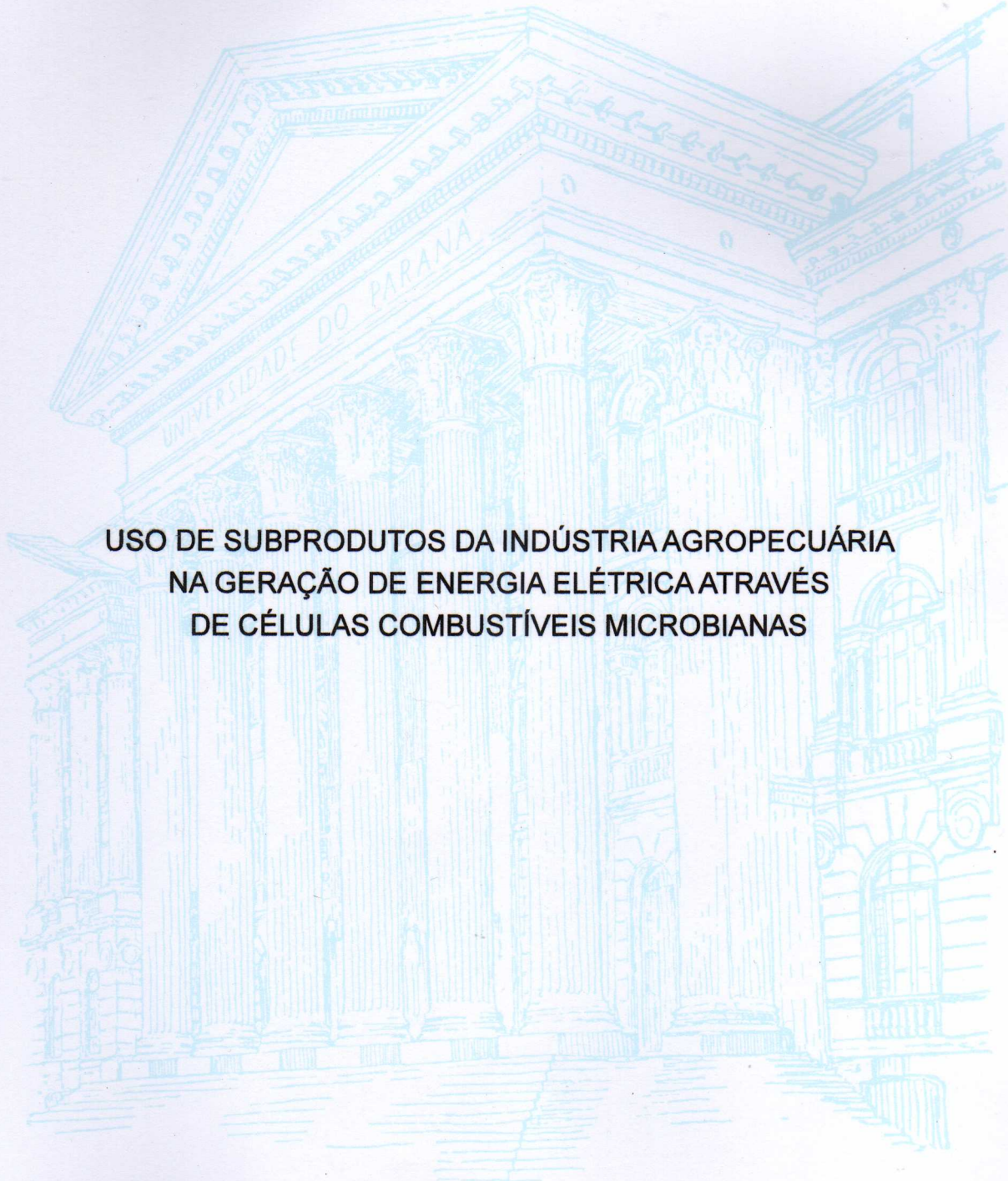


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SILVIO RACHINSKI



USO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AGROPECUÁRIA
NA GERAÇÃO DE ENERGIA ELÉTRICA ATRAVÉS
DE CÉLULAS COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS

CURITIBA

2010

TERMO DE APROVAÇÃO

SUMÁRIO

USO DE SUBPRODUTOS DA AGROPECUÁRIA NA GERAÇÃO DE ENERGIA ELÉTRICA
ATRAVÉS DE CÉLULAS COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS

LISTA DE FIGURAS V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS VIII
RESUMO IX
ABSTRACT X

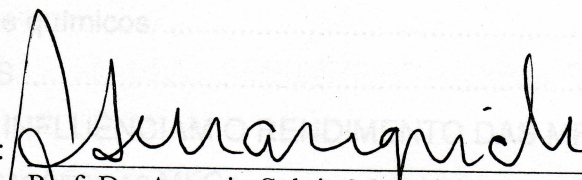
por

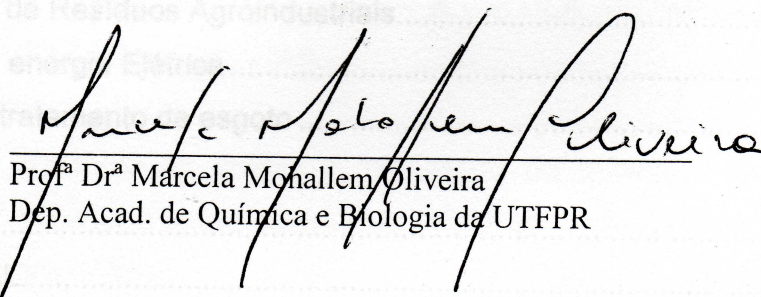
SILVIO RACHINSKI

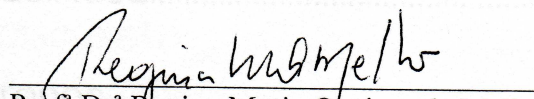
1. INTRODUÇÃO 1
1.1 CÉLULAS COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS 1
1.1.1 Oxi-redução 4
1.1.2 Oxi-redução 5
1.1.3 Mecanismo de transferência de elétrons ou Mecanismo Biológico 9
1.1.4 Nanofios 11
1.1.5 Mediadores químicos 11
1.2 TIPOS DE MFCs 12
1.3 FATORES QUE INFLUENCIAM O MFC 13
1.4 POTENCIAIS APLICATIVOS 14
1.4.1 Sensores 14
1.4.2 Tratamento de Resíduos Agroindustriais 15
1.4.3 Geração de energia 15
1.4.4 MFCs para tratamento de resíduos 15
2. OBJETIVOS 18
2.1 OBJETIVO GERAL 18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18
3. MATERIAIS E MÉTODOS 19
3.1 AMOSTRAS 19
3.1.1 Amostragem dos solos 19
3.1.2 Estercos suíno 19
3.1.3 Resíduos de cervejaria 19
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS 20

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:


Prof. Dr. Antonio Salvio Mangrich
Dep. de Química – UFPR


Prof.ª Dr.ª Marcela Monallem Oliveira
Dep. Acad. de Química e Biologia da UTFPR


Prof.ª Dr.ª Regina Maria Queiroz de Mello
Dep. de Química – UFPR

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SILVIO RACHINSKI

**USO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AGROPECUÁRIA NA
GERAÇÃO DE ENERGIA ELÉTRICA ATRAVÉS DE CÉLULAS
COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS**

Curitiba

2014

SILVIO RACHINSKI

**USO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AGROPECUÁRIA NA
GERAÇÃO DE ENERGIA ELÉTRICA ATRAVÉS DE CÉLULAS
COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química, Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salvio Mangrich

Co-Orientador: Prof. Dr. Ademir Carubelli

Curitiba

2014

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CÉLULAS COMBUSTÍVEIS MICROBIANAS.....	1
1.1.1 Breve Histórico das Células Combustíveis Microbianas.....	4
1.1.2 Oxidação do material orgânico	5
1.1.3 Mecanismo da transferência de elétrons ou Mecanismo Biológico	9
1.1.4 Nanofios.	11
1.1.5 Mediadores químicos.....	11
1.2 TIPOS DE MFCS.....	12
1.3 FATORES QUE INFLUÊNCIAM O RENDIMENTO DAS MFCS.....	13
1.4 POTENCIAIS APLICAÇÕES DAS MFCS.....	14
1.4.1 Sensores Ambientais.....	14
1.4.2 Tratamento de Resíduos Agroindustriais.....	15
1.4.3 Geração de energia Elétrica	15
1.4.4 MFCs para tratamento de esgoto	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 AMOSTRAS.....	19
3.1.1 Amostragem dos solos	19
3.1.2 Esterco suíno.....	19
3.1.3 Resíduos de cervejaria	19
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	20

3.2.1	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) por Transmitância e por Refletância Difusa (DRIFT).....	20
3.2.2	Espectroscopia de Ultravioleta e Visível por Reflectância Difusa (DRUV-VIS).....	20
3.2.3	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)...	20
3.2.4	Difratometria de Raios-X (DRX)	20
3.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS.....	21
3.4	MEDIDAS DE CORRENTE ELÉTRICA E POTÊNCIA (DDP).....	21
3.5	MONTAGENS DOS DIFERENTES TIPOS DE CÉLULA.....	21
3.5.1	Célula Sedimentar I	21
3.5.1.1	Preparação dos eletrodos para a célula sedimentar I.....	21
3.5.1.2	Montagem da célula sedimentar I.....	22
3.5.2	Montagem da Célula Sedimentar II - MFCs ligadas em série.....	24
3.5.2.1	Configuração dos Leds usados como dissipadores de energia	26
3.6	MONTAGEM DA CÉLULA SEDIMENTAR USANDO SOLO COMO SEPARADOR (CÉLULA SEDIMENTAR III).....	27
3.7	MONTAGEM DA MFC DE DUAS CÂMARAS COM MEMBRANA SEPARADORA.....	28
3.8	CULTURAS DE MICROORGANISMOS PARA A CÉLULA SEDIMENTARE II E PARA A CÉLULA DE DUAS CÂMARAS.....	29
3.8.1	Meio de cultura	30
3.8.2	Preparação de meio de cultivo e inoculação de microorganismos redutores de SO_4^{-2} e Fe(III) a serem usados na célula de duas câmaras com membrana separadora náfon.	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO:.....	33
4.1	MONTAGEM I. CÉLULA SEDIMENTAR I.....	33
4.2	MONTAGEM 2. MFCs EM SÉRIE.....	35
4.2.1	Células sedimentares em série utilizando esterco suíno	35
4.2.2	CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO ORGÂNICO – ESTERCO SUÍNO.....	38

4.2.2.1	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	38
4.2.2.2	Espectroscopia de Ultravioleta e Visível por Reflectância Difusa (DRUV-VIS)	40
4.3	CÉLULAS SEDIMENTARES USANDO SOLO COMO SEPARADOR	40
4.3.1	Gráficos de potencial de equilíbrio e corrente elétrica instantânea	40
4.3.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier por reflectância difusa (DRIFT)	46
4.3.3	Espectroscopia de ultravioleta e visível por reflectância difusa (DRUV-VIS)	47
4.3.4	Difratometria de Raios-X (DRX)	48
4.3.5	Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR) por transmitância	49
4.4	CÉLULA COMBUSTÍVEL MICROBIANA USANDO RESÍDUOS DE INDÚSTRIA CERVEJEIRA COMO SUBSTRATO	51
4.5	DESENVOLVIMENTO DE SOFTWARE PARA MONITORAR AS MFCS	54
4.5.1	Emissão de Relatórios	55
4.5.2	Princípios de operação do software	55
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	57
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UMA MFC DE DUAS CÂMARAS (ADAPTADO DE LOVLEY, 2006).....	2
FIGURA 2. ROTA GENÉRICA PARA A OXIDAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA EM DIÓXIDO DE CARBONO, EM AMBIENTES SEDIMENTARES. (ADAPTADO DE CHAUDHURI E LOVLEY, 2003).....	7
FIGURA 3 PROPOSTA DA FUNÇÃO MEDIADORA DAS S.H. NA OXIDAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA E REDUÇÃO DO FE (III). ADAPTADO DE MANGRICH <i>ET AL</i> , 2009	8
FIGURA 4. CONFIGURAÇÕES TÍPICAS PARA AS MFCs. (A) MFC DE BIOREATOR DESACOPLADO EM UM BIOREATOR SEGUIDO POR UMA CÉLULA DE COMBUSTÍVEL QUÍMICA. (B) MFC DE BIOREATOR ACOPLADO. (C) MFC COM INTERAÇÃO ÂNODO-BACTÉRIA.	13
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ELETRODO USADO DURANTE OS TESTES COM A CÉLULA SEDIMENTAR.....	23
FIGURA 7. CÉLULAS ELETROQUÍMICAS SEDIMENTARES UTILIZANDO ESTERCO SUÍNO COMO FONTE DE MATERIAL ORGÂNICO. DETALHE PARA O POTENCIAL ELÉTRICO VISTO NO VOLTÍMETRO.	24
FIGURA 8. ELETRODOS INTRODUZIDOS NOS RECIPIENTES DE POLIPROPILENO CONTENDO O MATERIAL ORGÂNICO EM DECOMPOSIÇÃO.....	25
FIGURA 9. CONFIGURAÇÃO DA MFC COMPOSTA POR VÁRIAS UNIDADES INDIVIDUAIS LIGADAS EM SÉRIE.	26
FIGURA 10. CONFIGURAÇÃO DA PLACA CONTENDO OS <i>LEDS</i> USADOS COMO DISSIPADORES DE ENERGIA.	27

FIGURA 11. ESQUEMA DAS CÉLULAS UTILIZANDO SOLO COMO SEPARADOR.....	28
FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA CÉLULA DE DUAS CÂMARAS.....	29
FIGURA 13 .(A) POTENCIAL ELÉTRICO DE EQUILÍBRIO DESENVOLVIDO E (B) CORRENTE ELÉTRICA. MEDIDOS NOS PRIMEIROS 300 MINUTOS, SEM OXIGENAÇÃO DO SISTEMA.	34
FIGURA 14. (A) POTENCIAL ELÉTRICO DE EQUILÍBRIO DESENVOLVIDO E (B) CORRENTE ELÉTRICA MEDIDA APÓS REALIZAR A RE-OXIGENAÇÃO DA SOLUÇÃO.....	35
FIGURA 15. POTENCIAL ELÉTRICO (DDP) DO SISTEMA EM SÉRIE.....	37
FIGURA 16. QUATRO CÉLULAS MICROBIANAS LIGADAS EM SÉRIE, DETALHE PARA O POTENCIAL E LEDS OS ACESOS , SENDO MANTIDOS APENAS PELA ENERGIA GERADA PELO SISTEMA.	38
FIGURA 17. (A) ESPECTROS DE EPR DO MATERIAL ORGÂNICO,(B) DETALHE DA REGIÃO DO RADICAL LIVRE ORGÂNICO.	40
FIGURA 18. DR-UVVIS DAS AMOSTRAS DO SUBSTRATO ORGÂNICO, NO INÍCIO DA MONTAGEM E APÓS 3 SEMANAS DE FUNCIONAMENTO.	41
FIGURA 19. GRÁFICOS DE POTENCIAL E CORRENTE ELÉTRICA GERADOS PELA CÉLULA (A) INÍCIO DO EXPERIMENTO, MEDIDOS EM MINUTOS. (B) APÓS 300 MINUTOS, MEDIDOS EM HORAS.	43
FIGURA 20. GRÁFICOS DE DENSIDADE DE CORRENTE ELÉTRICA, NORMALIZADA PELA ÁREA DO ÂNODO. (A) INÍCIO DO EXPERIMENTO, MEDIDAS EM MINUTOS. (B) MEDIDAS EM HORAS	44
FIGURA 21. GRÁFICOS DE POTENCIAL E CORRENTE ELÉTRICA GERADOS PELA MFC COM RESISTÊNCIA DE 2,5 KΩ	45

FIGURA 22. GRÁFICOS DE DENSIDADE DE CORRENTE ELÉTRICA, NORMALIZADA PELA ÁREA DO ÂNODO. (A) INÍCIO DO EXPERIMENTO, MEDIDAS EM MINUTOS; (B) APÓS CERTO TEMPO, MEDIDAS EM HORAS.	46
FIGURA 23. POTENCIAL APÓS ADIÇÃO DE CLORETO DE MERCÚRIO NAS DUAS CONCENTRAÇÕES.....	47
FIGURA 24. ESPECTRO DE DRIFT DA AMOSTRA ORIGINAL DE SOLO USADA NO EXPERIMENTO.....	48
FIGURA 25. ESPECTROS DE DRUV-VIS DA AMOSTRA DE SOLO INICIAL...	49
FIGURA 26. DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DA AMOSTRA DE SOLO UTILIZADA COMO SEDIMENTO NO EXPERIMENTO DA MFC. CÓDIGO UTILIZADO: CAULINITA (K), GIBSITA (GI), MONTMORILONITA (M), QUARTZO (Q), ANATASE (NA), GOETITA (GO), HEMATITA (H), BRUCHITA (B), ALBITA (AL), JAROSITA (J), ORTOCLÁSIO (O), PALIGORSQUITA (P) E ILITA (I).	50
FIGURA 27. ESPECTROS DE FTIR DAS AMOSTRAS DE SOLO EM DIFERENTES TEMPOS DE REAÇÃO NA MFC.....	51
FIGURA 28. CÉLULA DE DUAS CAMÂRAS COM MEMBRANA SEPARADORA ENTRE CATODO E ANODO.....	54
FIGURA 29. GRÁFICOS DE POTENCIAL DE TESTE PARA DIFERENTES PREENCHIMENTOS DAS CAMÂRAS CATÓDICA E ANÓDICA DA CELULA COM DUAS CAMÂRAS E MEMBRANA SEPARADORA.....	56
FIGURA 30. TELAS DO SOFTWARE DESENVOLVIDO DURANTE O TRABALHO.....	58

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AF	Ácidos Fúlvicos
AH	Ácidos Húmicos
APHA	American Public Health Association
APHA/VIS	Método oficial para determinação de fenóis na região do visível
DRX	Difração de raios X
DRUV-Vis	Ultravioleta por Reflectância difusa
DQO	Demanda química de oxigênio
DDP	Diferença de Potencial
DRIFTS	Espectroscopia no Infravermelho por Reflectância Difusa
EPR	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
MO	Matéria Orgânica
MFC	Célula combustível microbiana
PBS	Solução Tampão Fosfato
RPM	Rotações por minuto
UV-VIS	Ultravioleta -Visível
λ	Comprimento de onda
θ	Ângulo de difração de raios X

RESUMO

Células combustíveis microbianas (MFCs) são dispositivos capazes de converter energia química em energia elétrica, através de reações catalisadas por microorganismos. O grande diferencial destas células, em relação a outros tipos de aproveitamento de material orgânico na geração de energia, é de que as MFCs realizam esta conversão em uma única etapa, o que pode tornar o processo de obtenção de energia mais barato e eficiente. Foram montados e monitorados diferentes tipos de MFCs, utilizando substrato orgânico proveniente da agropecuária e também, em uma outra configuração, rejeitos de uma indústria cervejeira da cidade de Curitiba. Foram obtidas quantidades substanciais de energia elétrica, capazes de manter pequenos dispositivos elétricos em funcionamento por um longo período de tempo. Foram estudadas também as modificações químicas do material orgânico presente nas câmaras anódica e catódica destas células, o que permitiu traçar um perfil das modificações químicas ocorridas com o material durante a evolução do experimento.

ABSTRACT

Microbial fuel cells (MFCs) are devices capable of converting chemical energy into electrical energy through reactions catalyzed by microorganisms. The great advantage of these cells compared to other types of utilization of organic material for energy generation, is that the MFC perform this conversion in one step, which can make the process of obtaining energy cheaply and efficiently. Were constructed and monitored different types of MFCs using organic substrate from the agriculture and also, in another configuration, a waste of brewing industry in the city of Curitiba. We obtained substantial amounts of electricity, capable of maintaining small electrical appliances in operation for a long period of time. We also studied the chemical modification of organic material present in the anode and cathode chambers of these cells, which allowed us to draw a profile of the chemical changes occurring in the material during the course of the experiment.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células Combustíveis Microbianas

“A desintegração de compostos orgânicos por microorganismos é acompanhada pela liberação de energia elétrica”.

M.C. Potter, 1911.

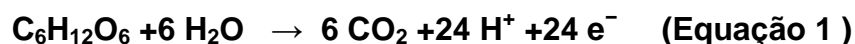
Cientistas e engenheiros de diferentes áreas do conhecimento buscam desenvolver novas tecnologias para dar utilidade aos rejeitos de biomassa e lixos em geral, atendendo também as crescentes necessidades globais de energia (Galembeck *et al*, 2009). Nesses trabalhos, surgem três questões principais: a ambiental, a econômica e a tecnológica propriamente dita, no sentido de poder suprir as demandas crescentes de energia. As Células Combustíveis Microbianas (MFC, sigla em inglês) geradoras de eletricidade atendem bem à primeira questão, e estudos estão sendo realizados para que atendam também a segunda e a terceira (Katz *et al*, 2003; Lewis e Nocera, 2006; Rifkin, 2002; Cohen, 1931).

No processo natural de degradação da matéria orgânica, uma das reações (bio)químicas envolvidas é a de oxidação, que ocorre de maneira anaeróbia, enquanto os elétrons são recuperados através de reações enzimáticas (Benetto, 1990). Os elétrons podem ser armazenados em intermediários como NADH ou quinonas. Ao fim da cadeia respiratória, o destino dos elétrons pode ser o oxigênio molecular ou outro aceitador extracelular.

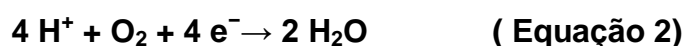
Uma MFC utiliza microrganismos para catalisar a oxidação da matéria orgânica, gerando eletricidade, pela transferência de elétrons para um circuito externo, introduzido antes da etapa da redução de um aceitador de elétrons (Bond *et al*, 2002). Assim, uma MFC é um dispositivo capaz de converter energia química em energia elétrica, através de reações químicas catalisadas por microrganismos.

As MFCs consistem basicamente de dois compartimentos, um deles anaeróbio, contendo o anodo e um compartimento aeróbio com o catodo. Estes dois compartimentos são normalmente separados por uma membrana que impossibilita a difusão de O₂ para o interior da câmara anódica, mas permita a passagem dos prótons gerados nesta para a câmara catódica. Há, entretanto, outras configurações possíveis, as quais serão discutidas em momento oportuno.

No compartimento anaeróbico ocorre a oxidação do material orgânico, com formação de CO_2 , prótons e elétrons. Como exemplo é apresentado, a seguir, o processo de oxidação da glicose gerando prótons e elétrons (Grzebyk e Pozniak, 2004).



Os prótons gerados migram para o compartimento aeróbico (câmara catódica) permeando através da membrana trocadora de prótons. Os elétrons produzidos são transferidos para o catodo através do circuito externo, e na superfície deste ocorre a redução do oxigênio à água.



Este fluxo de elétrons através do circuito externo gera uma corrente elétrica que pode ser mensurada e utilizada para realizar trabalho. A reação global da célula é a conversão do material orgânico biodegradável a dióxido de carbono e água, gerando eletricidade no processo (Grzebyk e Pozniak, 2004; Jang *et al*, 2004; Kim *et al*, 2004; Liu e Logan, 2004; Logan, 2009).

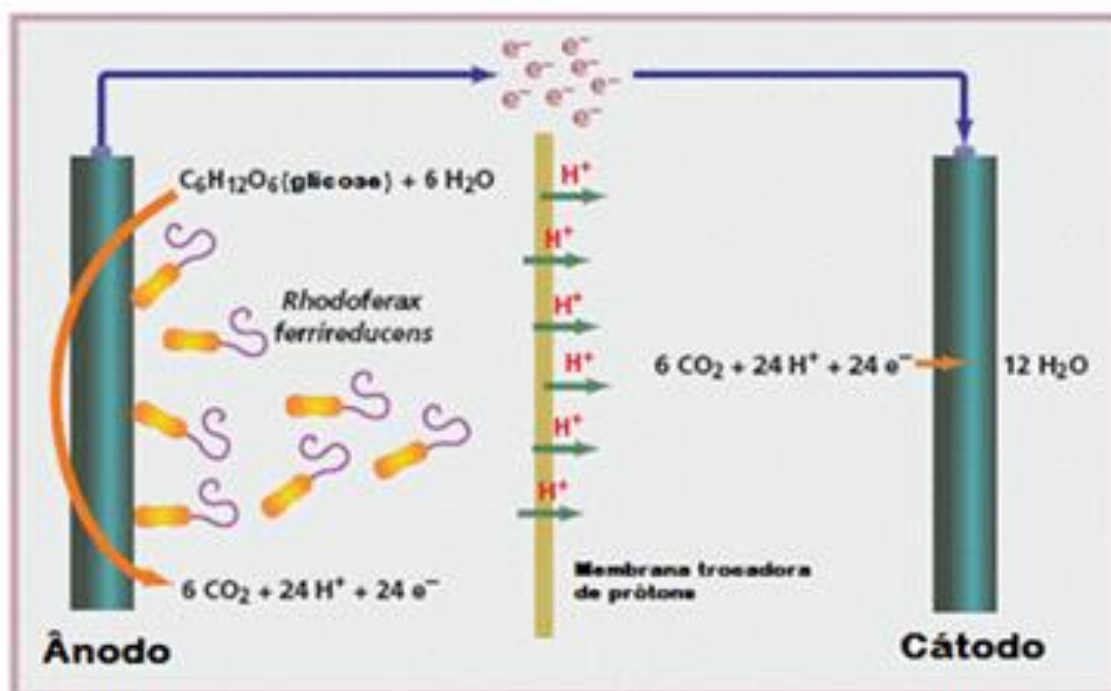


Figura 1. Esquema representativo de uma MFC de duas câmaras (adaptado de Lovley, 2006)

Na figura 1, temos um esquema representativo da MFC de duas câmaras: microorganismos anaeróbios oxidam o material orgânico na câmara do ânodo, gerando dióxido de carbono, prótons e elétrons. Alguns microorganismos

se fixam ao eletrodo como um biofilme e os elétrons são transferidos diretamente para o eletrodo, fluindo em seguida para o cátodo; os prótons são transferidos na mesma direção através da membrana de troca de prótons (normalmente *náfion^R*), o oxigênio atua então como aceitador de elétrons, ocorrendo a redução, e, posteriormente a reação com o próton para formar água. Além do oxigênio, outras substâncias cumprem a função de aceptadores de elétrons, tais como permanganato de potássio. Entretanto, deve-se levar em conta a geração de resíduos tóxicos ao meio ambiente, o que não ocorre quando usamos oxigênio.

Assim, microrganismos anaeróbios oxidam o material orgânico na câmara do ânodo, gerando dióxido de carbono, prótons e elétrons. Alguns microorganismos se fixam ao eletrodo como um biofilme e os elétrons são transferidos diretamente para o eletrodo, fluindo em seguida para o cátodo; os prótons também são transferidos para a câmara do catodo através da membrana permeável somente a prótons, sendo uma das mais conhecidas, a chamada membrana *náfion*. A molécula de oxigênio atua então como aceptadora de elétrons, ocorrendo a sua redução e reação com os prótons para formar água. Além do oxigênio, outras espécies químicas, como os íons Fe^{3+} , cumprem também a função de aceptadores de elétrons.

Algumas espécies de bactérias já identificadas em MFCs montadas em laboratório são: *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter sulfurreducens* (Bond e Lovley, 2003), *Geobacter metallireducens* e *Rhodoferrax ferrireducens* (Chaudhuri e Lovley, 2003), as quais são normalmente encontradas em sedimentos marinho ou fluviais, e também no esgoto doméstico. Culturas puras de bactérias, como *Rhodoferrax ferrireducens*, ou *Geobacter sulfurreducens*, foram usadas para a preparação de MFCs (Bond e Lovley, 2003; Chaudhuri e Lovley, 2003),. Entretanto, o uso de culturas mistas, como as existentes em lodos de tratamento de esgoto, também já foi citado como material biológico eficiente (Min *et al*, 2005; Ieropoulos *et al*, 2005). Quanto ao substrato orgânico, vários tipos já foram testados com sucesso em MFCs, tais como amido (Niessen *et al*, 2004), glicose (Bennetto, 1990; Gil *et al*, 2003) e esgoto doméstico (Gil *et al*, 2003).

1.1.1 Breve histórico das células combustíveis microbianas

O primeiro relato científico correlacionando organismos vivos e eletricidade é atribuído a Luigi Galvani, que em 1790, realizou experiência na qual observou contração das pernas de rãs submetidas à descarga de corrente elétrica. Desta observação surgiu o termo *bioeletricidade*. Em 1911, Michael Cresse Potter, professor de botânica na Universidade de Durham, UK, demonstrou a liberação de energia elétrica quando bactérias *E. coli* atuavam sobre substrato orgânico (Potter, 1911). Em 1931, Cohen, pesquisador da Universidade de Cambridge, retomou as idéias de Potter, descrevendo um grupo de células combustíveis biológicas capazes de produzir tensão de aproximadamente 35 Volts e corrente elétrica de 2 mA. Durante muito tempo o tema foi visto apenas como curiosidade científica. Em 1960 as células combustíveis biológicas tornaram-se populares quando a empresa de exploração espacial dos Estados Unidos da América, NASA, mostrou interesse por elas. O objetivo era gerar eletricidade concomitantemente com a degradação de resíduos orgânicos produzidos durante as viagens espaciais.

Em 1962 Rohrback projetou uma célula de combustível microbiana na qual *Clostridium butyricum* foi usada como catalisador na geração de hidrogênio através da fermentação da glicose (Rohrback *et al*, 1962). Em 1963, algumas células combustíveis biológicas estavam disponíveis comercialmente, sendo usadas como fonte de energia para rádios receptores e, luzes sinalizadoras em alto mar, e outros dispositivos, no entanto não alcançaram sucesso comercial e logo desapareceram do mercado. Em 1966 foram apresentadas várias células combustíveis microbianas utilizando palha de arroz que, ligadas em série, produziram corrente elétrica de 40 mA com tensão de 6 Volts (Williams, 1966). Em 1969, Yao e colaboradores demonstraram que a glicose pode ser usada como substrato para geração de eletricidade usando como catalisador negro de platina (Yao *et al*, 1969). No entanto, com o desenvolvimento bem sucedido de alternativas mais viáveis tecnicamente, como as células fotovoltaicas, houve rápido desinteresse pelas células combustíveis microbianas.

Apenas com a ocorrência da crise do petróleo ocorrida na década de 80, renovou-se o interesse no desenvolvimento das MFCs. Poucos anos mais

tarde, Karube e colaboradores descreveram a geração de corrente elétrica de aproximadamente 300 mA a partir da *Anabaena spp*, utilizando uma MFC com ácido fosfórico como eletrólito (Karube *et al*, 1986).

Bennetto e seu grupo de pesquisa têm feito notáveis contribuições para as MFCs, tendo desenvolvido células combustíveis microbianas mais eficientes usando diversos microorganismos e sistemas *mediadores*, que são determinados compostos químicos, como quinonas e ferricianeto, que atuam como intermediários eficientes na transferência de elétrons. O uso de alguns mediadores apresenta desvantagens, como a necessidade de reposição constante e geração de resíduos tóxicos para os microorganismos (Bennetto, 1990). Recentemente, Chaudhuri e Lovley, citaram que *R. ferrireducens*, pode recuperar até 83 % dos elétrons provenientes da oxidação da glicose na presença de Fe^{3+} , sem uso de mediadores químicos (Chaudhuri e Lovley, 2003).

Um dos motivos das MFCs não serem normalmente consideradas como parte do portfólio das energias do futuro, é o fato desta tecnologia não estar suficientemente bem desenvolvida a ponto de gerar quantidades substanciais de energia com relação custo-benefício apropriada (Karube *et al*, 1986). As pesquisas de 40 anos atrás sugeriam que as MFCs poderiam ser atualmente usadas em larga faixa de aplicações, como geradores elétricos individuais para residências e como fonte de energia para dispositivos eletrônicos (Bennetto, 1990), barcos (Sisler, 1962) e robôs auto-sustentáveis (Wilkinson, 2000). No entanto, ainda não houve avanços suficientes para permitir que todas essas aplicações fossem postas em prática. Uma das aplicações pensadas, em curto prazo, para as MFCs é na sustentação de dispositivos de monitoração em locais remotos (Tender *et al*, 2002)

1.1.2 Oxidação do material orgânico

Para que ocorra a liberação de elétrons da matéria orgânica, com a atual tecnologia das MFCs, um processo anaeróbico precisa ser promovido no anodo para causar um fluxo de elétrons proveniente da oxidação da matéria orgânica, além do mais, estes elétrons devem ser transferidos para o eletrodo de maneira rápida e em proporção adequada ao funcionamento da célula.

A fermentação apresenta mecanismo bem conhecido para a oxidação anaeróbia da matéria orgânica, e, recentemente, surgiram vários estudos sobre células de combustível microbianas utilizando somente microrganismos fermentativos. Entretanto, a fermentação é um método pouco eficiente para a geração de eletricidade a partir da matéria orgânica, pois muitos dos elétrons retirados da matéria orgânica não são prontamente transferidos aos eletrodos, resultando em baixa eficiência (Liu e Logan, 2004). Os microrganismos fermentativos podem ter pouca ou nenhuma capacidade para transferência de elétrons para o ânodo (Lovley, 2008).

A oxidação efetiva de material orgânico de composição heterogênea utiliza produtos do metabolismo da fermentação de açúcares, aminoácidos e outros compostos, para a efetiva transferência de elétrons para um *aceitador de elétrons* (Lovley, 2006). Isto pode ser observado na Figura 2.

Os análogos naturais disponíveis no ambiente que mais se assemelham aos eletrodos para o metabolismo microbiano são provavelmente óxidos de Fe^{3+} , pois tanto os eletrodos como estes óxidos são receptores de elétrons incapazes de atravessar a membrana plásmica das células bacterianas. (extracelulares) A oxidação da matéria orgânica, acoplada à redução de íons Fe^{3+} em sedimentos, requer a cooperação de um consórcio de microrganismos fermentativos e microrganismos redutores de Fe^{3+} . Os microrganismos redutores de Fe^{3+} , (normalmente *Geobacter spp.*), metabolizam os produtos de fermentação e os compostos orgânicos que os microrganismos fermentativos não metabolizam prontamente, oxidando-os a dióxido de carbono, com os óxidos de Fe^{3+} servindo como receptores de elétrons (Mangrich *et al*, 2009). Este esquema está bem representado na figura 2 (abaixo).

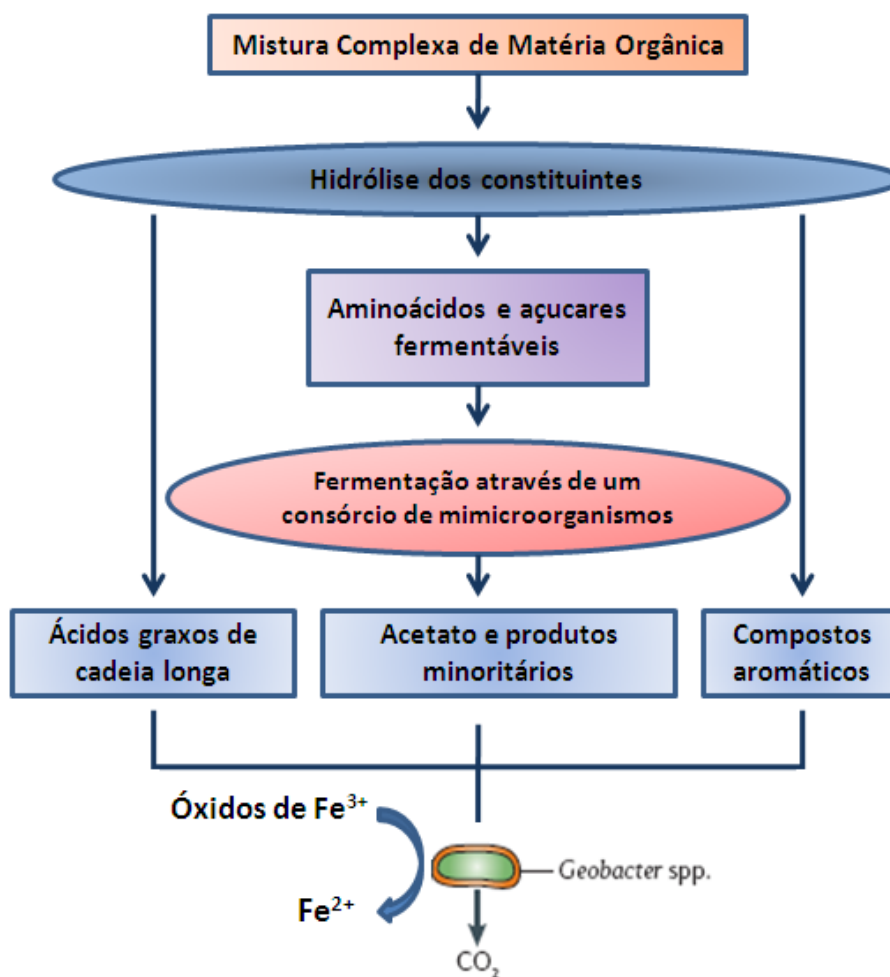


Figura 2. Rota genérica para a oxidação da matéria orgânica em dióxido de carbono, em ambientes sedimentares. (adaptado de Chaudhuri e Lovley, 2003).

Embora existam microrganismos redutores de íons férricos capazes de oxidar completamente compostos fermentáveis, como açúcares e aminoácidos, convertendo-os em dióxido de carbono, com a redução de óxidos férricos, são mais comumente encontrados consórcios de microrganismos fermentativos e redutores de óxidos férricos (Lovley *et al*, 2006), o que é explicado por considerações termodinâmicas. Obviamente, para gerar eletricidade com a oxidação da matéria orgânica, consórcios cooperativos similares são requeridos, com a diferença de que o ânodo serve como receptor final de elétrons.

Em 1996, Lovley e colaboradores descobriram um novo e importante papel biológico das substâncias húmicas no ambiente. Nesta função estão envolvidos fluxos de carbono e elétrons nos ambientes anaeróbios (Lovley *et al*, 2006). Os microrganismos oxidam os poluentes orgânicos transferindo os

elétrons resultantes para os ácidos húmicos que se re-oxidam reduzindo íons Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Mangrich e colaboradores (2009) utilizaram íons férricos e radicais livres orgânicos como “probe” de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) para avaliação do nível de poluição ambiental (Mangrich *et al*, 2009). O esquema abaixo, na figura 3, mostra a seqüência de reações envolvidas.

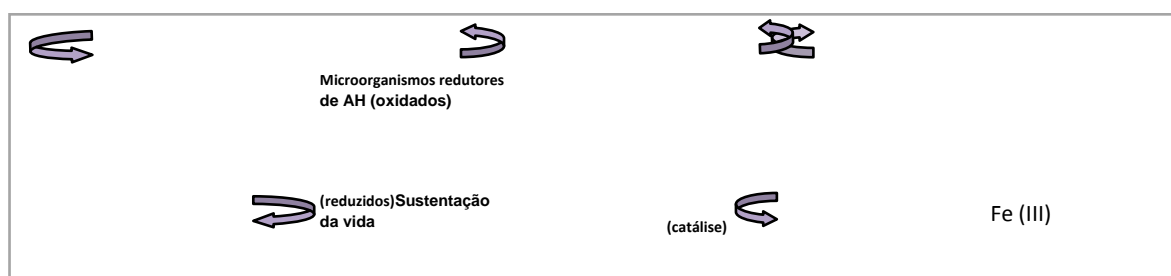


Figura 3. Proposta da função mediadora das substâncias húmicas. Na oxidação da matéria orgânica e redução do Fe (III). Adaptado de Mangrich *et al*, 2009

Esta transferência de elétrons, demonstrada no esquema da Figura 3, fornece energia para a manutenção dos sistemas de vida no local. As substâncias húmicas (SH) microbiologicamente reduzidas podem, então, transferir elétrons aos íons Fe (III) de forma abiótica. No esquema acima não é mostrada a re-oxidação anaeróbia dos íons Fe (II). Uma das reações que promovem essa oxidação é a da redução do íon sulfato a sulfeto. Assim, o cheiro de ovo podre em valas de esgoto a céu aberto não significa que tudo está perdido, mas que as bactérias estão trabalhando tentando limpar o ambiente. Nosso papel deve ser o de ajudá-las parando de poluir. Essa é uma mensagem importante resultante do conhecimento científico que se contrapõe as notícias alarmantes sobre poluição dadas pela imprensa que não animam as pessoas a agirem corretamente.

Concluiu-se que as substâncias húmicas mediam o aumento da velocidade de oxidação da matéria orgânica (MO) acoplada a redução de Fe (III) em solos e sedimentos, conforme evidenciado pelo grande estímulo da degradação anaeróbia de benzeno em sedimentos, na zona de redução de Fe (III) de um aquífero contaminado por derrame de petróleo (Lovley *et al*, 2006).

Deve-se ressaltar, no entanto, que poluente, no caso, significa qualquer composto orgânico, mesmo tido como não poluente pelos padrões atuais, mas que não seja evolutivamente próprio ao ambiente em causa. Uma bela lavoura cultivada com as regras do manejo do plantio orgânico será considerada material alienígena (poluição) e oxidada pelos microrganismos nativos daquele local.

1.1.3 Mecanismo da transferência de elétrons ou mecanismo biológico

Os microrganismos podem transferir os elétrons para o ânodo por três mecanismos: transferência direta das enzimas respiratórias (citocromos) para o eletrodo, através de mediadores externos à célula, introduzidos no meio em que os microrganismos se encontram (ferricianeto de potássio, tionina), e ainda mediadores produzidos pela própria bactéria (Bond *et al*, 2002; Min e Logan, 2004).

A transferência de elétrons para o ânodo pode ser feita de maneira direta ou indireta (Kim *et al*, 1999). A transferência direta requer contato físico dos microrganismos com o ânodo na célula. Em muitos casos os microrganismos se desenvolvem em colônia sobre a superfície do ânodo na forma de um biofilme (Pham *et al*, 2003). *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter sulfurreducens*, *Geobacter metallireducens* e *Rhodospirillum rubrum* já foram classificados como microrganismos capazes de gerar corrente elétrica em MFCs do tipo sem mediador, desenvolvendo colônias sobre o eletrodo (Bond *et al*, 2002; Pham *et al*, 2003; Katz *et al*, 2003). As bactérias presentes em MFCs sem mediadores possuem enzimas redox eletroquimicamente ativas em suas membranas, as quais transferem os elétrons para materiais externos, sem a necessidade de exógenos químicos para acompanhar a transferência de elétrons até o eletrodo (Liu e Logan, 2004). Quando estas bactérias oxidam o material orgânico presente, os elétrons são transferidos para o anodo e os prótons sofrem difusão no meio até encontrar o contra eletrodo. Oxigênio e prótons são então cataliticamente reunidos para a formação de H₂O no compartimento catódico, como demonstrado anteriormente (Grzebyk e Pozniak, 2004; Chaudhuri e Lovley, 2003).

O mecanismo de transferência direta é extremamente elegante e atraente, no entanto, esta necessidade de contato físico entre eletrodo e microorganismo é uma limitação para a obtenção de densidades de corrente maiores. Como exemplo, densidades de corrente baixas da ordem de 3 A.cm^{-2} foram citadas para uma MFC baseada na formação de biofilme de microrganismos redutores de Fe(III) *Rhodospirillum rubrum* (Logan, 2009).

Outras espécies de bactérias incapazes de realizar esta transferência direta, ou simplesmente fora de contato físico com o ânodo, devido, por exemplo, ao aumento na espessura do biofilme, podem realizar um mecanismo de transferência indireto, através de “carregadores” de elétrons. Estes mediadores podem captar os elétrons da célula ao entrar em contato com esta, reduzirem-se, e então tornar ao estado oxidado, ou “estado natural” através do contato com os eletrodos, quando então o ciclo é reiniciado. Já foi reportado um importante papel de “nanofios” produzidos pelas bactérias para o último caso, (Reguera *et al*, 2005). Por sua vez, estes mediadores podem ser naturais - produzidos pelas próprias bactérias-, ou artificiais, introduzidos no meio. O uso de mediadores artificiais está sendo abandonado (Rabaey *et al*, 2004), devido à necessidade de reposição destes nas células e também pela geração de resíduos tóxicos, mas substâncias sintetizadas naturalmente pelas células podem atuar como carregadores de elétrons (Rabaey *et al*, 2005), como é o caso da psicocianina e compostos correlatos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Rabaey *et al*, 2005; Beliaev e Saffarini, 1998) e também os nanofios, que foram relatados para ambas as espécies *Geobacter* e *Shewanella*. Pesquisas mostram que a redução do íon férrico por bactérias da espécie *Shewanella* também envolve mediadores ligados à membrana da célula, através da identificação de proteínas envolvidas na redução mineral dos óxidos férricos, presentes na membrana plásmica, periplasma e outras membranas. Esta identificação foi feita por mutagenese (Myers e Myers, 2001; Dobbin *et al*, 1995; Lower *et al*, 2001) e estudos bioquímicos (Dobbin *et al*, 1995; Lower *et al*, 2001).

Apesar dos resultados acima, o conhecimento da transferência de elétrons ainda é insuficiente para descobrir como as bactérias colonizam a superfície dos eletrodos e mantêm MFCs viáveis.

1.1.4 Nanofios.

Em 2005, Gorby e colaboradores relataram, através de estudos por microscopia de tunelamento por varredura (STM) a ocorrência de “prolongamentos” condutores para as espécies *Geobacter* e *Shewanella* (Gorby *et al*, 2005). Quase simultaneamente foi demonstrada a existência de nanofios, que foi o termo criado por Gorby para *G. Sulfurreducens*, utilizando outras técnicas de detecção (Reguera *et al*, 2005).

Já há evidências da transferência eletrônica entre espécies diferentes de microrganismos. Foi observado que bactérias da espécie *Pelotomaculum thermopropionicum* produzem minúsculas terminações condutoras que se assemelham a pelos (Park *et al*, 1999). Em culturas mistas, observou-se que as terminações podem conectar bactérias fermentativas a outras bactérias metanogênicas (*M. Thermoautotrophicus*): Essas conexões podem facilitar a transferência de elétrons entre as bactérias fermentativas, as quais necessitam recuperar esses elétrons para regenerar o NADH intracelular. Normalmente, as bactérias fermentativas transferem os elétrons na formação de gás hidrogênio, ou através da produção de outras espécies reduzidas. Entretanto, a existência de terminações condutivas possibilita a transferência de elétrons diretamente de um microrganismo a outro. Claramente, são necessários maiores estudos para verificar este fenômeno interessante.

1.1.5 Mediadores químicos.

Mediadores químicos ou “carregadores” de elétrons foram rotineiramente adicionados às MFCs para aperfeiçoar a captação dos elétrons do ciclo de oxidação. Uma variedade de produtos químicos tem sido usada para facilitar a rota dos elétrons de dentro da célula até os eletrodos. Estes mediadores incluem, por exemplo, *neutral red* (Park *et al*, 1999), 2-6,disulfato-antraquinona (AQDS), tionina, ferricianeto de potássio (Bond *et al*, 2002), violeta de metila, entre outros (Liu e Logan, 2004; Rabaey *et al*, 2005).

Há casos onde os mediadores externos não precisam ser adicionados à cultura, devido à existência de mediadores químicos endógenos (Rabaey *et al*, 2005). A produção de altas concentrações de mediadores por culturas mistas contendo *P. aeruginosa* numa MFC de resistência interna muito baixa através do uso de ferricianeto como aceitador de elétrons produziu densidade de energia de 3,1 até 4,2 W/m² (Rabaey *et al*, 2005; Tender *et al*, 2002). Em sistema de fluxo contínuo, ou em sistemas nos quais a solução é trocada após cada ciclo de geração de energia quando o substrato é exaurido, é difícil acumular altas concentrações de mediadores. No entanto, Rabaey e seus colaboradores. (2003) adicionaram substrato ao reator sem trocar a solução do compartimento anódico, o que possibilitou aumentar a concentração destes mediadores (Rabaey *et al*, 2003).

1.2 Tipos de MFCs

Quatro configurações básicas para os bio-reatores podem ser distinguidos nas MFCs:

i) ***MFC de Bioreator Desacoplado.***

Há produção microbiológica de hidrogênio ou metano, com subsequente recuperação em um bioreator separado procedido por uma célula de combustível química, geralmente operando a altas temperaturas, para converter o gás hidrogênio em eletricidade.

ii) ***MFC de Bioreator Integrado.***

Há produção microbiológica de hidrogênio e conversão em eletricidade em apenas uma célula.

iii) ***MFC com transferência direta de elétrons.***

Há geração de eletricidade com o uso de microrganismos e transferência direta do elétron para o ânodo.

iv) ***MFC com mediador para a transferência de elétrons.***

Há geração de eletricidade através dos microorganismos e transferência do elétron para o ânodo por meio de um “carregador” de elétrons funcionando como mediador.

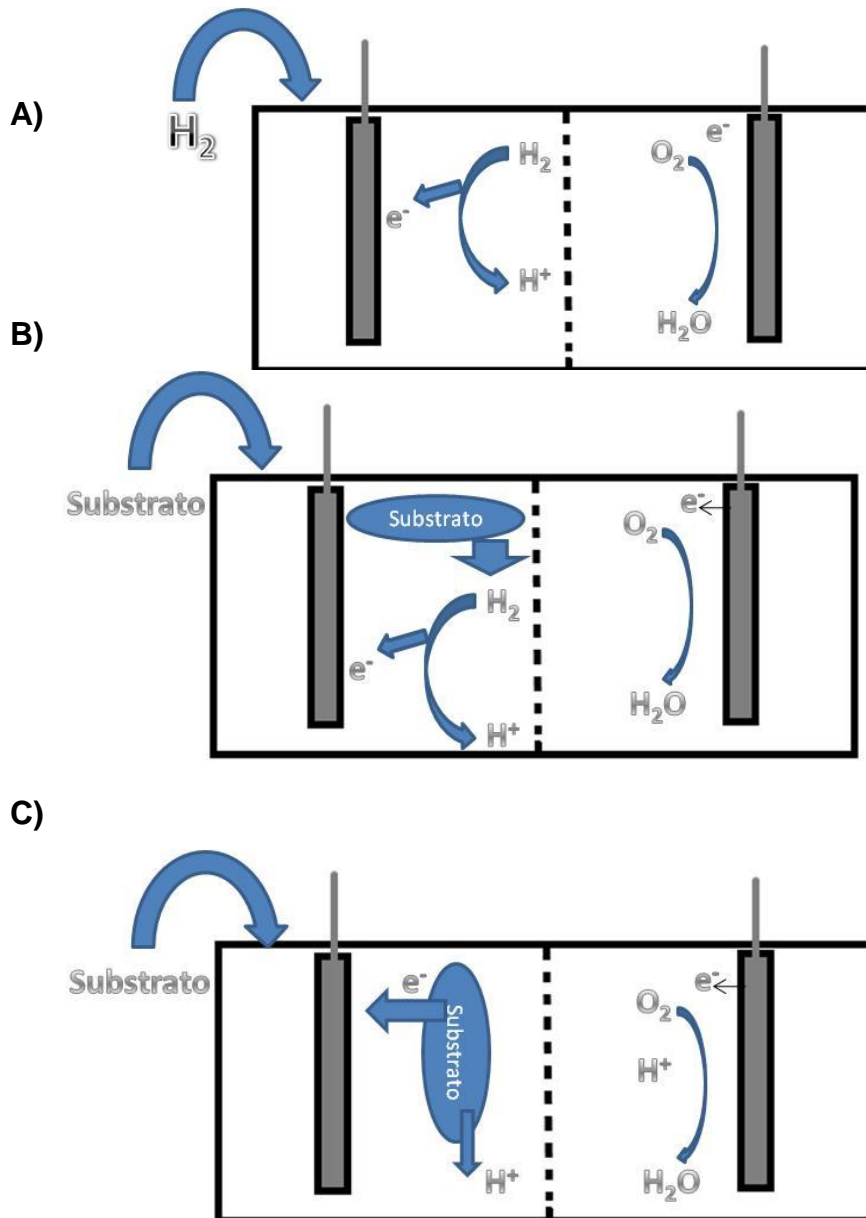


FIGURA 4. Configurações típicas para as mfcs. (a) MFC de bioreator desacoplado em um bioreator seguido por uma célula de combustível química. (b) MFC de bioreator acoplado. (c) MFC com interação ânodo-bactéria.

1.3 Fatores que Influenciam o Rendimento das MFCs

O desempenho das MFCs pode ser influenciado por vários fatores. Dentre eles, as constantes de oxidação e transferência do elétron dos microrganismos para o eletrodo, a resistência do circuito, transporte do próton para o cátodo através da membrana, e o fornecimento de oxigênio e a sua redução no cátodo (Gil *et al*, 2003). No estudo de Gil, (2003) e seus colaboradores, foi feita a tentativa de otimização das condições acima. Observações por microscopia eletrônica mostraram a formação de um grosso biofilme de microrganismos no ânodo da célula combustível, em aglomerações fracamente associadas ao eletrodo.

Desde que os microrganismos atuam como catalisadores na transferência de elétrons do substrato para o ânodo, a seleção de consórcio de microrganismos de alta performance, seja cultura pura ou mista, é de crucial importância nas MFCs.

1.4 Potenciais Aplicações Das MFCs

1.4.1 Sensores ambientais

O conteúdo de material orgânico em uma solução é normalmente avaliado em função da demanda biológica de oxigênio (DBO). Os métodos clássicos para a determinação da DBO demoram de 5 (DBO₅) a 7 (DBO₇) dias de incubação em recipiente ao abrigo da luz (APHA,1992; SIS 1979). DBO₅ e DBO₇ são bons métodos para avaliação da qualidade de águas e esgotos, são baratos e aplicáveis a uma ampla faixa de amostras, no entanto, o tempo de análise os torna tediosos e demorados para a obtenção de resultados reprodutíveis. O princípio das MFCs pode ser aplicado à construção de biosensores para determinação rápida da demanda biológica de oxigênio (DBO), com os microrganismos atuando como sensores e a corrente elétrica ou potencial gerado atuando como indicadores. Já foi desenvolvido um biosensor no qual microrganismos atuam como catalisadores da oxidação de material orgânico, transferindo elétrons para o ânodo (Kumlanghan *et al*, 2007). A resposta do sensor construído manteve-se linear até a concentração de 25 g.L⁻¹, com limite de detecção de 0,025 g.L⁻¹ de glicose.

1.4.2 Tratamento de resíduos agroindustriais

Um modo de diminuir os custos do tratamento de esgoto animal e industrial é gerando quantidades apreciáveis de bioenergia, na forma de gás hidrogênio ou metano, a partir da matéria orgânica contida no esgoto, através de algum tratamento acoplado (Kim *et al*, 2004). O processamento de águas residuais, para a produção de hidrogênio foi testado usando bactérias fermentativas em vários tipos de processos (Kumlanghan *et al*, 2007; Das e Veziroglu, 2001; Yu *et al*, 2006; Oh e Logan, 2005). Entretanto, estes processos não têm sido muito utilizados, devido à baixa recuperação de energia da matéria orgânica (1,4 - 2,5 mols de hidrogênio por mol de hexose) e elevados custos operacionais (Liu e Logan, 2004; Oh e Logan, 2005).

Efluentes provenientes das indústrias de processamento de alimentos ou vindos da pecuária de animais em regime de confinamento são poluentes ambientais ideais para o bioprocessamento, pois contém altos níveis de material orgânico facilmente degradável, cujo resultado é um saldo positivo de energia ao final do processo. Como efluentes são fontes potenciais de energia, a recuperação desta ou a transformação destes efluentes em subprodutos úteis pode reduzir o custo do tratamento e, em alguns casos, diminuir também a nossa dependência dos combustíveis fósseis.

1.4.3 Geração de energia elétrica

A produção de energia na forma de eletricidade é a aplicação mais óbvia e direta das MFCs. Já foram desenvolvidas MFCs que podem gerar eletricidade diretamente de sedimentos marinhos, lodo digestivo anaeróbio, águas de resíduos alimentares e esgoto doméstico. A quantidade de energia gerada depende do tipo de reator e da fonte específica de matéria orgânica. Conforme já citado, essas células podem funcionar como fontes de energia auto-sustentáveis por longos períodos de tempo em áreas remotas, fornecendo energia elétrica *in situ* para pequenos aparatos elétricos, como sensores *on line* e transmissores de dados, por exemplo, em alto mar. Para contornar o problema de

tensão e corrente elétricas baixas, capacitores e conversores podem ser utilizados (Van Ginkel *et al*, 2005). Este princípio foi recentemente demonstrado com uma SMFC (MFC do tipo sedimentar), que manteve em funcionamento um sensor meteorológico e seu transmissor de dados, consumindo aproximadamente 18 mW. Isto foi possível graças a aplicação de um estabilizador de voltagem e um capacitor (Tender *et al*, 2002).

A produção de cerveja consome grandes quantidades de água, utilizando aproximadamente 7 L de água para cada litro de cerveja produzido. Geralmente, esta água é usada nas atividades de lavagem e o esgoto é tratado antes de ser descartado no meio ambiente. A re-utilização desta água não é comum neste tipo de indústria, devido aos problemas de aceitação pública e possível deterioração na qualidade do produto final. O tratamento e disposição corretos destes rejeitos são um sério problema ambiental. Este tipo de resíduo não é muito tóxico, mas possui elevados valores de DQO e DBO, quando comparado a outros tipos de esgotos industriais. Geralmente, são adotados métodos biológicos para o tratamento deste tipo de esgoto, com objetivo de diminuir a DQO (Ince *et al*, 2000, Parawira *et al*, 2005).

O principal problema destes tratamentos é a alta quantidade de energia gasta, consumida principalmente nos processos de aeração do resíduo. Devido a isto e ao aumento da rigidez das leis de tratamento e disposição de resíduos, alternativas estão sendo estudadas para reduzir, reciclar e recuperar energia destes esgotos, com elevados níveis de DQO e DBO, dentre os quais se destaca a utilização em MFCs,

1.4.4 Tratamento de esgoto

As MFCs constituem uma tecnologia promissora para o tratamento de esgotos, como um método de recuperar energia na forma de hidrogênio ou eletricidade, ao mesmo tempo em que se produzem condicionadores orgânicos de solos para a agricultura. Na década de 90, Kim e seus colaboradores demonstraram que as bactérias podem ser usadas como maneira de determinar a concentração de lactato em solução (Kim *et al*, 1999) e que uma MFC pode ser sustentada por resíduos industriais. Entretanto, a quantidade de energia

produzida foi baixa e não ficou claramente definido que o uso das MFCs pode reduzir significativamente o nível de material orgânico no esgoto utilizado. Em 2004, houve uma mudança na relação entre produção de energia elétrica e tratamento de esgoto, quando foi demonstrado que esgoto doméstico pode ser tratado em níveis práticos paralelamente à geração de energia elétrica. A quantidade de energia gerada no estudo, apesar de baixa, pode ser considerada alta em relação aos estudos anteriores. Pesquisa feita por Reimers e seus colaboradores em 2001 havia demonstrado poucos anos antes que os materiais orgânicos e inorgânicos presentes em sedimentos marinhos podiam ser usados em um novo tipo de MFCs, com o uso de variedade de substratos, materiais e novos arranjos estruturais na construção das mesmas (Reimers *et al*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Tendo em vista a necessidade de novas fontes de energia, e como as MFCs são uma fonte alternativa promissora e ainda pouco estudada, com o presente trabalho pretende-se estudar, comparativamente, células eletroquímicas microbianas, utilizando resíduos agroindustriais. O objetivo principal é realizar estudos versando sobre a utilização destes resíduos na produção de energia elétrica.

Além do monitoramento da quantidade de energia e tensão geradas, serão retiradas amostras a intervalos regulares do material orgânico para acompanhamento químico do processo de degradação. O estudo será realizado através da aplicação de diferentes técnicas de análises qualitativas e quantitativas, de constituintes orgânicos e inorgânicos das amostras para monitoramento de fatores essenciais no processo de degradação.

2.2 Objetivos Específicos

1. Tratamento de resíduos agroindustriais concomitante à produção de energia elétrica.
2. Montar uma MFC sem mediador de transferência de elétrons, usando eletrodos de grafite como cátodo e ânodo;
3. Desenvolver programa de computador para usar no monitoramento da MFC.
4. Montar sistema informatizado de coleta e tratamento de dados de uma MFC com possibilidade para gerar tecnologia para esse fim.
5. Caracterizar e avaliar, através de métodos químicos (DQO) e espectroscópicos as amostras retiradas a intervalos de tempos regulares das células.
6. Identificar as variáveis que interferem na geração de energia elétrica e fazer a otimização destes fatores.
7. Montar e monitorar uma MFC usando membrana náfion e resíduos de indústria cervejeira como substrato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

3.1.1 Amostragem dos solos

As amostras de solos utilizadas no presente trabalho foram coletadas em perfil de solo em diferentes profundidades. A coleta foi feita em São Mateus do Sul (PR), na área experimental da EMBRAPA Clima Temperado localizada na unidade da PETROBRAS/SIX. Estas amostras foram utilizadas nas MFCs que tinham solo com separador entre cátodo e ânodo. No entanto, como a caracterização do solo a diferentes profundidades foge ao escopo deste trabalho, foram utilizadas neste estudo apenas amostras retiradas a 50 cm de profundidade.

3.1.2 Esterco suíno

Os resíduos foram coletados em uma chácara dedicada à criação de suínos em Araucária - PR, acondicionados em recipientes previamente esterilizados por autoclavagem e mantidos sob refrigeração a 4°C até o momento da sua utilização nas respectivas MFCs.

3.1.3 . Resíduos de cervejaria

Os resíduos de indústria cervejeira mencionados neste trabalho referem-se às amostras gentilmente cedidas por uma empresa local. Os resíduos foram coletados diretamente da unidade de tratamento de esgotos da unidade situada em Curitiba-PR, acondicionados em recipientes previamente esterilizados por autoclavagem e mantidos sob refrigeração a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da sua utilização nas respectivas MFCs.

3.2 Caracterização das Amostras

3.2.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR) por transmitância e por refletância difusa (DRIFT)

Os espectros por transmitância foram registrados em espectrofotômetro Bomem FTIR, série MB₁₀₀, utilizando-se pastilhas preparadas com misturas de aproximadamente 1 mg de amostra e 99 mg de KBr de grau espectroscópico (FTIR). Para as medidas de DRIFTS foram utilizados o material não prensado e o acessório “Gemini Difuse Reflectance Sampling Head”. Para cada espectro foram somadas 256 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹, na região de 4000 a 400 cm⁻¹.

3.2.2 Espectroscopia de ultravioleta e visível por reflectância difusa (DRUV-VIS)

As análises de amostras sólidas foram realizadas utilizando-se espectrofotômetro Shimadzu UV-2401PC equipado com o acessório, esfera de integração 240-52454-01. Estas análises foram realizadas no LabPPAm, Depto. de Química, UFPR.

3.2.3 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Os espectros de EPR foram registrados em temperatura ambiente (~ 300 K) e de N₂ líquido (77 K), em espectrofotômetro Bruker EMX operando em banda-X (9,5 GHz), empregando 100 kHz de frequência de modulação (LABEPR/DQ/UFPR). Os dados de EPR obtidos foram submetidos à simulação e tratamento com auxílio dos programas Win-EPR[®] e SimFonia[®], e o padrão weak pitch disponíveis no LABEPR.

3.2.4 Difratometria de raios-X (DRX)

Para esta análise, as amostras no estado sólido foram colocadas em porta amostras com 25 mm de diâmetro e analisadas em difratômetro Shimadzu

XRD-6000, utilizando radiação Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) com parâmetros de alimentação elétrica de 40 kV e 40 mA. Os ângulos de varredura, variando de 10 a 80° (2 θ) foram regist

3.3 Análises Estatísticas dos Dados

Os dados experimentais obtidos foram tratados e analisados utilizando-se o programa Origin 6.1[®] e MATLAB 6.5[®]. Também foram analisados os dados fornecidos pelo software desenvolvido para monitoramento das células.

3.4 Medidas de Corrente Elétrica e Potencial (ddp)

O controle destes parâmetros foi feito utilizando-se um multímetro digital, marca *minipa*, modelo *ET1501*, o qual possui limite de sensibilidade na ordem de microAmperes. A partir das células usando solo como fonte de substrato orgânico, foi utilizado controle automatizado, utilizando-se o sistema desenvolvido durante esse trabalho, para as medidas de potencial elétrico.

3.5 Montagens dos Diferentes Tipos de Células

3.5.1 Célula sedimentar I

Como primeiro teste, foi montada uma aparelhagem para verificar a viabilidade dos experimentos. Inicialmente foi feita uma montagem bastante simples, utilizando béquer e eletrodos de grafite retirados de pilhas secas comuns, tamanho grande. Esterco suíno foi utilizado como substrato orgânico, em parte devido à grande percentagem de matéria orgânica contida neste material, e também devido ao problema ambiental gerado pela grande quantidade deste rejeito, na suinocultura de confinamento. Foi montada uma MFC sem uso de mediadores químicos introduzidos ao meio de cultura, usando substrato sólido, ao invés de solução, pois desta maneira, devido à separação natural entre a solução eletrolítica e o material orgânico, elimina-se a

necessidade de agitação e também é desnecessário o uso de membranas separadoras.

3.5.1.1 Preparação dos eletrodos para a célula sedimentar I

Foram usados eletrodos de grafite cilíndricos, embora a área superficial dos eletrodos não seja a maior possível, e esta interfira na quantidade de elétrons recuperada (magnitude da corrente elétrica), estes eletrodos foram úteis nessa primeira fase. Os pólos de grafite foram retirados das pilhas elétricas usadas e conectados a um fio de cobre, utilizando resina polimérica como suporte, conforme pode ser visto na representação esquemática abaixo:

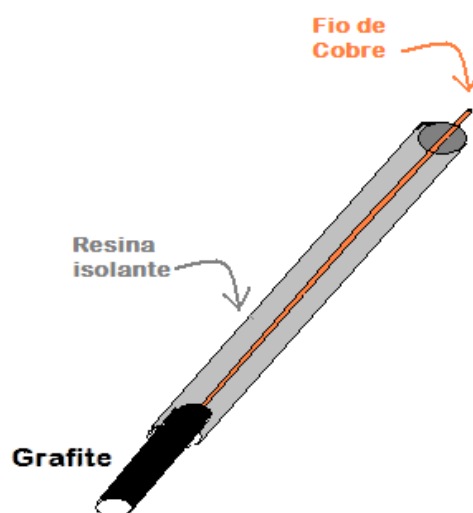


Figura 5. Representação esquemática do eletrodo usado durante os testes com a célula sedimentar.

3.5.1.2 Montagem da célula sedimentar I

Como pode ser visto nas fotos (Fig. 6), um dos eletrodos (ânodo), foi colocado em contato direto com o material orgânico (esterco suíno, 350 g) depositado no fundo de um béquer de 1L, o qual foi quase preenchido com 800 mL de solução K_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, atuando como eletrólito de suporte. O outro eletrodo (cátodo), foi mantido em contato com a solução, é neste eletrodo que ocorre a redução do O_2 dissolvido na água. Neste teste, periodicamente a água foi aerada, para manter o teor de oxigênio, no entanto, não foi usada oxigenação contínua. O potencial e a corrente elétrica foram medidos a intervalos regulares de tempo.



Figura 6. Célula eletroquímica do tipo sedimentar utilizando esterco suíno como fonte de material orgânico.

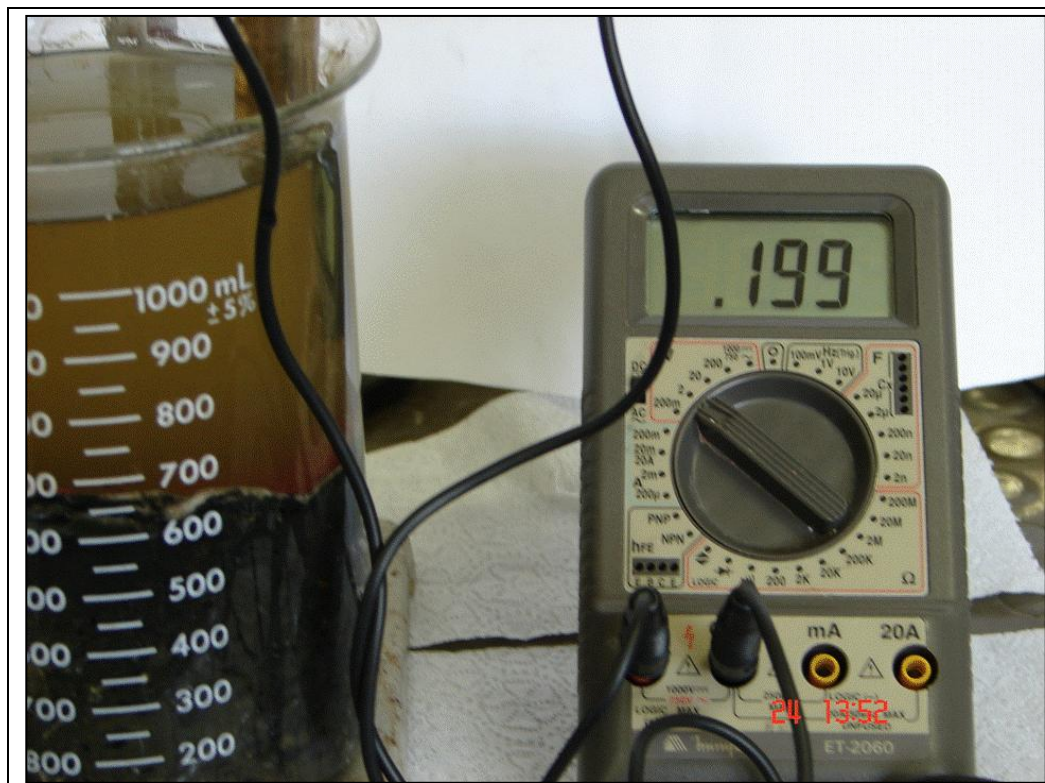


Figura 7. Célula eletroquímica sedimentar utilizando esterco suíno como fonte de material orgânico. Detalhe para o potencial elétrico visto no voltímetro

3.5.2 Montagem da Célula Sedimentar II - MFCs ligadas em série

Após 14 dias controlando os parâmetros do primeiro protótipo, verificada a aplicabilidade do experimento, foi montada uma MFC funcionando sob o mesmo princípio, mas composta por várias MFCs em um arranjo um pouco diferente, estas unidades foram ligadas em série, como vemos na figura 8 com objetivo de aumentar o potencial elétrico gerado. Mais uma vez, o material orgânico utilizado foram amostras de esterco suíno.

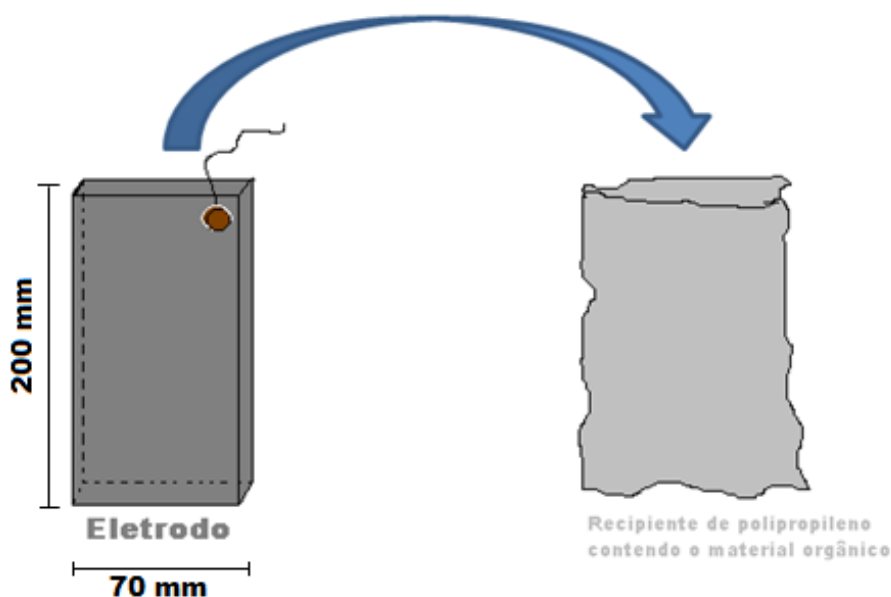


Figura 8. Representação esquemática dos eletrodos introduzidos nos recipientes de polipropileno contendo o material orgânico em decomposição.

Neste caso, foram usadas como eletrodos placas retangulares de grafite sólido, nas dimensões de 70 x 200 mm, adquiridas da empresa *Carbono Lorena SP*. Para maior aproveitamento da área das placas, o material orgânico foi disposto em “saquinhos” confeccionados com membranas de polipropileno poroso, a mesma usada em baterias automotivas, do tipo chumbo ácidas (Fig. 9). Aliás, a montagem destas células foi inspirada na engenharia das baterias automotivas. Foi utilizada oxigenação forçada, usando 2 bombas comuns de aquário com capacidade para 20 L h⁻¹, adquiridas no comércio local. O fluxo de ar fornecido por estas duas bombas foi dividido entre os quatro compartimentos da célula (ligados em série), fornecendo uma taxa média de 10 L.h⁻¹ em cada compartimento.

Periodicamente, foram lidos e anotados os valores de potencial gerado e a magnitude da corrente elétrica. Após a ambientação da célula por 24 horas, foi introduzido no sistema um dispositivo capaz de dissipar a energia elétrica gerada, no caso, *leds* que passavam a emitir luz quando o potencial fornecido fosse no mínimo 1,5 V.



Figura 9 . Configuração da MFC composta por várias unidades individuais ligadas em série.

3.5.2.1 Configuração dos *Leds* usados como dissipadores de energia

A figura 10, abaixo, mostra como foi montada uma pequena placa contendo três diodos emissores de luz (*leds*). Através da configuração dos fios que eram ligados aos pólos positivo e negativo da bateria, foi possível escolher a quantidade de *leds* que eram ligados ao sistema. De acordo com o número destes dispositivos que são ligados ao sistema, é exigida maior ou menor quantidade de corrente elétrica para manter a placa em funcionamento.

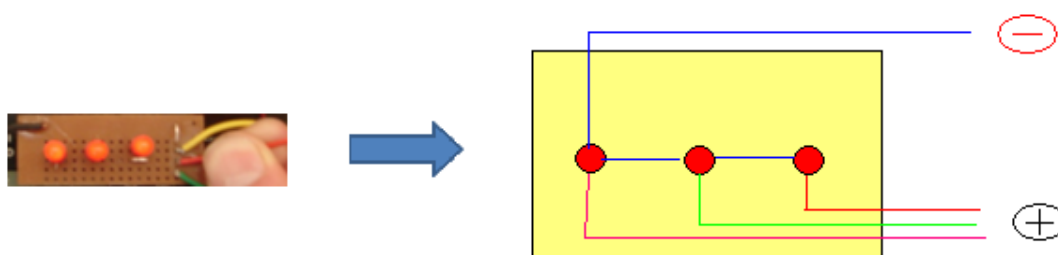


Figura 10. Configuração da placa contendo os *leds* usados como dissipadores de energia.

3.6 Montagem da Célula Sedimentar Usando Solo Como Separador (Célula Sedimentar III)

Com objetivo de aumentar a sensibilidade à variações na célula, e prevenindo possível contaminação de pessoas devido ao substrato orgânico utilizado, foram montadas células utilizando quantidades de solo como separador entre o cátodo e ânodo, às quais foram adicionadas quantidades variáveis de acetato de sódio, a fim de enriquecer o teor de material orgânico. Foram usados eletrodos de grafite novamente, os quais atados a fios de cobre, sendo que as conexões entre estes foram isoladas com resina de silicone. A Figura 11 trás a representação esquemática da montagem desta célula, e, abaixo, encontram-se as especificações principais do recipiente e dos eletrodos anódico e catódico utilizados.

Especificações:

- Área do cátodo: 10.56 cm^2
- Área do ânodo: 13.2 cm^2
- Massa de solo: 126,3 g
- Volume de sol. Tampão (pH 7) : 175 mL]

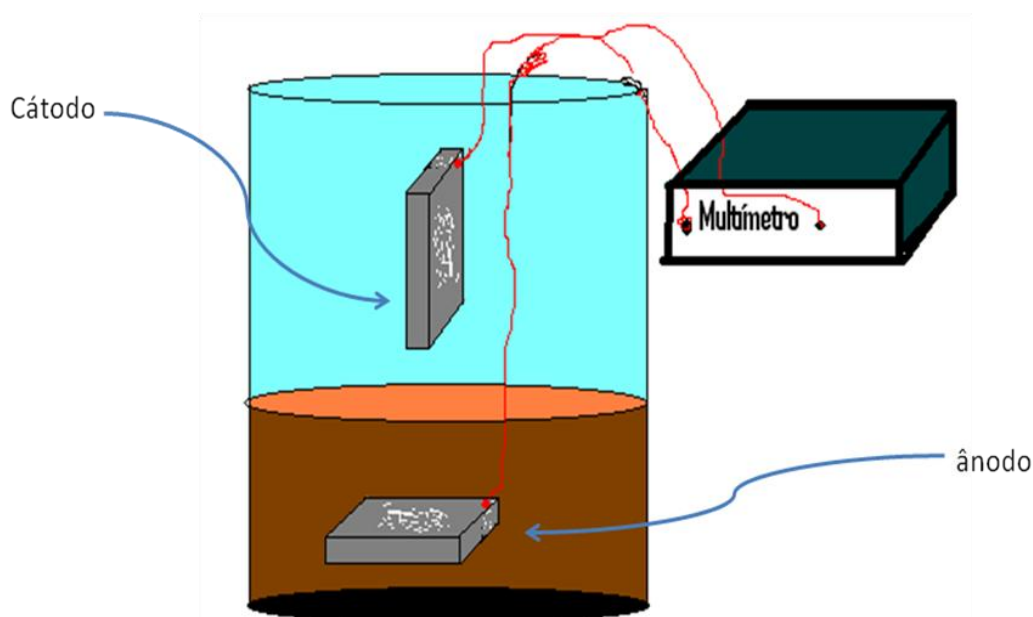
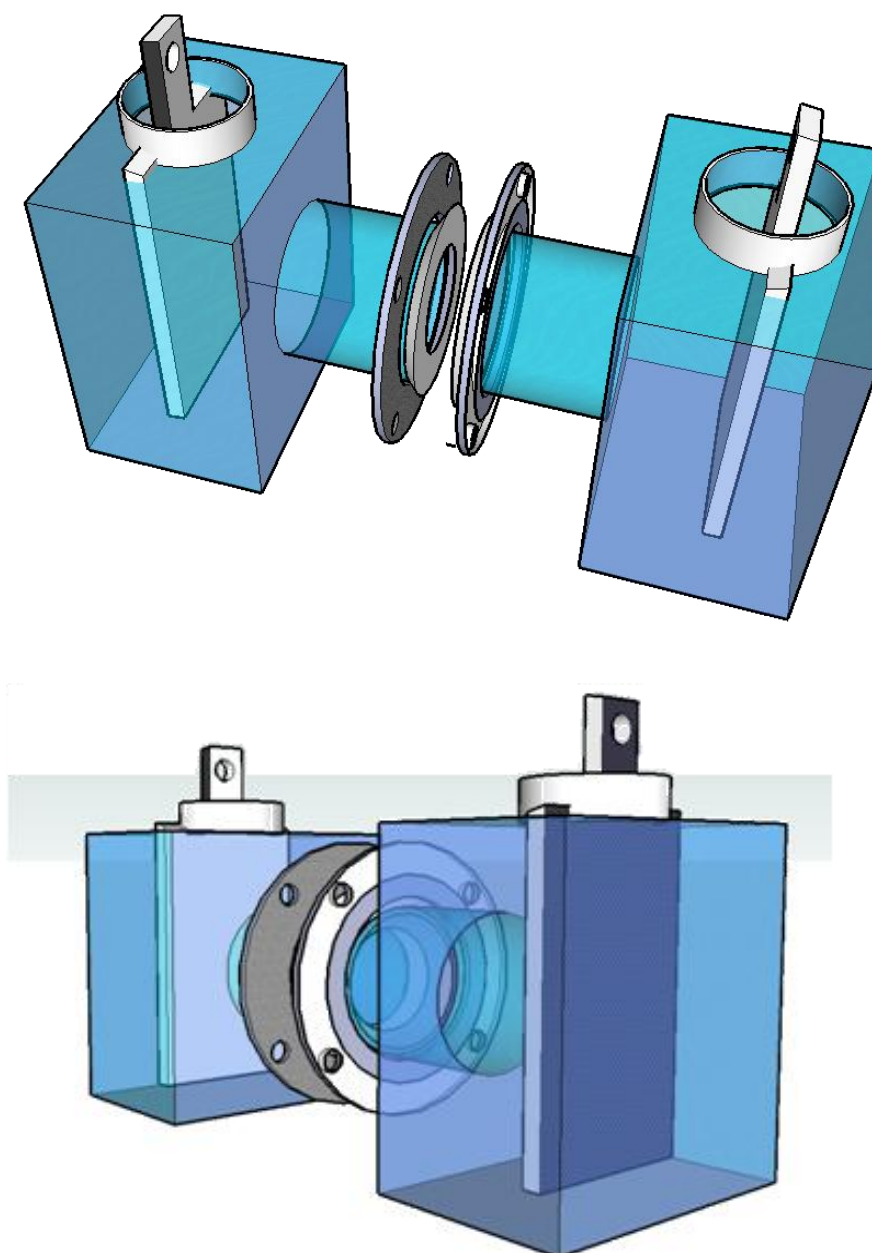


FIGURA 11. ESQUEMA DAS CÉLULAS UTILIZANDO SOLO COMO SEPARADOR

3.7 Montagem Da MFC De Duas Câmaras Com Membrana Separadora

As figuras abaixo mostram como foi montada uma célula de duas câmaras, conforme citada na introdução deste trabalho. Foram usados novamente placas de grafite como eletrodos para o cátodo e anodo, e as conexões foram feitas com fio de cobre, isolados por resina de silicone. Cada uma das câmaras possui um volume de 300 mL, e foi confeccionada com frascos simples de plástico. Entre o cátodo e o ânodo foi introduzida uma membrana separadora náfion, para impedir a difusão do oxigênio para o interior do ânodo.



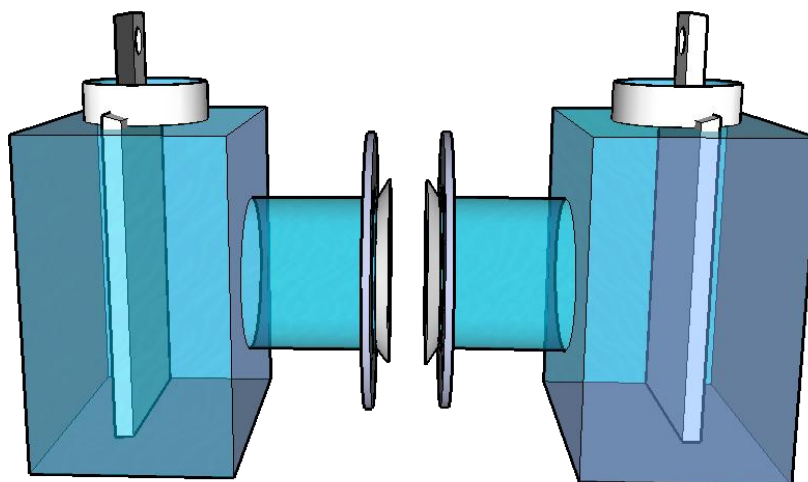


Figura 12. Representação tridimensional da célula de duas câmaras.

3.8 Culturas De Microorganismos Para a Célula Sedimentar II e para a Célula De Duas Câmaras

Quarenta gramas de amostra de solo, as quais devem conter os microorganismos de interesse, foram distribuídos igualmente em 4 tubos de ensaio. A cada tubo foi adicionado 10 mL de solução tampão “phosphate buffer solution” (PBS). As amostras foram submetidas a centrifugação à 4000 rpm durante quatro minutos. O sobrenadante foi recuperado e novamente centrifugado a 4000 rpm durante 4 minutos. Desta vez, o sobrenadante foi descartado e o precipitado recuperado e armazenado em solução tampão PBS a -4° C em geladeira. 1 ml desta solução foi adicionado a cada tubo de ensaio contendo meio de cultura (descrito a seguir), os quais foram incubados por 7 dias em estufa a 37° C. Antes do uso e da incubação dos microorganismos, todas as soluções e frascos utilizados foram esterilizados em autoclave por 40 minutos a 1,3 atm. Sempre que era necessária a abertura de algum frasco autoclavado, a bancada era limpa com álcool 70 %, um bico de Bunsen era aceso sobre a bancada, após passados 5 minutos, no mínimo, os frascos eram abertos e todo o trabalho realizado na região próxima ao fogo, visando desta maneira trabalhar em ambiente esterilizado.

3.8.1 Meio de cultura

Em balão volumétrico, foram adicionados 0,5 g de peptona, 0,25 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl , 1 g de agar-agar e 1,2 g de citrato férrico. Foi realizada autoclavagem deste meio a 1,3 atm e 121 °C durante 20 minutos.

3.8.2 Preparação de meio de cultivo e inoculação de microorganismos redutores de SO_4^{-2} e Fe(III) a serem usados na célula de duas câmaras com membrana separadora náfion.

Foram preparados os meios de cultura para inoculação das bactérias sulfato redutora e ferro redutoras, com vistas a utilização destas na célula microbiana de duas câmaras. Em balão volumétrico de 100 mL, foram adicionadas as quantidades de reagentes descritas abaixo, logo após, o volume foi preenchido até a marca com água deionizada:

i) Bactérias Sulfato redutoras:

- 0,015 g de glicose
- 7mL de lactato de sódio
- 0,1 g de extrato de carne
- 0,2 de peptona de carne
- 0,15 g de Na_2SO_4
- 0,05 g de K_2HPO_4
- 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,01 g de CaCl_2

ii) Bactérias Ferro redutoras

- 0,005 g de KCl
- 0,05 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,005 g de fosfato de potássio dibásico

- 0,001 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

- *(1) 0,392 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - * (2) 0,1 g de ascorbato de sódio

Para os dois meios de cultura, foi realizado o seguinte procedimento: As quantidades dos reagentes acima descritas foram colocadas em um erlenmeyer de 250 mL, ao qual foram adicionados 100 mL de água deionizada e levados à autoclave para esterilização por 20 minutos. Para os reagentes assinalados acima com * (ascorbato de sódio e sulfato ferroso amoniacal) foram preparados a parte, apenas 50 mL, e esterilizados em membrana *Millipore*. Foram preparados também 50 mL de solução de $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10% m/m.

i) Bactérias Sulfato redutoras:

Como as bactérias nas quais se está interessado são basicamente anaeróbias, realizou-se o seguinte procedimento de modo a evitar a presença de oxigênio no meio de cultura: em um tubo de ensaio com tampa rosqueável de 30 mL foram colocados 15 mL do meio de cultura previamente preparado e foi novamente realizada a esterilização em autoclave por 20 min a 1 Atm. As soluções de sulfato ferroso amoniacal e ascorbato de sódio foram esterilizadas em seringa *Millipore* (membrana de 45 micrometros) e adicionadas ao meio na razão de 0,1 mL para cada 10 mL de meio de cultura. Foi também adicionada uma alíquota de solução contendo as cepas de bactérias fornecidas pelo estudante de Mestrado Paulo Roberto Marangoni, do laboratório de Microbiologia da UFPR, onde foram realizadas a cultura e o isolamento das bactérias.

O tubo de ensaio foi completamente preenchido com meio de cultura também esterilizado por autoclave. A seguir foi vedado através da inserção de uma rolha de borracha na qual estava inserida uma agulha hipodérmica (ambos esterilizados). A presença da agulha permite que parte do líquido escape, o que torna possível que seja retirado a maior parte do O_2 não dissolvido presente no tubo. A agulha foi retirada e a tampa rosqueada, cortando as bordas da rolha que ficaram para fora do tubo. Procedeu-se à incubação em estufa a 36°C , e o crescimento da cultura foi verificado diariamente para acompanhamento.

ii) Bactérias Ferro redutoras:

Em um balão volumétrico de 100 mL, previamente esterilizado, foram acrescentadas as quantidades já descritas dos reagentes e o volume foi completado com água deionizada. O meio foi esterilizado por 20 min em autoclave a 1 atm e 121 ° C, após isto, foram adicionados 10 mL da solução de $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O pH foi fixado em exatos 3,5 com HCl 1 mol L⁻¹. Em ambiente estéril, o meio de cultura foi distribuído em 10 tubos de ensaio de 10 mL, os quais foram então autoclavados por 15 minutos nas mesmas condições acima. Após o resfriamento, foi adicionado a cada amostra 1 mL da solução contendo cepas das bactérias extraídas das amostras de solo, conforme o procedimento já descrito. Os tubos foram vedados da mesma maneira que em (i) e mantidos em estufa de CO₂ à temperatura de 36° C para verificar se realmente haverá crescimento da colônia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 Montagem I. Célula Sedimentar I.

Abaixo, são apresentados os gráficos demonstrando o potencial e a corrente elétrica gerada pela montagem da primeira MFC, onde não havia membrana separadora entre a solução do eletrólito e o sedimento (esterco suíno). Deve ser feita ressalva, pois no primeiro gráfico, o tempo inicial corresponde a 48 h após o início do experimento (não foi feita inoculação de microorganismos, mas sim utilizados as bactérias naturalmente presentes no substrato orgânico). Devido à pequena área dos eletrodos usados, e também ao volume reduzido de solução do eletrólito, já eram esperados valores discretos de corrente elétrica produzida, como podemos ver na figura 13, o máximo valor de corrente obtida foi de 0,036 mA.

Nas primeiras 48 horas, praticamente não houve aumento no potencial elétrico gerado, tendo este se mantido muito próximo a zero. Após este período, os valores para o potencial elétrico da célula aumentam devido à atividade microbiana e estabilizam em aproximadamente 150 mV, após um período de 50 h, a corrente elétrica se mantém em torno de 0,03 mA.

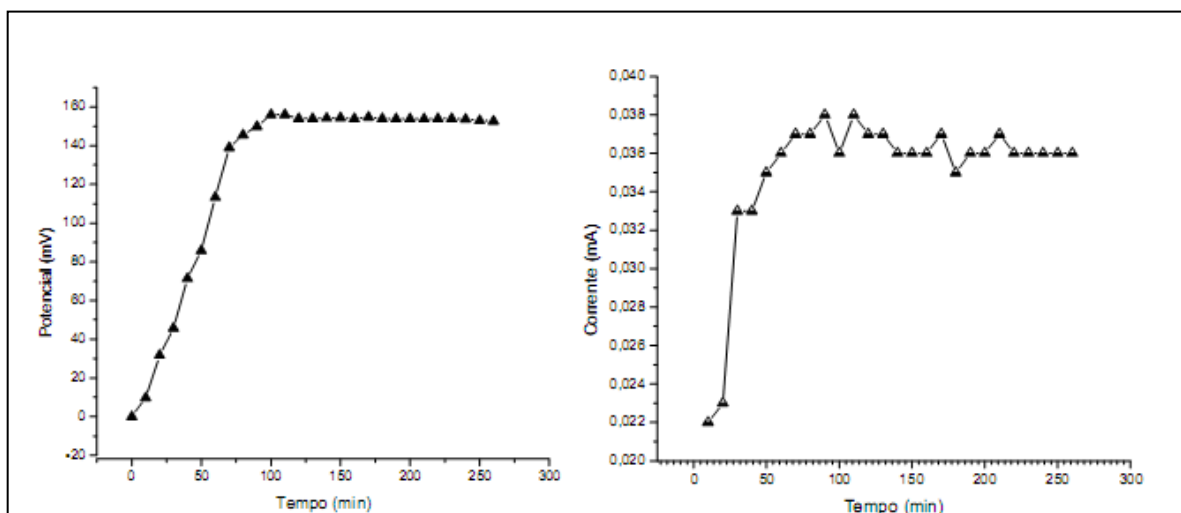
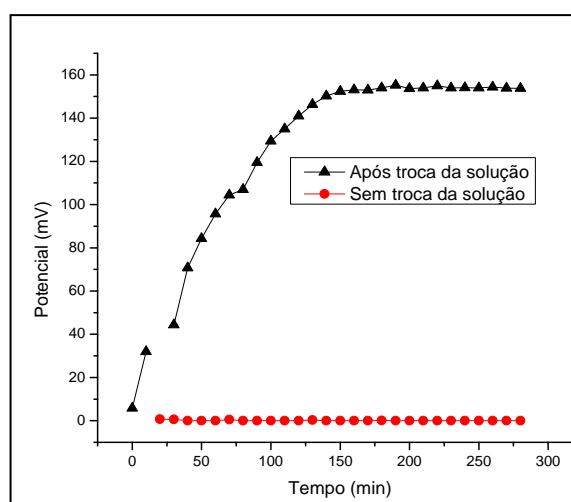


Figura 13. (A) Potencial elétrico de equilíbrio desenvolvido e (B) Corrente elétrica. Medidos nos primeiros 300 minutos, sem oxigenação do sistema.

Esta primeira montagem serviu para confirmar a teoria e a funcionalidade das células combustíveis microbianas utilizando este tipo de substrato.

Na Figura 13, gerada após 48 horas do início do experimento, percebe-se estabilização do potencial elétrico em aproximadamente 150 mV, o que justifica-se, provavelmente, pela limitação do crescimento da colônia de bactérias sobre o eletrodo que atua como ânodo. A demora para obter corrente mensurável deve-se ao tempo de estabelecimento da colônia no eletrodo.

(A)



(B)

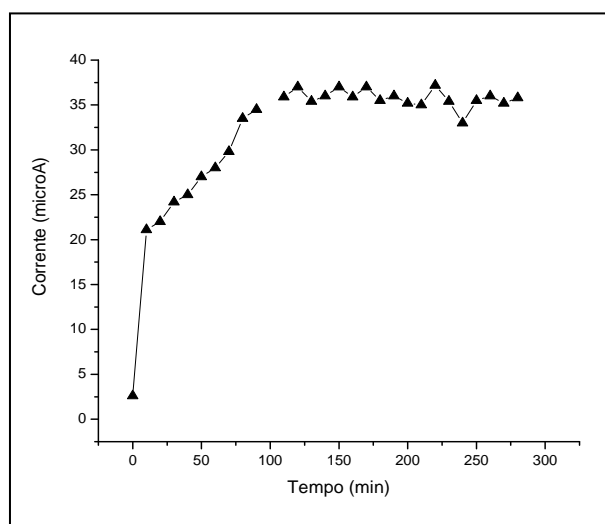


Figura 14. (A) Potencial elétrico de equilíbrio desenvolvido e (B) corrente elétrica medida após realizar a re-oxigenação da solução.

Na figura 14, gerada após mais 48 horas, observamos a influência do oxigênio sobre os valores da diferença de potencial da célula. Podemos observar pela linha vermelha (Fig. 14A), que os valores de potencial e corrente elétrica passaram a decrescer à taxa constante, até chegar próximo de zero. Isto é atribuído ao consumo do oxigênio disponível no sistema, pois em seguida, ao ser injetado ar na solução, o valor do potencial novamente aumentou. Foi feita então a substituição da solução eletrolítica por nova solução, com mesma concentração de eletrólito, e novamente verificou-se o padrão de aumento no potencial e de corrente elétrica. Após re-oxigenação da solução, o comportamento do sistema foi muito semelhante, quanto às medidas de potencial e corrente elétrica, novamente, o potencial atingiu o valor aproximado de 150 mV após 3 horas da re-oxigenação, e a corrente elétrica manteve-se um pouco abaixo dos 40 uA, como observado na Figura 14B.

4.2 Montagem 2. MFCs em Série

4.2.1 Células sedimentares em série utilizando esterco suíno

Após a montagem das células como já descrito no item 3.5.2, foram feitas medidas do potencial diariamente. As quatro células operaram por 90 dias, tempo após o qual a voltagem passou a diminuir a uma taxa constante, provavelmente devido a necessidade de reposição do material orgânico. Nos dois primeiros dias, não foram feitas medidas de potencial, para equiparar as condições da primeira célula. Foi obtido potencial comparável a uma pilha AA comum. A voltagem máxima produzida foi de 1,589 V, e a média das voltagens ficou em torno de 1,5 V. Vale frisar que este valor é 10 vezes superior ao potencial obtido na primeira montagem, o que prova que o arranjo de várias celular em série é útil para aumentar o potencial obtido a partir destes dispositivos.

Na figura 15, vemos a evolução do potencial elétrico com o tempo. As medidas foram feitas diariamente, e percebemos que o potencial aumenta de maneira relativamente rápida até os primeiros 10 dias, atiginfo 1,55 V no dia 11. Após este tempo, os valores de ddp da célula permanecem em torno de 1,5 V,

com pequenas variações para mais ou para menos. Estas pequenas variações no valor da tensão observadas são devidas a oscilações comuns nas medidas, e neste tipo de experimento, podem ser consideradas sem problemas como ruído inerente à instrumentação.

A célula responde com relação à diminuição e ao aumento da voltagem quando o fluxo de oxigênio fornecido pela bomba é interrompido pelo desligamento desta, ou novamente fornecido.

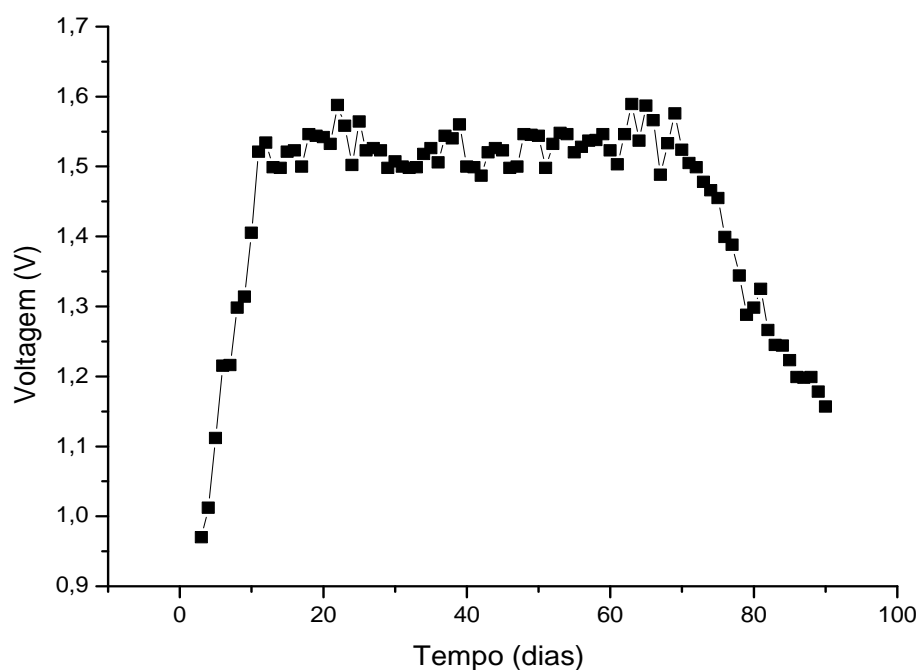


Figura 15. Potencial elétrico (ddp) do sistema em sèrie.

A diferença fundamental desta montagem em relação à primeira, é que neste caso foi inserido no sistema um dispositivo dissipador de energia (diodo emissor de luz). Depois de decorridos 10 dias do início do experimento, a ddp da célula atingiu a tensão mínima de funcionamento do *led*, sendo capaz de gerar corrente elétrica suficiente para manter a lâmpada acesa durante todo o tempo em que a voltagem se manteve ao redor de 1,5 V, o que indica a estabilidade deste tipo de MFC.



(A)



(B)

FIGURA 16. (A) Quatro células microbianas ligadas em série. (B) Detalhe para o potencial e leds acesos, sendo mantidos apenas pela energia gerada pelo sistema.

Devido à complexidade do material orgânico utilizado como substrato (esterco suíno), estão envolvidas várias etapas na oxidação do material orgânico a dióxido de carbono, catalisada por microorganismos. Abaixo, temos um esquema genérico, em que o acetato produzido pela fermentação do esterco suíno é oxidado pelas bactérias, produzindo neste processo prótons e elétrons. Os últimos fluem para o cátodo, onde reduzem o oxigênio, produzindo água com os prótons formados na primeira etapa, ao mesmo tempo em que ocorre a liberação de CO_2 .

Matéria orgânica → fermentação → acetato (C₂H₄O₂) (Equação 3)

C₂H₄O₂ + 2 H₂O → 2CO₂ + 8H⁺ + 8 e⁻ (SEDIMENTO) (Equação 4)

2 O₂ + 8H⁺ + 8 e⁻ → 4 H₂O (SOLUÇÃO) (Equação 5)

As reações acima demonstram a necessidade da oxigenação contínua para produzir um fluxo de elétrons. Entretanto, como não se está utilizando a membrana separadora mais adequada, pois a membrana de náfonpermite apenas a passagem de prótons, está ocorrendo a difusão de oxigênio para o interior do sedimento, a redução do oxigênio ocorre *in situ*, e por isto baixa a eficiência do aproveitamento da corrente elétrica gerada pelo sistema.

4.2.2 Caracterização do substrato orgânico – esterco suíno.

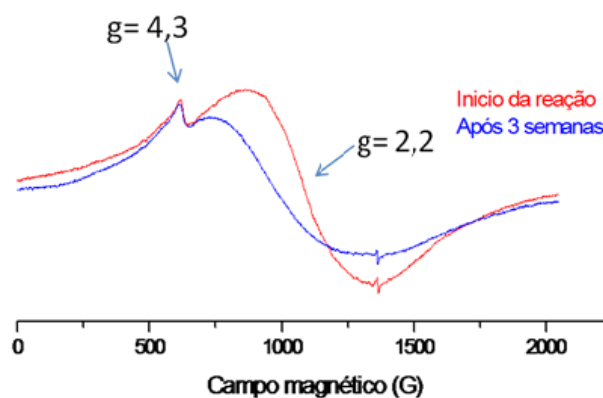
4.2.2.1 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A ressonância paramagnética eletrônica é um fenômeno que ocorre quando moléculas, íons ou átomos que possuem elétrons desemparelhados são submetidos a um campo magnético e absorvem radiação na frequência de microondas.

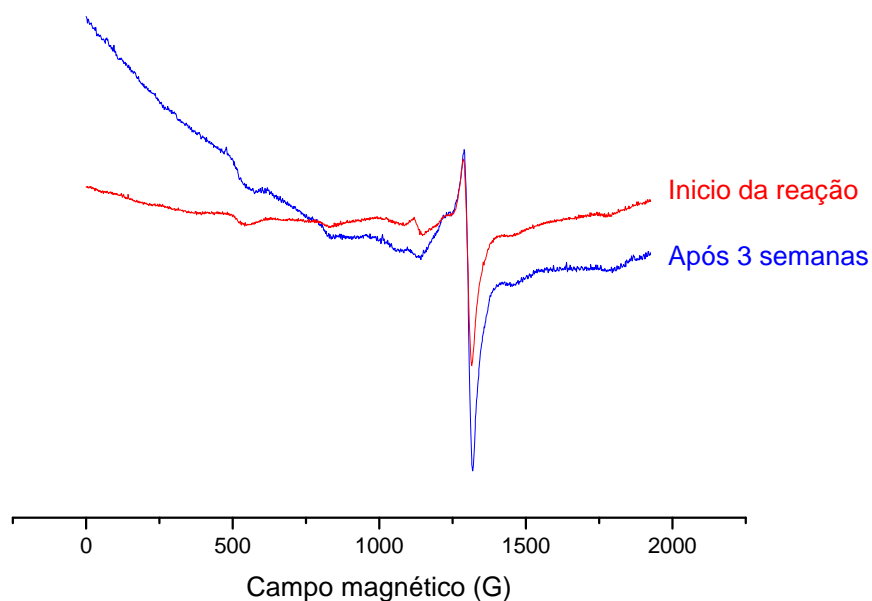
A espectroscopia de EPR permite a detecção de espécies com elétrons desemparelhados e a determinação da concentração do teor de spins na amostra (número de spins g⁻¹) (Narimoto, 2006; Guimarães, 2006). Esta é uma técnica útil no estudo de sítios metálicos paramagnéticos (Mn²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺), além de permitir o acompanhamento do processo de humificação através da determinação da concentração de radicais livres orgânicos (spins g⁻¹ da MO). (Saab e Martin-Neto, 2007; Guimarães, 2006; Novotny *et al.*, 2006a). A seguir (Fig. 17) tem-se os espectros de ressonância paramagnética eletrônica, adquiridos do esterco suíno no início da reação e passadas 3 semanas de funcionamento da célula eletrolítica. Observam-se, no espectro (A) diferenças em relação aos dois espectros. A linha em campo magnético correspondente a g = 4,3 no espectro refere-se aos íons de Fe³⁺, em domínios diluídos, protegidos por grupos hidrófobos, dentro das estruturas orgânicas. Estes íons não sofreram

processo redutivo pelas bactérias, como demonstram as intensidades iguais das linhas nos dois espectros, antes e depois da reação na MFC.

Com relação a linha larga em torno de $g \sim 2,2$ correspondente a íons Fe^{3+} em domínios concentrados (óxidos hidróxidos Fe^{3+}), verifica-se que diminuiu de intensidade no espectro do material após três semanas de reação, além de apresentar formato típico de interação magnética de íons Fe^{2+} Fe^{3+} , como em Fe_3O_4 . Assim, pela análise de EPR, verifica-se também “respiração” das bactérias pela redução de íons Fe^{3+} a íons Fe^{2+} . Também podemos perceber que o teor de radicais livres orgânicos aumenta após 3 semanas, como evidenciado na figura 17 (A).



A)



(B)

FIGURA 17. (A) Espectros de EPR do material orgânico, (B) detalhe da região do radical livre orgânico.

4.2.2.2 Espectroscopia de ultravioleta e visível por reflectância difusa (DRUV-VIS)

Os espectros de DRUV-vis das duas amostras, antes e depois da reação na MFC, são vistos na figura 18. Observam-se semelhanças entre os dois espectros, exceto no que toca a uma banda de $\log 1/R$, em 650 nm, que se observa no material antes da reação na MFC, e não mais na amostra do material depois da reação na MFC. A banda em 650 nm corresponde a estrutura de goetita, FeO(OH) . Esta banda é atribuída a transição de campo ligante, d-d, ${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_1 ({}^4G)$, de pares de íons Fe^{3+} com interação magnética (Sherman, 1985). Assim, com o auxílio da espectroscopia de UV-VIS, concluiu-se que as bactérias, nessa MFC, reduziram íons Fe^{3+} de estruturas de goetita, FeO(OH) .

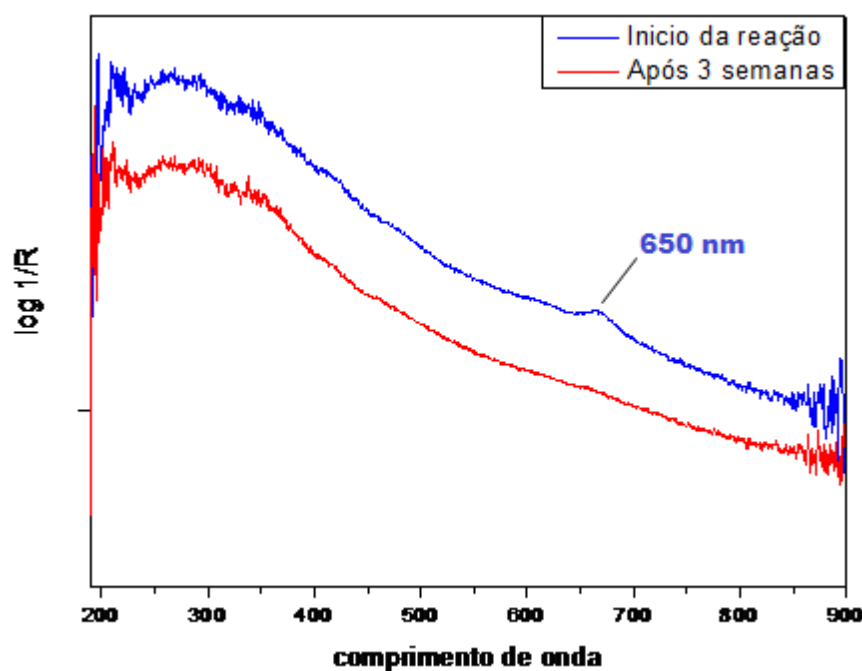


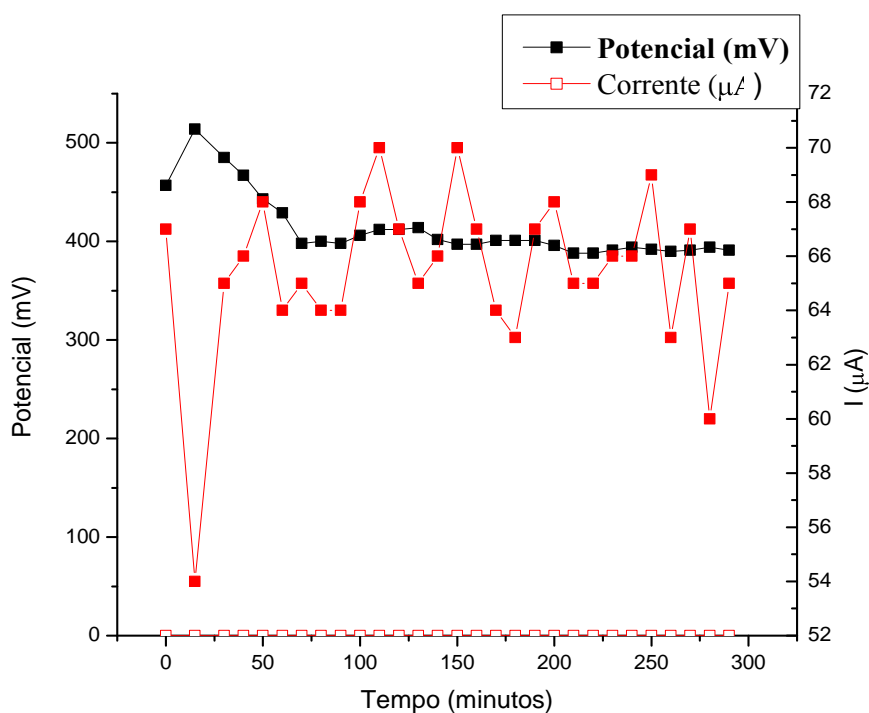
Figura 18. DR-UVVis das amostras do substrato orgânico, no início da montagem e após 3 semanas de funcionamento.

4.3 Células Sedimentares Usando Solo Como Separador

4.3.1 Gráficos de potencial de equilíbrio e corrente elétrica instantânea

Nos gráficos da figura 19, observam-se os valores de potencial e corrente elétrica desenvolvidos com o passar do tempo de reação. No início do experimento o tempo foi medido na escala de minutos (Fig. 19A) e, após 300 minutos passou-se a fazer medições periódicas na escala de tempo em horas (Fig. 19B), visto que, até então ainda não se estava utilizando o software desenvolvido para acompanhamento da reação na MFC. Vê-se que a corrente elétrica instantânea obtida oscilou entre os valores de 60 e 70 μA tanto no gráfico A quanto no gráfico B. O potencial elétrico (ddp da célula), por sua vez, atingiu um pico de 500 mV logo no início do experimento, estabilizando em 400 mV nas primeiras cinco horas de funcionamento da célula. Vale ressaltar que, nesta montagem, o potencial elétrico obtido foi de apenas um terço do que conseguiu se obter com a célula utilizando esterco suíno como substrato.

(A)



(B)

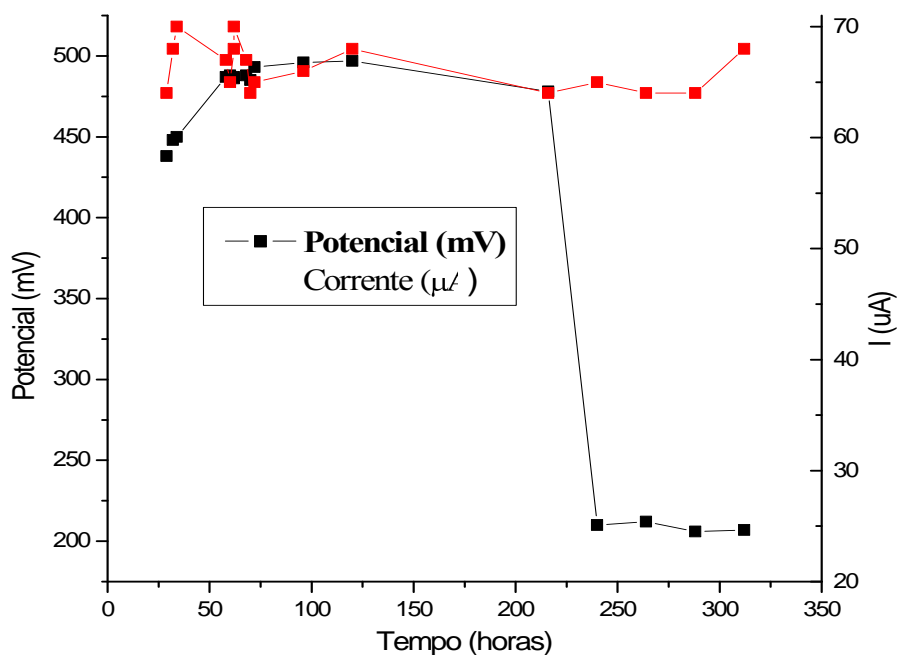
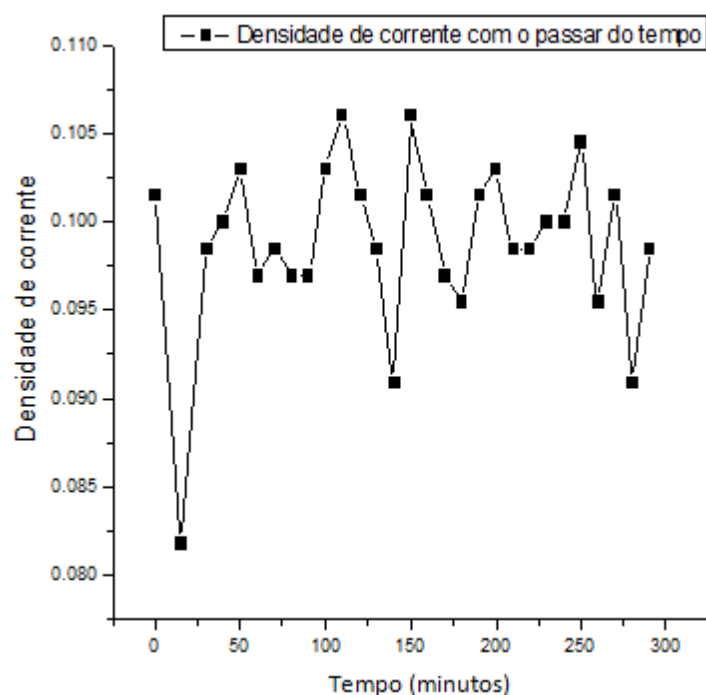
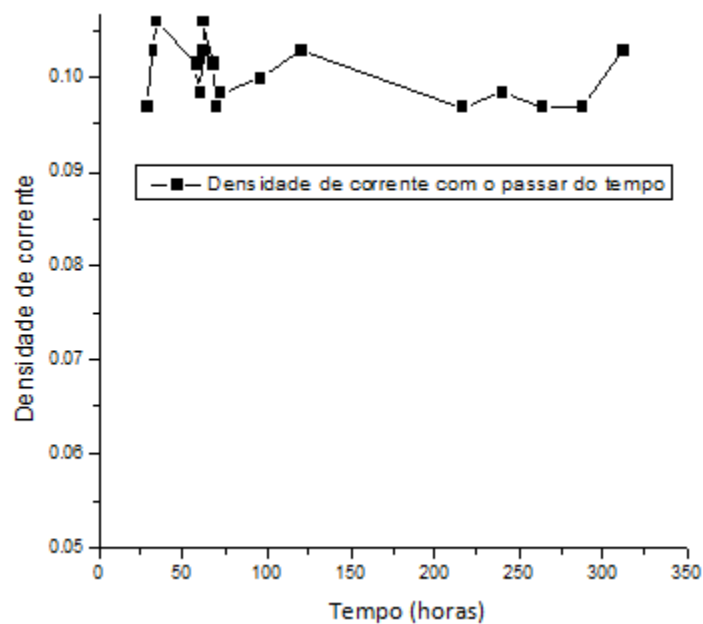


FIGURA 19. Gráficos de potencial e corrente elétrica gerados pela célula (A) Início do experimento, medidos em minutos. (B) Após 300 minutos, medidos em horas.

Com objetivo de fazer o comparativo entre diversas células, ou seja, entre MFCs diferentes, foram construídos os gráficos referentes à normalização da corrente elétrica pela área superficial do ânodo (Figura 20 A e B) como sugerido na literatura (RABAEY *et al*, 2006). A densidade de corrente elétrica obtida manteve-se ao redor de $0,1 \text{ mA}\cdot\text{m}^{-2}$, mesmo após decorridas 300 h de funcionamento da MFC.



(A)



(B)

Figura 20. Gráficos de densidade de corrente elétrica, normalizada pela área do ânodo. (A) Início do experimento, medidas em minutos. (B) Medidas em horas.

Quando foi adicionado um resistor de 2,5 k Ω ao circuito da célula, com intuito de dissipar a energia gerada, obtiveram-se os seguintes valores para potencial e corrente elétrica (Fig. 21). A ddp da célula caiu para aproximadamente 250 mV, enquanto a corrente elétrica permaneceu em torno de

67 μA . É possível concluir que o potencial gerado não é devido apenas a alguma polarização momentânea, já que se mantém após a inclusão da resistência (fechamento do circuito), o que possibilita a circulação de corrente elétrica, embora os valores sejam baixos.

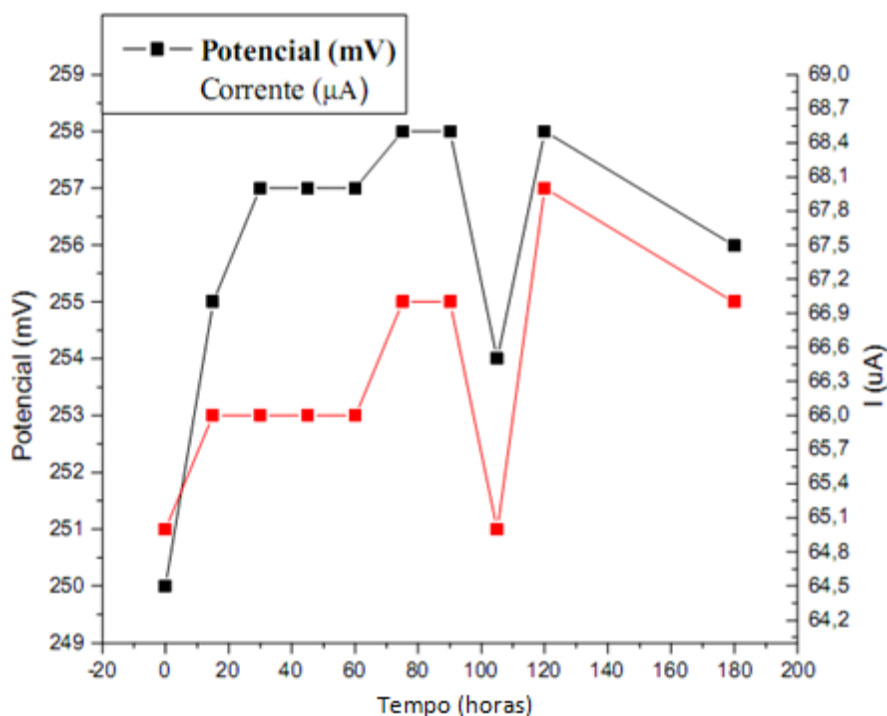
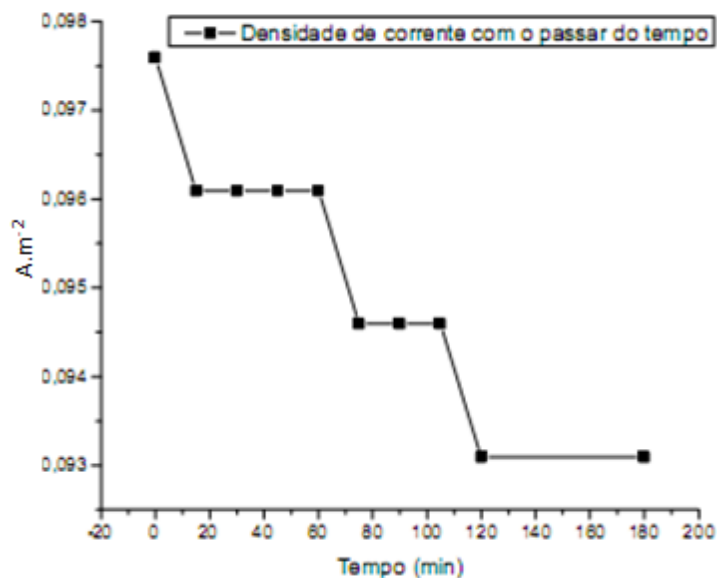
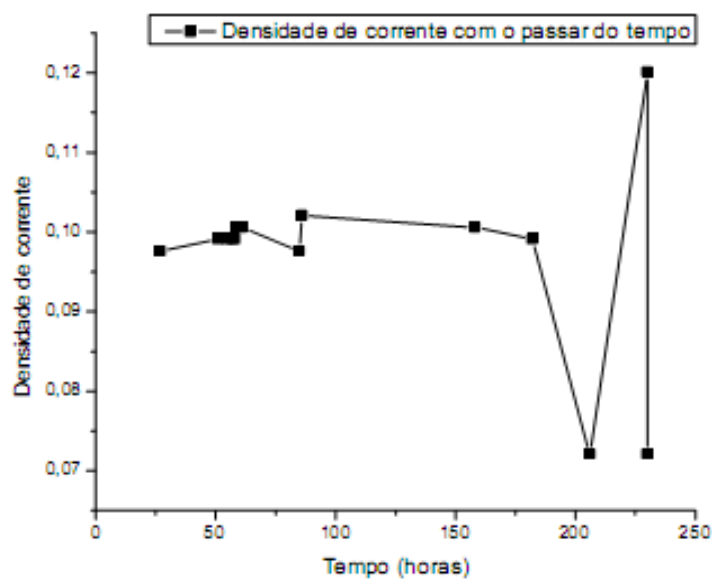


FIGURA 21. Gráficos de potencial e corrente elétrica gerados pela mfc com resistência de 2,5 kw

Novamente, os valores foram normalizados pela área do ânodo, como mostra a figura 22. Observou-se o desenvolvimento de densidades de corrente de aproximadamente $0,01 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}$, valor que se manteve relativamente estável por 180 horas, indicando que a MFC estudada é capaz de manter uma pequena corrente elétrica em circulação, mesmo com elevada resistência interna.



(A)



(B)

Figura 22. Gráficos de densidade de corrente elétrica, normalizada pela área do ânodo. (A) Início do experimento, medidas em minutos; (B) Após certo tempo, medidas em horas.

Com intuito de verificar se realmente o potencial medido era devido à oxidação da matéria orgânica pela colônia de microorganismos existente, procedeu-se a tentativa de esterilização do meio reacional, através da adição de

solução de HgCl_2 a 1 mg kg^{-1} (Viotti *et al.*, 2005). Como não foi observada a diminuição do potencial, após 24 horas, deduziu-se que a concentração de HgCl_2 adicionada não fora suficiente para inibir a totalidade da colônia microbiológica existente. Procedeu-se então à adição de solução maior concentração de HgCl_2 , (10 g kg^{-1}). Nos dois casos da adição do agente de esterilização, HgCl_2 , não houve o efeito esperado (diminuição do potencial gerado pela MFC), mas o que se observou foi o contrário, aumento na ddp da célula. Os gráficos da figura 26 abaixo representam a variação do potencial elétrico nos dois casos:

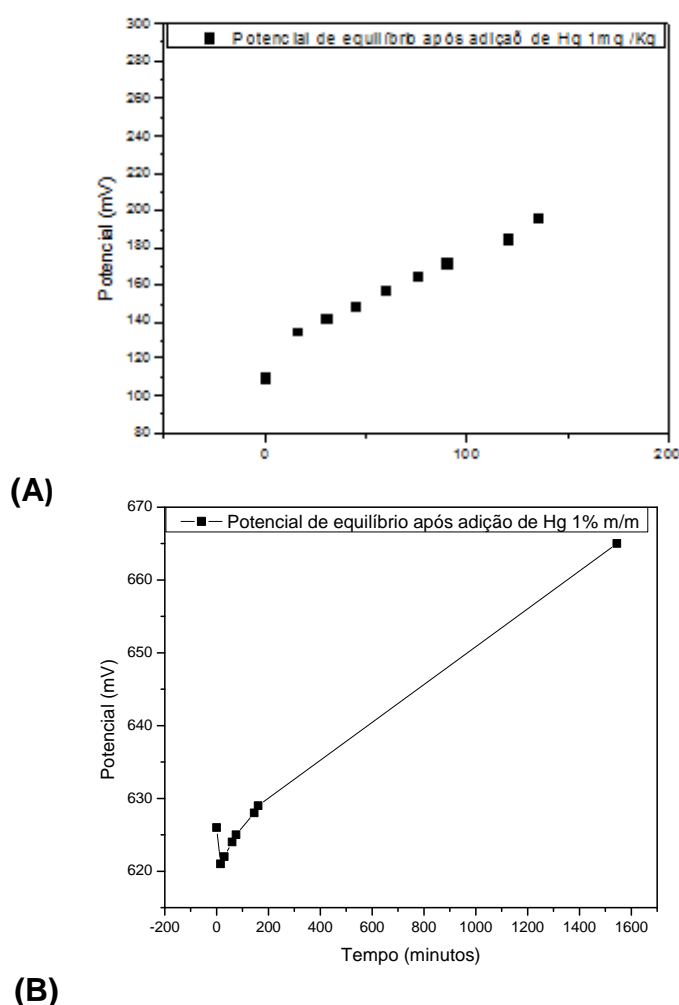


Figura 23. Potencial após adição de cloreto de mercúrio nas duas concentrações.

4.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa (DRIFT)

A Figura 14 a seguir apresenta o espectro de refletância difusa da amostra de solo original usada na célula eletroquímica-

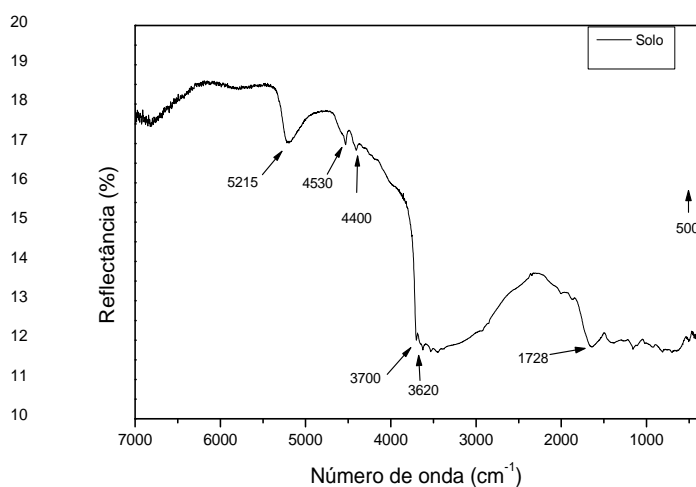


Figura 24. Espectro de DRIFT da amostra de solo usada no experimento

Através do espectro de DRIFT pode-se obter informações na região do infravermelho próximo (7000 a 4000 cm^{-1}). A banda em 6750 cm^{-1} foi atribuída ao primeiro sobreton de estiramento de grupos OH de argilas. As bandas de 4400 a 5215 cm^{-1} são atribuídas a combinação de estiramento mais deformação de grupos MO-H.

As bandas em 1250 cm^{-1} (estiramento assimétrico de C-O de ácidos carboxílicos), 1728 cm^{-1} (estiramento de C=O de ácidos carboxílicos) e 2500 cm^{-1} (banda de combinação de estiramento assimétrico de C-O de ácidos carboxílicos) confirmam a presença de ácidos carboxílicos na amostra de solo utilizada (Emsley *et al* 2001).

4.3.3 Espectroscopia de ultravioleta e visível por reflectância difusa (DRUV-VIS)

Absorções nas regiões de ultravioleta e visível podem resultar de dois tipos de transições eletrônicas. Uma delas acontece entre orbitais moleculares, com transição de elétrons de um orbital ligante, ou não ligante, para um orbital antiligante ($\pi \rightarrow \pi^*$; $n \rightarrow \pi^*$; e $n \rightarrow n^*$). Outra transição envolve a transferência de carga de uma espécie química para outra.

Na análise da amostra por reflectância difusa (estado sólido) há contribuição da policondensação aromática em moléculas isoladas e também a contribuição destas moléculas com interações supramoleculares. A Figura 25, a

seguir, mostra o espectro de DRUV-VIS da amostra de solo original utilizada no experimento de MFC.

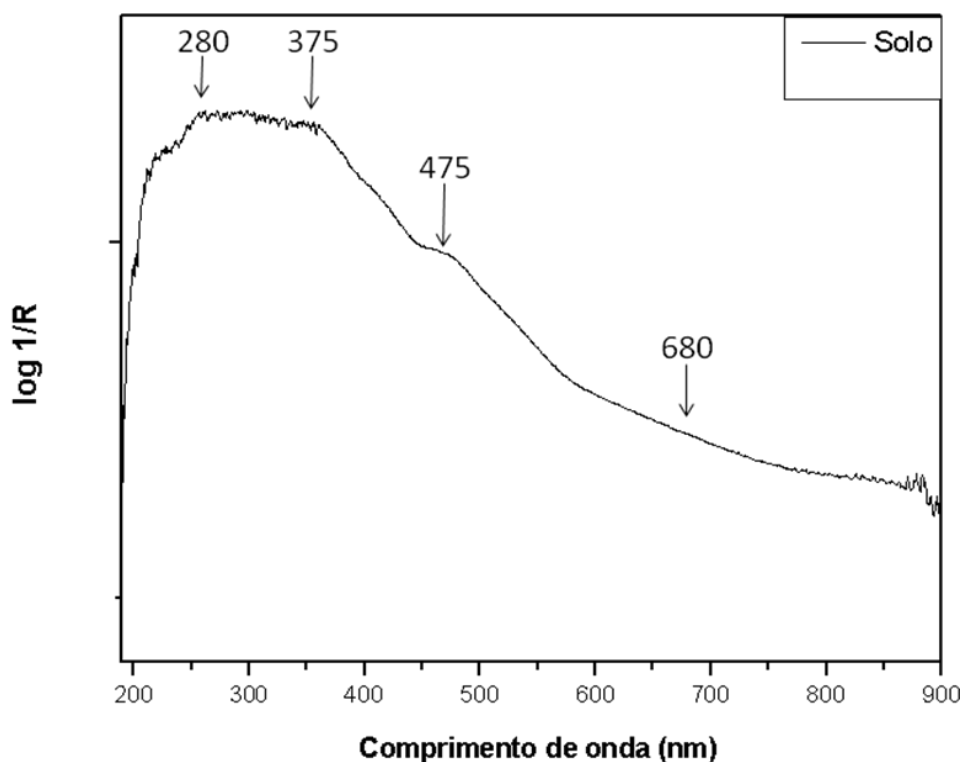


Figura 25. Espectros de DRUV-VIS da amostra de solo inicial.

Através da técnica DRUV-VIS observa-se presença de bandas de transição de campo ligante de íons Fe^{3+} , permitidas devido a interações magnéticas entre pares de íons, $\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{3+}$, e bandas de transferência de carga, ligante – metal. Em 475 nm, transição d-d de ${}^6\text{A}_1 \rightarrow {}^4\text{E}, {}^4\text{A} ({}^4\text{G})$ (d-d), relativas a estrutura de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Em 375 nm, transição d-d de ${}^6\text{A}_1 \rightarrow {}^4\text{E} ({}^4\text{D})$, relativas a estrutura de goetita ($\text{FeO}(\text{OH})$). As bandas em comprimentos de onda menores que 280 nm referem-se a transições de transferência de carga, ligante – metal Fe-O; no caso, ($\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$). (Sherman e Waite, 1985; Fukamachi *et al.*, 2007).

4.3.4 Difractometria de Raios-X (DRX)

Através do difratograma de Raios-X da amostra de solo usada na MFC, (Fig. 26) pode-se observar a composição mineralógica básica da amostra.

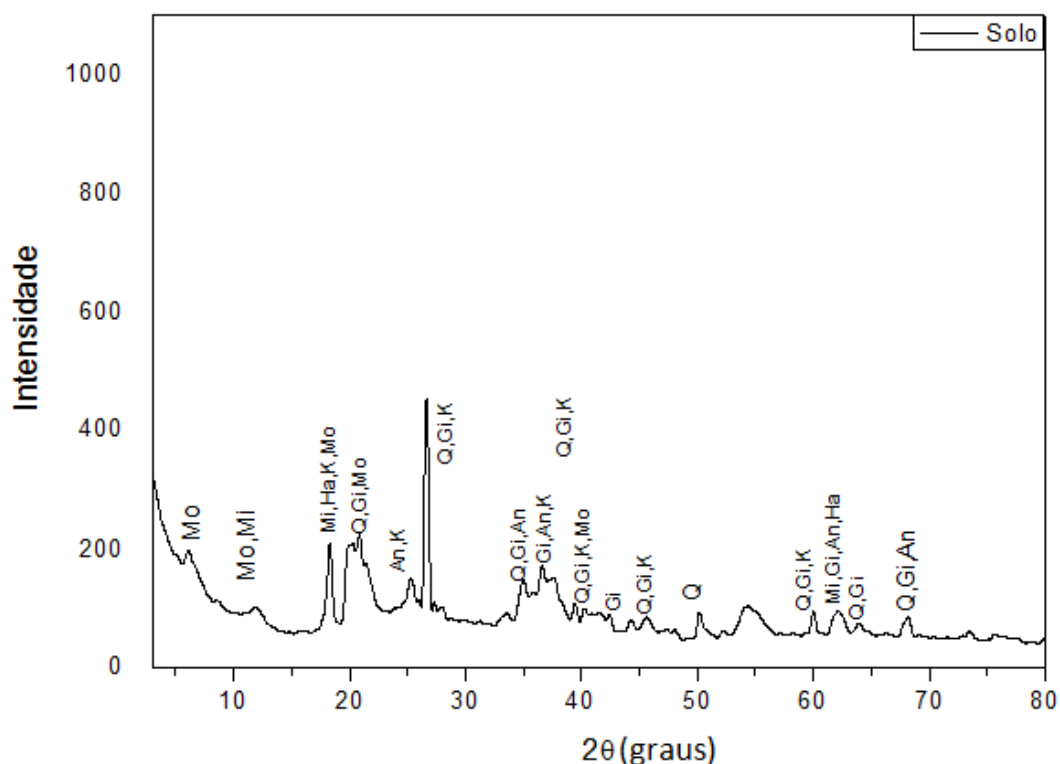


FIGURA 26. Difratoograma de Raios-X da amostra de solo utilizada como sedimento. Código utilizado: Caulinita (K), Gibsita (GI), Montmorilonita (M), Quartzo (Q), Anatase (NA), goetita (GO), hematita (H), Bruchita (B), Albita (AL), Jarosita (J), Ortoclásio (O), Paligorsquita (P) e Ilita (I).

Observa-se que a amostra é composta, principalmente, por quartzo, caulinita, montmorilonita, gibsita (observados também por FTIR) e anatase. Além destes minerais, observa-se presença de picos referentes à goetita e hematita, confirmados pela técnica DRUV-VIS, (Denaix *et al.*, 1999; Manhães *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2006;.Olendzki, 2006; Nayak e Singh, 2007, Sherman e Waite, 1985; Fukamachi *et al.*, 2007).

4.3.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) por transmitância

A Figura 27 mostra os espectros de FTIR das amostras de solos coletadas nos tempos de reação na MFC: 0 h, 168 h, 336 h, 504 h. O solo utilizado era da área recuperada da mineração de xisto no processo PETROSIX. No geral, observa-se que não houve modificações acentuadas nos espectros de

FTIR durante os tempos de reação. Todas as amostras apresentaram bandas finas e bem definidas na região de 3700 a 3830 cm^{-1} , referentes a estiramento de grupos O-H internos de argilas (sem pontes de hidrogênio), superpostas a bandas largas. Em todas as amostras, foram observadas bandas largas centradas na região de 3445-3400 cm^{-1} devidas à vibração axial de grupos O-H com ligações de hidrogênio. Sugere-se que bandas na região de 3390 – 3400 cm^{-1} podem estar relacionadas à vibração de grupos AlO-H, FeO-H (argilas) e/ou, OH (fenol, H_2O) (Nakamoto, 1986)

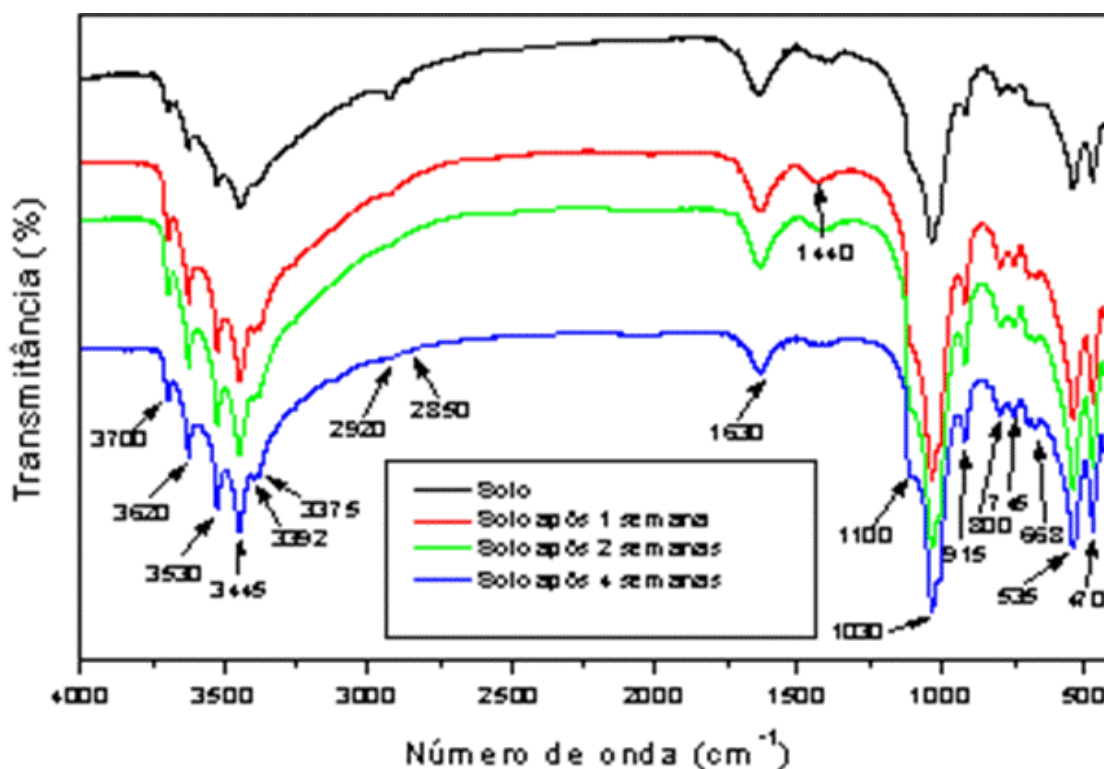


FIGURA 27. Espectros de FTIR das amostras de solo em diferentes tempos de reação na MFC.

Mais detalhadamente, sugere-se que as bandas em 3700, 3620, 3530, 915, 800, 750, 694, 535 e 470 cm^{-1} estão relacionadas à presença do mineral caulinita e que as bandas em 3620, 3530, 3445, 3392, 3375 e 1013 cm^{-1} são relacionadas à presença de gibssita (Russell e Fraser, 1994).

As bandas na região de 2920 e 2850 cm^{-1} , características de deformação axial de ligação C-H são fracas no início, e inexistentes no final, sugerindo que devem pertencer a estruturas mais facilmente oxidáveis, como íons acetato. A banda em 1630 cm^{-1} é característica de deformação angular de

moléculas de água, ou ainda, ligação C=C de constituintes aromáticos, ou, juntamente com a banda em 1440 cm^{-1} pode ser atribuída a grupos carboxilatos (Nakamoto, 1986). A banda em 1440 cm^{-1} pode ser atribuída também à deformação de carbonatos inorgânicos. A diminuição dessa banda com a evolução da reação bioquímica seria consequência do consumo do íon acetato na reação de oxidação, ou do íon carbonato pelo aumento da acidez como em metabólitos de micro-organismos. Observa-se claramente a diminuição das bandas em 1440 e 1530 cm^{-1} , em relação às bandas de minerais, que aumentam gradativamente após 4 semanas.

As amostras apresentam uma banda 1170 cm^{-1} , esta banda é atribuída à ligação C-C em alifáticos e substâncias poliméricas ou ao grupo Si-O-C, o que pode indicar ligação de macromoléculas húmicas ao grupo Si-O de aluminossilicatos do solo, (Nakamoto, 1986).

Bandas entre 915 e 470 cm^{-1} são atribuídas a diversos óxidos metálicos (Russell e Fraser, 1994; Nayak e Singh, 2007).

4.4 Célula Combustível Microbiana Usando Resíduos De Indústria Cervejeira Como Substrato

Como não houve desaparecimento do potencial após a adição do Cloreto de Mercúrio, ou ao menos um decréscimo significativo deste após a inibição do crescimento da cultura microbiana, conclui-se que a complexidade química e mineralógica do solo utilizado dificulta o estudo deste tipo de célula (MFCs sedimentares). Em outras palavras, devem estar ocorrendo outras reações químicas na amostra, que não são catalisadas e nem devidas à presença de microorganismos.

Então, buscou-se nova forma de preparação da MFC, de modo a não necessitar, inicialmente, da utilização de solo para separar os eletrodos. Na nova montagem (Figura 28), utilizou-se membrana “Náfion”, cedida pelo Prof. Vargas (Dep. Mec. Eng./UFPR) como separadora das câmaras catódica e anódica, mas que permite a passagem de íons H^+ .



FIGURA 28. Célula de duas câmaras com membrana separadora entre catodo e anodo.

Observa-se, na figura 29, que o sistema demora aproximadamente 1200 minutos para retornar ao equilíbrio quando é introduzida alguma modificação, tal como a adição de um novo reagente químico, inclusive, oxigênio. Este tempo deve ser levado em conta quando da análise com a colônia de microorganismos inoculada. Com água deionizada, o potencial, após oscilações, manteve-se estável, próximo de zero. Já quando foi adicionada à câmara anódica a solução tampão PBS (ver parte experimental), em pH 7,1, o potencial estabilizou em aproximadamente 18 mV. Ao se adicionar, à célula, o meio de cultura (esterilizado), contendo além do PBS, também citrato férrico, peptona, extrato de levedura e agar-agar, observou-se grande variação do potencial elétrico medido, que, estabilizou-se em, aproximadamente 65 mV. Estas variações são, provavelmente, devidas ao potencial de junção entre as soluções anódica e catódica, uma vez que na câmara catódica foi mantida apenas água deionizada com fluxo de ar.

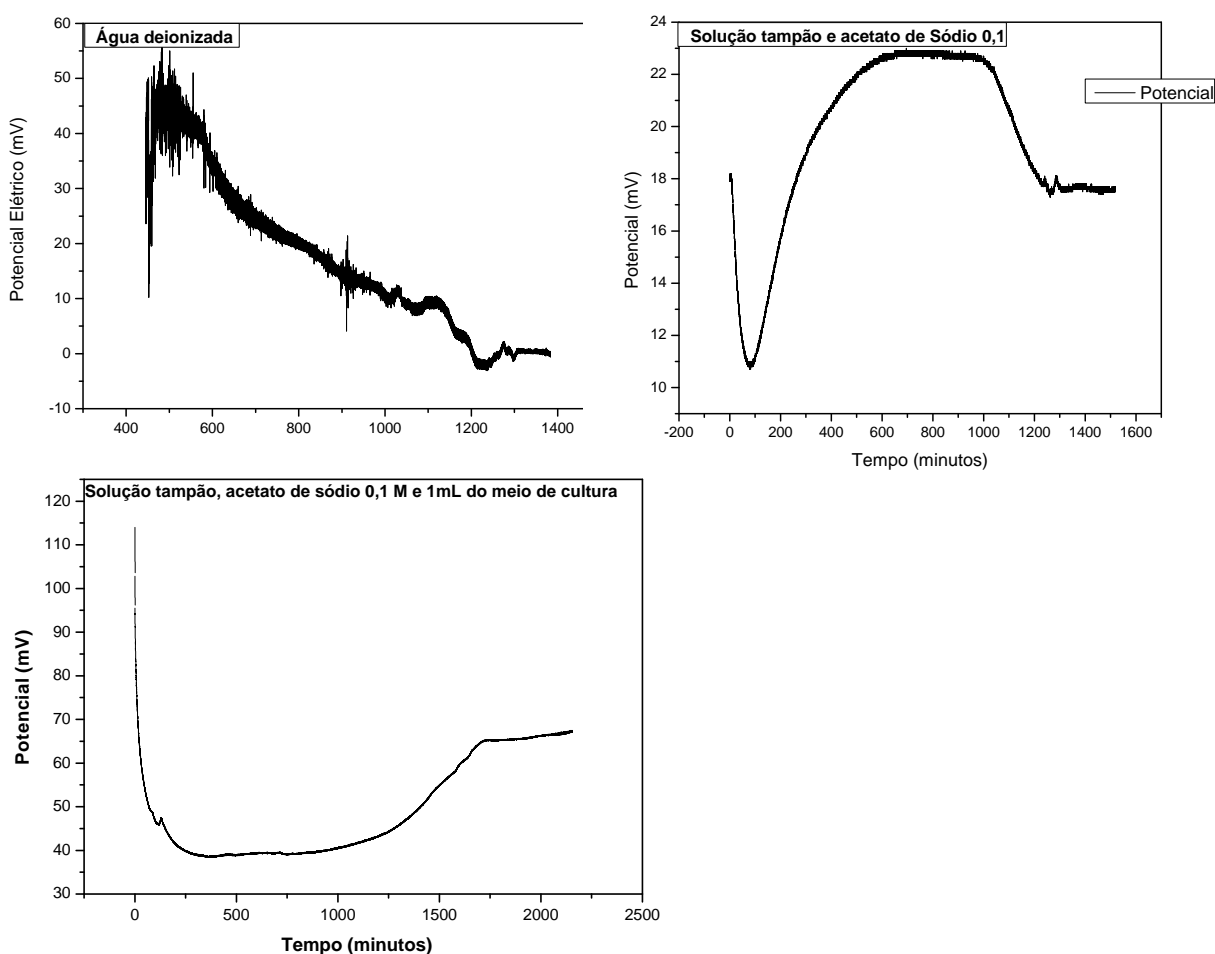


FIGURA 29. Gráficos de potencial de teste para diferentes preenchimentos das câmaras catódica e anódica da célula com duas câmaras e membrana separadora.

Foi feito um teste para verificar o comportamento deste resíduo frente à oxigenação, já que esta é necessária no compartimento que contém o cátodo.

Foram colocados em dois frascos quantidades iguais de resíduo, em apenas um deles foi forçado um fluxo de ar de 20L/h^{-1} , ambos ficaram em temperatura ambiente por 7 dias, como demonstrado na tabela abaixo, mostrando as variações de pH durante estes 7 dias. A tabela 1 resume os valores encontrados:

Amostra	pH Inicial	pH 1	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Amostra 1	4,99	5,00	5,05	5,11	4,92	4,60	4,62	4,61
Amostra 2	4,99	5,01	5,1	5,10	5,00	4,80	4,84	4,84
Amostra 3	4,98	4,98	5,15	5,10	5,11	4,90	4,91	4,87
Amostra 1 (O ₂)	5,00	5,33	8,51	8,42	8,45	8,50	8,53	8,59
Amostra 2 (O ₂)	4,99	5,42	8,60	8,45	8,50	8,50	8,51	8,51
Amostra 3 (O ₂)	5,01	5,34	8,67	8,45	8,48	8,48	8,53	8,60

Tabela 1. Variação do pH das amostras, com oxigenação e sem oxigenação, durante 7 dias:

O resíduo da cervejaria elevou o pH frente à oxigenação até o segundo dia, depois permaneceu estável. Este experimento deverá ser repetido ainda uma vez, já que quando foi realizado, ainda não dispúnhamos de aparelho liofilizador no LabPPAm. Poderá ser feito o acompanhamento das modificações através de análises dos sólidos do resíduo (é possível remover a água do resíduo sem modificar a amostra). Os dados das células usando resíduos da indústria cervejeira como substrato não são conclusivos, mas os resultados acima mostram evidências de que a montagem realizada pode ser adequada para o estudo das células microbianas, o que por si só, é considerado um avanço.

4.5 Desenvolvimentos De Software Para Monitorar As MFCs.

O princípio básico de concepção do “software” desenvolvido é o de assumir o controle dos parâmetros, potencial elétrico e temperatura, da célula eletroquímica microbiana em estudo. Neste trabalho considera-se o potencial elétrico como variável primária mais importante do processo de oxidação, uma vez que o aumento da corrente gerada será motivo de trabalho conjunto com o DME/UFPR.

O “software” foi desenvolvido para ambiente computacional Windows[®], usando como compilador o programa “Free Basic”, opera baseado em rotina simples, por meio da qual adquire e armazena os dados enviados por potenciômetro/pHmêtro, no modo para medir potencial elétrico.

4.5.1 Emissão de relatórios

“O software gera como relatório um arquivo de texto, no formato”. txt” contendo as seguintes informações a respeito do experimento: Potencial elétrico; Tempo de Experimento; Temperatura; Hora de início. Todos os relatórios podem ser visualizados na tela antes de serem impressos.

4.5.2 Princípios de operação do software

Tendo conhecimento das informações acima citadas, é possível descrever os princípios de operação do software controlador do potenciômetro. Cinco passos são necessários:

- I. Entrada de dados da quantidade de pontos a ser medida;
- II Especificação do nome e local do arquivo aonde serão gravados os valores medidos;
- III Escolha da escala a ser usada para geração dos gráficos de acompanhamento;
- Iç Escolha do tempo de “refresh” das medidas;
- ç Geração de relatórios das análises.

A figura 30, abaixo, mostra duas telas do software desenvolvido, na 1ª tela, temos o início da medição, na segunda, temos o gráfico de potencial (ddp) da célula versus o tempo do experimento. O monitoramento da temperatura não está sendo mostrado nas figuras, mas é, simultaneamente ao potencial, gravado e salvo automaticamente em um arquivo de texto.

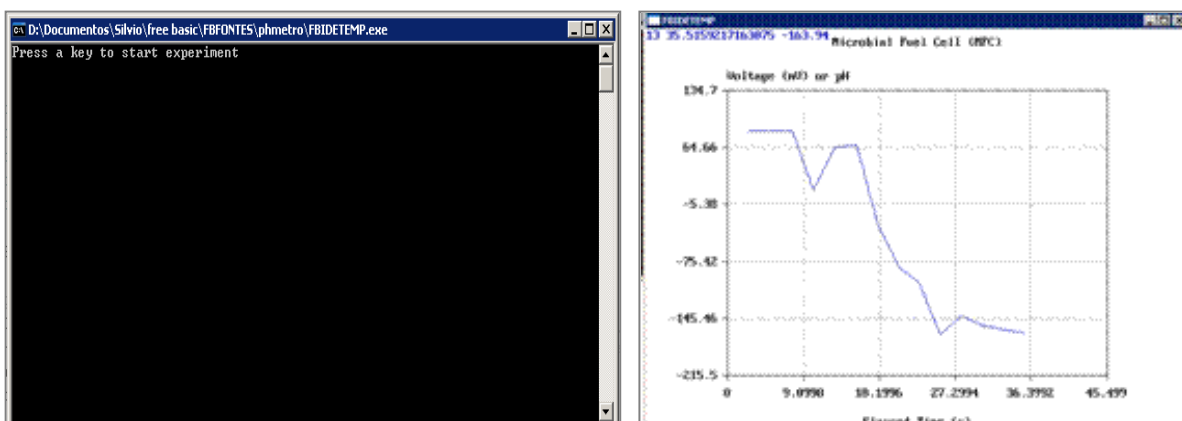


Figura 30. Telas do software desenvolvido durante o trabalho.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Embora seja uma tecnologia ainda na fase inicial de desenvolvimento, as células combustíveis baseadas em microorganismos podem tornar-se alternativa viável para a geração de energia elétrica, ao mesmo tempo em que promove o tratamento de rejeitos, com grande potencial para o tratamento de resíduos agroindustriais. Com uma célula combustível isolada, foram obtidos valores discretos para a corrente elétrica e o potencial. Os valores de potencial elétrico foram bem mais satisfatórios quando foi feita a associação em série, fornecendo um máximo de 1,589 volts. A associação de várias células possibilita a obtenção de quantidades significativas de energia elétrica.

Por espectroscopias de EPR e DRUV-VIS foi possível determinar a redução de íons Fe^{3+} de estruturas de óxidos de ferro durante o processo na MFC.

São necessários aperfeiçoamentos nas condições de controle, introduzindo modificações nas condições das células, tais como força do eletrólito, tipo de substrato orgânico, variações nas condições de oxigenação, e uso de outros receptores de elétrons ao invés do oxigênio, temperatura controlada e membrana separadora. Nas células sedimentares que foram estudadas até o momento, a complexidade química e mineralógica do solo dificulta a caracterização precisa das reações e modificações químicas envolvidas no processo.

As células com duas câmaras, separadas pela membrana náfon, apresentam maior resistência interna à passagem de corrente e menor eficiência na conversão energética, mas é mais adequada para fins acadêmicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beliaev, A.S.; Saffarini D.A.; *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 6292.
- Bennetto, H. P.; *In Frontiers of Science*, Blackwell: Cambridge, 1990.
- Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M. Lovley, D. R.; *Science.* **2002**, 295, 483.
- Bond, D.R.; Lovley, D.R.; *Appl. Environ.* **2003**, 69, 1548.
- Chaudhuri, S. K.; & Lovley, D. R.; *Nature Biotechnol.* **2003**, 21, 1229.
- Chaudhuri, S. K.; Lovley, D. R. *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1229.
- Cohen, B.; *Journal of Bacteriol.* **1931**, 121, 18.
- Das, D.; Veziroglu T. N.; *Int. J. Hydrogen Energy.* **2001**, 26, 13.
- Denaix, L., Van Oort, F., Pernes, M., Jongmans, A.G., *Clays and Clay Minerals*, 1999, 47, 637.
- Dobbin P. S.; Powell A.K.; McEwan A.G.; Richardson D.J.; *Biometals.* **1995**, 8, 163.
- Emsley, A.M., Herman, A.H., Heywood, R. *J. of Polym* **2001**, 42, 2893.
- Fukamachi, C.R.B, Wypych, F., Mangrich, A.S., *Journal of Colloid and Interface Science*, **2007**, 313, 537.
- Galembeck, F., Barbosa, C.A.S. e Sousa, R.A. *QN*, **2009**, 32(3), 571.
- Gil G. C; Chang I. S.; Kim B. H; Kim, M.; Jang J.K.; *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 18, 327.
- Gorby Y.A.; Beveridge, T.J.; [William R. W.](#); *Resumos da 18ª Conferencia Anual NABIR PI Meeting, Warrenton, VA, 2005.*
- Grzebyk, M., Pozniak, G., *Sep. Purif. Technol.* **2004**, 41, 321.
- Guimarães, E., Caracterização de solos basálticos através de análises química e espectroscópica em laboratório e por satélite. Tese (Doutorado em Química) , Setor de Ciências de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, **2006**.
- Haberhauer, G., Gerzabek, M.H., *J. Vibrational Spectroscopy*, **1999**, 19, 413.
- Ieropoulos, I. A.; Greenman J.; Melhuish C.; Hart J.; *Enz. Microbio.l Technol.* **2005**, 37, 238.
- Ince B. K.; Ince O.; Sallis P. J., Anderson G. K. *Water Research.* **2000**, 34, 3943.

- Jang, J.K.; Pham, T.H.; Chang, I. S.; Kang, K.H.; Moon, H.; Cho, K.S.; Kim, B.H.; *Process Biochem.* **2004**, 39, 1007.
- Janhom T.; Wattanachira, S.; Pavasant P.; *J. Environ. Monit.* **2009**, 90, 1184.
- Karube, I.; Ikemoto, H.; Kajiwara, K.; Tamiya, E.; Matsuok, H.; *Biotechnol.*, **1986**, 4, 73.
- Katz, E.; Shipway, N.; Willner, I.; Vielstich, W.; Gasteiger, H.A.; Lamma, A. *Handbook of Fuel Cells – Fundamentals, Technology and Applications, Fundamentals and Survey of Systems.* Wiley: New York, **2003**.
- Kim, B. H.; Kim H. J.; Hyun M.S.; Park D. H.; *J. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 9, 365.
- Kim, B.H.; Park, H.S.; Kim, K.J.; Kim, G.T.; Chang, I.S.; Lee, J.; Phung, N.T.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 63, 672.
- Kumlanghan A.; Liu J.; Thavarungkul P.; Liu J. , **Thavarungkul P.; Kanatharana P.; Mattiasson B.**; *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2939.
- Lewis, N. S.; Nocera, D. G.; *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **2006**, 103, 15729.
- Liu, H.; Ramnarayanan, R.; Logan, B. E.; *Environ. Sci. Technol.*, **2004**, 38, 2281.
- Liu, H.; Logan, B.E.; *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 4040.
- Logan, B. E.; *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 375.
- Logan, B. E; *Microbial Fuel Cells.* Wiley: New York, **2003**.
- Lovley, D.R.; *Nature Reviews: Microbiology*, **2006**, 4, 497
- Lovley, D.R.; Woodward, J.C.; Chapelle, F.H.; *Appl Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 288.
- Lower S.K.; Hochella M.F.; Beveridge T.J.; *Science.* **2001**, 292, 1360.
- Mangrich, A. S.; Silva, L.; Pereira, B. F.; Messerschmidt, I.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 294.
- Manhães, R.S.T., Auler, L.T., Sthel, M.S., Alexandre, J., Massunaga, M.S.O., Carrió, J.G., Dos Santos, D.R., Da Silva, E.C., Garcia-Quiroz, A., Vargas, H., *Applied Clay Science*, **2002**, 21, 303.
- Min B.; Logan B.E.; *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 5809.
- Min, B.; Kim, J.R.; OH, S.; Regan, J.M; Logan, B.E.; *Water Res.* **2005**, 39, 4961.
- Myers, J.M.; Myers D.R.; *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 67.
- Myers, J.M.; Myers D.R.; *J. Bacteriol.. Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 260.

- Nakamoto K., *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4th Edit. **Wiley, New York**, 1986.
- Nayak, P.S., Singh, B.K. *Bull. Mater. Sci.* **2007**, 30, 235.
- Niessen, J.; Harnisch, F.; Rosenbaum M.; Schröder U.; Scholz F.; *Electrochem. Commun.* **2006**, 8, 869.
- Niessen, J.; Schröder, U.; Rosenbaum, M.; Scholz, F.; *Eletrochem. Commun.* **2004**, 6, 571.
- Oh, S. E.; Logan, B. E.; *Water Res.* **2005**, 39, 4673.
- Oh, S.; Min B.; Logan B.E.; *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 4900.
- Olendzki, R.N. Caracterização das interações de substâncias húmicas com a matéria orgânica em solos de cultivo de arroz irrigado: contribuição à aquisição de dados essenciais para a avaliação global do seqüestro de carbono no solo. Tese (Doutorado em Química) , Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, **2006**.
- Parawira, W.; Murto, M.; Read, J. S.; Mattiasso, B.; *Process Biochem.* **2005**, 40, 2945.
- Park, D.H.; Laivenieks, M.; Guettler M.V.; Jain M.K.; **Zeikus J. G.**; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 2912.
- Pereira, B.F. Novas abordagens no preparo e na caracterização de substâncias húmicas. Tese (Doutorado em Química), Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, **2004**.
- Pham C. A.; Jung S. J.; Phung, N. T.; Lee, J.; Chang I. S.; Kim, B. H.; Yi, H.; Chun J.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, 129, 223.
- Potter M.C., *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **1911**, 84, 260.
- Potter, M.C.; *Proc. R. Soc. Ser.* **1912**, B84, 260.
- Rabaey K.; Boon N.; Hofte M.; Verstraete W.; *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 3401.
- Rabaey K.; Boon, N.; Siciliano S. D.; Verhaege, M.; Verstraete W.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 5373.
- Rabaey, K.; Lissens, G.; Siciliano, S. D.; Verstraete, W. *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25, 1531.
- Reguera, G.; McCarthy K. D.; Mehta T.; Nicoll J.S.; Tuominen M.T.; Lovley D.R. *Nature.* **2005**, 435, 1098.

- Reimers, C.E.; Tender, L.M.; Fertig, S.; Wang, W. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 192.
- Rifkin, J.; *The Hydrogen Economy*, Tarcher/Putnam: New York, 2002.
- Rohrback, G. H., Scott, W. R.; Canfield, J. H.; *Proceedings of the 16th Annual Power Sources Conference*, **1962**, 18.
- Rosenbaum M.; Zhao F.; Schrder U.; Scholz F.; *Appl. Catal., B - Environmental*, **2006**, 74, 262.
- RUSSELL, J.D. e FRASER, A.R. *Infrared Methods*, **1994**.
- Saab, S.C., Martin-Neto, L. *Química Nova*, **2007**, 30, 260.
- Shantaram, A.; Beyenal, H.; Raajan, R.; Veluchamy, A.; Lewandowski, Z. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 5037.
- Sherman, D.M., Waite, T.D.. *American Mineralogist*, **1985**, 70, 1262.
- Sisler, F. D.; *J. Wash. Acad. Sci.* **1962**, 52, 182.
- Tender, L.M.; Reimers, C.E.; Stecher H.A.; Holmes D. E.; Bond D.R.; Lowy D. A.; Pilobello, K.; Fertig S. J.; Lovley, D. R.; *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 821.
- Van Ginkel, S. W.; Oh S.E.; Logan B.E.; *Int. J. Hydrogen Energy.* **2005**, 30, 1535.
- Wilkinson, S.; *Autonomous Robots.* **2000**, 9, 99.
- Williams K. R.; *An Introduction to Fuel Cells*. Elsevier: Amsterdam, 1966.
- Yao, S. J.; Appleby, A. J.; Geise, A.; Cash, H. R.; Wolfson, S., K.; *Nature*, **1969**, 224, 921.
- Yu, X.; Amrhein, C.; Deshusses, M. A.; Matsumoto, M. R. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 1328.