutividade elétrica e estabilidade química), portanto, dependendo do tipo de material influenciará também o contato com o microrganismo, a transferência de elétrons, a resistência do eletrodo e a reação na superfície do eletrodo (LOGAN et al., 2006).

Os requisitos para um eletrodo são: alta condutividade, não corrosivo, não tóxico as células, alta porosidade, não incrustante, grande área superficial, dimensionado em diversos tamanhos e barato. Eletrodos construídos de materiais de carbono são os mais tradicionais e bastante utilizados em estudos

com CCMs, principalmente devido ao seu baixo custo, excelente condutividade elétrica e estabilidade química. Exemplos de materiais de carbono tais como tecido de carbono, placas porosas e agregados de grafite são mostrados na Figura 3 (CARVALHO, 2010; LOGAN, 2007).

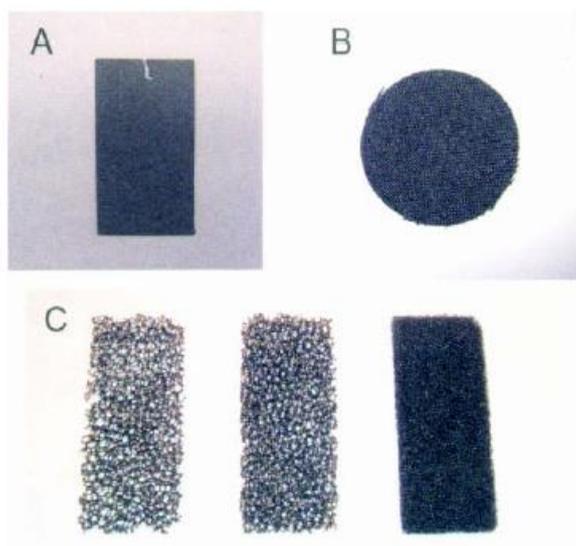


Figura 3. Exemplos de eletrodos de carbono.

A: placa de carbono, B: tecido de carbono, C: placa de carbono com diferentes porosidades.

Fonte: Adaptado de Logan (2007)

Com relação às hastes e placas de grafite, Liu e colaboradores (2004), utilizando uma CCM de câmara simples contendo oito hastes de grafite como ânodo e efluente como meio de cultivo e fonte de microrganismos, conseguiram uma potência máxima de 26 mW.m^2 com remoção da DQO de 80%. No entanto, a aplicação da haste de grafite foi limitada por causa de sua baixa porosidade e baixa área superficial para adsorção dos microrganismos. Chaudhuri e Lovley (2003) obtiveram melhores resultados com relação à potência gerada quando as hastes de grafite foram substituídas por feltro de grafite, indicando assim que o aumento da área superficial do eletrodo foi benéfico para a performance da CCM. Sobre o eletrodo irão se fixar na forma de biofilme as bactérias presentes no meio líquido que circunda o eletrodo. Portanto, é importante que a superfície do eletrodo tenha afinidade com as células facilitando assim sua adesão e ao mesmo tempo seja condutivo o

suficiente para captação dos elétrons provenientes da célula. A maior área superficial do eletrodo aumenta a quantidade de microrganismos aderidos permitindo, portanto, um maior número de reações sobre a superfície do mesmo para um maior volume de elétrons encaminhados para o ânodo.

Alguns estudos têm testado o uso de eletrodos sem carbono. Numa CCM de sedimento foi testado um eletrodo de aço inoxidável, mas a densidade de potência máxima obtida foi de somente 4 mW.m^{-2} (DUMAS et al., 2007). Ânodos de metal feitos de malha de aço inoxidável foram utilizados no trabalho de Tanisho e colaboradores (1998), porém não é recomendável, pois o cobre utilizado na composição da liga pode ser tóxico para muitas bactérias, mesmo em quantidades mínimas (LOGAN et al., 2006). Richter e colaboradores (2008) desenvolveram uma CCM utilizando ouro condutivo como ânodo e *Geobacter sulfurreducens*, e uma corrente estável de 0,4-0,7 mA foi produzida. Embora essa última CCM tenha apresentado valores similares a outros trabalhos utilizando eletrodos de grafite, sua aplicação prática ficou limitada à pequena escala. Portanto, a seleção e o desenvolvimento de materiais compatíveis e eficientes são ações importantes para promover uma boa performance da CCM (PANT et al., 2011; ZHOU et al., 2011).

2.4.2 Membrana trocadora de prótons (PEM)

A membrana trocadora de prótons (PEM) é tipicamente colocada em CCMs entre as câmaras anódica e catódica, com função de separar o ânodo do cátodo, e permitir que os prótons passem de um lado para outro (GUPTA, 2011; LOVLEY, 2006). Como alternativas à separação das câmaras pode ser utilizada uma ponte salina (SINGH et al., 2010; RAHIMNEJAD et al., 2011) ou ainda membranas trocadoras de cátions e ânions (DU et al., 2007). A PEM mais comumente utilizada é o Nafion, comercializado pela empresa americana Dupont. O Nafion é composto por polietileno que tem hidrogênio substituído por um flúor formando uma molécula conhecida como politetrafluoretileno (PTFE) (Figura 4). A forte ligação entre o carbono e o flúor garante a durabilidade da membrana além da resistência a ataques químicos (MAURITZ; MOORE, 2004).

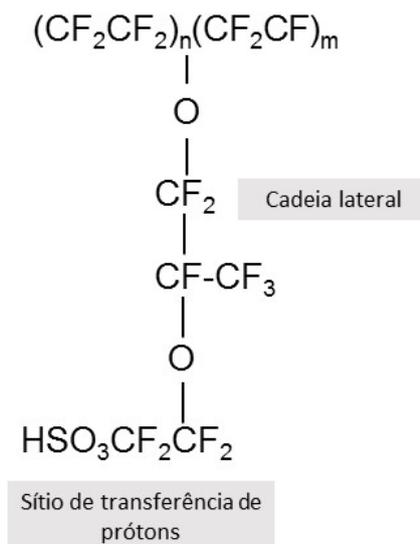


Figura 4. Estrutura química do Nafion
Fonte: Adaptado Mauritz e Moore, 2004.

No Nafion, o grupo sulfônico (HSO_3) está aderido ionicamente no final da cadeia do PTFE, resultando na presença dos íons SO_3^- e H^+ e ação mutua de duas fortes atrações tanto positiva como negativa. Como demonstrado na Figura 4 a principal propriedade da membrana trocadora de prótons é a presença do grupo sulfônico. Este grupo, por ser altamente hidrofílico, atrai moléculas de água hidratadas onde o íon H^+ é mais fraco. Quando o grupamento SO_3^- se move, cria zonas hidrofóbicas para os íons H^+ que podem se mover mais livremente até o outro lado da câmara (LARMINIE; DICKS, 2003).

2.5 MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE ELÉTRONS

Os mecanismos de transferência de elétrons envolvem conhecimentos de eletroquímica, bioquímica e microbiologia (MAHADEVAN; GUNAWARDENA; FERNANDO, 2014). Como dito anteriormente, CCMs são sistemas que adquirem elétrons a partir de microrganismos que transferem elétrons para superfície do eletrodo. Esse processo pode ser realizado por meio de alguns mecanismos diferentes, conforme mostrado a seguir.

2.5.1 Transferência indireta de elétrons por meio de metabólitos reduzidos com o ânodo

A oxidação dos metabólitos no ânodo pode levar à formação de ácidos orgânicos que reagem lentamente com o eletrodo, podendo gerar uma diferença de potencial. Esta ação indireta do microrganismo sobre o substrato e ânodo pode ser considerada como um mecanismo de transferência de elétrons (Figura 5).

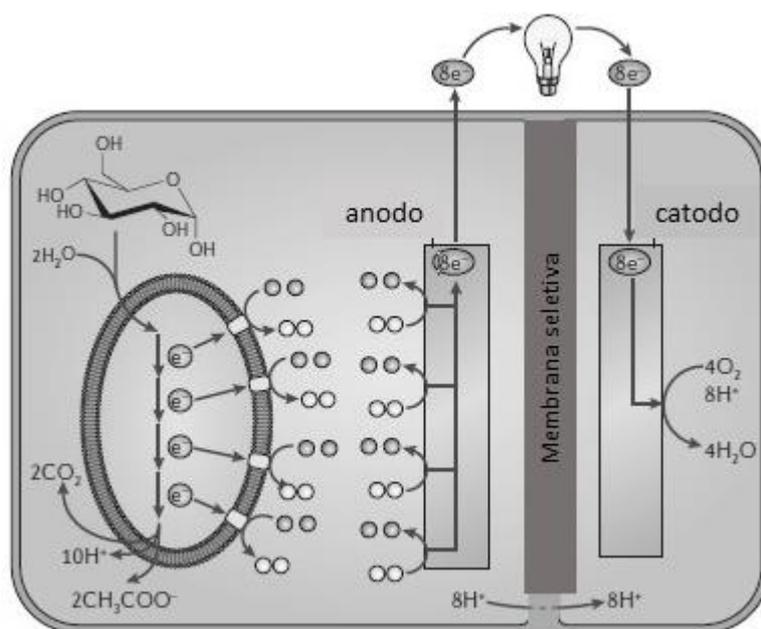


Figura 5. Mecanismo de transferência indireta de elétrons por metabólitos

Fonte: Adaptado de Lovley (2006)

2.5.2 Transferência de elétrons por mediadores químicos externos

Os elétrons podem chegar à superfície do ânodo a partir do meio líquido da câmara anódica se eles forem transportados por mediadores de elétrons. Mediadores de elétrons são substâncias químicas capazes de “lançar” os elétrons liberados durante as reações de oxidação dos substratos para a superfície do ânodo, potencializando assim a comunicação microrganismo-eletrodo. Teoricamente para cada elétron liberado, existe um próton correspondente liberado para a solução (Figura 6).

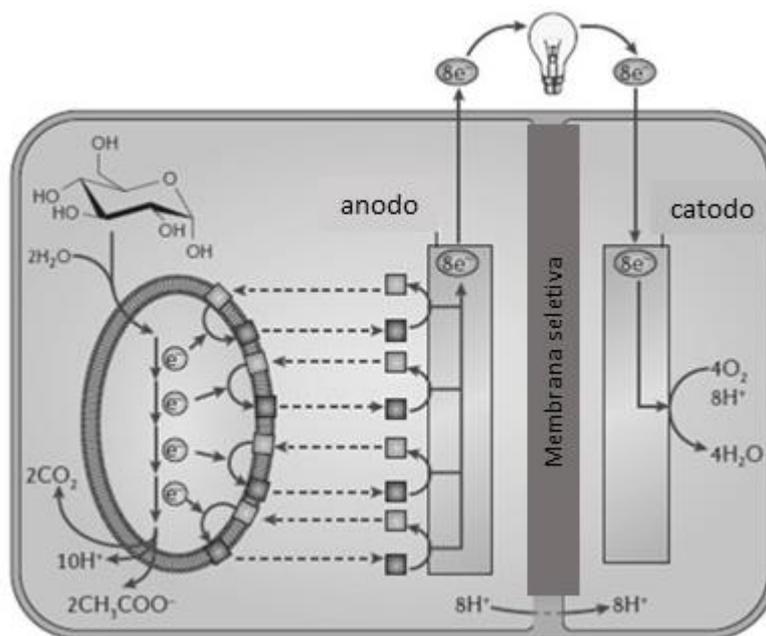


Figura 6. Mecanismo de transferência de elétrons por mediadores químicos externos
Fonte: Adaptado de Lovley (2006)

Segundo Du (2007), os mediadores deslocam-se através da membrana e lançam os elétrons até o ânodo, onde se oxidam novamente e voltam para a solução para iniciar novamente o ciclo. Um mediador deve ter permeabilidade pela membrana, deve ser adequadamente solúvel, possuir alta taxa de transferência de elétrons, não ser tóxico ao microrganismo e não ser biodegradável (MAHADEVAN; GUNAWARDENA; FERNANDO, 2014). Em alguns estudos são vistos como mediadores o corante vermelho neutro (PARK; ZEIKUS, 2000), o mediador redox antraquinona-2,6-dissulfonato (AQDS), os corantes tionina e azul de metileno, o corante azul piocianina, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (HNQ) e Fe(III)-EDTA (DU et al., 2007). Segundo Lovley (2006), os mecanismos de captura de elétrons utilizados pelos mediadores são os mais diversos. Por exemplo, o corante vermelho neutro pode receber elétrons diretamente do NADH celular sendo reduzido enzimaticamente por uma desidrogenase.

2.5.3 Transferência de elétrons por mediadores químicos produzidos pelo próprio microrganismo

Em muitos casos algumas cepas bacterianas produzem seus próprios mediadores, dependendo da espécie (ZHOU et al., 2012). A produção de mediadores pela própria bactéria influencia seu desempenho e a transferência de elétrons (RABAEY; VERSTRAETE, 2005). Mediadores de algumas espécies do gênero *Pseudomonas* recuperados na oxidação da glucose não apresentaram captação eficiente de elétrons, pois deixaram maior parte destes indisponíveis (degradam os mediadores), devido ao do metabolismo fermentativo particular dessas espécies (LOVLEY, 2006). Zhang e colaboradores (2006) demonstraram que alguns componentes solúveis secretados pela *E. coli* durante seu metabolismo, como o etil-2-aminoacetimidato, meti-4-etoxi-butanoato e 3-isobutilhexahidropirrol [1,2- α] pirazina-1,4-diona, podem ser responsáveis pela formação de uma comunicação entre a cepa e o eletrodo, agindo dessa forma como mediadores.

2.5.4 Transferência direta de elétrons para os eletrodos

Segundo Teleken (2013), a transferência direta requer o contato físico entre o microrganismo e o eletrodo. Isto é possível devido a um conjunto de proteínas associadas à membrana celular capazes de transportar elétrons do interior do microrganismo para o meio extracelular. A primeira vez que foi verificado que microrganismos poderiam enviar elétrons diretamente à superfície do eletrodo foi com a bactéria *Shewanella putrefaciens* (LOVLEY, 2006). O estudo mostrou que elétrons poderiam ser transferidos diretamente da célula até o eletrodo pela membrana celular através da proteína citocromo C (Figura 7A). O citocromo tipo C é uma proteína hidrossolúvel presente na cadeia respiratória, participando da transferência de elétrons para o aceptor final na célula microbiana. Segundo Schechter e colaboradores (2014), os citocromos tipo C são considerados a principal estratégia de transferência de elétrons nesses organismos, sendo por isso denominados exoeletrogênicos. Através da purificação dos citocromos do tipo C localizados na superfície externa da célula, verificou-se que estes são capazes de reduzir aceptores de

elétrons extracelulares, sugerindo assim que transferem elétrons para aceptores de elétrons extracelulares. Citocromos C são comumente encontrados em gêneros como *Geobacter*, *Desulfovibrio*, *Rhodopseudomonas* e *Shewanella* (SCHECHTER et al., 2014). Estes microrganismos são capazes de produzir ATP em condições anaeróbicas empregando como oxidantes óxidos minerais como: Fe (III) e Mn (IV) (TELEKEN, 2013) e ácidos húmicos (LOVLEY, 2006).

Uma recente descoberta foi a verificação de que o pili, apêndice filiforme encontrado na superfície de muitas bactérias, responsável pelo fenômeno de conjugação e aderência a superfícies, pode auxiliar também no mecanismo de transporte de elétrons, neste caso são denominado de nanofios (MAHADEVAN; GUNAWARDENA; FERNANDO, 2014) (Figura 7B). Esse fenômeno foi observado em biofilme da bactéria *Geobacter sulfurreducens* formado na superfície do ânodo, no qual as múltiplas camadas de biofilme na superfície do ânodo se tornaram condutoras (LEHNEN, 2014; LOVLEY, 2006).

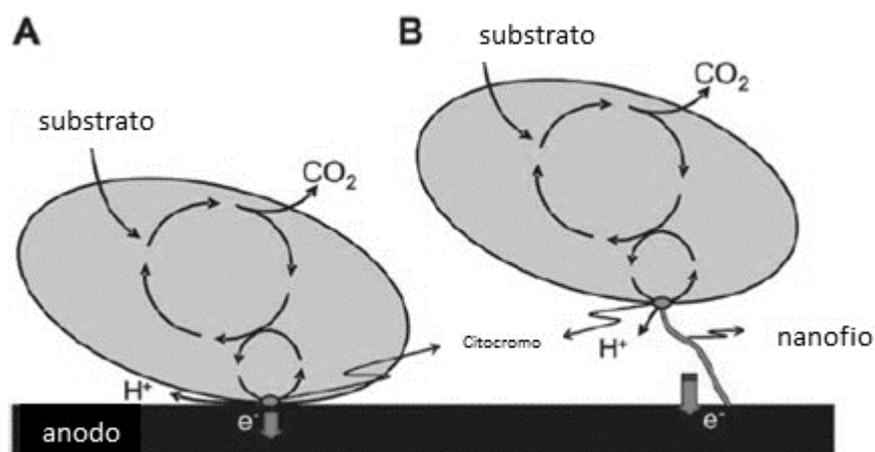


Figura 7. Tipos de transferência direta de elétrons para o eletrodo.

A. Ligação direta da membrana via citocromo C. B. Ligação direta utilizando nanofios

Fonte: Adaptado de Lovley (2006)

2.6 CÉLULAS A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS UTILIZANDO *E. coli*

A *E. coli* é uma bactéria Gram negativa, heterotrófica, anaeróbica facultativa pertencente à classe Gammaproteobacteria (MOORE, 2009) e nível de biossegurança 1. É uma bactéria normalmente encontrada no intestino de animais de sangue quente, incluindo o homem. A *E. coli* é um microrganismo modelo, sendo a bactéria mais amplamente estudada, em termos bioquímicos, também assumindo papel importante no campo da biotecnologia, como por exemplo, a produção de insulina humana por via recombinante. Possui multiplicação rápida sob condições favoráveis (37°C e aerobiose) levando apenas 20 minutos para a duplicação celular, além de apresentar exigências nutricionais mínimas. Estas características contribuem para que a *E. coli* seja o organismo ideal para projetos básicos e de investigação, incluindo estudos com CCM (MOORE, 2009).

As vias metabólicas primárias da *E. coli*, estando envolvidas no metabolismo aeróbio da glucose, consiste na glicólise, formação do piruvato e ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico, são mostradas na Figura 8 ,(LOGAN,2006). A *E. coli* pode se desenvolver em uma ampla gama de substratos sendo capaz em condições aeróbicas de oxidar completamente uma variedade de compostos orgânicos incluindo açúcares (hexoses e pentoses), álcoois, ácidos orgânicos, gorduras e proteínas. Pode sintetizar todos os aminoácidos, ácidos nucleicos e cofatores necessários para seu crescimento e metabolismo. Em condições anaeróbicas é capaz de utilizar nitrato, nitrito, dimetil sulfóxido ou fumaratos como acceptor final de elétrons (MOORE, 2009). Como produtos de fermentação primária podem ser formados lactato, acetato, formato e etanol acompanhado por succinato e piruvato como produtos secundários (LOGAN, 2006; MOORE, 2009).

ATCC 8739

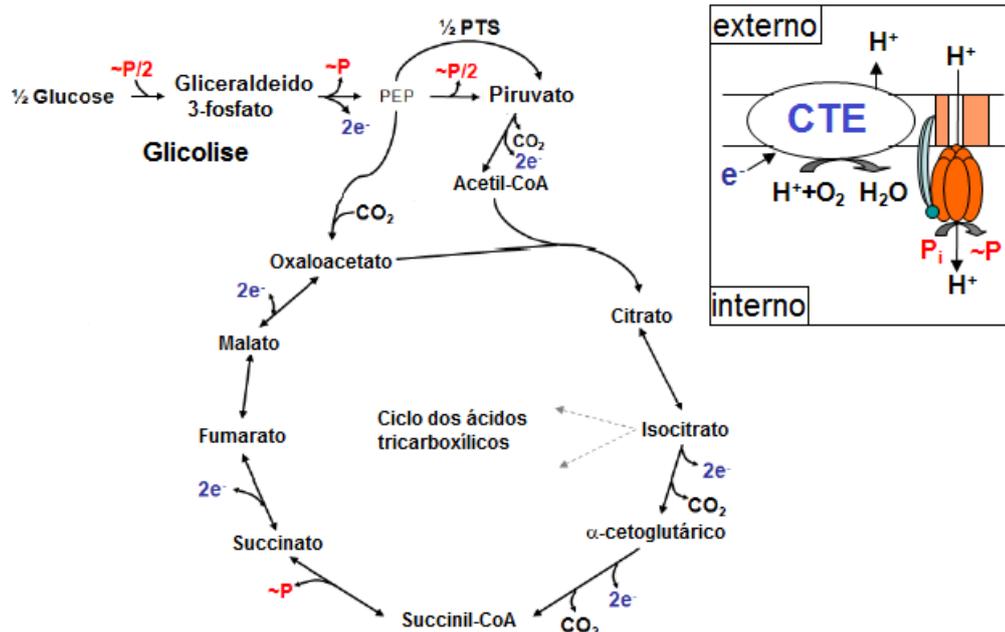


Figura 8 - Visão simplificada do metabolismo central da *E. coli* (ATCC 8739). No quadrado mostra a fosforilação oxidativa simplificada com a cadeia transportadora de elétrons (CTE) demonstrando a movimentação de prótons para fora da célula (externo) e seu retorno para o citoplasma (interno). Equivalentes redutores são mostrados como elétrons (e^-) e ATP é $\sim P$ para simplificar. P_i , fosfato inorgânico
Fonte: Adaptado de Moore, 2009

Segundo Zhang e colaboradores (2006), *E. coli* em contato com eletrodo (ânodo) é capaz de produzir seus próprios mediadores (etil 2-amino acetimidato, metil 4-etoxi butanoato e 3 isobutilhexahidropirrol [1,2- α] pirazina - 1,4-diona), moléculas solúveis de espécies eletroativas capazes de carregar os elétrons entre a célula e o eletrodo. Segundo Sugnaux e colaboradores (2013), em células bacterianas sem membrana condutora ou sem proteínas de redox, o único contato com o meio externo seria feito através de porinas, proteínas encontradas comumente na membrana celular de bactérias Gram negativas permitindo a difusão de substâncias hidrofílicas através da membrana. Quando a porina está em contato direto com o eletrodo, ocorre a transferência de elétrons de forma similar à direta.

Zhang e colaboradores (2006 - A) argumentam que para melhorar o desempenho das bactérias deve-se aclimatá-las, submetendo o inóculo e as várias gerações da cepa ao mesmo substrato e às mesmas condições da

CCM, selecionando assim cepas com maior capacidade de transferência de elétrons. A Tabela 1 mostra alguns trabalhos utilizando *E. coli* em CCM, o tipo de ânodo utilizado, sistema e a máxima densidade de potência obtida nos trabalhos.

Tabela 1. Exemplos de CCMs utilizando *E. coli*

Substrato utilizado	Ânodo	Sistema	Máx. densidade de potência (mW/m ²)	Referência
Glucose	Grafite poroso	Duas Câmaras	178,69	MASIH; DEVASAHAYAM; ZIMIK, 2012.
Sacarose	Grafite poroso	Duas Câmaras	220,66	MASIH; DEVASAHAYAM; ZIMIK, 2012,
Acetato de sódio	Grafite poroso	Duas Câmaras	222,84	MASIH; DEVASAHAYAM; ZIMIK, 2012.
Lodo	Grafite com Mn ⁺⁴	Câmara única	91,00	PARK; ZEIKUS, 2000
Lodo	Grafite com vermelho neutro	Câmara única	152,00	PARK; ZEIKUS, 2000
Lodo	Platina e eletrodo modificado com polianilina	Câmara única	6000,00	FRANKS; NEVIN, 2010
Glucose	Grafite/PTFE	Câmara única	760	ZHANG <i>et al</i> , 2007.
Glucose	Papel de carbono com platina + azul de metileno	Câmara única	94	RAHIMNERJAD <i>et al</i> 2013
Glucose	Papel de carbono com platina + Vermelho neutro	Câmara única	186	RAHIMNERJAD <i>et al</i> 2013
Glucose	Papel de carbono com platina + Tionina	Câmara única	83	RAHIMNERJAD <i>et al</i> 2013
Glucose	Papel de carbono com platina + sem mediadores	Câmara única	5	RAHIMNERJAD <i>et al</i> 2013
Glucose	Papel de carbono modificado com polipirrol e nanotubos	Duas Câmaras	228	ZOU <i>et al</i> , 2008

2.7 POLÍMEROS CONDUTORES

A primeira evidência de polímeros condutores teve origem com os trabalhos de Letheby, em 1862, a partir da oxidação da anilina em ácido sulfúrico diluído, produzindo um pó brilhante azul escuro e insolúvel que foi depositado sobre um eletrodo de platina. Em 1876, Led Goppelsroeder estabeleceu que o material sintetizado pela oxidação da anilina era poliacetilo. Após, houve a descoberta do polipirrol por Angeli (1916), polímero orgânico que nessa época era conhecido como pirrol preto (ATEH; FRANKS; NEVIN, 2006).

Foi somente em 1977 que Shirakara e colaboradores demonstraram que a dopagem do poliacetileno aumentou consideravelmente a condutibilidade, em cerca de 10 ordens de grandeza (ROCHA-FILHO, 2000). Desde então outros polímeros vêm sendo estudados, entre eles o polipirrol, politiofeno, polifurano e poliaromático (polianilina) (ZOPPI; PAOLI, 1993). Existe um grande foco para o desenvolvimento de polímeros condutores para diversas aplicações práticas, tais como em biosensores, sensores de gás, baterias recarregáveis, capacitores eletroquímicos, janelas eletrocromáticas, dispositivos eletromecânicos, entre outros (CHOUGULE et al., 2011). A Figura 9 mostra a estrutura de alguns polímeros condutores bem conhecidos. Os polímeros condutores são basicamente sistemas π conjugados, cadeias orgânicas com ligações simples (C-C) e duplas (C=C) alternadas (MATTOS, 2011). A condutividade aumenta por meio de um processo de oxido redução e incorporação de íons, num processo conhecido como dopagem (JUNIOR; OLIVEIRA; KUBOTA, 1997).

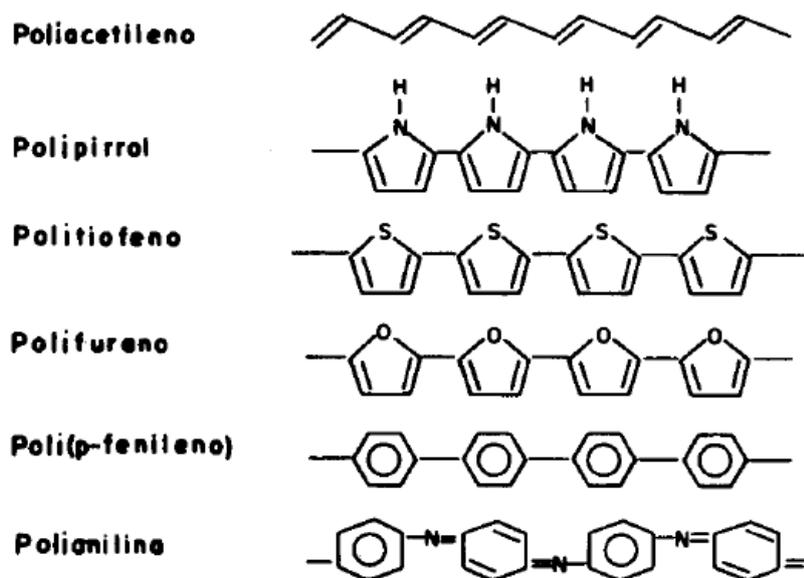


Figura 9. Estrutura química de alguns polímeros condutores.
Fonte: Zoppi;De Paoli (1993)

Existe uma diferença no comprimento das ligações simples e duplas, sendo que os carbonos ligados por ligações simples estão mais afastados entre si do que os carbonos ligados pela ligação dupla. Isso faz com que os elétrons localizados na ligação π não fiquem livres para se moverem pela cadeia polimérica; portanto, a conjugação não é suficiente para fazer um polímero condutor (MATTOS, 2011).

A condutividade de um polímero conjugado depende de alguns fatores, como difusão ou migração do contra-íon no filme para manter a eletroneutralidade (BARIOTO, 2014). Os polímeros condutores podem ser sintetizados por duas vias: química e eletroquímica (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007). A Tabela 2 mostra as vantagens e desvantagens entre os processos químicos e eletroquímicos na síntese de polímeros condutores.

Tabela 2. Comparação entre os métodos de síntese de polímeros condutores.

Tipo de polimerização	Vantagens	Desvantagens
Química	Produção em grande escala Possibilidade de modificações na estrutura por ligações covalentes	Dificuldade de se obter material na forma de filmes (limitação na solubilidade)
Eletroquímica	Possibilidade de se obter filmes finos Facilidade de síntese Possibilidade de aprisionamento de moléculas nos filmes Dopagem simultânea a síntese	Dificuldade em remoção da superfície do elétron; Impossibilidade de modificações das ligações covalentes

Fonte: Adaptado Guimard; Gomez; Schmidt (2007) e Barioto (2014)

2.7.1 O Polipirrol

O polipirrol foi sintetizado pela primeira vez por Angeli em 1916 (SASSO et al., 2011), em uma síntese aquosa que gerou um precipitado preto insolúvel, conhecido como polipirrol preto, proveniente da solução de ácido pirrol/ H_2O_2 . O polipirrol pode ser sintetizado tanto por via química quanto eletroquímica. A via eletroquímica é preferida em pesquisas, devido à sua simplicidade técnica, facilidade de dopagem durante a síntese, geometria, localização, a grande faixa de dopantes e produção de filmes de boa qualidade (ATEH; NAVSARIA; VADGAMA, 2006).

Em 1968, foi publicado o primeiro trabalho sobre as propriedades condutoras do polipirrol, preparado por via eletroquímica em eletrodo de platina em solução de pirrol e ácido sulfúrico diluído. Com estas características o polipirrol passou a ser um dos polímeros condutores mais estudados (BARIOTO, 2014). Suas propriedades eletroquímicas permitem a transferência de carga entre o componente biológico incorporado e o eletrodo produzindo assim uma gama de sinais analíticos (BARIOTO, 2014). A vantagem do polipirrol é relatada com a não citotoxicidade e biodegradabilidade associada a um alto grau de condutividade (CORDEIRO et al., 2015).

Normalmente em CCMs o processo de transferência de elétrons gera uma potência de saída muito baixa e pouco aplicável, devido ao fato que há muita dificuldade na transferência dos elétrons das bactérias para o acceptor extracelular (eletrodo). Com isso, para se obter uma alta performance, buscam-se novos materiais, especialmente no ânodo que é a estrutura que tem as bactérias ligadas intrinsecamente em sua superfície (ZOU et al,2008). Teoricamente, quanto mais bactérias aderidas à superfície do eletrodo, mais elétrons serão gerados, aliados ao crescimento bacteriano e ao consumo de substrato (LOGAN,2006). O aumento da área superficial possibilita um grande número de moléculas mediadoras e de bactérias tenham mais acesso ao ânodo e uma forma rápida de transferência de elétrons (YUAN; KIM, 2008). As camadas de polímero servem como uma barreira para os metabolitos, como o H_2 , este um dos principais elementos eletroativos, que se difunde na superfície do eletrodo eletrocataliticamente ativo e bloqueando moléculas grandes de atingir a superfície do eletrodo, preservando o catalisador e evitando que ele seja contaminado (SCHRÖDER, 2007).

Outra melhoria relatada por Yuan e Kim (2008) e Jiang e Li (2009), foi que o polipirrol carregado positivamente aumentou a adesão das bactérias carregadas negativamente por meio da interação eletrostática, tornando fácil a transferência de elétrons para o ânodo. O polipirrol pode servir como um mediador. A cadeia de polipirrol pode penetrar a membrana celular da bactéria para coletar elétrons da via metabólica para o ânodo (YUAN; KIM, 2008). Estudo semelhante feito por Morishima e colaboradores (2006), citado também por Yuan e Kim (2008), no qual um revestimento de polianilina em fibra de carbono em contato com uma bio-célula de combustível metabolismo/fotossintética foi utilizado para aumento da performance.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 CONSTRUÇÃO DAS CCMs

Neste trabalho foram contruídas dois tipos de CCMs de duas câmaras interligadas por uma membrana trocadora de prótons do tipo Nafion. As CCMs construídas diferem entre si com relação ao volume, a área da membrana trocadora de prótons e material no qual foram confeccionadas.

A primeira configuração da CCM foi montada em acrílico translúcido com cada câmara (anódica e catódica) medindo 10 cm x 10 cm x 10 cm (largura x comprimento x altura) de 1L cada e 800 mL de volume de trabalho (Figura 10). Entre as câmaras foi feita uma junção entre elas com uma abertura de 5 cm X 5 cm (25 cm²), para encaixe de uma membrana trocadora de prótons do tipo Nafion 117 (DuPont, EUA) (Figura 10). A conexão entre as câmaras foi feita através de oito parafusos zincados 3/4". No lado superior da câmara anódica foram feitas duas aberturas: uma para conexão do eletrodo de grafite e outra para a inserção de um tubo para as amostragens. Na câmara catódica foram feitas três aberturas: para conexão do eletrodo de grafite, para o tubo de amostragem e para o tubo de difusão de ar. A distância entre cada eletrodo e a membrana foi fixada em 10 cm. Para a vedação foi desenvolvido e utilizado um polímero termoplástico (HM Rubber Indústria e Comércio Ltda., Brasil), aplicado líquido e atingindo a fixação completa depois de 24h.

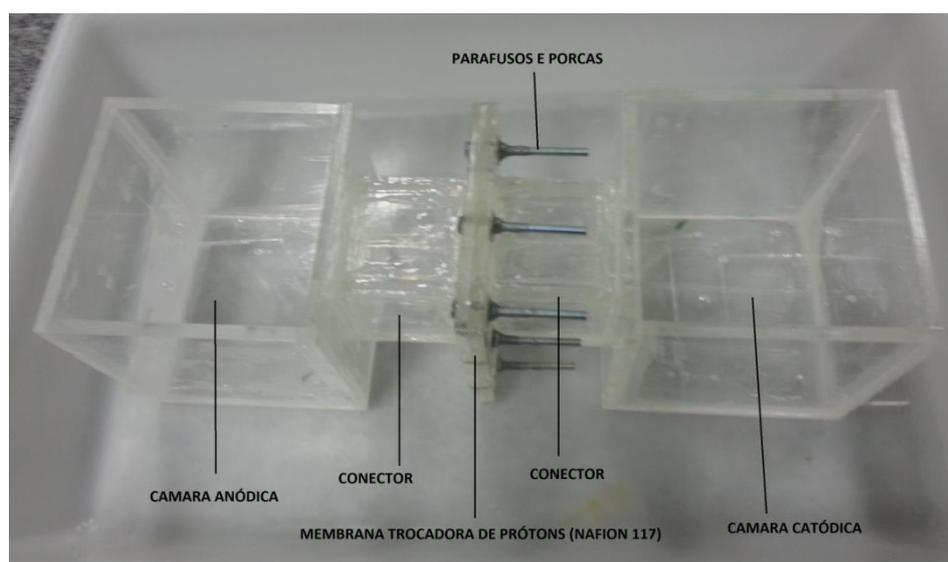


Figura 10. Vista superior da CCM com as câmaras anódica e catódica construída em acrílico.

A Figura 11 mostra a configuração dos eletrodos, amostradores, e dispersor de ar, enquanto a Figura 12 mostra o detalhe da membrana trocadora de prótons que foi colocada entre as câmaras.

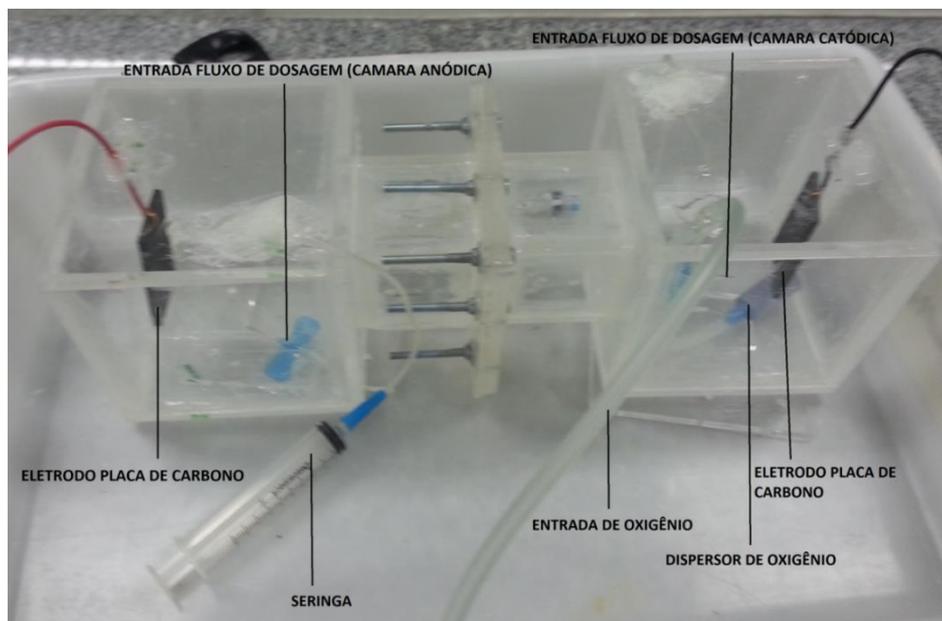


Figura 11. Vista frontal-superior da CCM construída em acrílico com a configuração de seus componentes.



Figura 12. Detalhe da membrana trocadora de prótons do tipo Nafion 117.

Na segunda configuração, duas CCMs idênticas de duas câmaras foram confeccionadas. Para isso foram utilizados potes plásticos de polipropileno herméticos (capacidade de 312 mL), sendo seu volume útil de 300 mL, os quais foram perfurados em uma lateral para serem ligados entre si com uma conexão tipo PVC de 40 mm de diâmetro (modelo curvar 45°, marca Tigre), em cuja junção foi fixada a uma membrana Nafion 117 (DuPont, EUA) (Figuras 13 e 14). Foi respeitada a distância entre os eletrodo e membrana como na célula de 1L, assim como sendo a área da membrana utilizada. Sendo adicionado por fim amostradores, difusores de ar e etc, seguindo a configuração da célula anterior.

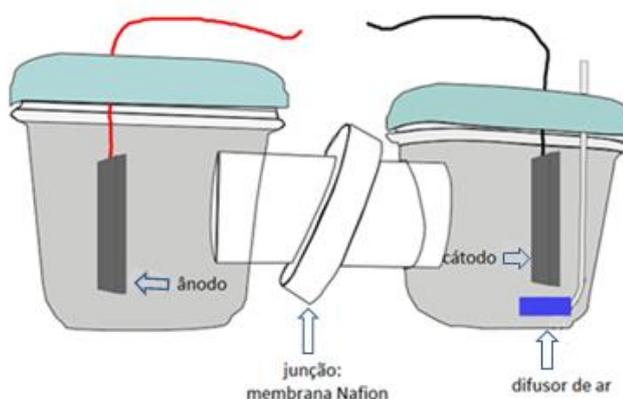


Figura 13. Configuração das CCMs construídas em polipropileno e PVC.
Fonte: Autoria própria.



Figura 14. Foto das duas CCMs construídas em polipropileno e PVC.
Fonte: Autoria própria.

Em ambas as configurações das CCMs foram utilizadas placas de grafite planas (Sisfix Sistemas de Fixação Ltda.) de dimensões 50 mm x 30 mm x 0,5 mm (comprimento x largura x espessura) conectadas por meio de um fio duplo de cobre (0,5 mm) a uma resistência externa. Cada placa de grafite totalizou uma área superficial de 38 cm². As câmaras catódicas de ambos os sistemas receberam aeração forçada por meio de um compressor de ar de aquário conectado à câmara por uma mangueira de silicone, seguida de um difusor de ar.

3.2 PREPARAÇÃO DO ELETRODO DE GRAFITE MODIFICADO POR ELETRODEPOSIÇÃO DE POLIPIRROL

Para o preparo dos eletrodos de grafite modificados pela eletrodeposição de polipirrol, o pirrol foi inicialmente purificado por destilação. Após, foi preparada uma solução aquosa contendo 0,5 mol/L de pirrol e 1,0 mol/L de KCl como eletrólito suporte e dopante do polipirrol foi preparada. O polímero condutor foi sintetizado no modo potenciostático, a 0,8 V, em célula de três eletrodos, por um tempo de 20 min, utilizando um Potenciostato/Galvanostato (modelo 273A, EG&G Princeton Applied Research, EUA).

O eletrodo de trabalho foi uma placa de grafite (50 mm x 30 mm x 0,5 mm), o eletrodo auxiliar foi outra placa de grafite de mesma dimensão e Ag/AgCl com KCl saturado foi utilizado como eletrodo de referência. Os eletrodos de trabalho e auxiliar foram posicionados paralelamente a uma distância de aproximadamente 30 mm e o maior lado do eletrodo de trabalho, que ficou de frente para o eletrodo auxiliar, foi trocado após 10 min de síntese para garantir uma maior homogeneidade da cobertura do filme eletrodepositado, (Figura 15). Após a síntese, o filme foi lavado com água destilada.

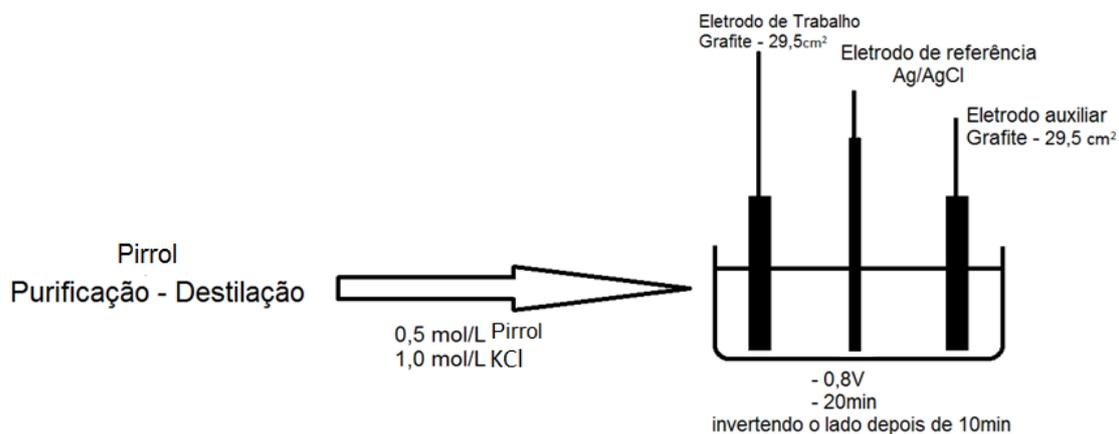


Figura 15. Esquema simplificado da modificação do eletrodo de grafite por eletrodeposição de polipirrol.

Os eletrodos de placa de grafite modificados pela eletrodeposição de polipirrol possuíram uma menor área (30 mm x 40 mm x 5 mm, área superficial de 29,5 cm²) em relação ao eletrodo de grafite puro, pois foi considerada apenas a área correspondente ao polipirrol aderido desconsiderando a parte que foi isolada. As conexões do eletrodo foram feitas com conectores do tipo “jacaré” acoplados diretamente nos eletrodos, que por sua vez foram fixados a uma fiação de cobre revestido devidamente isolado para evitar curtos ou perda de corrente.

3.3 CEPA DE *E. coli* UTILIZADA, MEIO DE CULTIVO E PREPARO DO INÓCULO

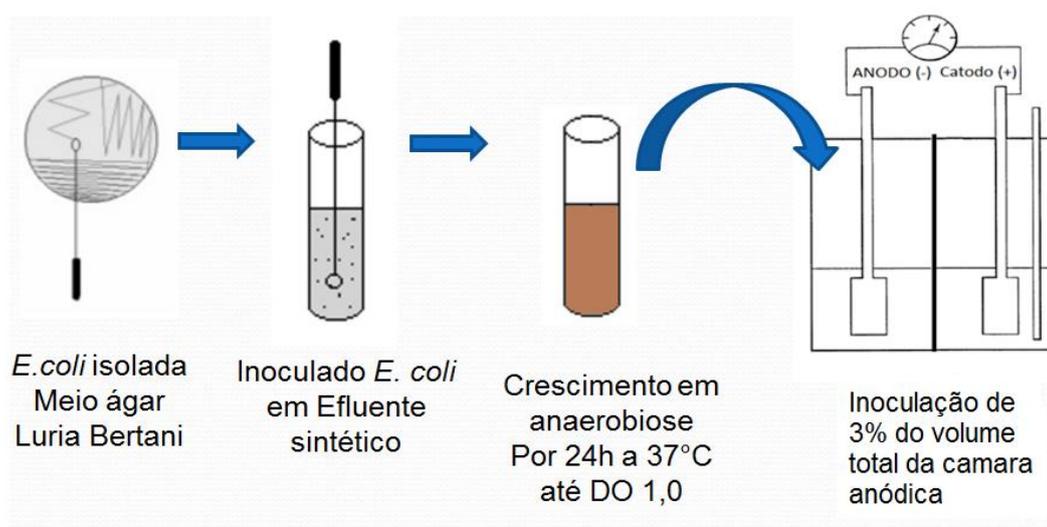
Foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* (ATCC 8739), nível de biossegurança 1, que foi mantida em placa de Petri contendo meio ágar Luria Bertani (10 g/L caseína, 5g/L extrato de levedura, 10 g/L cloreto de sódio, 15 g/L ágar bacteriológico) e conservada na temperatura de 4°C em refrigerador. Para os experimentos com as CCMs foi utilizado um meio sintético de efluente para *E. coli* (PARK; ZEIKUS, 2000; ZHANG et al., 2006-A; ZHANG et al., 2007) (Tabela 3). Após o ajuste do pH para 7,0, com NaOH 0,1M e H₂SO₄ 0,1M o meio foi autoclavado a 115°C por 15 minutos.

Tabela 3. Meio sintético de efluente utilizado para *E. coli* nas CCMs.

Ânodo	(g/L)
Glucose	10
Extrato de Levedura	5
NaH ₂ PO ₄	8,5
NaHCO ₃	10
Cátodo	(g/L)
NaH ₂ PO ₄	8,5
NaHCO ₃	10

Fonte: PARK; ZEIKUS, 2000; ZHANG et al. (2006-A); ZHANG et al. (2007)

Para o inóculo das CCMs uma única colônia isolada da placa de Petri foi inoculada em 50 mL de meio sintético de efluente. As bactérias cresceram sem agitação, em anaerobiose, e incubação a 37°C. Após a cultura atingir uma DO₆₀₀ de 1,0, 3% do volume total da câmara anódica foi utilizada como inóculo (PARK; ZEIKUS, 2000). Uma ilustração das etapas desse procedimento está mostrada na Figura 16.

**Figura 16. Procedimento de preparo do inóculo.**

3.4 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO, pH e AÇÚCARES REDUTORES

O crescimento da *E. coli* foi determinada pela medida de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro (DO_{600}) durante as diferentes fases de crescimento (PARK; ZEIKUS, 2000). Para avaliação do pH do meio de cultivo nas CCMs foi utilizado um pHmetro de bancada (Tecnoon mPA210). A glucose nas CCMs foi quantificada pelo método do DNS (Ácido 3,5-dinitro salicílico) de acordo com Miller (1959) utilizando para análise 3 mL das amostras. Uma curva padrão de quantificação foi realizada utilizando glucose (0,05 g/L a 10g/L). A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (540 nm) e os resultados foram expressos em grama de glucose por litro.

3.5 CONFIGURAÇÃO E MONITORAMENTO DO SISTEMA

O monitoramento da célula a combustível foi feito utilizando um multímetro *data logger* (marca True-RMS 46-Range Digital Multimeter, RadioShack, EUA) ligado em série entre os eletrodos (Figura 17). O multímetro foi conectado a um computador por uma conexão USB utilizando como interface programa fornecido pelo fabricante (Meter View, RadioShack) para aquisição e armazenamento dos dados em tempo real (cada 1 minuto). Os eletrodos localizados próximos ao centro de cada câmara são conectados a um resistor de 1000Ω (LOGAN, 2006).

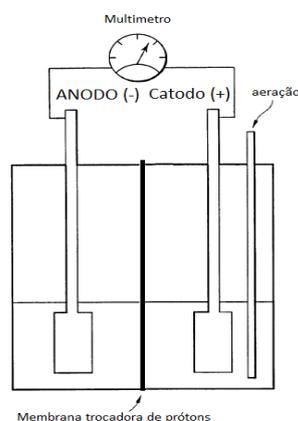


Figura 17. Esquema de ligação da CCM com o multímetro *data logger*.

A configuração da montagem experimental do sistema CCM-multímetro-computador está mostrada na Figura 18. Amostras das CCMs foram retiradas a cada 24h para análise. A CCM foi mantida em estufa bacteriológica a 37°C durante todo o período do experimento (3-5 dias).

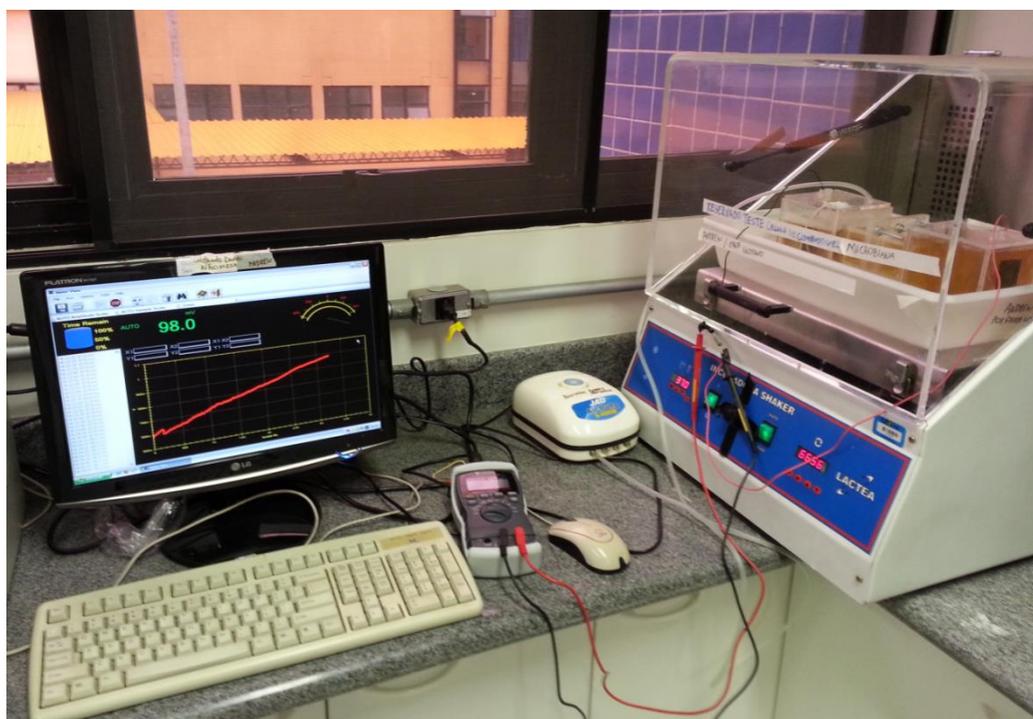


Figura 18. Configuração e monitoramento do sistema com a CCM.
Fonte: Autoria própria.

3.6 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Quando se analisa células a combustível, são necessários fatores para comparação, pois assim pode-se avaliar a eficiência de uma célula em relação a outra, a potência, corrente e tensão estão de acordo. Neste experimento foram medidos os seguintes parâmetros: diferença de potencial, corrente, densidade de potência em relação à área e densidade de potência em relação ao volume.

Através da lei de Ohm foi obtida a corrente e, utilizando a fórmula da potência, foi obtida a densidade de potência e a densidade de corrente das células. A curva de potência foi determinada pelo método de queda da polarização e o método do pico de densidade de potência (LOGAN, 2007). Os

dados obtidos com a diferença de potencial foram utilizados nas linhas de cálculos (equação 1 e 4). Segundo Du e colaboradores (2007), desde que o eletrólito e os eletrodos obedeçam à lei de Ohm, a perda ôhmica que ocorre na resistência pode ser devido ao fluxo dos elétrons para a resistência e em seguida para o eletrodo. Assim, tem-se a equação 1:

$$I = U \cdot R^{-1} = Q \cdot t^{-1} \quad (1)$$

Onde: I = corrente
 R = Resistência
 U = diferença de potencial
 Q = carga
 t = tempo

Segundo Logan (2007) a potência elétrica da célula pode ser medida pela relação da Corrente (A) com a diferença de potencial (V), dado na equação 2:

$$P = I \cdot U \quad (2)$$

Onde: P = Potência elétrica total

Sabe-se que apenas o conhecimento da potência elétrica do sistema não basta para descrever sua eficiência, sendo necessária, para isso uma referência. Se a área do ânodo em que se forma o biofilme for considerada, pode-se avaliar o quanto os microrganismos afetam na geração de energia. Segundo Logan (2007), a área superficial do eletrodo necessária para a formação de biofilme é importante para a energia gerada pelo sistema, pois quanto maior o número de microrganismos maior será o número de elétrons disponíveis na superfície do eletrodo. A potência normatizada pela área pode ser calculada como:

$$P = \frac{U^2}{A \cdot R_{ext}} \quad (3)$$

Onde: R_{ext} = Resistencia externa do sistema

A = Área do ânodo

No entanto nem todas as CCMs obedecem a esta forma de avaliação de potência (LARMINIE; DICKS, 2003). Uma forma técnica de avaliar a performance do sistema é em termos de reatores, considerando o volume em relação a potência gerada (RABAEY; VERSTRAETE, 2005; LOGAN, 2007). A potência normalizada pelo volume pode ser calculada como:

$$P = \frac{U^2}{V \cdot R_{ext}} \quad (4)$$

Onde: V = volume

Para as curvas polarizadas o valor medido de circuito aberto de uma CCM foi a tensão máxima que se pode atingir em um sistema, com as limitações impostas pelo tipo de microrganismo (LOGAN, 2007). Com a variação da resistência no circuito externo, tem-se a variação da diferença de potencial e corrente obtida, assim pode-se avaliar o melhor período de geração de energia do sistema (MAHADEVAN *et al*, 2014). A partir da curva polarizada é possível retirar dados relevantes para o sistema, como a potência máxima do sistema, assim como sua corrente máxima e, finalmente, a sua resistência interna. A figura 19 demonstra o método empregado para obtenção dos dados da curva polarizada, onde a variação da resistência externa, desenvolve uma determinada diferença de potencial que determina uma nova corrente.

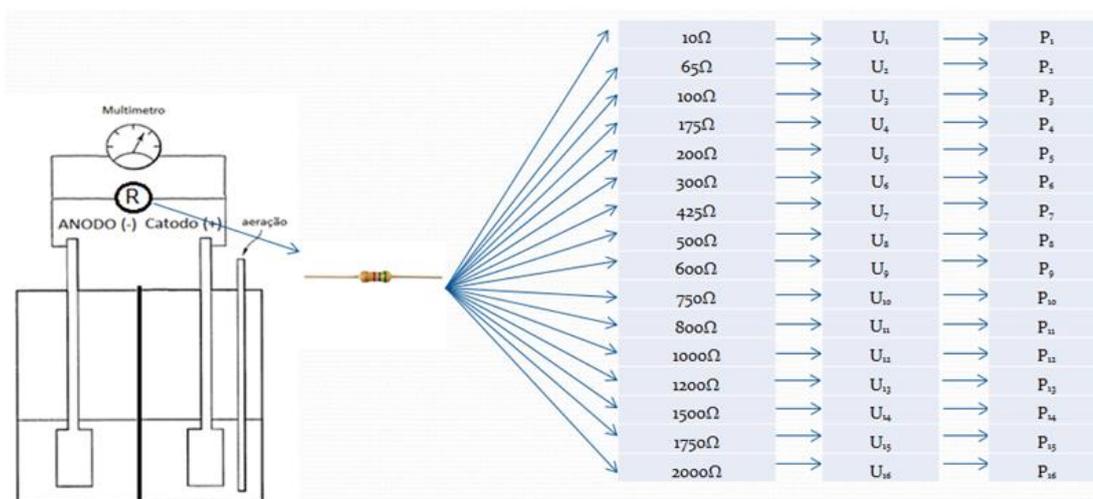


Figura 19. Determinação da curva de polarização da CCM.

O principal objetivo da CCM é gerar energia extraindo ao máximo elétrons armazenados na biomassa. Como dito anteriormente a CCM gera energia através da oxidação de matéria orgânica biodegradável na presença de biocatalizadores como o processo fermentativo de bactérias (DEVASAHAYAN; MASIH, 2012). Os elétrons extraídos da matéria orgânica e levados ao sistema é conhecida como eficiência Coulombica, definida em termos de porcentagem de elétrons pela quantidade de matéria orgânica (LOGAN, 2006). A transferência de elétrons para o sistema ou corrente elétrica é definida pela transferência de Coulomb por segundo. Assim se integrado pode-se obter o valor total de Coulombs transferidos para o sistema.

$$E_c = \frac{M \int_0^t I dt}{F b_{es} v_{an} \Delta_c} \quad (5)$$

Onde:

M = Massa molecular do substrato

F = Constante de Faraday

b_{es} = Numero de elétrons capturados por molécula de oxigênio

v_{an} = Volume do liquido no ânodo

Δ_c = Variação da concentração do substrato (massa)

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens da superfície dos eletrodos obtidas por MEV foram realizadas na UTFPR com equipamento marca Zeiss, modelo EVO-MA15. Para o preparo das amostras foi utilizado um eletrodo de grafite contendo polipirrol recoberto sem biofilme, e um eletrodo de grafite recoberto com polipirrol retirado de uma CCM após 5 dias de experimento. Fragmentos da superfície de ambos eletrodos foram retirados com a ponta de um bisturi. Em seguida, cada fragmento de eletrodo (com e sem biofilme bacteriano) foi colocado separadamente em Eppendorf de 2 mL e lavado 3 vezes durante 10 minutos com um volume aproximado de 2 mL tampão fosfato 0,05 N a pH 7,4. Após remoção do sobrenadante, as amostras foram fixadas com uma solução de

glutaraldeído a 3% em tampão fosfato durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas empregando soluções de etanol de distintas concentrações e durante diferentes tempos: a 30% durante 15 min, a 50% durante 30 min, a 70% por 24 horas e a 100 % 3 vezes durante 30 min. Os fragmentos de eletrodo foram então colocados sobre porta amostras (especiais para o microscópio) (KUNKEL, 2008). Foi necessário fazer recobrimento com ouro, com camada estimada de 20 μm . Este procedimento permite melhorar ainda mais condução dos elétrons que são projetados pelo microscópio eletrônico por varredura e, também aumentar a dissipação de calor das amostras, que tendem a aquecer muito durante o procedimento. O recobrimento, com tempo de deposição de 30s foi realizado em evaporadora modelo Q150R ES, marca Quorum.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos desse trabalho foram divididos em duas etapas. A primeira etapa corresponde aos experimentos com as CCMs com eletrodos de grafite. A segunda etapa corresponde às CCMs com eletrodos de grafite modificados pela eletrodeposição de polipirrol, seguido por um estudo comparativo dos resultados obtidos com os dois tipos de eletrodos. No total foram realizados 21 experimentos com as CCMs, sendo que alguns serviram para ajuste testes iniciais e monitoramentos, outros foram testes efetivos com suas respectivas análises.

Com relação à construção da primeira CCM foi verificado que o uso do acrílico como material conferiu resistência mecânica ao sistema para que tivesse um maior tempo de vida. Por ser translúcido permitiu uma boa visualização além da fácil higienização por apresentar uma superfície lisa. Devido ao seu maior tamanho (1 L cada câmara) permitiu que houvesse uma melhor separação dos seus componentes, evitando assim problemas comuns como a perda de área ativa pela disposição do eletrodo. Os problemas iniciais de vazamento foram resolvidos com a elaboração e aplicação de um polímero termoplástico desenvolvido na empresa HM Rubber Ltda, que foi aplicado cuidadosamente em todas as junções das placas de acrílico conferindo resistência e vedação. A Figura 20 mostra a CCM feita em acrílico em operação durante um experimento com eletrodos de grafite. Na segunda CCM de 0,3L, foram utilizados todos os conceitos da primeira célula, as vedações foram substituídas por anéis de borracha no interior da junção das células, o volume menor possibilitou testes de células simultâneas, assim com o ganho de tempo e espaço.



Figura 20. CCM construída em acrílico em operação durante um dos experimentos

4.1 ELETRODO PLANO DE GRAFITE – ETAPA 1

A Fase 1 do experimento se baseou no trabalho com o eletrodo plano de grafite, sem o uso de catalisadores ou mediadores. Sendo usado tanto na célula de 1L e 0,3L. O gráfico representado na Figura 21 apresentou valores de potencial chegando a 61mV. O experimento inicial da CCM utilizando *E. coli* e com a configuração utilizada se mostrou interessante, pois a bactéria caracterizada como exoeletrogênica com auxílio de mediadores (LOGAN, 2006; RABAEY et al., 2005), podendo não estar conseguindo transportar o elétrons do biofilme na superfície do eletrodo para o mesmo sem o auxílio de mediadores. Uma das causas possíveis para a transferência de elétrons seria a composição do meio de cultivo que possui extrato de levedura, neste meio estão presentes mediadores conhecidos como por exemplo flavinas, conjunto de compostos orgânicos baseado na pteridina, formado pelo anel orgânico heteronuclear tricíclico isoaloxazina (LOGAN, 2012). A partir de 3000min pode-se verificar um aumento na tensão gerada pelo sistema (Figuras 21 e 22).

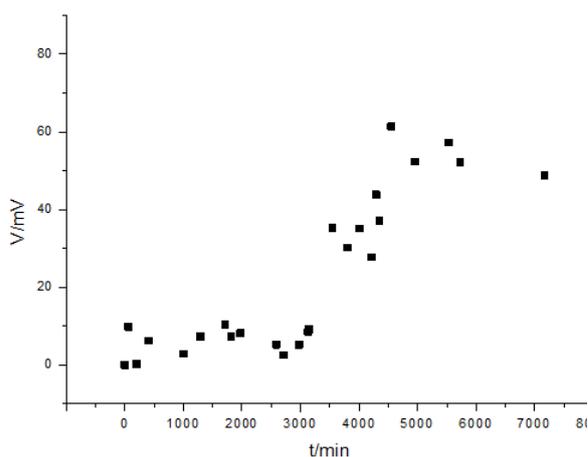


Figura 21. Diferença de potencial obtida no decorrer do tempo em CCM com eletrodo de grafite.

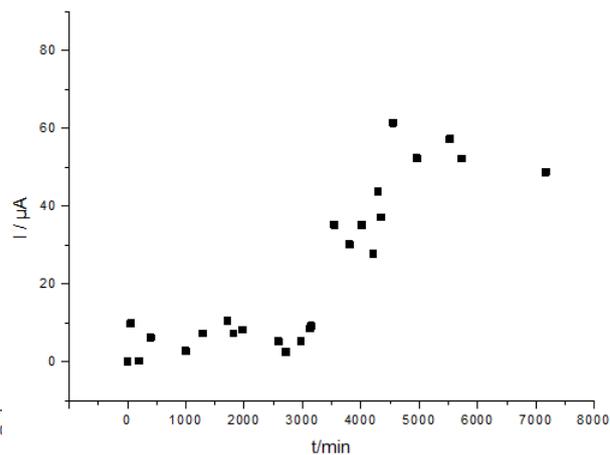


Figura 22. Corrente calculada no decorrer do tempo em CCM com eletrodo de grafite.

Zhang e colaboradores (2007) verificou este mesmo aumento com *E. coli* sugerindo que a bactéria estaria de alguma forma gerando seus próprios mediadores. Neste ponto é importante observar que o sistema é em batelada, não recebendo nutrientes continuamente e com isso a quantidade de mediadores pode se acumular no decorrer do tempo.

De acordo com a Figura 23, que diz respeito à geração de energia elétrica pelo sistema (pontos quadrados), a CCM obteve densidade de potência do sistema variando entre 0,5 a $15 \text{mW} \cdot \text{m}^{-2}$. Esse resultado teve relação com o trabalho de Rahimnejad e colaboradores (2013), que conseguiram um valor de $5 \text{mV} \cdot \text{m}^{-2}$, em um comparativo do uso ou não de diversos mediadores presentes no meio de cultivo.

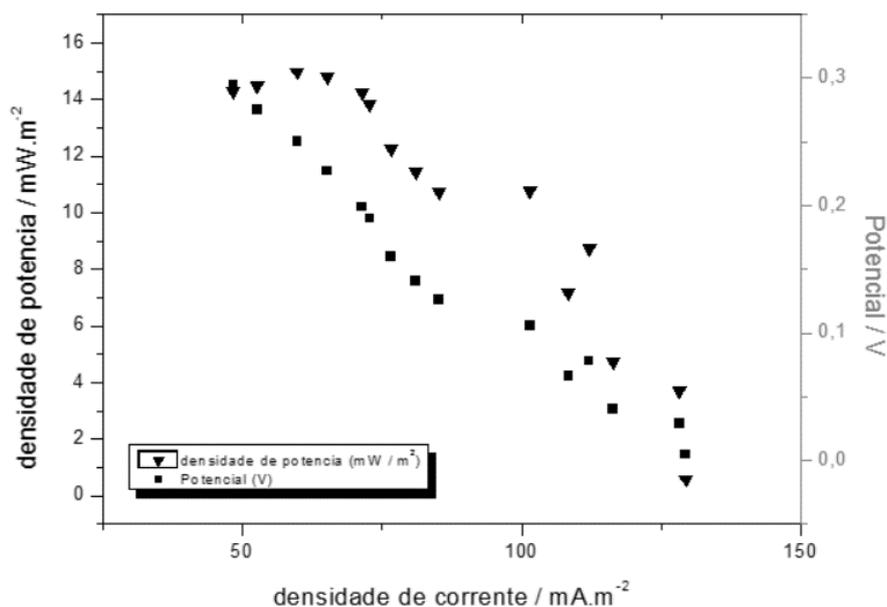


Figura 23. Curva de potência (quadrados) e curva de polarização (triângulo invertido) no eletrodo de grafite plano.

A obtenção da curva de polarização é de grande importância para o sistema CCM pois, através dela se pode fazer o estudo da potência máxima gerada pelo sistema (LOGAN, 2007) e também verificar a corrente limite do sistema (WANG et al., 2010). De acordo com o método do pico de densidades de potência, se a resistência externa do circuito for trocada, obtém-se uma resposta no potencial, quando esta variação (troca de resistências) é realizada em intervalos regulares. Desta forma é possível verificar o desenvolvimento do potencial e da corrente do sistema em cada resistência, escolhendo o intervalo de resistência mais apropriado no qual a produção de energia seja maior e, portanto, mais interessante (LOGAN, 2007). Com a resistência externa mais próxima à interna tem-se um melhor desempenho do sistema. Com o aumento da resistência, a corrente se torna pequena e diminui a taxa de transferência de elétrons para o ânodo, conduzindo a menor geração de energia nos microrganismos exoeletrogênicos e, conseqüentemente, reduzindo sua taxa de crescimento (KATURI et al, 2011).

O ponto de equilíbrio foi verificado quando o desenvolvimento do potencial na célula se estabilizou, não havendo variações maiores que 2 mV. O tempo escolhido foi o de 96 h (ou 5760 min). A resistência interna foi determinada pela redução linear da inclinação da curva. Uma vez encontrado o

ponto de estabilização foi determinada a melhor curva (potencial x corrente), conforme indicado na Figura 24.

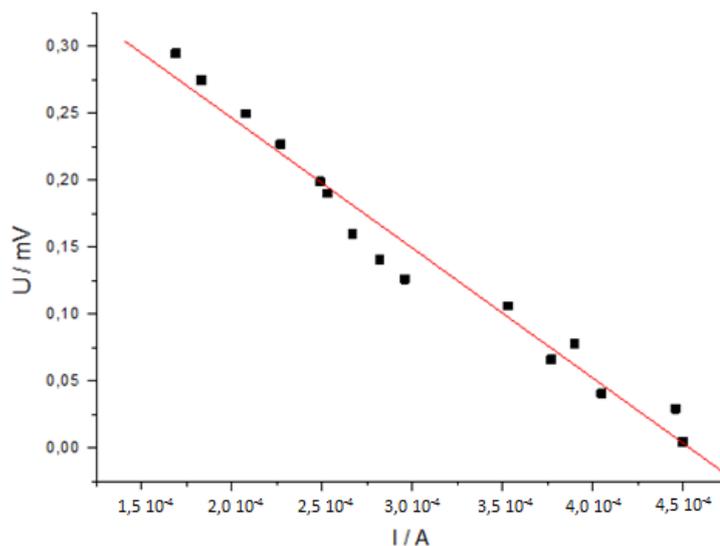


Figura 24. Determinação da curva potencial x corrente em eletrodo de grafite.

A derivação da curva de potência com a resistência interna é outra forma para se determinar a resistência interna, na qual pode ser verificado o ponto máximo da curva durante a estabilização da célula. Com isso a resistência interna foi de aproximadamente 1200Ω , como apresentado na Figura 25.

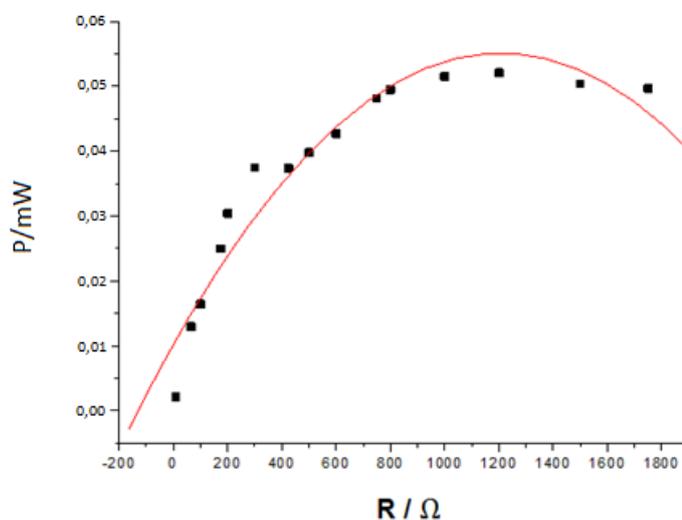


Figura 25. Determinação da resistência interna em eletrodo de grafite.

4.2 ELETRODO PLANO DE GRAFITE COM POLIPIRROL – ETAPA 2

Na ETAPA 2 do trabalho, os mesmos procedimentos foram realizados na ETAPA 1 utilizando no lugar do eletrodo de grafite o eletrodo de grafite modificado com polipirrol. Os gráficos representados nas Figuras 26 e 27 apresentaram dados com valores de potência e corrente mais uniformes.

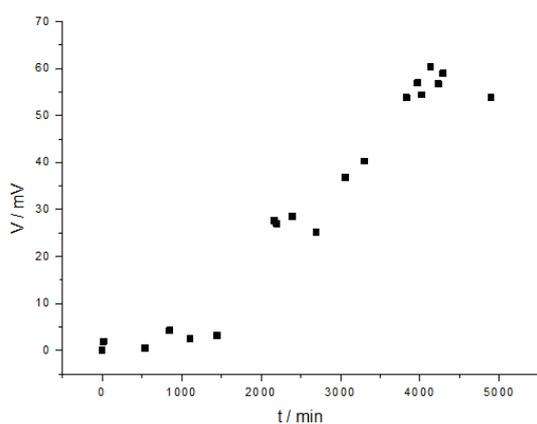


Figura 26. Diferença de potencial obtida no decorrer do tempo em CCM com eletrodo de grafite com polipirrol.

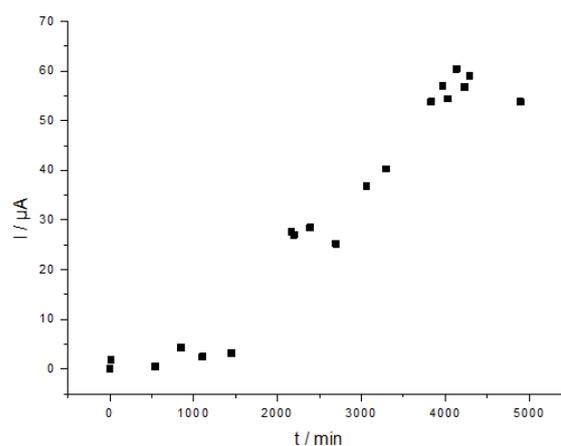


Figura 27. Corrente obtida no decorrer do tempo em CCM com eletrodo de grafite.

Segundo estudo de Zou e colaboradores (2008) o uso de eletrodo de grafite no ânodo afeta o potencial podendo causar instabilidade; contudo, quando o polipirrol foi utilizado os autores obtiveram maior estabilidade nos dados da mesma forma como foi observado nesse trabalho.

O polipirrol está associado com a biocompatibilidade e boa condutividade (CORDEIRO et al., 2015), unido a área superficial permite às bactérias um ambiente favorável para que formem biofilme na superfície do eletrodo (Yuan; Kim, 2008). A CCM com polipirrol obteve o desenvolvimento da geração de potência e corrente em um intervalo menor que o eletrodo sem polipirrol, indicando a possibilidade de desenvolvimento microbiano e formação de biofilme. No tempo 2000 min, enquanto a CCM com somente grafite começou a se desenvolver a partir de 3000 min.

Com relação ao potencial máximo obtido foi verificado 63 mV com a resistência de 1000Ω no decorrer de 5 dias, um valor maior que da célula de

grafite (61 mV). A densidade de potência no eletrodo com polipirrol ficou entre 9,0 e 20 $\text{mW}\cdot\text{m}^{-2}$, faixa mais elevada que aquela obtida somente com o grafite, como demonstrado na figura 28.

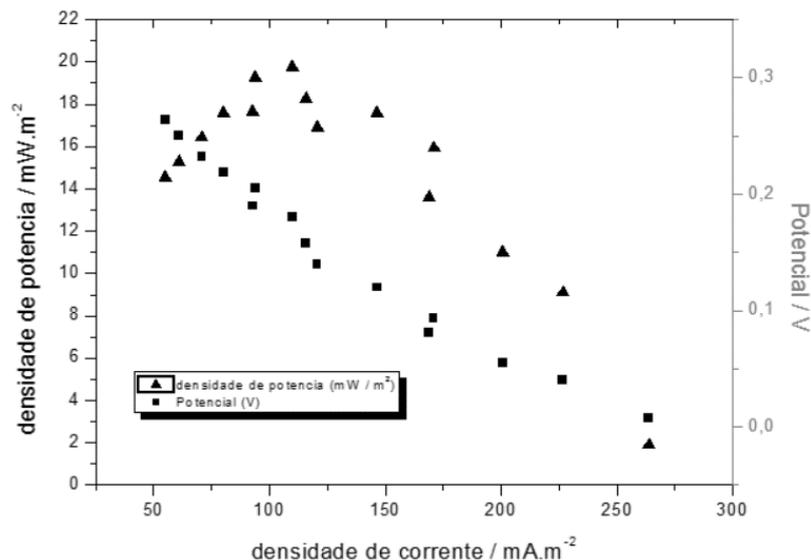


Figura 28. Curva de potência (quadrados) e curva de polarização (triângulos) no eletrodo de grafite com polipirrol.

Na sequência foi possível determinar a resistência interna pelo cálculo da regressão linear da melhor curva do potencial por corrente, no momento da estabilização da célula neste caso 96h (Figura 29).

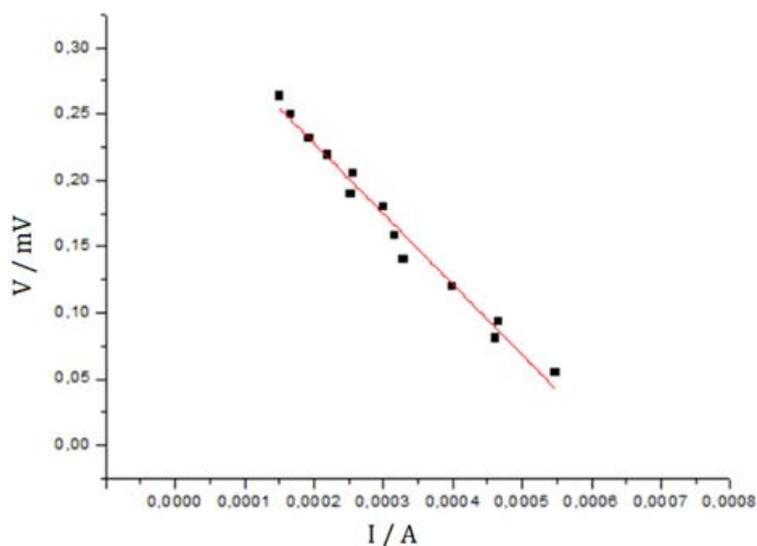


Figura 29. Determinação da curva potencial x corrente em eletrodo de grafite com polipirrol.

A Derivação da curva de potência x resistência externa foi analisada a fim de se verificar a melhor resistência. Durante a estabilização da célula foi obtido um valor de 530Ω , como mostrado na Figura 30.

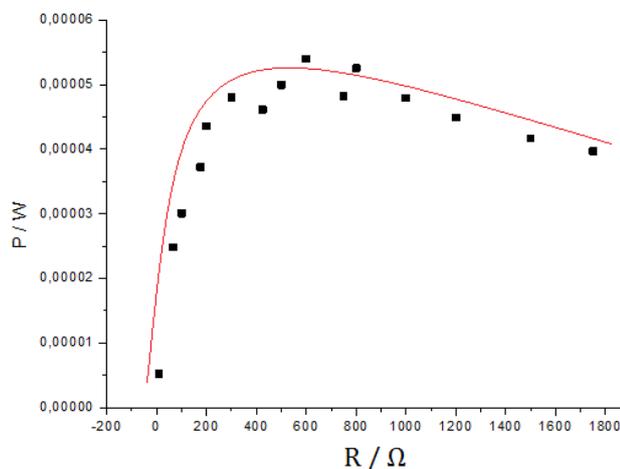


Figura 30. Determinação da resistência interna (potência x resistência) em eletrodo de grafite com polipirrol.

Assim, baseado na Lei de ohm, pode-se verificar uma diminuição na resistência interna e externa e por consequência um aumento da energia efetiva gerada pela CCM.

4.3 AVALIAÇÃO DO pH NAS CCMs

O pH do eletrólito é um importante fator para o desenvolvimento de uma CCM. Geralmente o microrganismo necessita de uma faixa restrita de pH para seu crescimento ótimo. É bem conhecido que a *E. coli* produz durante a fermentação anaeróbia diversos compostos ácidos tais como ácido acético, ácido lático, ácido fórmico dentre outros, resultando em um decréscimo acentuado do pH que poderia inibir o desenvolvimento bacteriano e ao mesmo tempo impactar negativamente na sua geração de energia, além de aumentar da resistência interna do sistema (HE *et al*, 2008). Puig e colaboradores (2010), observaram que a potência do sistema caiu consideravelmente quando o pH final reduziu para 5,2, sendo necessário equilibrar novamente o pH para um valor próximo 7,0 (ideal) para microrganismos neutrófilos.

O comportamento observado nas CCMs testadas, tanto para o eletrodo de grafite quanto para o eletrodo de grafite com polipirrol, foi bastante semelhante. No preparo do meio de cultivo o pH foi sempre pré-ajustado para 7,0 (neutro). Após a inoculação da *E. coli* na CCM foi verificado que o pH sempre diminuía para valores entre 5,9 a 6,3. Após 40h de corrida, a tendência do pH das CCMs foi de aumentar voltando a valores próximos à neutralidade, na faixa de 6,8-7,0 a partir das 160h (Figura 31). Segundo He e colaboradores (2008), quando o pH do eletrólito decresce para valores abaixo de 7,0, após 24 ou 48h o pH tende a se equilibrar novamente voltando a valores próximos à neutralidade. Fan; Ho e Liu (2007) demonstraram que o papel do bicarbonato como composto tamponante para o sistema, auxiliado pela própria membrana trocadora de prótons consegue manter o fluxo constante de prótons gerados para o outro lado da câmara para neutralização no cátodo.

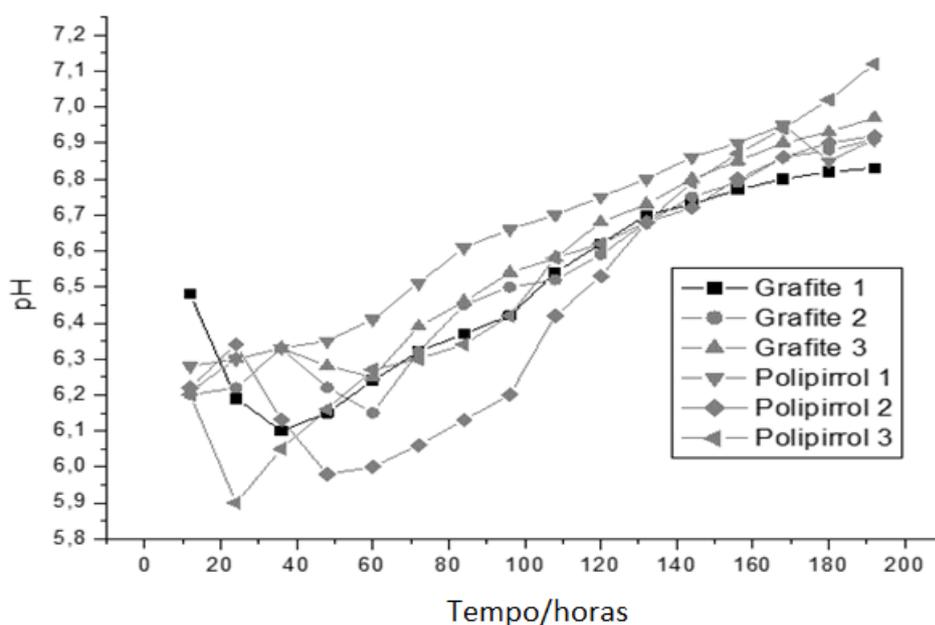


Figura 31. Perfil do pH ao longo do tempo nas CCMs com eletrodo de grafite e polipirrol (triplicatas).

O pH do sistema também é um indicativo do funcionamento adequado da membrana trocadora de prótons, no caso desse trabalho a membrana do tipo Nafion. Os prótons devem ser conduzidos através da membrana à câmara

cátodica para entrarem em contato com a superfície do cátodo. Caso o pH diminua de forma constante no ânodo certamente um desequilíbrio da atividade microbiana pode ocorrer comprometendo assim a eficiência da CCM.

4.4 AVALIAÇÃO DA CONSUMO DE GLUCOSE, DENSIDADE OTICA E EFICIÊNCIA COULOMBICA

A eficiência coulombica da CCM se baseia na energia recuperada pelo sistema com relação a energia inicial no sistema (LOGAN, 2006). Foi possível verificar que a glucose foi consumida rapidamente nas primeiras 24h, passando de 10 g/L no tempo zero a 0,1-0,2 g/L após 24h (Figura 34).

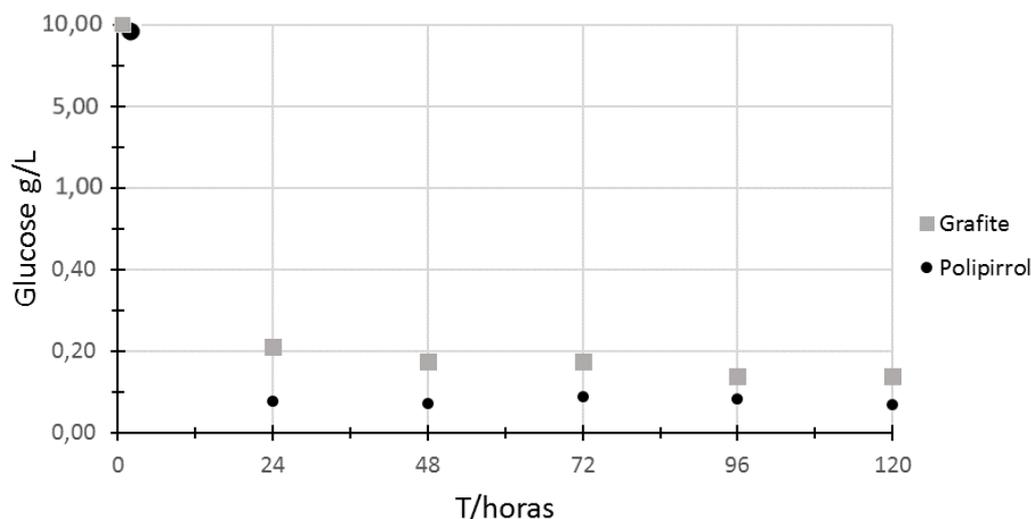


Figura 32. Consumo de glucose durante 120h em CCM com eletrodo de grafite e grafite com polipirrol.

Esse consumo inicial pode estar relacionado ao acelerado crescimento da *E. coli* no meio de cultivo sob condições anaeróbias nas 24h iniciais do lançamento da CCM. Depois da rápida multiplicação das células foi mantido um nível basal de glucose (0,2 – 0,1 g/L) durante os 5 dias do experimento, no qual as células microbianas estão consumindo o mínimo possível de carbono para a manutenção básica de suas necessidades. Possibilidade de apenas as bactérias aderidas sobre a superfície do eletrodo manterem o consumo de

glucose, assim a diferença de consumo em relação ao volume total se torna pequeno, justificando os níveis baixos de glucose

Park e Zeikus (2000) examinaram o impacto da geração de energia de CCMs nas propriedades fisiológicas de *E. coli*. Segundo esse estudo, a glucose consumida é elevada nas células em multiplicação, assim como a geração elétrica. Contudo, quando as células microbianas passam para estado mais estático a tendência é a diminuição do consumo de glucose utilizado apenas para a geração elétrica e apenas para aquelas que estão na superfície do eletrodo. Tal observação vai de acordo com os resultados obtidos com uma análise da DO_{600} medida no período de 24h (Figura 35). Conforme observado o crescimento bacteriano ocorre justamente até as primeiras 25h do lançamento da célula (1.500 min) no caso do polipirrol chegando a DO_{600} de 1,33. A partir desse momento a DO_{600} no meio abaixa no decorrer do tempo atingindo o valor de 0,7 após 5 dias. A diminuição da DO é justificada pela lise das células no volume da célula microbiana, contudo a geração esta considerando apenas as bactérias na superfície do eletrodo, com isso, apesar da diminuição da DO, as bactérias contidas na superfície do eletrodo podem estar ativas sem sofrer a lise.

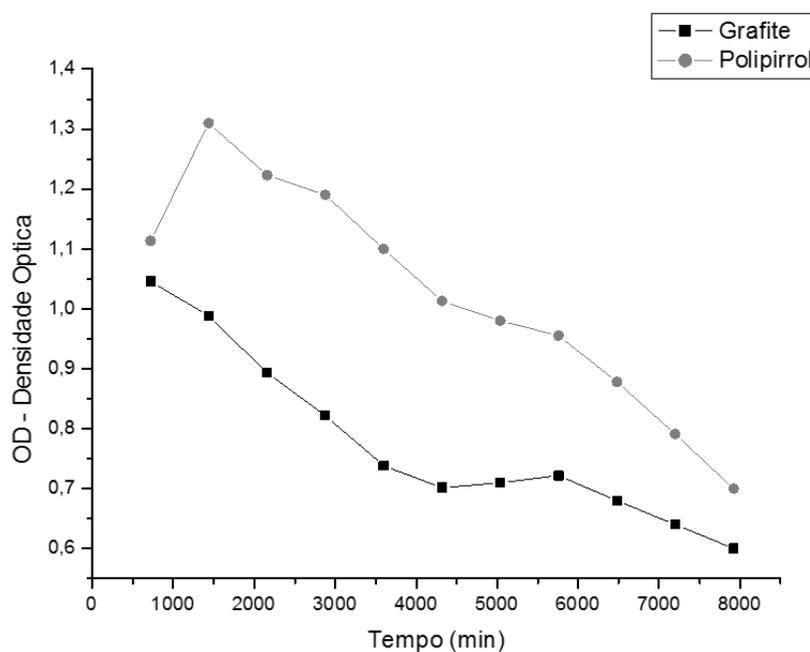


Figura 33. Variação da DO_{600} no meio de cultivo do ânodo no decorrer de 5 dias.

No eletrodo de grafite o crescimento foi menor atingindo uma DO_{600} de 1,05 no tempo de 16h (~1000 min). Da mesma forma foi verificado uma queda na DO_{600} que se manteve durante os 5 dias do experimento. Zhang e colaboradores relacionam o consumo de glucose da *E. coli* com o processo de oxidação desta na ausência de mediadores externos, se mantêm com um rendimento baixo apesar da alta taxa de degradação do substrato, mantendo o potencial anódico com uma baixa polarização. Convém porem ressaltar que a DO não avalia o desenvolvimento do biofilme aderido sobre o eletrodo, apenas o desenvolvimento de microrganismo no meio de cultivo, ou a glucose consumida no mesmo.

Logan (2006) cita que o rendimento das CCMs varia entre 2% a 50% com mediadores químicos. Zhang e colaboradores (2006) tiveram um aumento do rendimento de 24% para 36% utilizando no ânodo um composto de grafite com politetrafluoretileno (PTFE). Neste trabalho, a eficiência coulombica para 120h, ou seja, a quantidade de elétrons recuperada pelo sistema para geração de energia para as células de grafite foi de 7,31% e de grafite modificado pela eletrodeposição de polipirrol de 17,18%, o que representa um ganho de eficiência representativo.

4.5 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE POTÊNCIA RELACIONANDO COM A ÁREA

Em um experimento de duas CCMs de 300 mL analisadas em paralelo e mantendo a mesma distância entre os eletrodos e a membrana foi possível observar efeitos diferentes na densidade de potência na CCM com eletrodo de grafite e eletrodo de grafite com polipirrol (Figura 36).



Figura 34. Experimento com CCM de 300 ml

Conforme observado na Figura 37, quando comparado o polipirrol em um volume de 0,3L, observa-se um melhor desempenho, principalmente a partir do tempo 2000min, quando as densidades de potência das células com polipirrol apresentam valores superiores a $0,2 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$, enquanto os eletrodos de grafite $0,1 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$. Esta diferença é observada devido a diferença do potencial desenvolvido pelas células com polipirrol daquelas que não apresentam, este efeito pode ser considerado pela significativo crescimento microbiano na superfície do polipirrol em relação ao grafite plano. Segundo Zou e colaboradores (2008), sem mediadores externos a transferência de elétrons se mantém através do contato com o eletrodo por meio da proteína de redox delimitada na membrana com os citocromos, ou compostos secretados pela bactéria. Neste sentido, a biocompatibilidade pode facilitar o contato das bactérias com o polipirrol.

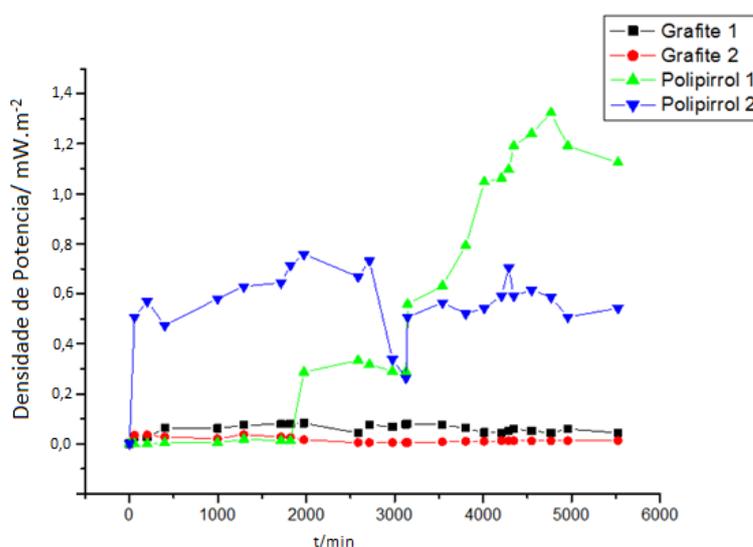


Figura 35. Densidade de potência no decorrer do tempo com CCMs com eletrodo de grafite e grafite com polipirrol – relação de volume pela área do eletrodo.

Yuan e Kim (2008), comentaram sobre a possibilidade do próprio polipirrol agir como mediador, quando a cadeia de polipirrol penetra a membrana celular e é capaz conduzir elétrons diretamente para o eletrodo.

4.6 RELAÇÃO DA DENSIDADE DE POTÊNCIA PELO VOLUME DA CCM

Segundo Singh e colaboradores (2010), algumas performances não podem ser avaliadas apenas pela área, pois determinadas a área do eletrodo não podem ser mensuradas (como eletrodos de escovas de carbono) ou alguns designs não permitem que a área superficial seja verificada, neste caso a comparação de células de combustível pode ser utilizada outra forma de avaliação de densidade de potência, ao invés de avaliar somente a área do eletrodo, avalia-se o tamanho do reator (volume da célula) pela potência gerada.

Com isso, todas as CCMs anteriormente citadas (CCM com eletrodo de grafite nos volumes de 1 L e 300 mL e CCM com eletrodo de grafite com polipirrol nos volumes de 1 L e 300 mL) foram utilizadas para análise da densidade de potência (Figura 38)

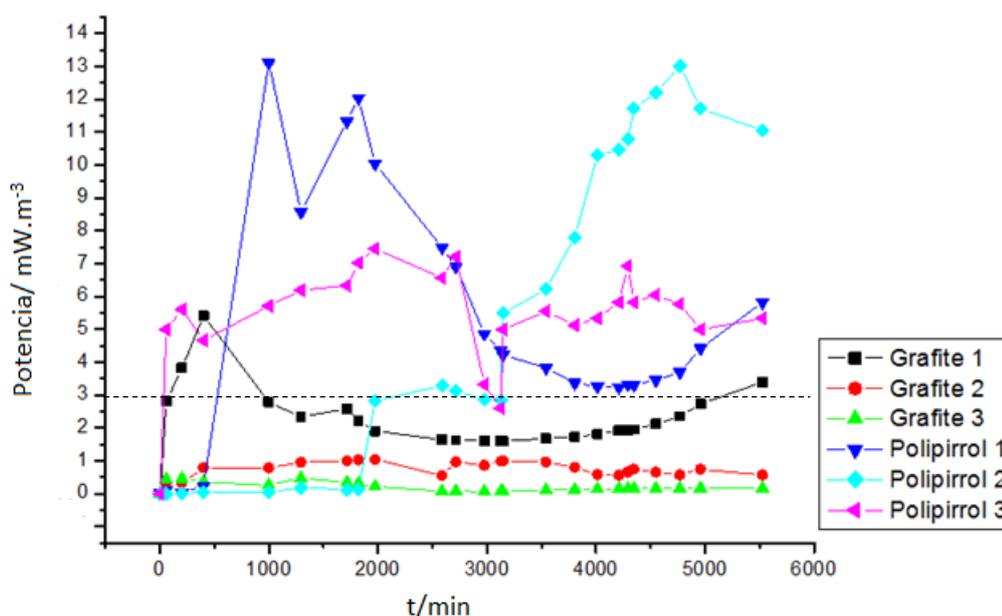


Figura 36. Densidade de potência considerando o volume da CCM no decorrer do tempo.

**Grafite 1: CCM de 1L; Grafite 2 e 3: duplicata CCM de 300 mL;
 Polipirrol 1: CCM de 1L; Polipirrol 2 e 3: CCM de 300 mL**

Quando são relacionadas todas as células em apenas um gráfico pode-se verificar a diferença de potência das células com polipirrol e aquelas que não possuem, se traçar uma linha dividindo o gráfico aproximadamente em

$3\text{mW}\cdot\text{m}^{-3}$ (linha tracejada na figura 38), pode-se verificar que em grande parte as células de grafite se mantêm abaixo da linha tracejada e as células com eletrodo de grafite com polipirrol eletroquimicamente aderido estão acima desta linha. No tempo de 1000 a 2000 min, provavelmente durante a fase de crescimento bacteriano logarítmico, em geral as células de polipirrol demonstram melhor desempenho. Jiang e Li (2009) citam que o polipirrol, além de aumentar a área superficial, aumenta a polaridade da superfície do ânodo aumentando a atração entre a bactéria e eletrodo, aumentando assim sua adesão.

4.7 MORFOLOGIA DO ELETRODO COM POLIPIRROL

O MEV foi realizado utilizando fragmentos da superfície do eletrodo de grafite com polipirrol em duas situações: a) sem biofilme e b) após cinco dias de experimento com *E. coli*. Nas micrografias do polipirrol encapsulando no eletrodo (situação a) foi verificada a formação de nódulos, sendo esta característica nodular típica de filmes formados em meio aquoso (Figura 39).

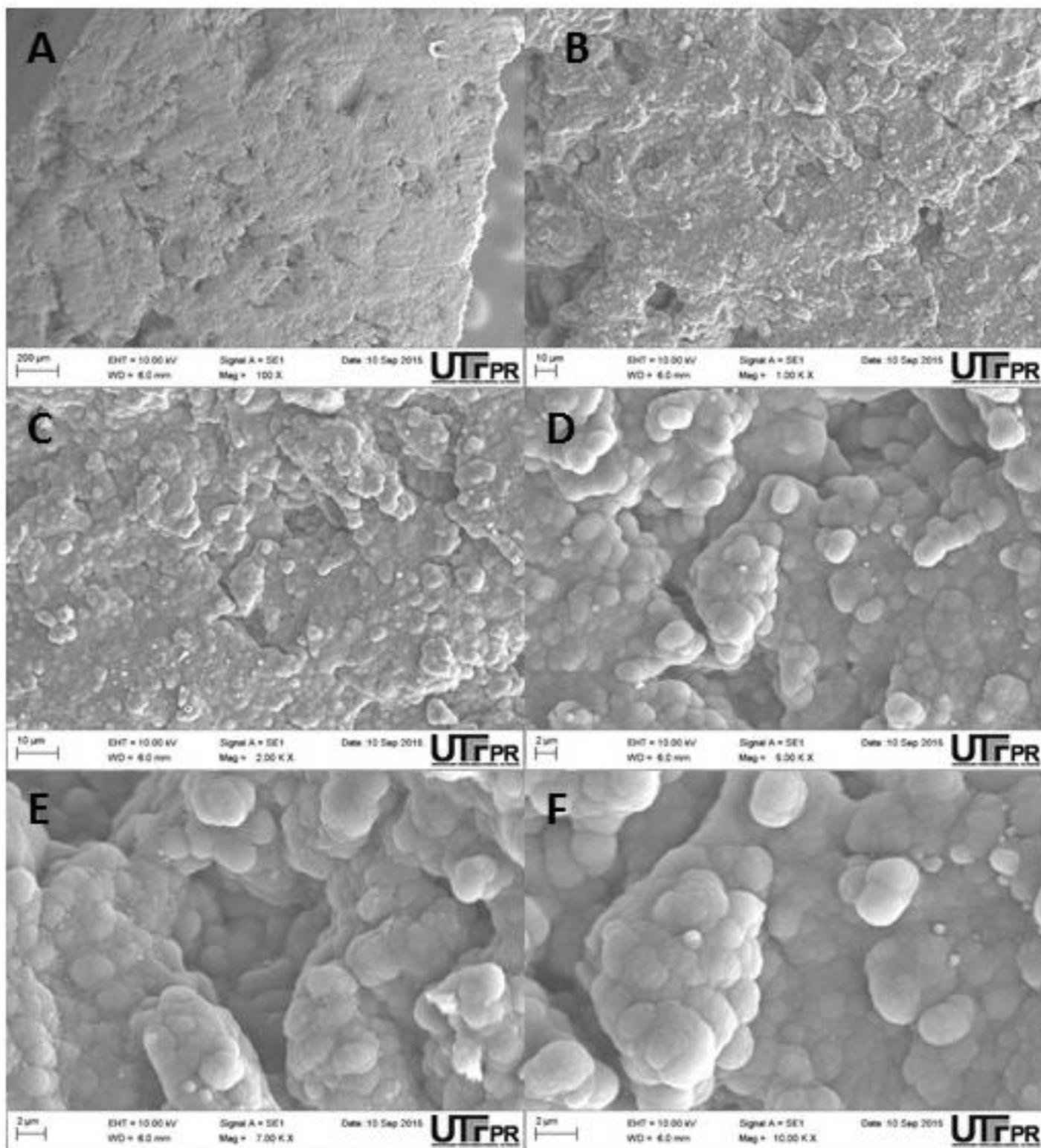


Figura 37. MEV da superfície do eletrodo de grafite recoberto com polipirrol. Aumento 100x (A), 1000x (B), 2000x (C), 5000x (D), 7000x (E) e 10000x (F).

Segundo Bello (2002) e Basavajara (2009), verificaram a formação de nódulos os quais identifica como nanoesferas presentes na superfície do substrato do ânodo. A morfologia globular é toda a superfície de material característica intrínseca de revestimentos de polipirrol se destacando por toda a matriz polimérica (MONTROYA *et al*, 2012). Esta mesma morfologia já foi observada em outros trabalhos (BASAVAJARA *et al*, 2009; ZOU *et al.*, 2008; GODWIN *et al*, 2012).

Numa segunda etapa com o MEV foram analisados fragmentos da superfície do eletrodo de grafite com polipirrol obtidos após 5 dias de experimento de uma CCM com *E. coli*. O termo biofilme diz respeito à formação de uma comunidade de microrganismos aderida sobre uma superfície (biótica ou abiótica) em meio líquido, no qual uma matriz polimérica primariamente de polissacarídeos está presente (SCHECHTER *et al*, 2014; CORDEIRO *et al.*, 2015). O biofilme é rico em proteínas adesivas que auxiliam a junção de células de forma irreversível como o transporte de nutrientes entre os componentes do biofilme. O crescimento do biofilme na superfície do eletrodo é conhecido como biofilme anódico (SUN *et al.*, 2015). O desenvolvimento de biofilmes sobre a superfície do ânodo afeta a condutividade e a difusão dos substratos e seus produtos finais (SUN *et al.*, 2015). Diferentes características podem ser verificadas com a formação de biofilmes, como a diminuição da resistência interna (RAMASAMY *et al.*, 2008; BARANITHARAN *et al.*, 2014) o que pode reduzir a resistência externa, verificado nas curvas de polarização, aumento do potencial, devido ao aumento da área superficial efetiva do eletrodo (BARANITHARAN *et al.*, 2014).

Nas fotomicrografias foi possível observar as bactérias aderidas em uma matriz polimérica recobrando toda a superfície do eletrodo (Figura 40). A morfologia do biofilme de *E. coli* na superfície do ânodo apresentou as células formando uma camada espessa em toda a superfície. Foi possível observar o desenvolvimento do biofilme inclusive nas reentrâncias criadas pelo polipirrol (Figura 40).

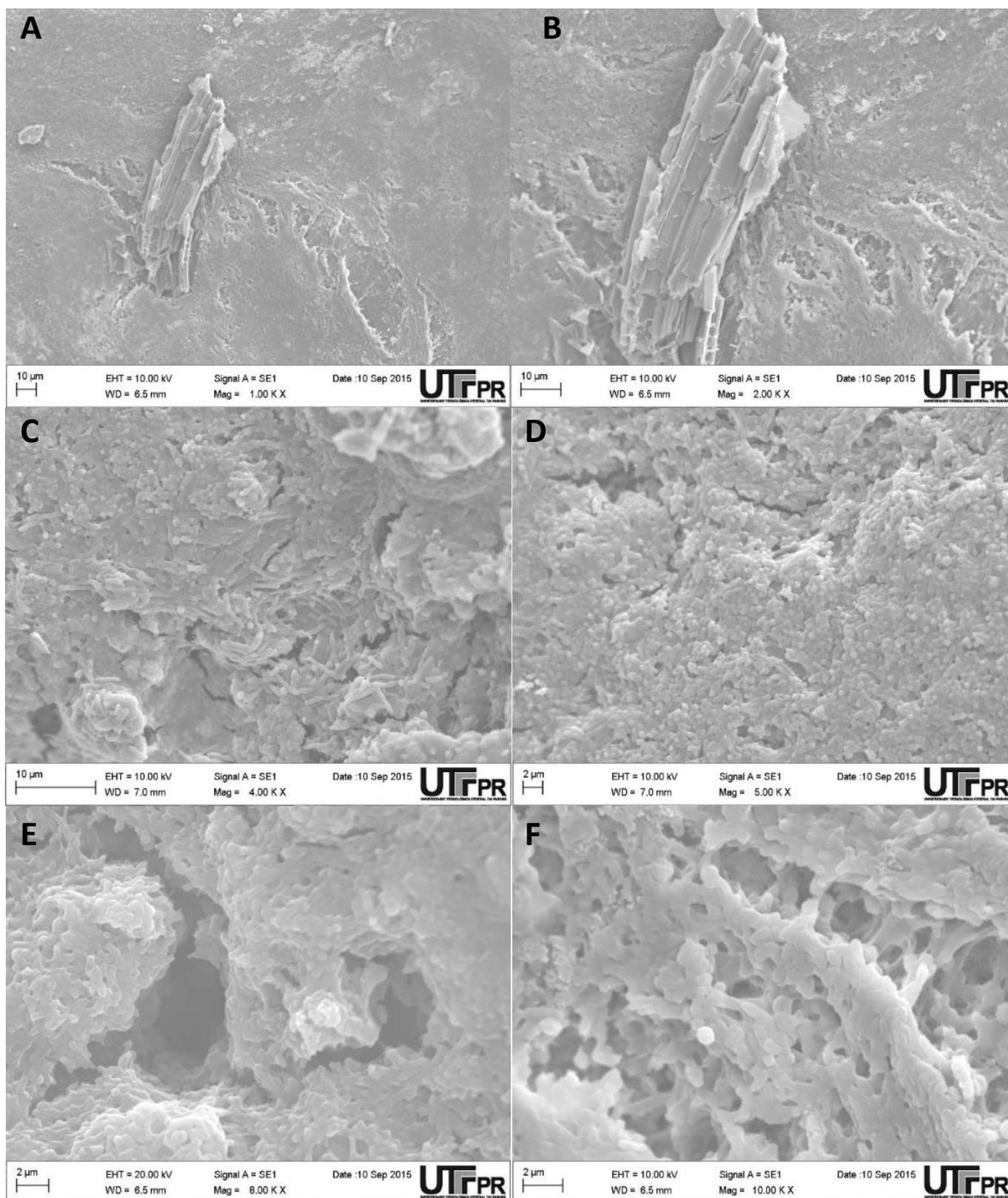


Figura 38. MEV da superfície do eletrodo de grafite recoberto com polipirrol contendo biofilme de *E. coli*. Aumento 1000x (A), 2000x (B), 4000x (C), 5000x (D), 8000x (E) e 10000x (F).

Portanto, através do MEV foi possível observar que o polipirrol apresentou características favoráveis como suporte para formação biofilme sobre o eletrodo.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho teve como objetivo a construção de CCMs de duas câmaras em escala de bancada utilizando uma bactéria modelo (*Escherichia coli*), sem mediadores químicos, para comparar a eficiência energética obtida com um eletrodo normalmente utilizado em estudos de CCMs (eletrodo de grafite plano) com um eletrodo desse material, recoberto com polipirrol pelo processo de eletrodeposição. Os resultados obtidos mostraram que:

Com a construção das CCMs com membrana trocadora de prótons e utilizando como microrganismo a bactéria *E. coli* foi funcional e permitiu a geração de energia elétrica que, apesar de baixa, pode servir como base para outros estudos com CCMs.

Com a modificação da superfície de um eletrodo de grafite pela adição do polipirrol foi possível observar um incremento de atividade elétrica e aumento de área superficial do eletrodo. Esse aumento da superfície de contato resulta no maior número de bactérias ligadas ao eletrodo por unidade de área que, conseqüentemente se traduz numa maior capacidade de transferência de elétrons/produção de energia. Com isso há aumento da potência gerada, aumento da polarização do eletrodo (devido à formação do biofilme celular sobre a área do polímero condutor), possível ação de mediação do polímero condutor com a bactéria ou de qualquer outro mediador produzido pela célula, ganho de estabilidade da célula (tempo de vida útil da CCM) devido ao grau de penetração do biofilme no eletrodo (verificado no MEV), que demonstrou ser totalmente biocompatível com a bactéria.

Foi observada uma diminuição da resistência interna, verificada na curva polarizada, que possibilitou incremento de energia. Um circuito com menor resistência tem um maior fluxo de elétrons ou corrente elétrica.

Em termos da eficiência da célula foi possível observar um acréscimo em termos de eficiência coulombica no sistema contendo polipirrol (17,18%)

em relação ao sistema que não possuía (7,31%). Isso representa um melhor aproveitamento dos elétrons do substrato que podem de fato ser convertidos em energia elétrica.

Portanto, neste trabalho foi possível analisar alguns aspectos importantes demonstrando que o eletrodo de grafite modificado pela eletrodeposição de polipirrol pode ser uma alternativa viável e proveitosa para uso em CCMs.

Como perspectivas futuras poderiam ser testados a utilização de mediadores para aumentar a eficiência da célula, o uso de outras espécies de bactérias sob cultivo puro ou ainda utilizando o co-cultivo com mais cepas bacterianas. Por último seria interessante a síntese de um eletrodo fabricado totalmente com polipirrol para a comparação com os dados obtidos nesse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Type Culture Collection (ATCC), *Escherichia coli* (ATCC® 8739™), p1-2, 2014.

ANGENENT L. T., KARIM K., AL-DAHMAN M. H., WRENN B. A., DOMIGUEZ-ESPINOSA R., Production of bioenergy and biochemical from industrial and agricultural wastewater, Trends in Biotechnology, vol 22, No 9, September, 2004.

ASHLEY E., FRANKS A. E., NEVIN K. P., Microbial Fuel Cells, A Current Review, Energies – 2010.

ATEH D. D., NAVSARIA H. A., VADGAMA P., Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues, J. R. Soc. Interface, vol 3, p. 741-752, June, 2006.

BARANITHARAN E., KHAN M. R., PRASAD D. M. R., TEO W. F. A., TAN G. Y. A., JOSE R., Effect of biofilm formation on the performance of microbial fuel cell for the treatment of palm oil mill effluent, BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, July, 2014.

BARIOTO V. DA C. R., Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização das enzimas fitase e polifenol oxidase e aplicados como biossensores, Tese de Doutorado, Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais, Escola de Engenharia de São Carlos USP, 2014.

BASAVARAJA C., KIM N. R., JO E. A., HUH D. S., Biological Templating of Polyaniline and Polypyrrole Using *E. coli*, Macromolecular Research, Vol 18, No3, p. 222 -226, July, 2009.

BELLO, M. E., Obtenção e caracterização eletroquímica do compósito polipirrol/ cobalto, Dissertação de mestrado Química (área Físico-química), Universidade de São Carlos - Abril 2002.

BOCKRIS J. O., SRINIVASAN S., *Fuel Cells: Their Electrochemistry*, Toronto, Canada: McGraw- Hill, 1969.

CARVALHO T. J. L., Estudo da produção de energia elétrica a partir de uma célula de combustível microbiana, Tese de Mestrado Engenharia Química, Faculdade de Engenharia (FEUP), Universidade do Porto, Março, 2010.

CHAE, K. L.; CHOI, M.; AJAYI, F. F.; CHANG, I e S, KIM, I. S. Mass transport through a proton exchange membrane (nafion) in microbial fuel cell, *Energy Fuels*, 2008, 22 (1), pp 169–176

CHAUDHURI S. K., LOVLEY D. R., Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.* 21, 1229–1232. 2003.

CHOUGULE M. A., PAWAR S. G., GODSE P. R., MULIK R. N., SEN S., PATIL V. B., Synthesis and Characterization of Polypyrrole (PPy) Thin Films, *Soft Nanoscience Letters*, vol 1, p. 6-10, January, 2011.

CORDEIRO E. R., FERNANDES A. W. C., PEREIRA A. F. C., COSTA M. M. DA, NASCIMENTO M. L. F., OLIVEIRA H. P. de., *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation on Polypyrrole: An Electrical Overview, *Quimica Nova* vol 38, No 8, pág. 1075-1079, February, 2015.

CUNHA E. F. da, Avaliação e aplicação de Tecnologias de células a combustível tipo PEMFC desenvolvidas no IPEN em um Modulo de 500 W de potência nominal, Tese de doutorado Ciências na área de tecnologia nuclear , Instituto de pesquisas energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo, 2009.

DEVASAHAYAM M., MASIH S. A., Microbial fuel cells demonstrate high coulombic efficiency applicable for water remediation, *Indian Journal of Experimental Biology*, vol 50, p. 430-438, June, 2012.

DU, Z.; LI, H.; GU, T., A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy Review Article. *Biotechnology Advances*, Volume 25, Issue 5, p. 464-482, September–October, 2007.

DUMAS C., MOLLICA A., FÉRON D., BASSÉGUY R., ETCHEVERRY L., BERGEL A., Marine microbial fuel cell: use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials, *Electrochim Acta* 53:468. 2007.

ESMAEILI C., GHASEMI M., HENG L. Y., HASSAN S. H. A., ABDI M. M., DAUD W. R. W., ILBEYGI H., ISMAIL A. F., Synthesis and application of polypyrrole/carrageenan nano-bio composite as a cathode catalyst in microbial fuel cells, *Carbohydrate Polymers*, vol 114, p. 253-259, august, 2014.

FAN Y., HU H., LIU H., Sustainable power generation in microbial fuel cells using bicarbonate buffer and proton transfer mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* Vol 41. 8154-8158. September, 2007.

FRANKS A.E., NEVIN K. P., Microbial Fuel Cells, A Current Review, *Energies*, vol 3, p. 899-919, 2010.

FUEL CELL TODAY (a). Disponível em: <<http://www.fuelcelltoday.com/history>> Acesso em: 17 mar 2007

GHOOREYSHI, A. A.; JAFARY, T.; NAJAFPOUR G. D.; HAGHPARAST, F. Effect of type and concentration of substrate on power generation in a dual chambered microbial fuel cell. *World Renewable Energy Congress*, 2011.

GODWIN J. M., EVITTS R. W., KENNEL G. F., Microbial fuel cell with a polypyrrole/poly(methylene blue) composite electrode, *Reports in Electrochemistry*, p. 3-11, 2012.

GOMES, A. S. de O. Desenvolvimento de uma Célula a Combustível Microbiana com Culturas puras de *Pseudomonas aeruginosa* em Meio de Cultura de Glicerol, *Dissertação (Mestrado em Físico-química)*, Instituto de Química de São Carlos – USP, São Carlos, 2011.

GUIMARD N. K., GOMEZ N., SCHMIDT C. E., Conducting polymers in biomedical engineering, *Progress in Polymer Science*, vol 32, Issues 8-9, p. 876-921, August-September, 2007.

GUPTA, G. SIKARWAR, B., VASUDEVAN V., BOOPATHI M., KUMAR, O., SINGH, B. AND VIJAYARAGHAVAN, R. Microbial fuel cell technology: A

review on Electricity Generation; Journal of Cell and Tissue Research, Vol. 11 p. 2631-2654,2011;

HANDBOOK OF FUEL CELL, Fundamentals Technology and Applications, John Wiley & Sons Ltd, v1, c.5 p. 31, 2003.

HASLETT N. D., Development of a microbial fuel cell for organic waste bioremediation and simultaneous electricity generation, Thesis Doctorate Philosophy of Biochemistry, Lincoln University, 2012.

HE Z., HUANG Y., MANOHAR A. K., MANSFELD F., Effect of electrolyte pH on the rate of the anodic and cathodic reactions in an air-cathode microbial fuel cell. Bioelectrochem. Vol 74, cap 1, p. 78-82, august, 2008.

HOLMES, D. E.; BOND, D. R.; O'NEIL, R. A.; REIMERS, C. E.; TENDER, L. R.; LOVLEY, D. R., Microbial Communities Associated with Electrodes Harvesting Electricity from a Variety of Aquatic Sediments, Microbial Ecology, Vol. 48, Issue 2, p.178, August, 2004.

JIANG D., LI B., Novel electrode materials to enhance the bacterial adhesion and increase the power generation in microbial fuel cells (MFCs), Water Science & Technology, vol. 59 p.557-563, 2009

JUNIOR L. R., NETO G. DE O., KUBOTA L.T., Transdutores Potenciometricos a base de polímeros condutores: Aplicações Analíticas, Química Nova, vol. 20, no.5, Maio , 1997.

KATURI K. P., SCOTT K., HEAD I. M., PICIOREANU C., CURTIS T. P., Microbial fuel cells meet with external resistance, Bioresource Technology 102 2758–2766, 2011.

KIM M. H., An Analysis of Anaerobic Dual-Anode Chambered Microbial Fuel Cell (MFC) Performance, A Thesis Master of Science Degree, The University of Tennessee, Knoxville, August, 2009.

KUNKEL, D. Observación de la estructura y composición superficial de sólidos. Dennis Kunkel Microscopy, Inc., P. O. Box, Kailua, Hawaii, 9 67-34, 2008.

LARMINIE J., DICKS A., Fuel Cell Systems Explained, John Wiley & Sons Inc, 2003.

LEHNEN D. R., Desenvolvimento de Células de Combustível Microbianas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Tese de Mestrado em Química, Porto Alegre, 2014.

LIU H., RAMNARAYANAN R., LOGAN B. E., Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. Environ Sci Technol; 28:2281–5. 2004.

LOGAN B. E., Microbial Fuel Cell, John Wiley & Sons, 2007.

LOGAN B. E., Essential Data and Techniques for Conduction Microbial Fuel Cell and other Types of Bioelectrochemical System Experiments, Chemsuschem 0000, pag 1 a 8, Wiley, 2012.

LOGAN B. E., HAMELERS B., ROZENDAL R., SCHRÖDER U., KELLER J., FREGUIA S., AELTERMAN P., VERSTRAETE W., RABAEY K., Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology, Environmental Science & Technology, vol 40, n°17, July, 2006.

LOGAN B., CHENG S., WATSON V., ESTADT G., Graphite Fiber Brush Anodes for Increased Power Production in Air- Cathodes Microbial Fuel cells, Environ. Sci. Technol., vol 41, p. 3341-3346, 2007.

LOVLEY D. R., Bug Juice: Harvesting electricity with microorganisms, Nature Reviews Microbiology, vol 4, p. 497-508, July, 2006.

LOVLEY D. R., Live wires: direct extracellular electron exchange for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination, Energy & Environmental Science, October, 4, 4896-4906 2011.

LOVLEY D. R., NEVIN P. K., A shift in the current: New applications and concepts for microbe-electrode electron exchange, Current Opinion in Biotechnology – Science Direct, February, 854, p.8, 2011.

LOVLEY D. R., The microbe electric: conversion of organic matter to electricity, Current Opinion in Biotechnology – November, 19, 564-571 2008.

MAHADEVAN A., GUNAWARDENA A. D., FERNANDO S., Biochemical and Electrochemical Perspectives of the Anode of a Microbial Fuel Cell, INTECH - Technology and Application of Microbial Fuel Cells – capítulo 2, 2014.

MARCON L. R. C., Potencialidade da célula combustível microbiana para geração de energia elétrica a partir de esgoto sanitário, tese de mestrado em Ciências (Engenharia Hidráulica e Saneamento), Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011.

MASIH S. A., DEVASAHAYAM M., ZIMIK M., Optimization of power generation in a dual chambered aerated membrane microbial fuel cell with *E. coli* as biocatalyst, Journal of Scientific & Industrial Research, Vol 71, p. 621-626, September, 2012.

MATTOS L. L., Membranas Nanoestruturadas de Polipirrol para aplicação em baterias, tese de mestrado em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Março, 2011.

MAURITZ K. A., MOORE R.B., State of understanding of nafion, Chemical Review, vol 104, 4535-4586, 2004.

MILLER G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing, *Anal. Chem.*, 31 (3), pp 426–428, 1959.

MINA B., CHENGA S., LOGAN B. E., Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells, Water Research Volume 39, Issue 9, May 2005, Pages 1675–1686.

MONTOYA P., MARÍN T., CALDERÓN J. A., JARAMILLO F., Electrodeposition of Polypyrrole Films: Influence of Fe₃O₄ Nanoparticles and Platinum Co-Deposition, Aspects on Fundamentals and Applications of Conducting Polymers – cap 7, pag 137 - 158 - INTECH – 2012.

MOORE J. C., Metabolic Engineering of *Escherichia coli* ATCC 8739 for production of Bioelectricity, Dissertation Doctor of Philosophy, University of Florida, 2009.

MORISHIMA K., FURUYA A., MORIUCHI T., YOSHIDA M., OTA M., FURUKAWA Y., Improving Performance of Direct Photosynthetic/Metabolic bio-fuel cell (DPBFC) Using Gene Manipulated bacteria, The six International Workshop on Micro and Nanotechnology for Power Generation and Energy Conversion Applications, Journal of Micromechanics and Microengineering Berkeley, USA, 17, September 2007

NGUYENA U. H. P., GREKOVA D., GEISELMANN J., STAMBOULIA V., WEIDENHAUPTA M., DELABOUGLISEA D., Anodic deposit from respiration metabolic pathway of *Escherichia coli*, *Electrochimica Acta*, Volume 130, 1, Pages 200–205, June 2014

OJI A., OPARA C. C., ODUOLA M. K., Fundamentals and Field Application of Microbial Fuel Cells (MFCs), *Scholars Research Library - European Journal of Applied Engineering and scientific Research* Vol 4. P. 185–189, 2012.

PANT D., BOGAERT G. V., PORTO-CARRERO C., DIELS L., VANBROEKHOVEN K., Anode and cathode materials characterization for a microbial fuel cell in half cell configuration. *Water Sci. Technol.* 63, 2457–2461. 2011.

PARK D. H., ZEIKUS J. G., Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore, *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1292-1297, Abril, 2000.

PEI-YUAN Z., LIANG-ZHONG L., Experimental study of the microbial fuel cell internal resistance, *Journal of Power Sources*, vol 195, p.8013-8018, junho, 2010.

POTTER M. C., Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, Vol 84, No 571, p. 260-276, Setembro, 1911.

PUIG S., SERRA M., COMA M., CABRÉ M., BALAGUER M. D., COLPRIM J., Effect of pH on nutrient dynamics and electricity production using

microbial fuel cells. *Bioresource Technology* vol 101, p.9594-9599, july, 2010.

RABAEY K., OSSIEUR W., VERHAEGE M., VERSTRAETE W., Continuous microbial fuel cells convert carbohydrates to electricity, *Water Sci Technol*, Vol 52, p. 515-523, 2005.

RABAEY K., VERSTRAETE W., Microbial Fuel Cells: Novel biotechnology for energy generation, *Trends in biotechnology*. Vol 23, No 6 june, 2005.

RAGHAVULU S. V., SARMA P. N., MOHAN S. V., Comparative bioelectrochemical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* with anaerobic consortia as anodic biocatalyst for fuel cell application, *Journal of Applied Microbiology*, vol 110, p. 666-674, 2011.

RAHIMNEJAD M., NAJAFPOUR G. D., GHOREYSHI A.A., BAKERI G., TALEBNIA F., Oh S., Investigation of Different Mediators in Microbial Fuel Cell with Cyclic Voltammeter, *Pak. J. Biotechnol*, vol 10 (2), p. 37-51, 2013.

RAHIMNEJAD M., ADHAMI A., DARVARI S., ZIREPOUR A., OH S., Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review, *Alexandria Engineering Journal*. Vol 54, p. 745-756, april, 2015.

RAMASAMY R. P., REN Z., MENCH M. M., REGAN J. M., Impact of initial biofilm growth on the anode impedance of microbial fuel cells, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 101, No. 1, September 1, 2008.

REICHE A., KIRKWOOD K. M., Comparison of *Escherichia coli* anaerobic consortia derived from compost as anodic biocatalysts in a glycerol-oxidizing microbial fuel cell, *Bioresource Technology*, p. 318 -323, 2012.

RICHTER H., MCCARTHY K., NEVIN K. P., JOHNSON J. P., ROTELLO V. M., LOVLEY D. R., Electricity Generation by *Geobacter Sulfurreducens* Attached to gold electrodes. *American Chemical Society*, 24 p. 4376–4379 January, 2008a.

RICHTER H., MCCARTHY K., NEVIN K. P., JOHNSON J. P., ROTELLO V. M., LOVLEY D. R., Electricity generation by *Geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes. *Langmuir*, 24:4376-4379. 2008b.

ROCHA-FILHO R. C. Polímeros Condutores: Descoberta e Aplicações, Química Nova na escolar, Premio Nobel 2000, No12, Novembro, 2000.

ROHAN D., DEEPA V., ROHAN G., SATISH B., Bioelectricity Production from Microbial Fuel using *Escherichia coli* (Glucose and Brewery Waste), *International Research Journal of Biological Sciences*, Vol. 2(7), 50-54, July 2013.

SASSO C., BENEVENTI D., ZENO E., CHAUSSY D., PETIT-CONIL M., BELGACEM N., Polypyrrole and polypyrrole/wood-derived materials conducting composites: A Review, *BioResources*, vol 3, p. 3585-3620, 2011.

SCHECHTER M., SCHECHTER A., ROZENFELD S., EFRAT E., CAHAN R., Anode Biofilm, *INTECH - Technology and Application of Microbial Fuel Cells – cap 4*, 2014

SCHOLZ F., SCHRÖDER U., Bacterial batteries., *Nature Biotechnology*, vol 21, No 9, September, 2003.

SCHRÖDER U., Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency, *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol 9, p. 2619-2629, 2007.

SINGH D., PRATAP D., BARANWAL Y., KUMAR B., CHAUDHARY R. K., Microbial Fuel Cells: A green technology for power generation, *Scholars Research Library, annals of biological research*, p. 128 - 138 2010.

SUGNAUX M., MERMOUD S., COSTA A. F. DA, HAPPE M., FISCHER F., Probing electron transfer with *Escherichia coli*: A method to examine exoelectronics in microbial fuel cell type systems, *Bioresource Technology*, vol 148 p. 567-573, Setembro, 2013.

SUN D., CHENG S., WANG A., LI F., LOGAN B. E., CEN K., Temporal-Spatial Changes in Viabilities and Electrochemical Properties of Anode Biofilms, *Environ. Sci Technol*, Vol 49, 5227-5235, 2015.

SWANSON L., SCHULTZ J., BEYENAL H., NGUYEN H., Using Microbial Fuel Cells in the High School Science Classroom, Nacional Science Foundation Grant Award, No. ECC-0808716, July, 2008.

TANISHO S., KAMIYA N., WAKAO N., Microbial fuel cell using *Enterobacter aerogenes*. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol 21, p. 25-32. 1989.

TELEKEN J. T., Modelagem Matematica da Geração de Corrente Elétrica em uma Célula de Combustível Microbiana Inoculada com Micro-organismos Marinhos, tese de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

TUNG S., HWANG B., Synthesis and characterization of hydrated phosphor-silicate glass membrane prepared by an accelerated sol-gel process with water/vapor managenement, *Journal of Materials Chemistry*, vol 15, 3532-3538, july, 2005.

WANG L., LI X., YANG Y., Preparation, properties and applications of polypyrroles, *Reactive & Functional polymers*, vol 47, p. 125-139, December, 2000.

WANG T., CHEN W., HUANG R., Influence of growth curve phase on electricity performance of microbial fuel cell by *Escherichia coli*, *International Journal of Hydrogen Energy* p. 7217 a 7223, 2010.

WANG X., FENG Y., LIU J., SHI X., LEE H., LI N., REN N., Power generation using adjustable Nafion/PTFE mixed binders in air- cathode microbial fuel cell, *Biosensors and Bioelectronics*, p. 946-948, 2010.

WEI J., LIANG P., HUANG X., Recent progress in electrodes for microbial fuel cells, *Bioresource Technology*, 102, p.9335-9344, October 2011.

YONG Y., YU Y., YANG Y., LIU J., WANG J., SONG H., Enhancement of Extracellular Electron Transfer and Bioelectricity Output by Synthetic Porin, *Biotechnology Bioengineering*, 110, p. 408-416, February, 2013.

YUAN Y., KIM S., Improved Performance of a Microbial Fuel Cell with Polypyrrole/ Carbon Composite Coated Carbon Paper Anodes, Bull. Kporean Chem. Soc. Vol 29, No 7, 2008.

ZHANG T., CUI C., CHEN S., AI X., YANG H., SHEN P., PENG Z., A novel mediatorless microbial fuel cell based on direct biocatalysis of *Escherichia coli*, Electrochemistry communications, p. 293-297, January, 2006a.

ZHANG T., CUI C., CHEN S., YANG H., SHEN P., The direct electrocatalysis of *Escherichia coli* through electroactivated excretion in microbial fuel cell, Electrochemistry communications, p. 293-297, December, 2007.

ZHANG T., ZENG Y., CHEN S., AI X., YANG H., Improved performances of *E. coli*-catalyzed microbial fuel cells with composite graphite/PTFE anodes, Electrochemistry communications, p. 349 a 353, September – 2006b.

ZHAO F., SLADE R. C. T., VARCOE J. R., Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. Chem Soc Rev, 38, p. 1926-1939 July, 2009.

ZHOU M., CHI M., LUO J., HE H., JIN. T., An overview of electrode materials in microbial fuel cells Journal of Power Sources, 196 (10), pp. 4427–4435. 2011.

ZHOU M., WANG H., HASSETT D., GU T., Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts, J. Chem Technol Biotechnol, vol 88, p. 508-518, November, 2012.

ZOPPI R. A., PAOLI M. de., Aplicações Tecnológicas de Polímeros Intrinsecamente Condutores: Perspectivas Atuais, Instituto de Química – UNICAMP – Julho, 1993.

ZOU Y., XIANG C., YANG L., SUN L., XU F., CAO Z., A mediatorless microbial fuel cell using polypyrrole coated carbon nanotubes composite as anode material, International Journal of Hydrogen energy. p.4856-4862. 2008.