ADRIANO SOARES DE OLIVEIRA GOMES

Desenvolvimento de uma célula a combustível microbiana com culturas puras de *Pseudomonas aeruginosa* em meio de cultura de glicerol

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências, área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Rafael Gonzalez

São Carlos

Agosto/2011

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 30/09/2011

Adriano Soares de Oliveira Gomes

A Deus toda a glória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao Prof. Ernesto Rafael Gonzalez, meu orientador e o grande idealizador deste projeto. Sem dúvida nenhuma, todo seu sucesso se deve à sua garra e incansáveis horas de trabalho, que me inspiraram e ainda inspiram a dar o meu melhor em tudo que eu faço. Muito obrigado pelos ensinamentos, pelo apoio e pela amizade.

À Prof. Dr Marcia Nitschke por todos os ensinamentos que me levaram a entender a complexidade do trabalho com microrganismos. Ao Dr Valdecir A. Paganin, que usou todo o seu conhecimento em eletroquímica para me ajudar a desenvolver os experimentos com voltametria cíclica e reação de redução de oxigênio, que esclareceram grande parte dos meus resultados. Ao Dr Camilo E. La Rotta H., meu amigo e “co-orientador”, agradeço de forma especial por me ajudar a resolver os problemas, aconselhar e corrigir meus erros. A vocês três que foram indispensáveis para a realização deste projeto, agradeço imensamente pela amizade e companheirismo.

A todos aqueles que, desde que cheguei a São Carlos, vêm me apoiando e ajudando nas minhas principais dificuldades, amigos sem os quais eu não conseguiria chegar até aqui. Aos meus grandes amigos Camila Almeida Alves (Kμ'), Guilherme de Paula (Morcego), Eduardo G. Machado (Spin) e aos demais amigos e companheiros da turma de 2005. A todos os companheiros de laboratório de Biotecnologia Microbiana e Eletroquímica.

Quero agradecer àquelas pessoas que mesmo não estando próximas nos momentos mais difíceis, estavam nos bastidores torcendo, apoiando e orando por mim. Minha mãe Maryangela Soares e ao meu pai Jeremias de Oliveira Gomes (*in memorian*) agradeço pela vida, pela minha formação pessoal e pelo amor que de maneira única expressaram por mim. Às minhas irmãs que igualmente contribuíram durante o meu crescimento como pessoa e sempre trouxeram uma palavra de conforto e apoio nos momentos difíceis. Aos cunhados meus agradecimentos sinceros, já são igualmente meus irmãos. Aos meus quatro maravilhosos sobrinhos Jéssica, Leonardo, Rafael e Amanda pela alegria que me trazem. Aos meus tios Valdir e Elisabeth (Beth), que confiaram no meu potencial, investindo pesado nos estudos que me permitiram ingressar na Universidade de São Paulo. E a todos os demais familiares que igualmente amo.

Estas últimas linhas foram guardadas para as duas pessoas mais importantes da minha vida. Minha amiga, companheira, conselheira, ajudante, psicóloga e esposa Milene Zezzi do Valle Gomes, sem a qual meu mundo seria vazio e sem graça. Sem eu apoio, paciência e companheirismo, eu não teria chegado até aqui. E a Jesus Cristo, autor e consumidor da vida, que em sua onipresença sempre esteve ao meu lado, guiou os meus passos e colocou todas essas pessoas maravilhosas no meu caminho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do funcionamento de uma PEMFC H_2/O_2 . Os elétrons resultantes da oxidação do hidrogênio no ânodo são transportados para o cátodo por meio de um circuito elétrico externo onde sua energia pode ser aproveitada, enquanto os prótons são transportados pela membrana transferidora de prótons. No cátodo ocorre a redução do oxigênio molecular na presença do catalisador e dos prótons e elétrons provenientes do ânodo.21

Figura 2 – Esquema de uma célula a combustível enzimática que utiliza dois tipos de enzimas no ânodo e cátodo metálico. No desenho, a Enzima 1, que transfere os elétrons diretamente para o suporte do eletrodo, catalisa a reação do Substrato 1 dando origem ao Produto 1 mais um próton, que por sua vez é o substrato para a Enzima 2, que realiza o transporte de elétrons mediado. As reações enzimáticas produzem elétrons e prótons que são utilizados no cátodo metálico para a redução de oxigênio molecular.26

Figura 3 – Esquema simplificado de uma célula a combustível microbiana. (a) O metabolismo celular leva à oxidação de um substrato (combustível), produzindo prótons e elétrons que são transportados até o cátodo onde ocorre a redução de oxigênio. (b) Uma célula a combustível microbiana na qual um microrganismo utiliza um substrato formando um combustível (H_2 , por exemplo) que posteriormente é oxidado no ânodo de uma célula a combustível convencional.29

Figura 4 – Esquema de eletrodos microbianos construídos com diferentes tipos de bactérias. Cada uma das exoeletrogênicas é capaz de realizar um diferente tipo de transporte eletrônico extracelular. (a) transferência direta de elétrons através de estruturas presentes na membrana celular; (b) transferência direta das células bacterianas para os eletrodos por meio de nanotubos ou pili; e (c) transferência de elétrons mediada por transportadores de elétrons extracelulares.31

Figura 5 – Mecanismo de transferência eletrônica extracelular realizada por *Geobacter sulfurreducens*. (a) Micrografia de transmissão eletrônica mostrando a associação de óxido férrico com os pili da bactéria *Geobacter sulfurreducens*. (b) Esquema de transferência de elétrons direta (sem o uso de mediadores químicos extracelulares) do interior da membrana celular (citoplasma) para os receptores finais de elétrons (Fe^{3+}). MacA, OmcB, OmcE e OmcS são tipos de citocromos c. (De Lovley(2006)).33

Figura 6 – Representação dos mediadores químicos azinas. No caso de X ser um átomo de nitrogênio (N) este composto recebe o nome de fenazina e é amplamente produzido por culturas de *Pseudomonas* spp.35

Figura 7 – Esboço da célula de trabalho projetada para célula a combustível microbiana.46

Figura 8 – Aparatos de acrílico utilizados como célula a combustível microbiana. (a) células utilizadas nos primeiros meses de pesquisa. As marcas marrons evidenciam a degradação das peças de acrílico que ocorreram durante os experimentos e as constantes esterilizações com álcool 70%. (b) Novas células de acrílico que, mesmo após diversos experimentos, não apresentaram degradação.....48

Figura 9 – Peças centrais das células de acrílico: (a) primeira célula utilizada e (b) células reforçadas. As setas apontam para os pontos de contato com o-rings de borracha para evitar vazamentos. Enquanto as células antigas apresentavam apenas um ponto, as novas células apresentam dois pontos.....48

Figura 10 – Tampas de Teflon utilizadas para os erlenmeyers nos testes de voltametria cíclica do meio de cultura King e dos pigmentos piocianina e fenazina. a) visão lateral e b) visão superior.51

Figura 11 – Crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) pela cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 em diferentes meios de cultura sob agitação constante de 150 rpm a 37 °C.54

Figura 12 – Crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) pela cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 em diferentes meios de cultura sob agitação constante de 150 rpm em temperatura ambiente.....57

Figura 13 – Crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) pela cepa *P. aeruginosa* ATCC27853 em diferentes meios de cultura em temperatura ambiente e sem agitação.....58

Figura 14 – Crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) pela cepa *P. aeruginosa* ATCC27853 em meio de cultura King sob diferentes condições de cultivo. (Preto - agitado a 37 °C; Azul – não agitado em temperatura ambiente; Vermelho – não agitado em temperatura ambiente; agitação de 150 rpm).59

Figura 15 – Avaliação do crescimento microbiano (a) e da produção de pigmentos (b) por diferentes linhagens de *P. aeruginosa* em meio King, a temperatura constante de 37 °C e agitação de 150 rpm.....61

Figura 16 – Avaliação do crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) por diferentes linhagens de <i>P. aeruginosa</i> em meio King, a temperatura ambiente e agitação a 150 rpm.	62
Figura 17 – Avaliação do crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) por diferentes linhagens de <i>P. aeruginosa</i> em meio CN1%, temperatura constante de 37 °C e agitação a 150 rpm.	65
Figura 18 – Avaliação do crescimento microbiano (D.O. 610 nm) e da produção de pigmentos (Abs 400 nm) da cepa ATCC 27853 em meio de cultura mínimo em temperatura ambiente e agitação constante de 150 rpm.	67
Figura 19 – Voltametria cíclica do meio de cultura caldo King. A presença do pico de redução que se inicia a partir de -0,3 V foi atribuída, inicialmente, à presença de glicerol no meio.	69
Figura 20 – Voltametria cíclica do meio de cultura caldo King sem glicerol. Observa-se a formação de um pico de redução após -0,3 V.	69
Figura 21 – Voltametria cíclica do meio de cultura caldo King em intervalo de potencial de -0,4 a 0,2 V.	70
Figura 22 – Voltametria cíclica da piocianina (a) e da fenazina (b) em caldo King. Observa-se que existem picos de oxidação e redução da piocianina em aproximadamente -0,24 V e da fenazina em aproximadamente -0,37 V.	72
Figura 23 – Cronoamperometria da CCM com caldo nutriente enriquecido com 2,5 e 5 g.L ⁻¹ de glicose e com cultura pura de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 278523. Observa-se que a corrente atingida pela célula que possui o dobro de glicose atinge correntes até dez vezes maiores em determinados momentos de experimento.	74
Figura 24 – Cronoamperometria da CCM com caldo nutriente enriquecido com 5 e 10 g.L ⁻¹ de glicerol e com cultura pura de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 278523.	75
Figura 25 – Cronoamperometrias de CCM que utilizam diferentes combustíveis. A comparação entre o desempenho de CCMs que utilizam caldo nutriente enriquecido com glicerol a 10 g.L ⁻¹ ou glicose a 5 g.L ⁻¹ mostra que não existe grande diferença no valor, mas na curva de produção de corrente.	76

Figura 26 – Cronoamperometrias de células a combustível microbianas com culturas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 em meio de cultura caldo nutriente enriquecido com 25 g.L ⁻¹ de glicerol.	78
Figura 27 – Cronoamperometrias de células a combustível microbianas com culturas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 em meio de cultura caldo King.	80
Figura 28 – Cronoamperometrias das células a combustível microbianas com meio de cultura King e cátodo sem membrana trocadora de prótons. Os cátodos apresentaram vazamentos que foi mais intenso para a célula denominada KingSM 2, o que obrigou o encerramento deste teste antes das 70 horas.	81
Figura 29 – Fotografia do cátodo de célula a combustível microbiana com culturas puras de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 sem membrana trocadora de prótons. A coloração verde-musgo observada sobre a superfície do cátodo são as colônias bacterianas produtoras de piocianina.	83
Figura 30 – Cronoamperometrias das células a combustível microbianas com meio de cultura King e cátodo sem membrana trocadora de prótons e uma camada extra de Teflon	84
Figura 31 – Gráfico de I x E para reação de redução de oxigênio em cátodos (a) sem membrana trocadora de prótons e (b) com membrana trocadora de prótons.	86
Figura 32 – Gráfico de I x E para reação de redução de oxigênio em solução de H ₂ SO ₄ 2 mol.L ⁻¹ . O cátodo utilizado neste experimento foi o mesmo utilizado no experimento anterior com membrana.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de enzimas, função enzimática, mediadores químicos e substratos comumente utilizadas em CCEs.....	25
Tabela 2 – Exemplos de microrganismos utilizados em ânodos de CCMs que realizam transporte de elétrons direto e mediado, e o receptor final de elétrons que utilizam.	28
Tabela 3 – Valores máximos de absorbância em 400 nm e de D.O. em 610 nm das linhagens ATCC 27853, LBI e L2-1 em diferentes condições de cultivo.	63
Tabela 4 – Crescimento microbiano (610 nm) e produção de pigmentos (400 nm) em células a combustível microbianas com caldo King.....	80

RESUMO

Biocélulas a combustível são dispositivos eletroquímicos que convertem energia química em energia elétrica por meio da combustão bioeletroquímica de matéria orgânica. Células a combustível microbianas são biocélulas que utilizam microrganismos para metabolizar substratos no compartimento anódico. Entre os diversos microrganismos utilizados, algumas bactérias têm se destacado por apresentarem características de transferência de elétrons altamente eficientes, seja diretamente ou indiretamente (mediada), para os eletrodos. Entre as bactérias mais estudadas a espécie *Pseudomonas aeruginosa* possui grande importância devido à sua capacidade de produzir piocianina, um pigmento azul-esverdeado, que possui as características necessárias para a transferência de elétrons. A *Pseudomonas aeruginosa* apresenta melhor desempenho na produção da piocianina em meios de cultura enriquecidos com glicerol. O glicerol, por sua vez, é o principal subproduto na produção de biodiesel, e amplamente utilizado em indústrias como a de cosméticos. No entanto, o aumento exponencial na produção de biodiesel resultou no acúmulo do glicerol residual, o que fez seu preço cair substancialmente nos últimos anos e ocasionado o acúmulo como um subproduto indesejável. Com base nesses dados, o objetivo deste trabalho foi estudar linhagens de *P. aeruginosa* quanto à produção de pigmentos em caldo nutriente enriquecido com glicerol e caldo King (meio de cultura próprio para a produção de piocianina, que contém em sua formulação 10 g.L⁻¹ de glicerol) e células a combustível microbianas com a linhagem que apresentar os melhores resultados em relação à produção de pigmentos. Os resultados mostraram que das seis linhagens apenas três se mostraram capazes de produzir piocianina em meio King, sendo que a cepa ATCC 27853 apresentou o melhor desempenho. As células a combustível microbianas construídas com meio de cultura caldo nutriente enriquecido com glicerol e meio King mostraram que é possível produzir pequenas quantidades de corrente com esta bactéria. Os estudos de cronoamperometrias e reação de redução de oxigênio apontam que a utilização de Nafion® como membrana trocadora de prótons é ineficiente devido à alta concentração de íons Na⁺ e K⁺ e, portanto, mais estudos devem ser realizados na ausência deste tipo de membrana para a otimização da produção de corrente.

ABSTRACT

Biofuel cells are electrochemical devices that convert chemical energy into electrical energy by the bioelectrochemical combustion of organic matter. Microbial fuel cells are biofuel cells that use microorganisms to metabolize substrates in the anodic chamber. Among several microorganisms used, some bacteria species have gained special attention because they show high efficiency in the electronic transfer, directly or indirectly (mediated transfer), toward the electrodes. Among the most studied bacteria species *Pseudomonas aeruginosa* showed a great importance due to their capacity to produce pyocyanin, a blue-green pigment, that possess the necessary features to mediate electron transfer. The *P. aeruginosa* show the best performance for pyocyanin production in culture media enriched with glycerol. Glycerol is the main byproduct of biodiesel production and largely used in the cosmetics industries. Nevertheless, the exponential increase in the biodiesel production resulted in a glycerol byproduct accumulation that made its price decreased substantially in the last years and became an undesirable product. With this information, the aim of this study was to investigate the pigment production by *P. aeruginosa* strains in nutrient broth enriched with glycerol and King broth (a culture medium specific for pyocyanin production which uses 10 g.L⁻¹ of glycerol) and microbial fuel cells with *P. aeruginosa* strains which showed the best results in the pigment production experiments. The results showed that among the six studied strains only three were able to produce pyocyanin in King culture medium, and the ATCC 27853 strain showed the best performance. Microbial fuel cells constructed with nutrient broth enriched with glycerol and King broth media resulted in a small current output. The experiments with chronoamperometry and oxygen reduction reaction suggest that the utilization of Nafion® as a proton exchange membrane is inefficient due the high Na⁺ and K⁺ ion concentration. So, new experiments with membraneless microbial fuel cells are needed to improve the current output.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. CÉLULAS A COMBUSTÍVEL	18
2.1 As células a combustível convencionais.....	19
2.2 Células a combustível biológicas (CCB)	22
2.2.1 Células a combustível enzimáticas.....	23
2.2.2 Células a combustível microbianas	26
2.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a produção de piocianina.....	36
2.4 Glicerol	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivos gerais	40
3.2 Objetivos específicos	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Microrganismos	43
4.1.1 Microrganismos utilizados	43
4.1.2 Cultivo e padronização de inóculo	43
4.2 Meios de cultura.....	43
4.2.1 Para os testes de crescimento e produção de pigmentos	44
4.2.2 Para as culturas bacterianas.....	44
4.2.3 Para as células a combustível microbianas	45
4.3 Testes de crescimento microbiano e produção de pigmentos.....	45
4.4 Células a combustível microbianas.....	46
4.4.1 Aparatos deacrílico como células a combustível microbiana.....	47
Figura 9 – Peças centrais das células deacrílico: (a) primeira célula utilizada e (b) células reforçadas. As setas apontam para os pontos de contato com o-rings de borracha para evitar vazamentos. Enquanto as células antigas apresentavam apenas um ponto, as novas células apresentam dois pontos.	48
4.4.2 Preparação do cátodo	49
4.4.3 Preparação do ânodo	50
4.5 Voltametria cíclica e reação de redução de oxigênio.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Crescimento microbiano e produção de pigmentos	53

5.1.1 Culturas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 em diferentes meios de cultura	53
5.1.2 Diferentes culturas de <i>P. aeruginosa</i> em meio King	60
5.1.3 Diferentes culturas de <i>P. aeruginosa</i> em caldo nutriente enriquecido com 10 g.L ⁻¹ de glicerol.....	63
5.1.4 Avaliação da cepa <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 em meio mínimo	65
5.2 Caracterização eletroquímica dos pigmentos piocianina e fenazina	67
5.2.1 Voltametria cíclica do meio de cultura caldo King.....	68
5.2.2 Voltametrias cíclicas dos mediadores químicos em caldo King	70
5.3 Cronopotenciometrias	73
5.3.1 Cronoamperometrias das células a combustível em caldo nutriente enriquecido com 10 g.L ⁻¹ de glicose e 10 g.L ⁻¹ de glicerol.....	73
5.3.2 Cronoamperometrias das células a combustível microbianas que utilizam caldo nutriente enriquecido com 25 g.L ⁻¹ de glicerol	76
5.3.3 Cronoamperometrias das células a combustível microbianas que utilizam meio de cultura King.....	79
5.3.4 Cronoamperometria das células a combustível com caldo King sem membrana de Nafion®	80
5.4 Avaliação da atividade da membrana de Nafion por meio de reação de redução de oxigênio	84
6. Conclusões	87
7. Referências bibliográficas	90

1.INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos dos últimos dois séculos nas áreas da indústria e da saúde acarretaram em um aumento exponencial da população mundial exigindo assim uma maior demanda energética para os diversos setores que hoje são indispensáveis para o sustento da qualidade de vida. Infelizmente, o crescimento populacional se deu de forma descontrolada, o que levou ao aquecimento global pela alta emissão de gases causadores do efeito estufa, à poluição de rios, lagos e lençóis freáticos e ao acúmulo de resíduos industriais e urbanos. Gonzalez (1999) descreveu que um dos principais problemas para o futuro da sociedade é a degradação do meio ambiente, decorrente do uso indiscriminado dos combustíveis de origem fóssil para a geração de energia. A queima dos combustíveis fósseis leva à geração de gases como o CO₂ e o SO₂ que são responsáveis pela chuva ácida e aumentam o efeito estufa (SAXENA, 2007; SHAY, 1993). Além disso, as jazidas de combustíveis fósseis não são renováveis, ou seja, seu uso levará ao seu total esgotamento. Saxena, Adhikari e Goyal (2007) escreveram que próximo ao ano 2050 as reservas de petróleo estarão completamente extintas. Todavia, a demanda por energia tem apenas aumentado (SAXENA; ADHIKARI; GOYAL 2007) e as tecnologias para a substituição de combustíveis não renováveis ainda estão longe de atingirem seu objetivo, levando a um futuro incerto sobre a manutenção da vida como a conhecemos.

Para contornar este problema, faz-se necessário o estudo de novas tecnologias que utilizem fontes de carbono renováveis (YAZDANI; GONZALEZ, 2007) sejam baratas e não causem danos ao meio ambiente (SAXENA; ADHIKARI; GOYAL 2007). Neste quadro, o uso dos biocombustíveis que podem ser sólidos (carvão vegetal), líquidos (etanol, óleo vegetal e biodiesel) e gasosos (biogás e biohidrogênio) tem aumentado e, além dos benefícios ambientais, seu uso ainda traz benefícios sociais tais como sustentabilidade e desenvolvimento econômico regional e agrícola (DEMIRBAS, 2009). O biodiesel tem ganhado cada vez mais destaque devido às leis internacionais que tornam obrigatória a

presença de biodiesel no diesel de petróleo. No Brasil, essa quantidade é de 3% e deve aumentar para 5% até 2013 (MOTA; SILVA; GONÇALVES 2009) e, futuramente, este valor percentual pode aumentar para 20% (POUSA; SANTOS; SUAREZ 2007). Contudo, a produção do biodiesel de óleo de soja custa em torno de U\$2,94 por galão e o custo do galão de biodiesel no mercado é de U\$3,02 (YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

Uma das alternativas para contornar o baixo valor do biodiesel, é utilizar métodos de produção deste biocombustível que leve a geração de resíduos com alto valor agregado (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). O biodiesel produzido por meio da transesterificação dos óleos vegetais ou gordura animal em meio alcalino leva à produção de 10% em massa de glicerol, o qual é um co-produto desejável para impulsionar o mercado do biodiesel (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). No entanto, a grande produção de biodiesel tem acarretado em um acúmulo de glicerol que rapidamente se tornou um grande problema, uma vez que seu preço caiu dez vezes em dois anos, obrigando duas empresas, a Dow Chemicals e a Procter & Gamble, a fecharem suas fábricas especializadas neste produto (BARBOSA, 2009).

Com base nesses dados, uma alternativa viável para contornar os problemas energéticos e ambientais se encontra nas células a combustível. Estes dispositivos são capazes de oxidar combustíveis no ânodo e reduzir oxigênio no cátodo de modo que a energia química possa ser convertida em energia elétrica. As células a combustível são construídas com eletrodos metálicos os quais são altamente capazes oxidar hidrogênio e outras moléculas de baixo peso molecular como metanol (GONZALEZ, 1999) sem que haja emissão de gases tóxicos ou a liberação de resíduos indesejáveis. Contudo, os eletrodos metálicos são caros e extinguíveis, de tal forma que atualmente os bioeletrodos vêm sendo cada vez mais utilizados em células a combustível. Os bioeletrodos utilizam catalisadores biológicos que são renováveis, mais baratos e possuem alta eficiência na oxidação de combustíveis. Além disso,

eles apresentam diversas vantagens sobre os eletrodos metálicos que serão posteriormente detalhadas.

Neste estudo foram realizados experimentos com bioeletrodos de *Pseudomonas aeruginosa*, um microrganismo comum em todos os tipos de ambientes e capaz de consumir glicerol e produzir um pigmento conhecido como piocianina. Além das diversas características antibióticas (BARON; ROWE, 1981; VUKOMANOVIC et al., 1996), a piocianina possui características redox altamente desejáveis em células a combustível, porque tem um importante papel na transferência de elétrons das células bacterianas para os eletrodos (RABAEY et al., 2005). Desta forma, o uso de linhagens de *P. aeruginosa* capazes de consumir o glicerol e produzir pigmentos resultando na produção de energia em células a combustível microbianas visa, principalmente, ampliar o mercado para o glicerol residual e um aumentar seu valor agregado, tornando a produção do biodiesel um processo mais rentável.

2.CÉLULAS A COMBUSTÍVEL

Células a combustível são dispositivos eletroquímicos capazes de converter energia química em energia elétrica com alta eficiência e baixa emissão de poluentes (GONZALEZ 1999; TICIANELLI; GONZALEZ 1989; SANTOS; COLMATI; GONZALEZ, 2006). Além de serem mais facilmente manipuláveis por não apresentarem partes móveis, existe ainda uma vantagem termodinâmica destas células sobre as máquinas térmicas (motores de combustão interna, por exemplo), uma vez que a combustão eletroquímica dos combustíveis não possui as mesmas limitações de eficiência impostas pelo ciclo de Carnot (TICIANELLI; GONZALEZ, 1988). A produção de energia elétrica ocorre de forma simples: um combustível orgânico ou inorgânico é oxidado no ânodo (pólo negativo) enquanto no cátodo (pólo positivo) ocorre a redução de oxigênio molecular. Os prótons formados no ânodo são transferidos para o cátodo por meio de um eletrólito (que é uma solução transportadora de íons), enquanto os elétrons circulam por um circuito elétrico externo onde sua energia pode ser aproveitada. Nestas células, as reações ocorrem de forma mais controlada minimizando – ou mesmo eliminando – a presença de subprodutos indesejáveis. Embora seja uma tecnologia emergente, a utilização das células a combustível já é uma realidade nos EUA, Europa e Japão desde os anos 80 e seu funcionamento, aplicação e importância foram descritos por Ticianelli e Gonzalez (1989).

2.1 As células a combustível convencionais

Atualmente as células a combustível que têm mostrado melhor desempenho são as PEMFCs (*“Proton Exchange Membrane Fuel Cells”*), as quais utilizam membranas poliméricas para transferir os prótons do ânodo para o cátodo (Figura 1). Para que seu funcionamento ocorra de modo satisfatório mesmo em temperaturas moderadas (80-200 °C) é necessário o uso de materiais com alta atividade eletrocatalítica (GONZALEZ, 1999). Atualmente, são utilizados diversos metais para este fim, mas as PEMFCs que apresentam o

melhor rendimento são aquelas que utilizam platina como catalisadores eletroquímicos, tanto no ânodo quanto no cátodo, para oxidação de hidrogênio no primeiro e redução do oxigênio no segundo. Este tipo de célula a combustível é tão comum que são normalmente conhecidas como células a combustível convencionais (CCC).

Eletroquimicamente, a platina é um metal extremamente útil para aplicação em células a combustível como as PEMFCs. Isto porque a platina é um metal bastante estável nas condições de operação de uma CCC e, portanto, sofre minimamente oxidação ou outro tipo de reação que cause a perda do material eletródico. No entanto, nessas mesmas condições a platina é extremamente ativa eletroquimicamente tanto para a oxidação de combustíveis como para a redução do oxigênio. Contudo, este metal apresenta diversas limitações cinéticas e reacionais que restringem sua utilização. Entre elas Ticianelli e Gonzalez (1989) e Gonzalez (1999) destacam:

- i) A utilização de combustíveis facilmente oxidáveis, como por exemplo, H_2 ou MetOH, porque uma vez que se utilize combustíveis mais complexos como o etanol ou o glicerol, os produtos das semi-reações podem gerar intermediários que envenenem, ou seja, liguem-se fortemente aos eletrodos, reduzindo seu desempenho;
- ii) Utilização de combustíveis com alto grau de purificação. O hidrogênio é o composto mais facilmente oxidável em CCCs, mas o hidrogênio mais barato é aquele proveniente da reforma de combustíveis fósseis e, por esta razão, apresenta CO como contaminador. Para os eletrodos de platina o CO é uma molécula extremamente indesejável, porque reduz drasticamente o desempenho da célula a combustível mesmo em concentrações de 0,5-1% em CCCs de ácido fosfórico operando a 200 °C. Mas para células que operam em 80 °C as concentrações de

CO devem ser menores do que 10 ppm para que não haja envenenamento do eletrodo.

- iii) As reações devem ocorrer em altas temperaturas para que a cinética de reação seja elevada e haja maior conversão de combustível em energia.

Figura 1 – Esquema do funcionamento de uma PEMFC H_2/O_2 . Os elétrons resultantes da oxidação do hidrogênio no ânodo são transportados para o cátodo por meio de um circuito elétrico externo onde sua energia pode ser aproveitada, enquanto os prótons são transportados pela membrana transferidora de prótons. No cátodo ocorre a redução do oxigênio molecular na presença do catalisador e dos prótons e elétrons provenientes do ânodo.

Quando se trata de sua aplicação em escala industrial, um dos fatores que torna a utilização das CCCs insustentável é o preço da platina. Este metal raro, por ser inerte em diversos ambientes, é amplamente utilizado em indústrias e também em instrumentos cirúrgicos. Sendo assim, o seu preço tem exorbitado no mercado de metais nobres. Além

disso, Borgwardt (2001) relata que para que um veículo automotor utilizar células a combustível à base de platina, seriam necessários 25 g de platina em cada carro. A média mundial de produção de carros nos últimos cinco anos está em aproximadamente 52 milhões de carros (WORLDOMETERS) e, portanto, a quantidade necessária de platina para equipar os carros produzidos em apenas um ano seria de 1300 toneladas. Uma vez que as jazidas de platina estão estimadas em aproximadamente 45000 toneladas (CAWTHORN, 1999), o futuro suprimento deste metal para todas as suas áreas de aplicação torna-se incerto e a única alternativa para este cenário é a reciclagem (FUKUROZAKI; SEO, 2006).

Outro fator que contribui tanto quanto a platina para o custo das CCCs é a membrana de intercâmbio protônico. A membrana trocadora de prótons mais utilizada é a membrana de Nafion® da DuPont, que apresenta diversas características destacadas por Yamaki et al. (2004), as quais a torna uma excelente opção para as CCCs. Todavia, a preparação destas membranas é um processo longo e caro, o que limita ainda mais a aplicação das células a combustível em larga escala.

2.2 Células a combustível biológicas (CCB)

Com base nos problemas apresentados pelas CCCs, o interesse pelas células a combustível biológicas tem crescido e ganhado cada vez mais atenção. Nessas células a conversão de energia química em energia elétrica ocorre por meio de reações bioquímicas (SHUKLA et al., 2004). As CCBs que utilizam enzimas como catalisadores são conhecidas como células a combustível enzimáticas (CCE) e as que utilizam microrganismos são chamadas de células a combustível microbianas (CCM). Ambas já vêm sendo amplamente estudadas em diversas instituições de pesquisa. Existem também outros tipos de CCBs, as que utilizam fungos como as leveduras e outras que utilizam organelas como os citocromos para a

transferência de elétrons, mas seu estudo ainda é limitado. Ainda existe o caso de CCBs que assim são chamadas não por utilizarem catalisadores biológicos, mas moléculas orgânicas provenientes do metabolismo microbiano e que são aplicadas para a geração de energia elétrica em CCCs.

Os catalisadores biológicos para células a combustível não apresentam as limitações de disponibilidade como no caso dos metais, uma vez que, descoberto um microrganismo ou enzima capaz de oxidar os substratos e transferir os elétrons para os eletrodos com alta eficiência, sua produção pode ser realizada de modo a suprir toda a demanda necessária. Outro fator importante no estudo destes catalisadores é a vasta gama de combustíveis que podem ser utilizados e a baixa purificação exigida (SHUKLA et al., 2004; PRAKASH et al., 2010), já que as enzimas são específicas sobre seus substratos e os microrganismos possuem grande capacidade de se adaptar a diferentes ambientes e fontes de carbono. Ademais, existem ainda alguns fatores específicos de cada um deles que serão discutidos adiante.

2.2.1 Células a combustível enzimáticas

A primeira célula a combustível construída com enzimas purificadas foi demonstrada por Yahiro, Lee e Kimble (1964) que construíram bioânodos com três diferentes tipos de enzimas (glicose oxidase, aminoácido oxidase e álcool desidrogenase). Para serem utilizadas em CCEs, as enzimas devem apresentar alta atividade catalítica sobre os substratos (combustíveis) tanto na forma livre quanto imobilizada sobre o suporte do eletrodo, e a capacidade para transferir ou receber elétrons direta ou indiretamente dos materiais usados como suportes.

Enzimas que apresentam alta eficiência no transporte de elétrons para o suporte ou são capazes de receber os elétrons do suporte devem apresentar características tais como: (i) o

sítio ativo deve estar próximo da superfície enzimática; (ii) a enzima tem que ser imobilizada da forma correta no eletrodo, isto é, com o sítio ativo voltado para o suporte; (iii) a deformação da estrutura enzimática pelos processos de imobilização não podem afetar a atividade catalítica da enzima. Os estudos que primeiro demonstraram enzimas que transferem elétrons diretamente para materiais condutores foram realizados na década de 70, com o estudo de enzimas multicobre oxidase como a lacase e, mais tarde, já nos anos 80, novos estudos foram realizados com diversas enzimas capazes de transferir elétrons diretamente para os eletrodos (COONEY et al., 2008).

No entanto, grande parte das enzimas possui dimensões que estão na faixa de 70-200 Å e seus centros ativos estão cercados por grandes cadeias peptídicas, o que dificulta a transferência direta dos elétrons para os eletrodos e, portanto, necessitam de mediadores químicos para este fim (WILLNER et al., 2008). Mediadores químicos são moléculas orgânicas ou inorgânicas de baixo peso molecular que apresentam características redox e são oxidados ou reduzidos em contato com as enzimas e sofrem a reação contrária na superfície do eletrodo. Este tipo de reação é conhecido como transferência mediada de elétrons, e também é amplamente observada em células a combustível microbianas. A Tabela 1 traz exemplos de enzimas que são amplamente utilizadas em CCEs, se são utilizadas no ânodo ou cátodo, o mediador químico e o substrato preferencial.

A Figura 2 esboça o funcionamento de uma CCE que utiliza dois tipos de enzimas capazes de transferir elétrons diretamente ou por meio de um mediador químico para o suporte, e mostra como deve ser um eletrodo enzimático capaz de realizar uma catálise em cascata do substrato, de modo a se obter uma maior quantidade de elétrons e um produto final mais simples. Por exemplo, se na Figura 2 a Enzima 1 for uma álcool desidrogenase e o Substrato 1 metanol, o Produto 1 será o metanal. Assim, se a Enzima 2 for uma aldeído

dresidrogenase, o Produto 2 será formiato. Para que esse ciclo se feche com a formação do produto mais simples, seria ainda necessária uma terceira enzima – a formiato desidrogenase – para que se obtivesse a oxidação completa do metanol a CO₂. No entanto, realizar este tipo de reação em cadeia com alto rendimento em CCEs ainda não é tecnicamente possível (LOVLEY, 2006).

Tabela 1 – Exemplos de enzimas, função enzimática, mediadores químicos e substratos comumente utilizadas em CCEs.

Enzima	Função	Mediador	Substrato	Referência
Lacase	Cátodo	ABTS*	O ₂	Luo et al. (2010)
Bilirrubina oxidase	Cátodo	Naftil-2-carboxilato	O ₂	Santos (2010)
Álcool desidrogenase	Ânodo	NAD/NADH	Alcoóis	Ramanavicius (2008)
Glicose oxidase	Ânodo	Azul de bromotimol e verde de bromocresol	Glicose	La Rotta et al., (2010)

* sal de diamônio 2,2-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfônico)

Quanto à produção de corrente e potência, as CCEs apresentam um melhor desempenho quando comparadas às CCMs. Entretanto, uma CCE construída com apenas um tipo de enzima leva à oxidação parcial dos substratos/combustíveis, as enzimas imobilizadas apresentam curtos períodos de atividade (7-10 dias) e a necessidade de mediadores químicos acarreta em mais uma limitação devido à estabilidade das moléculas transportadoras de elétrons (COONEY et al., 2008). Já as CCMs possuem tempos de vida que podem chegar a cinco anos, os combustíveis/substratos são completamente oxidados (COONEY et al., 2008) e podem-se utilizar combustíveis com alto grau de complexidade (resíduos urbanos e industriais) para produzir uma grande quantidade de energia elétrica (PRAKASH et al., 2010).

Ademais, as enzimas necessitam de complexos processos de purificação de modo a se conseguir um produto puro sem que haja perda de atividade enzimática, enquanto os microrganismos podem ser utilizados em grandes consórcios bacterianos ou são facilmente isolados (SHUKLA et al., 2004). Por estas razões, o estudo das células a combustível microbianas se torna extremamente interessante.

Figura 2 – Esquema de uma célula a combustível enzimática que utiliza dois tipos de enzimas no ânodo e cátodo metálico. No desenho, a Enzima 1, que transfere os elétrons diretamente para o suporte do eletrodo, catalisa a reação do Substrato 1 dando origem ao Produto 1 mais um próton, que por sua vez é o substrato para a Enzima 2, que realiza o transporte de elétrons mediado. As reações enzimáticas produzem elétrons e prótons que são utilizados no cátodo metálico para a redução de oxigênio molecular.

2.2.2 Células a combustível microbianas

Enquanto os estudos com CCEs datam de 50 anos atrás, o estudo de microrganismos teve seu início já há um século. Na realidade, Potter (1911) realizou estudos com leveduras para a oxidação de glicose no ânodo de uma célula a combustível. Contudo, o conceito de se utilizar bactérias para catalisar reações e produzir energia elétrica em células a combustível se

tornou popular na década de 60, quando a *National Aeronautics and Space Administration* mostrou interesse em transformar resíduos orgânicos em eletricidade (SHUKLA et al., 2004), e passou a ser amplamente explorado a partir dos anos 70 (RABAEY; VERSTRAETE, 2005). Em 1962, uma CCM foi construída com *Clostridium butyricum* para gerar hidrogênio por meio da fermentação da glicose, e somente em 1991 CCMs foram utilizadas para o tratamento de resíduos domésticos (RABAEY; VERSTRAETE, 2005). Como já foi dito, a maior importância no estudo das CCMs é a possibilidade de transformar resíduos domésticos, urbanos ou qualquer outro que possua uma grande quantidade de matéria orgânica em energia elétrica, com um aproveitamento de 90% dos elétrons disponíveis (LOVLEY, 2006). Por esta razão, é possível que estas células sejam futuramente utilizadas desde em pequenos dispositivos eletrônicos como celulares ou laptops, até grandes plantas de tratamento de esgotos e geração de energia elétrica. No entanto, ainda não existe tecnologia suficiente de CCMs para estes fins (LOVLEY, 2006).

Em suma, a produção de energia elétrica em uma CCM ocorre de maneira simples: os microrganismos (normalmente um consócio bacteriano ou bactérias em culturas puras) são colocados em uma câmara contendo matéria orgânica em suspensão aquosa, e o metabolismo das células bacterianas gera prótons e elétrons que são transportados até os eletrodos onde ocorrem as transformações eletroquímicas (LOGAN et al., 2006), como apresentado na Figura 3. Contudo, a tecnologia das CCMs abrange diversas áreas de conhecimento que parte dos conceitos básicos de biologia celular até o complexo estudo do transporte eletrônico intra e extracelular que acarreta na produção de energia elétrica, além dos diversos materiais eletroquímicos necessários para que haja o melhor aproveitamento dos elétrons das CCMs.

Para iniciar uma discussão mais detalhada sobre as CCMs, primeiramente será dado um destaque maior para bactérias que são capazes de transferir elétrons direta ou indiretamente para os eletrodos, essas são conhecidas como exoeletrogênicas ou

eletricigênicas, bactérias eletroquimicamente ativas (LOGAN, 2009). A Tabela 2 mostra alguns dos principais microorganismos utilizados em CCMs. O motivo das bactérias produzirem energia se encontra no fato de esses organismos vivos serem altamente capazes de se adaptar rapidamente a diferentes condições de vida. As bactérias exoeletrogênicas são capazes transferir os elétrons gerados durante seu metabolismo para diferentes receptores finais de elétrons ou receber elétrons dos eletrodos e realizar a redução de oxigênio (LOGAN, 2009).

Tabela 2 – Exemplos de microorganismos utilizados em ânodos de CCMs que realizam transporte de elétrons direto e mediado, e o receptor final de elétrons que utilizam.

Tipo de transferência	Microorganismos	Receptor final de elétrons	Referências
Diretamente pela membrana	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fe ³⁺ redutora	Chaudhuri e Lovley (2003)
	<i>Clostridium butyricum</i>	Citocromos	Park (2001)
Transferência mediada	<i>Geobacter sulfurreducens</i> ^a	89 kDa citocromo tipo c	Bond e Lovley (2003)
	<i>Aeromonas hydrophila</i> ^a	Citocromo tipo c	Pham (2003)
	<i>Escherichia coli</i> ^a	Hidrogenase	McKinlay e Zeikus (2004)
	<i>Shewanella putrefaciens</i> ^a	Quinonas	Hernandes e Newman (2001)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piocianina, fenazina carboximida	Rabaey (2005)
	<i>Erwinia dissolvens</i>	Desconhecido	Veja e Fernandez (1987)
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	S ⁻²	Cooney (1996)
	<i>Enterococcus faecium</i>	Desconhecido	Rabaey (2005)

(a)

(b)

Figura 3 – Esquema simplificado de uma célula a combustível microbiana. (a) O metabolismo celular leva à oxidação de um substrato (combustível), produzindo prótons e elétrons que são transportados até o cátodo onde ocorre a redução de oxigênio. (b) Uma célula a combustível microbiana na qual um microrganismo utiliza um substrato formando um combustível (H_2 , por exemplo) que posteriormente é oxidado no ânodo de uma célula a combustível convencional.

2.2.2.1 Exoeletrogênicas

Um dos maiores desafios do estudo das CCMs é fazer com que as bactérias exoeletrogênicas desviem os elétrons gerados no seu metabolismo dos receptores naturais de elétrons para os eletrodos (LOVLEY, 2006; OSMAN; SHAH; WALSH, 2010). Logan (2009), Lovley (2006) e Osman, Shah e Walsh (2010) relataram que existem três principais meios para o transporte de elétrons extracelular (Figura 4): a transferência direta da membrana celular para os eletrodos através de citocromos ou enzimas, o transporte de elétrons por meio de pili ou nanotubos que partem das bactérias para os eletrodos e a utilização de mediadores químicos (transportadores de elétrons) extracelulares. Lovley (2006) ainda destaca que existe um quarto modo de transporte de elétrons que ocorre por meio de metabolitos (por exemplo, H_2 , formiato ou acetato) que se formam durante o metabolismo e são oxidados em um ânodo metálico (Figura 3).

Devido ao fato de as bactérias transferirem elétrons para os eletrodos de modos diferentes, existe uma curiosidade sobre qual o melhor tipo de transporte eletrônico, ou seja, qual gera a maior quantidade de energia. No entanto, a produção de energia em uma CCM vai muito além do tipo de transferência eletrônica, uma vez que o desempenho das CCMs é afetado pelo tipo de eletrodo (SHUKLA et al, 2004), a presença de membrana trocadora de prótons (PRAKASH et al, 2010), o tipo de substrato/combustível e, por fim, a bactéria ou consórcio bacteriano utilizado. Além disso, CCMs construídas com bactérias que apresentam a capacidade de realizar a transferência eletrônica direta têm o desempenho melhorado quando é adicionado um mediador químico extracelular (RABAEY et al, 2005). Portanto, o estudo não só das bactérias, mas também dos mediadores químicos é de extrema importância para o desenvolvimento de CCMs que apresentem alto grau de rendimento.

Figura 4 – Esquema de eletrodos microbianos construídos com diferentes tipos de bactérias. Cada uma das exoeletrogênicas é capaz de realizar um diferente tipo de transporte eletrônico extracelular. (a) transferência direta de elétrons através de estruturas presentes na membrana celular; (b) transferência direta das células bacterianas para os eletrodos por meio de nanotubos ou pili; e (c) transferência de elétrons mediada por transportadores de elétrons extracelulares.

Entender os mecanismos de transferência eletrônica diretamente das células bacterianas para os eletrodos é de suma importância para que se possam desenvolver materiais anódicos que tornem esta transferência o mais eficiente possível (PARK; ZEIKUS, 2003). Embora os microrganismos tenham tido muito tempo para evoluir de modo a buscar a melhor forma de transferir elétrons para receptores naturais, não se pode afirmar que exista uma forma de transferência que seja melhor do que outra no caso de uma CCM (LOVLEY, 2006).

A primeira barreira que impede que os elétrons fluam do interior para receptores fora da membrana das células é a dupla camada lipídica não condutora, separando o citoplasma, onde os elétrons são produzidos no metabolismo, dos receptores finais de elétrons (LOVLEY, 2006). Contudo, as membranas celulares apresentam proteínas e outras estruturas que são

responsáveis pelo transporte de substâncias para o interior e exterior das células. Nelas (nas membranas celulares) estão presentes proteínas, chamadas de citocromos, que são responsáveis pelo transporte de elétrons. Os citocromos estão presentes em várias partes das células e são indispensáveis para o metabolismo, uma vez que são eles que realizam o transporte de elétrons, possibilitando a oxidação dos substratos. Lovley *et al.* (2004) sugeriram que uma série de citocromos c que estão associados à membrana interna e à membrana externa, possam interagir com os eletrodos, ocasionando a transferência de elétrons. Reguera *et al.* (2005) também afirmaram que além dos citocromos, algumas estruturas celulares como os pili também são necessários para que haja a transferência de elétrons diretamente para os eletrodos. A Figura 5, retirada do trabalho de Derek R. Lovley (2006) detalha como seria o transporte de elétrons direto do citoplasma para o eletrodo, ou seja, sem a utilização de nenhum mediador químico extracelular.

Figura 5 – Mecanismo de transferência eletrônica extracelular realizada por *Geobacter sulfurreducens*. (a) Micrografia de transmissão eletrônica mostrando a associação de oxido férrico com os pili da bactéria *Geobacter sulfurreducens*. (b) Esquema de transferência de elétrons direta (sem o uso de mediadores químicos extracelulares) do interior da membrana celular (citoplasma) para os receptores finais de elétrons (Fe³⁺). MacA, OmcB, OmcE e OmcS são tipos de citocromos c. (De Lovley(2006)).

2.2.2.2 A ação dos mediadores químicos extracelulares

Mediadores químicos ou transportadores de elétrons são compostos orgânicos que podem ser oxidados ou reduzidos reversivelmente e, desta forma, são substâncias capazes de transportar elétrons entre duas reações eletroquímicas (WATANABE et al., 2009). Os mediadores químicos estão presentes em todos os organismos e são indispensáveis para o metabolismo. Por exemplo, o NAD e o FAD são os transportadores de elétrons que entram no

ciclo de Krebs na forma oxidada e são reduzidos pela ação das proteínas formando o NADH_2 e o FADH_2 .

A presença de mediadores químicos nas CCMs possui o mesmo papel que o apresentado pelos mediadores químicos utilizados pelas enzimas, e algumas moléculas como o vermelho neutro são utilizados como mediadores químicos tanto por enzimas (COONEY et al, 2008) como por bactérias (SHUKLA et al, 2004). Da mesma forma que nas enzimas, as reações eletroquímicas que ocorrem no interior dos microrganismos estão a uma grande distância (guardadas as proporções) dos eletrodos e, portanto, é necessário um mediador químico capaz de entrar e sair das células facilmente (SHUKLA, 2004). Wilkinson (2000) relatou que os mediadores químicos devem apresentar seis características:

- i) O mediador químico deve penetrar na membrana celular facilmente.
- ii) O potencial redox do mediador deve ser compatível com o potencial de redução do metabólito.
- iii) Os estados de oxidação não devem interferir nas reações.
- iv) O mediador deve ser estável na solução e dentro das células nos estados oxidado e reduzido.
- v) Os mediadores não podem se adsorver irreversivelmente na membrana celular ou na superfície dos eletrodos.
- vi) A reação de oxidação do mediador na superfície do eletrodo deve ocorrer rapidamente.

Entre os principais mediadores químicos utilizados estão as azinas, compostos que apresentam três anéis aromáticos com dois heteroátomos posicionados como na Figura 6, e apresentam baixo sobrepotencial e alta taxa de reação sobre o eletrodo (COONEY et al, 2008). Em CCMs, os compostos derivados das azinas mais estudados são as fenazinas, que

apresentam um átomo de nitrogênio no lugar do X indicado na Figura 5. Rabaey *et al.* (2005) utilizaram piocianina, um derivado da fenazina produzido apenas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (SMIRNOV; KIPRIANOVA, 1990), em uma célula a combustível microbiana, o que resultou em um aumento na produção de energia de 1206 para 2672 $\mu\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$. Eles defendem que a presença deste composto pode influenciar na composição do consórcio bacteriano, favorecendo as bactérias que o utilizam como mediador químico. O estudo eletroquímico da piocianina se iniciou com o trabalho de Vukomanovic (1996) quando este desenvolveu um método de quantificá-la por meio de voltametria cíclica. Atualmente, a piocianina se destaca em diversos trabalhos realizados com CCMs, pois é um mediador químico eficiente utilizado não apenas por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, mas também por outras espécies bacterianas (RABAEY *et al.*, 2005).

Figura 6 – Representação dos mediadores químicos azinas. No caso de X ser um átomo de nitrogênio (N) este composto recebe o nome de fenazina e é amplamente produzido por culturas de *Pseudomonas* spp.

2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* apresentam-se como bastonetes Gram-negativos, podendo ser observadas como células isoladas, aos pares, ou em curtas cadeias; são intensa ou suavemente curvadas, não esporuladas e aeróbicas estritas (exceto na presença de nitrato, circunstância em que cresce em condições anaeróbicas). Medem de 1,5 a

3,0 µm de comprimento e 0,5 a 0,8 µm de largura. É móvel em grau variado, normalmente apresentando apenas um flagelo polar. Produz diversos pigmentos como a fluoresceína (verde fluorescente), a piorrubina (vermelho), a piomelanina (preto) e a piocianina (azul). Essas bactérias podem ser facilmente identificadas nos meios de cultura comuns devido às características morfológicas das colônias e à produção difusa de pigmentos (NOUÉR, 2005). Elas podem ser identificadas bioquimicamente por meio de reações positivas para oxidase, indofenol, argininahidrolase, utilização de citrato, oxidação da glicose e xilose, mas não oxidam maltose (NOUÉR, 2005).

As bactérias das espécies *P. aeruginosa* tornaram-se o alvo de pesquisas em CCMs devido à sua capacidade na produção de mediadores fenazínicos em meios de cultura com glicose e glicerol em meio alcalino. Além disto, a literatura trás uma vasta gama de artigos nos quais os substratos para produção de pigmentos são glicose e glicerol.

2.3.1 *Pseudomonas aeruginosa* e a produção de piocianina

A descoberta das bactérias da espécie *P. aeruginosa* data de meados do século XIX, quando o isolamento da piocianina foi relacionado à presença de um microrganismo anteriormente conhecido como *Bacillus pyocyaneus*. A presença da molécula de fenazina na piocianina foi primeiramente proposta por Wrede e Strack (1929) e, mais tarde, Hillemann (1938) determinou sua estrutura química correta (MAVRODI; THOMASHOW; BLANKENFELDT, 2008)

As *P. aeruginosa* são bactérias altamente capazes de produzir diversos compostos fenazínicos além da piocianina, incluindo fenazina-1-carboxilato, 1-hidroxifenazina e fenazina-1-carboxamida (BUDZIKIEWICZ, 1993; SMIRNOV; KIPRIANOVA, 1990;

TURNER; MESSENGER, 1986). Smirnov e Kiprianova (1990) ainda salientaram que 90 a 95% de linhagens de *P. aeruginosa* isoladas são produtoras de piocianina. A importância da produção de piocianina por estas bactérias reside em dois principais aspectos: regulação dos genes de quorum sensin (DIETRICH et al., 2006) e como agente antimicrobiano (BARON; ROWE, 1981). A ação antimicrobiana da piocianina ocorre devido à sua capacidade da ciclagem redox na presença de oxigênio, que gera superóxidos como o O_2^{-2} e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são altamente tóxicos para várias bactérias (MAVRODI et al., 2001).

A biossíntese completa da piocianina por culturas de *P. aeruginosa* é complexa e está longe dos objetivos deste estudo, portanto, não mais do que uma breve descrição será feita. Em um estudo dos genes responsáveis pela biossíntese da piocianina, Mavrodi e colaboradores (2001) mostraram que são necessários dois cromossomos homólogos designados pelos autores como *phzA1B1C1D1E1F1G1* e *phzA2B2C2D2E2F2G2* para a produção de fenazina-1-carboxilato e mais três genes adicionais que são responsáveis pela codificação da enzima que transforma a fenazina-1-carboxilato em piocianina. A importância de se estudar o genoma e o metabolismo da *Pseudomonas aeruginosa* para CCMs está relacionado com o entendimento da produção de piocianina e, desta forma, realizar estudos de fluxo metabólico para aumentar a produção deste mediador com o menor número de etapas possível. Isso leva a um aumento no desempenho de CCMs que utilizam este microrganismo, porque quanto menos etapas forem necessárias para a produção de piocianina, menor será a perda na eficiência coulombica da célula a combustível microbiana.

2.4 Glicerol

De acordo com Matsuoka et al. (2005) células a combustível que utilizam alcoóis como combustíveis são mais seguras e trazem menos complicações quando comparadas com

as células a combustível que utilizam H_2 . Essas afirmações são devido à maior facilidade que combustíveis líquidos apresentam nas questões de transporte a armazenamento. Metanol o álcool mais simples possui boa reatividade, é totalmente oxidado até CO_2 e produz seis mols de elétrons por mol. No entanto, o metanol é um produto industrial e tóxico, podendo causar danos ecológicos, principalmente pela sua alta solubilidade em água. Já o etanol é menos tóxico e proveniente da biomassa, mas sua oxidação produz acetaldeído ou acetato, os quais levam a uma baixa eficiência faradaica e ao acúmulo de produtos com baixo valor agregado (SIMÕES; BARANTON; COUTANCEAU, 2009). Observando esse quadro, o glicerol se torna um combustível promissor para células a combustível, pois é menos tóxico e menos inflamável, sua oxidação leva a produção de 14 mols de elétrons por mol e resíduos tais como glicerato, tartrato, hidroxipiruvato e mesoxalato os quais possuem um mercado limitado pela dificuldade de sua obtenção pelas maneiras usuais (SIMÕES; BARANTON; COUTANCEAU, 2009).

No entanto, o grande problema relacionado com a oxidação direta do glicerol é a formação de três mols de CO por mol de glicerol. Como já dito, o CO liga-se irreversivelmente aos catalisadores de platina, causando uma queda drástica em seu desempenho. Para contornar este problema, é necessário estudar as reações indiretas do glicerol as quais acarretam na formação de diversos intermediários. No entanto, esses intermediários são compostos que possuem $C=O$ em sua estrutura, que também são capazes de envenenar os catalisadores metálicos e reduzir a capacidade catalítica dos mesmos (DEMIREL et al., 2007).

Assim, o estudo de células a combustível microbianas com ânodos desenvolvidos com linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* capazes de consumir glicerol e produzir piocianina tem uma grande importância nos quadros energético e ambiental.

3.OBJETIVOS

O Grupo de Eletroquímica do Instituto de Química de São Carlos tem trabalhado com diferentes tipos de materiais eletródicos para a oxidação de combustíveis e redução de oxigênio há vários anos. Estes trabalhos deram a este grupo de pesquisa um prestígio internacional e o elevaram a um patamar de importância mundial. Contudo, os trabalhos realizados visavam melhorar o desempenho de eletrodos desenvolvidos com metais, ligas metálicas, óxidos de metais etc, frente à oxidação de combustíveis como o H₂, MetOH, EtOH, glicerol, acetato, entre outros. Entretanto, este grupo de pesquisa não possuía nenhuma pesquisa na área da bioeletroquímica ou bioeletrodos até 2006, quando se iniciaram trabalhos com enzimas como a lacase e bilirrubina oxidase para a redução de oxigênio, e álcool desidrogenase para a oxidação de metanol e etanol. No entanto, até o presente estudo, o Grupo de Eletroquímica ainda não apresentava nenhuma pesquisa na área de células a combustível microbianas.

Por estas razões, este trabalho tem como objetivo principal ampliar o conhecimento do Grupo de Eletroquímica frente ao comportamento de bactérias na oxidação de combustíveis e produção de energia elétrica, avaliar o desempenho da membrana de Nafion® em pH neutro e na presença de meios de cultura, entender os processos que levam ao transporte eletrônico das bactérias para os eletrodos, desenvolver um dispositivo de acrílico que possa ser utilizado como uma célula a combustível microbiana.

3.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma célula a combustível microbiana com cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* com meios de cultura enriquecidos com glicerol e avaliar a produção de corrente.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho se focaram principalmente em:

- a) Estudar o comportamentos das seguintes linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*: ATCC 27853, LBI, BI-3, 7a, Cepa Campo (CC) e L2-1, disponíveis no Laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química de São Carlos, frente às diferentes condições de crescimento em meios de cultura de glicerol;
- b) Avaliar a produção de pigmentos de forma qualitativa das linhagens estudadas;
- c) Estudar o desempenho da membrana polimérica Nafion® 117 quanto à sua capacidade de troca protônica nas condições a serem aplicadas nas CCMs;
- d) Estudar eletroquimicamente por meio de voltametrias cíclicas os principais mediadores químicos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, a saber, fenazina e piocianina, no meio de cultura selecionado;
- e) Elaborar um meio de cultura mínimo com glicerol como única fonte de carbono para as células microbianas de modo que estas sejam capazes de produzir a maior quantidade de piocianina
- f) Avaliar a produção de corrente por meio de cronoamperometria em uma célula a combustível microbiana com meio de cultura próprio para a produção de piocianina, inoculada com a linhagem de *P. aeruginosa* que apresentar o melhor desempenho nos testes de crescimento microbiano e produção de pigmentos.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

4.1.1 Microrganismos utilizados

Para este estudo foram utilizadas seis diferentes linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*: ATCC 27853; LBI, 7a, L2-1 e BI-3 (isoladas de solo); e Cepa Campo (CC) (isolado clínico). As linhagens de solo foram isoladas no Laboratório de Biotecnologia Microbiana – UFRJ, e o isolado clínico foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Microbiana do IQSC-USP.

4.1.2 Cultivo e padronização de inóculo

As culturas foram mantidas em estoques a -20°C, repassadas para placas contendo ágar nutriente (NA) e encubadas em estufa por 24 h. A placa foi adicionada de 5 mL de solução salina estéril e raspada com auxílio de alça de inoculação para que as células bacterianas aderidas sobre a superfície do ágar ficassem dispersas na solução. A suspensão bacteriana obtida foi submetida a diluições sucessivas e o número de células viáveis foi determinado pelo método de espalhamento em placa. O número de células viáveis foi relacionado com a medida de densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro a 610 nm visando padronizar o inóculo para os ensaios. A concentração celular foi ajustada para 10^9 UFC.mL⁻¹, onde cada UFC corresponde a uma unidade formadora de colônia.

4.2 Meios de cultura

Todos os meios de cultura preparados para os experimentos foram esterilizados em autoclave vertical (AV50 – Phoenix). Nos testes de crescimento microbiano e produção de

pigmentos foi utilizado agitador rotatório (MAXQ6000 – Thermo Scientific). Em todos os testes, foram simultaneamente analisados o crescimento microbiano e a produção de pigmentos por meio de análises de absorbância das amostras a 610 e 400 nm respectivamente em Espectrofotômetro UV-Vis (Genesys 10 UV – Thermo Scientific). O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 7,2 e não foram realizados ajustes ou medidas de pH durante os experimentos.

4.2.1 Para os testes de crescimento e produção de pigmentos

Foram utilizadas quatro diferentes formulações de meios de cultura para os testes de crescimento microbiano e produção de pigmentos: caldo nutriente (Mikrobiologie), caldo King, caldo nutriente (Mikrobiologie) enriquecido com 10 g.L⁻¹ de glicerol (HEXIS) e um meio mínimo (MM). O caldo King consiste de 20 g.L⁻¹ peptona (Bacto®Peptone – Difco Laboratories), 10 g.L⁻¹ de glicerol (HEXIS), 10 g.L⁻¹ de sulfato de potássio anidro (Synth) e 1,84 g.L⁻¹ de cloreto de magnésio (Synth). Para o meio mínimo foi utilizada água não deionizada (para traços de metais), 20 g.L⁻¹ de glicerol (HEXIS), nitrato de sódio 1,0% (Synth), fosfato de sódio mono e dibásico anidros 1,0% (Qhemis).

4.2.2 Para as culturas bacterianas

Todas as culturas bacterianas foram realizadas em ágar nutriente (Himedia) ou ágar King, cuja formulação segue a mesma que foi descrita na sessão anterior, mas com a adição de ágar-ágar (Acumedia).

4.2.3 Para as células a combustível microbianas

Os meios de cultura utilizados foram caldo nutriente (Mikrobiologie) e caldo King. O caldo King foi preparado no próprio Laboratório de Biotecnologia Microbiana e possui a seguinte formulação: 20 g.L⁻¹ peptona (Bacto®Peptone – Difco Laboratories), 10 g.L⁻¹ de glicerol (HEXIS), 10 g.L⁻¹ de sulfato de potássio anidro (Synth) e 1,84 g.L⁻¹ de cloreto de magnésio (Synth). No caso do ágar King, a esta formulação foi adicionado 10 g.L⁻¹ de Ágar-ágar (acumedia).

Em determinados experimentos o meio de cultura caldo nutriente foi enriquecido com 2,5 e 5 g.L⁻¹ de glicose (Synth) ou 5, 10 ou 25 g.L⁻¹ de glicerol (HEXIS).

4.3 Testes de crescimento microbiano e produção de pigmentos

Nestes testes, 45 mL dos meios de cultura descritos foram adicionados em erlenmeyers de 125 mL. Outros 5 mL de inóculo padronizado foram adicionados para completar o volume de 50 mL. Os testes foram realizados em agitador rotatório a 150 rpm durante 48 horas.

O crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* ocorre em uma temperatura ótima de 37 °C. Todavia, as CCMs foram montadas em temperatura ambiente e, por esta razão, os testes foram também realizados em temperatura ambiente. Outros testes de crescimento e produção de pigmentos foram realizados sem agitação, para que condições de crescimento nos erlenmeyers se aproximassem ainda mais as das condições de cultivo nas CCMs.

4.4 Células a combustível microbianas

As células a combustível microbianas consistiram de aparatos de acrílico com capacidade de 70 mL (Figura 7). Os sistemas eletroquímicos são formados de um cátodo ao ar Pt-Black 10% (m/m) com carga de platina de $0,5 \text{ g.cm}^{-2}$ e um ânodo formado por tecido de carbono Tipo A ® (E-TEK), ambos com área superficial de 19.6 cm^2 . Como membrana trocadora de prótons foi utilizada Nafion ® 117 (DuPont). Fios de níquel foram usados como contatos elétricos e também uma resistência externa de 500Ω . Para a aquisição dos dados, um multímetro digital (Minipa) foi ligado às células e tomava medidas a cada quatro minutos. Os experimentos foram realizados durante um período que variou entre 96 e 102 horas sem controle de oxigênio, em temperatura ambiente e homogeneização constante para minimizar os efeitos negativos da difusão dos mediadores. Em nenhum dos experimentos foi adicionada uma maior quantidade de inóculo ou mesmo de glicerol ou glicose.

Figura 7 – Esboço da célula de trabalho projetada para célula a combustível microbiana.

4.4.1 Aparatos de acrílico como células a combustível microbiana

O início dos estudos das células a combustível microbianas se deu com o desenvolvimento de aparatos de acrílico para serem utilizados como células a combustível microbianas. A Figura 21 mostra as células desenvolvidas no início das pesquisas em agosto de 2009 (a) e as novas células, mais reforçadas, desenvolvidas em agosto de 2010 (b). Durante os testes, as primeiras células se mostraram eficientes na retenção do meio de cultura, não apresentando vazamentos quando montadas corretamente. No entanto, com o passar dos experimentos, e as constantes esterilizações realizadas com álcool 70%, tornaram o acrílico quebradiço e a pressão necessária para estancar os vazamentos começou a causar rachaduras no acrílico, por onde o líquido do compartimento anódico começou a vazar. Além disso, as primeiras células desenvolvidas possuíam apenas um ponto para evitar vazamentos, de tal forma que as placas utilizadas para fechar as laterais da célula começaram a se deformar, devido à pressão necessária para evitar vazamentos.

A principal vantagem das células novas sobre as células antigas são as abas de acrílico que reforçaram a peça central (Figura 22). Estas abas trouxeram duas vantagens: i) maior sustentação das peças laterais e ii) um ponto adicional para evitar vazamentos. A presença das abas tornou a célula mais resistente e mais estável, de modo que a pressão necessária nos parafusos é menor e, desta forma, o acrílico das peças laterais não apresentaram nenhuma deformação com os diversos experimentos realizados. Além das peças centrais, as peças laterais também apresentaram modificações que permitiram a utilização de um o-ring de borracha a mais para vedação das células a combustível microbianas. A Figura 22b mostra o ponto de contato do o-ring que se situa na peça lateral.

Figura 8 – Aparatos de acrílico utilizados como célula a combustível microbiana. (a) células utilizadas nos primeiros meses de pesquisa. As marcas marrons evidenciam a degradação das peças de acrílico que ocorreram durante os experimentos e as constantes esterilizações com álcool 70%. (b) Novas células de acrílico que, mesmo após diversos experimentos, não apresentaram degradação.

Figura 9 – Peças centrais das células de acrílico: (a) primeira célula utilizada e (b) células reforçadas. As setas apontam para os pontos de contato com o-rings de borracha para evitar vazamentos. Enquanto as células antigas apresentavam apenas um ponto, as novas células apresentam dois pontos.

4.4.2 Preparação do cátodo

O cátodo foi preparado pela distribuição uniforme de platina em um tecido de carbono (TC) contendo pó de carbono (Vulcan XC-72R) e Teflon® (DuPont). Em uma das faces do tecido de carbono a tinta catalítica foi espalhada com o auxílio de um pincel, para que houvesse a melhor distribuição das partículas de platina sobre toda a área do eletrodo. A tinta catalítica foi preparada de modo que a carga de platina sobre o eletrodo fosse de $0,5 \text{ mg Pt.cm}^{-2}$. A seguir, o eletrodo foi seco em forno a 80°C por 60 min e em seguida prensado a 50 MPa a 125°C por dois minutos juntamente com uma membrana Nafion® 117 (DuPont). Outros dois conjuntos de cátodos foram preparados: 1) sem membrana de Nafion®; 2) sem membrana de Nafion®, mas com uma carga a mais de Teflon®.

A camada adicional de Teflon® foi pincelada em uma das faces do eletrodo e levada para secar em forno a 280°C durante 30 min e, a seguir, aquecido a 330°C para a sinterização do Teflon®. A solução de Teflon® possui concentração de 60% (m/m) em água. Após secar, uma nova camada foi passada na mesma face do eletrodo, para se evitar qualquer vazamento de líquidos do compartimento anódico, e mais uma vez foi levado ao forno. Somente após esses procedimentos a tinta catalítica foi passada sobre a face contrária à que estava o Teflon®.

A membrana de Nafion® 117 (DuPont) foi previamente tratada com água oxigenada a 3%, por uma hora, a 80°C . Este processo visa eliminar contaminadores orgânicos. A seguir, foram lavadas várias vezes com água Milli-Q a quente para eliminação do excesso de H_2O_2 e em seguida colocadas em uma solução de H_2SO_4 a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em temperatura de 80°C , para a remoção de impurezas metálicas. Finalmente as membranas lavadas foram deixadas em repouso em recipientes com água Milli-Q até o seu uso.

As camadas difusoras foram preparadas segundo descreveram Paganin, Ticianelli e Gonzalez (1996). Uma suspensão homogênea composta por PTFE a 30% (Teflon T-30, DuPont) e carbono pulverizado (Vulcan XC-72, Cabot) foi filtrada a vácuo nas duas faces do tecido de carbono (PWB-3, Stackpole). Então, as camadas difusoras foram secas em

temperatura ambiente, levadas a forno por 30 min a 280 °C para eliminação dos agentes dispersantes do Teflon® e sinterizadas a 330 °C por 30 min. Antes de serem utilizados, o pó de carvão e o tecido de carbono foram limpos a 450 °C em atmosfera ambiente e tratados quimicamente em solução aquosa 25% (v/v) de ácido nítrico durante 1 h a 80 °C.

4.4.3 Preparação do ânodo

Após 24 h de incubação em estufa, as células foram suspensas no meio de cultura a ser utilizado na célula a combustível microbiana e a D.O. da suspensão bacteriana foi ajustada para 0,344 em 610 nm. Posteriormente, 3,5 mL (5% da capacidade da câmara anódica) do caldo contendo a suspensão celular foram inoculados na célula que contém 66,5 mL do meio de cultura, completando então o volume de 70 mL. À medida que os microorganismos consomem o glicerol eles produzem os mediadores químicos. Ao entrar em contato com o TC, esses mediadores foram oxidados e os elétrons transferidos através do fio de níquel até o cátodo para que se fechasse o circuito.

4.5 Voltametria cíclica e reação de redução de oxigênio

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados em erlenmeyers de 125 mL, com tampa de acrílico contendo quatro orifícios para os eletrodos (Figura 8). Nestes testes foi utilizado tecido de carbono (Tipo A®, E-TEK) com área de 1 cm² como eletrodo de trabalho, fios de platina como contra eletrodo e Ag/AgCl/Cl⁻ como eletrodo de referência. Para estes testes foram preparadas soluções de piocianina a 1 mmol.L⁻¹ e fenazina a 1,1 mmol.L⁻¹.

Nos testes de reação de redução de oxigênio (RRO) uma célula de Teflon foi utilizada com eletrodo de trabalho de platina a 0,5 g.cm⁻² dispersa sobre camada difusora tais como os desenvolvidos para as CCMs, mas com área superficial de 1,23 cm². Como contra eletrodo foi utilizado tecido de

carbono E-TEK sem tratamentos e eletrodo de Ag/AgCl/Cl⁻ como referência. Os teste de VC e RRO foram realizados no mesmo potenciostato (Solartron 1285 Potentiostat).

Figura 10 – Tampas de Teflon utilizadas para os erlenmeyers nos testes de voltametria cíclica do meio de cultura King e dos pigmentos piocianina e fenazina. a) visão lateral e b) visão superior.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento microbiano e produção de pigmentos

Os objetivos deste trabalho se focam em maximizar a corrente produzida por uma CCM com culturas puras de *Pseudomonas aeruginosa*. Portanto, os trabalhos de reconhecimento do desempenho da cepa ATCC 27853 foram avaliados primeiramente em caldo nutriente (CN), caldo nutriente enriquecido com 10 g.L⁻¹ de glicerol (CN1%) e caldo King. Após, mais um meio de cultura foi preparado (MM) para analisar o comportamento desta mesma cepa frente ao mínimo de nutrientes presentes, sendo o glicerol a única fonte de carbono.

Após as análises dos meios de cultura, aquele em cujo desempenho da cepa *P. aeruginosa* 27853 foi superior foi selecionado para que as demais linhagens de *P. aeruginosa* disponíveis no Laboratório de Biotecnologia Microbiana – IQSC fossem avaliadas. Desta forma, tornaram-se selecionáveis o meio de cultura e a linhagem para aplicação em célula a combustível microbiana.

5.1.1 Culturas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 em diferentes meios de cultura

As Figuras 9a e 9b mostram o comportamento da cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 frente aos três primeiros meios de cultura primeiramente selecionados. Estes experimentos foram realizados em condições de agitação a 150 rpm e 37 °C. Este microrganismo apresenta crescimento ótimo em condições de aeração (aeróbia estrita) e temperatura de 37 °C (ANKENBAUER; COX, 1988; HASSETT et al., 1992) e, portanto, é nessas condições que o primeiro teste foi realizado.

(a)

(b)

Figura 11 – Crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) pela cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 em diferentes meios de cultura sob agitação constante de 150 rpm a 37 °C.

Quanto ao crescimento microbiano, observa-se que em todos os meios essa cepa apresentou um crescimento satisfatório, apenas apresentando um declínio na D.O. em meio CN a partir de 24 horas. Este declínio pode estar relacionado com a exaustão das bactérias

pela menor quantidade de nutrientes quando comparadas com os meios King e CN1%, que possuem o glicerol como fonte extra de carbono. No entanto, a produção de pigmentos apresentada por esta cepa foi maior em caldo King, meio de cultura que utiliza dois diferentes sais para promover a produção de piocianina e suprimir a produção de compostos fluorescentes. Devido a isto, considera-se, de maneira qualitativa, que grande parte da coloração e absorbância é devido à presença de piocianina. Contudo, para que se possa afirmar com certeza seriam necessários testes mais precisos que estão aquém dos objetivos deste trabalho.

As CCMs foram construídas em bancada, sem o controle de temperatura e com homogeneização do meio (agitação magnética), apenas para minimizar os efeitos de difusão dos mediadores e prótons, comprometendo assim a oxigenação do meio de cultura (dado não controlado). Por esta razão, novos testes foram realizados para avaliar o comportamento da cepa ATCC 27853 diante das condições que mais se aproximam daquelas utilizadas nas CCMs. A Figura 10a e 10b, mostram o crescimento e produção de pigmentos desta bactéria, em temperatura ambiente e agitação constante a 150 rpm.

Neste caso, o comportamento tanto do crescimento microbiano quanto da produção de pigmentos foi semelhante ao observado na Figura 9 em todos os meios de cultura. Também foi possível observar que o meio de cultura caldo King apresentou os melhores resultados sob estas condições. No entanto, era esperado que o crescimento microbiano apresentado pela Figura 10a fosse inferior ao apresentado pela Figura 9a e também que a produção de pigmentos fosse maior no primeiro teste (Figura 9b) do que no segundo (Figura 10b).

Para aproximar ainda mais as condições de crescimento e produção de pigmentos daquelas utilizadas nas CCMs, estes testes foram repetidos em temperatura ambiente e sem agitação (Figura 11). Deste modo, não houve aeração do meio, fator crucial para o desenvolvimento das bactérias da espécie *P. aeruginosa*. Já neste caso, as bactérias

apresentaram maior crescimento em meio de cultura CN1% do que nos outros dois meios avaliados (Figura 11a).

O fator crucial para a aplicação de bactérias da espécie *P. aeruginosa* em CCMs é a produção de pigmentos fenazínicos como a piocianina (RABAEY, 2005), o qual deve ser o parâmetro a ser otimizado. Observou-se, então, que mesmo nessas condições, a produção de pigmentos pela cepa ATCC 27853 ocorre mais acentuadamente em meio King (Figura 11b).

A Figura 12 mostra os resultados obtidos nos testes realizados em caldo King. A observação destes resultados é mais importante por dois principais motivos: i) em caldo King foram observados os melhores resultados em relação à produção de pigmentos e ii) não se pode precisar que nos meios de cultura CN e CN1% toda a absorbância é proveniente da presença de piocianina, uma vez que esses meios de cultura são gerais para o crescimento microbiano. Diferentemente, o caldo King é específico e suprime a produção de compostos que possam mascarar ou mesmo gerar um falso positivo para a piocianina, uma vez que os testes realizados são qualitativos e não possuem precisão para diferenciar compostos que absorvam no mesmo comprimento de onda. Comparando estes resultados (Figura 12), observa-se que as melhores condições para se construir uma célula a combustível microbiana com culturas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 são em temperatura ambiente e agitação constante a 150 rpm, e a pior condição se dá em temperatura de 37 °C e agitação.

(a)

(b)

Figura 12 – Crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) pela cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 em diferentes meios de cultura sob agitação constante de 150 rpm em temperatura ambiente.

(a)

(b)

Figura 13 – Crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) pela cepa *P. aeruginosa* ATCC27853 em diferentes meios de cultura em temperatura ambiente e sem agitação.

(a)

(b)

Figura 14 – Crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) pela cepa *P. aeruginosa* ATCC27853 em meio de cultura King sob diferentes condições de cultivo. (Preto - agitado a 37 °C; Azul – não agitado em temperatura ambiente; Vermelho – não agitado em temperatura ambiente; agitação de 150 rpm).

5.1.2 Diferentes culturas de *P. aeruginosa* em meio King

Uma vez acertadas as condições de cultivo e o meio de cultura na qual as bactérias da espécie *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresentam o melhor desempenho, o foco dos estudos se voltou para as linhagens desta bactéria disponíveis no Laboratório de Biotecnologia Microbiana – IQSC. Todos estes testes foram realizados em meio de cultura caldo King. Entretanto, cada linhagem possui uma origem diferente e, por esta razão, os testes foram novamente realizados sob diferentes condições de cultivo para que se confirmasse que as melhores condições encontradas para a cepa ATCC 27853 fossem também as melhores para o crescimento das demais linhagens.

Inicialmente os testes foram realizados com temperatura constante de 37 °C e agitação de 150 rpm (Figuras 13a e 13b). Comparando o desempenho das diferentes linhagens quanto ao crescimento bacteriano nessas condições de cultivo, observa-se que apenas a linhagem CC não apresentou crescimento satisfatório e que a linhagem BI-3 apresentou o melhor desempenho (Figura 13a). No entanto, quando se trata de produção de pigmentos, as linhagens 7a, CC e BI-3 apresentaram produção de pigmentos muito abaixo da cepa ATCC 27853 e das linhagens LBI e L2-1. Portanto, as três linhagens que não apresentaram resultados satisfatórios quanto à produção de pigmentos foram descartadas para os teste realizados em temperatura ambiente com agitação a 150 rpm (Figura 14).

A partir dos resultados observados na Figura 14 foi possível construir uma tabela comparando os valores de crescimento microbiano e produção de pigmento nos ensaios com diferentes linhagens (Tabela 3).

(a)

(b)

Figura 15 – Avaliação do crescimento microbiano (a) e da produção de pigmentos (b) por diferentes linhagens de *P. aeruginosa* em meio King, a temperatura constante de 37 °C e agitação de 150 rpm.

A Figura 14a mostra que, embora o crescimento microbiano tenha sido próximo entre as linhagens, houve diferença significativa. Em se tratando da produção de pigmentos, a cepa ATCC 27853 mais uma vez apresentou um melhor desempenho, com uma absorbância

máxima em 2,807 nm contra uma absorbância em 1,763 e 2,111 das linhagens L2-1 e LBI (Tabela 3), respectivamente.

(a)

(b)

Figura 16 – Avaliação do crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) por diferentes linhagens de *P. aeruginosa* em meio King, a temperatura ambiente e agitação a 150 rpm.

Tabela 3 – Valores máximos de absorbância em 400 nm e de D.O. em 610 nm das linhagens ATCC 27853, LBI e L2-1 em diferentes condições de cultivo.

Condição de cultivo	Temperatura ambiente e agitação a 150 rpm			Temperatura constante de 37 °C e agitação a 150 rpm		
Linhagem	ATCC 27853	LBI	L2-1	ATCC 27853	LBI	L2-1
D.O. máx. (610nm)	1,767	1,623	1,657	1,723	1,625	1,879
Tempo	48 horas	48 horas	48 horas	36 horas	36 horas	36 horas
Abs máx. (400 nm)	2,807	1,763	2,111	2,300	1,748	1,686
Tempo	48 horas	48 horas	48 horas	48 horas	48 horas	48 horas

Na Tabela 3 fica evidente que para uma CCM de *Pseudomonas aeruginosa* é mais indicado utilizar a cepa ATCC 27853 nas condições de agitação constante e temperatura ambiente (25-30 °C), devido à maior capacidade de produzir piocianina nessas condições de cultivo.

5.1.3 Diferentes culturas de *P. aeruginosa* em caldo nutriente enriquecido com 10 g.L⁻¹ de glicerol

Para finalizar os experimentos de produção de pigmentos e crescimento das diferentes linhagens de *P. aeruginosa*, mais um teste foi realizado para comparar a diferença que existe entre a produção de pigmentos no meio King e no meio caldo nutriente enriquecido com 10 g.L⁻¹ de glicerol (CN1%). O intuito deste experimento não foi apenas analisar as diferenças comportamentais das linhagens entre si, mas também dos meios de cultura, uma vez que, o que se deseja, é convencionar alguns parâmetros para aplicação desta espécie bacteriana em

células a combustível microbianas que utilizem meios não específicos (como o caldo King, por exemplo) e glicerol para a produção de pigmentos eletroquimicamente ativos.

A Figura 15 mostra que todas as linhagens estudadas apresentam crescimento microbiano tão satisfatório em CN1% quanto em caldo King, exceto a linhagem CC que em ambos os casos apresentou baixo crescimento. Enquanto a linhagem 7a apresenta uma queda acentuada após 30 horas de cultivo, as demais linhagens estudadas apresentam um comportamento muito semelhante até as 48 horas (Figura 15a), o que mostra que para diferentes linhagens de *P. aeruginosa*, o meio CN1% é mais eficiente para o crescimento microbiano do que o caldo King. Neste teste, a produção de pigmentos (Figura 15b) foi mais expressiva por parte das linhagens 7a e BI-3 e menos expressivas para as linhagens ATCC 27853, LBI e L2-1. O que mais chamou a atenção neste ensaio foi a capacidade de produção de pigmentos pela linhagem BI-3 que, nas mesmas condições em caldo King, não apresentou produção de pigmento satisfatória. Isso mostra que esta linhagem é grande produtora dos compostos suprimidos pelos sais utilizados no caldo King, compostos estes que podem ou não apresentar atividade eletroquímica. Portanto, esta linhagem pode ser estudada em trabalhos futuros com CCMs de meios não específicos para a piocianina.

(a)

(b)

Figura 17 – Avaliação do crescimento microbiano (a) e produção de pigmentos (b) por diferentes linhagens de *P. aeruginosa* em meio CN1%, temperatura constante de 37 °C e agitação a 150 rpm.

5.1.4 Avaliação da cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 em meio mínimo

Os experimentos com os diferentes meios de cultura e as diferentes cepas levaram a estabelecer as melhores condições para o cultivo e a selecionar a linhagem que apresentou o

melhor desempenho. No entanto, os meios de cultura complexos (CN, CN1% e King) utilizados apresentavam diversas fontes de carbono mais facilmente assimiláveis do que o glicerol, de modo que este substrato pudesse ser metabolizado mais lentamente. Portanto, um estudo foi realizado com meio de cultura mínimo (MM) que continha como única fonte de carbono o glicerol (Figura 16) e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Os resultados mostraram que inicialmente o crescimento microbiano é bem mais lento comparado com os meios de cultura complexos. Isso se deve ao tempo de adaptação das bactérias ao glicerol e da falta de aminoácidos já sintetizados que estão presentes nos outros meios utilizados. No entanto, é possível observar que após as 20 horas de experimento esta bactéria apresenta um crescimento acentuado, o que mostra que é um microrganismo versátil, capaz de crescer em condições mínimas de cultivo.

Quanto à produção de pigmentos, no entanto, a cepa ATCC 27853 se mostrou ineficaz quando cultivada neste MM, produzindo uma quantidade baixa de pigmentos comparada com os outros meios de cultura. Isso ocorre porque o gasto energético para a produção destes compostos (que são excretados) é alta e, portanto, ocorre mais acentuadamente em meios de cultura que apresentem substratos mais facilmente metabolizáveis. Todavia, no estudo deste meio de cultura, não foram adicionados os sais utilizados no meio King para a estimulação da produção de piocianina, o que pode ser uma opção para o estudo de meios de cultura mínimos de glicerol para a produção de piocianina.

Figura 18 – Avaliação do crescimento microbiano (D.O. 610 nm) e da produção de pigmentos (Abs 400 nm) da cepa ATCC 27853 em meio de cultura mínimo em temperatura ambiente e agitação constante de 150 rpm.

5.2 Caracterização eletroquímica dos pigmentos piocianina e fenazina

Bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* são grandes produtoras de diversos compostos fenazínicos como destacado anteriormente (MAVRODI, 2001). Entre esses compostos, dois foram destacados neste trabalho: a piocianina e a fenazina. Isto porque os melhores resultados de produção de pigmentos foram observados em meio King, comparado a outros meios de cultura estudados neste trabalho e, portanto, pode-se dizer que grande parte da absorbância é devido à presença de piocianina. A fenazina é um composto precursor da piocianina no metabolismo da *P. aeruginosa* e Rabaey et al. (2005) destaca que compostos fenazínicos são responsáveis pelo aumento na produção de corrente em células a combustível microbianas. Desta forma, grande foi o interesse em estudar o comportamento destes dois mediadores químicos no meio de cultura King, de modo a assegurar que o próprio meio não tornaria estes compostos ineficazes para o transporte de elétrons. Além disso, este teste

também teve o objetivo de avaliar a eficiência do tecido de carbono na oxirredução dos mediadores químicos.

5.2.1 Voltametria cíclica do meio de cultura caldo King

Para iniciar os experimentos de voltametria cíclica dos mediadores químicos, primeiramente o próprio meio de cultura foi testado como o branco dos experimentos. A Figura 17 mostra que até -0,3 V, o meio de cultura não apresenta nenhum pico de redução. Mas, a partir de então, inicia-se a formação de correntes de redução que se estendem até o potencial alcançado de -0,7 V. Estas correntes foram inicialmente atribuídas à presença de glicerol no meio de cultura, pois ele reduziu a cada ciclagem. Mas, como evidenciado pela Figura 18, a presença do glicerol não interfere na presença destas correntes de redução que então foram atribuídas a outros compostos presentes neste meio de cultura.

Após estes testes, novos testes de voltametria cíclica foram realizados em uma menor faixa de potenciais, para que se evitasse a observação das correntes de redução que surgem a partir de -0,3 V. Entretanto, uma nova varredura foi realizada de -0,4 a 0,2V (Figura 19), uma vez que em -0,4 V as correntes de redução ainda são muito baixas. Ao observar este resultado e conhecendo que os picos de oxidação e redução da piocianina se encontram em aproximadamente -0,2 V (Vukomanovic, 1996), os testes com o meio de cultura King foram satisfatórios, uma vez que nenhum pico de oxidação ou redução foi apresentado próximo a este potencial.

Figura 19 – Voltametria cíclica do meio de cultura caldo King. A presença do pico de redução que se inicia a partir de -0,3 V foi atribuída, inicialmente, à presença de glicerol no meio.

Figura 20 – Voltametria cíclica do meio de cultura caldo King sem glicerol. Observa-se a formação de um pico de redução após -0,3 V.

Figura 21 – Voltametria cíclica do meio de cultura caldo King em intervalo de potencial de -0,4 a 0,2 V.

5.2.2 Voltametrias cíclicas dos mediadores químicos em caldo King

As soluções de piocianina e fenazina foram preparadas em etanol a concentrações de 11 mmol.L^{-1} e 10 mmol.L^{-1} , respectivamente. Para os testes de voltametria cíclica apenas 0,1 mL das soluções etanólicas dos mediadores foram adicionados a 50 mL de caldo King, de modo que as concentrações finais dos mediadores em solução foram $2,2 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ para a piocianina e $2,0 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ para a fenazina. Embora a concentração seja baixa, o alto coeficiente de extinção molar destes pigmentos fez com que a coloração do meio de cultura se tornasse levemente esverdeada para a solução de fenazina e azul-esverdeada intensa para a solução de piocianina.

A Figura 20 mostra os resultados obtidos para a voltametria cíclica da piocianina e da fenazina. Observa-se que os picos de oxidação e de redução da piocianina estão próximos a -0,24 V (Figura 20a), enquanto os picos de oxidação e redução da fenazina estão próximos a -

0,37 V (Figura 20b). Isso mostra que, para ambos os mediadores, o tecido de carbono pode ser utilizado como ânodo da célula a combustível microbiana, devido sua eficiência na oxidação e redução destes mediadores. E também que o meio não suprime os picos de oxidação e redução tanto da piocianina quanto da fenazina.

Um fator interessante de se observar são os valores de correntes alcançados na oxidação e redução da fenazina, que ultrapassa os $2,0 \times 10^{-4}$ A, enquanto as correntes obtidas com piocianina não chegam a atingir $1,7 \times 10^{-4}$ A, mesmo em uma maior contração. Isso mostra que a fenazina é levemente mais eletroquimicamente ativa do que a piocianina, levando a acreditar que este mediador deve ser mais explorado em trabalhos futuros com células a combustível microbianas.

(a)

(b)

Figura 22 – Voltametria cíclica da piocianina (a) e da fenazina (b) em caldo King. Observa-se que existem picos de oxidação e redução da piocianina em aproximadamente -0,24 V e da fenazina em aproximadamente -0,37 V.

5.3 Cronopotenciometrias

A parte mais importante deste trabalho foram as cronopotenciometrias. Foi por meio delas que se pode medir a real efetividade das culturas puras de *P. aeruginosa* como fontes de energia em CCMs de glicerol. No entanto, os parâmetros de cultivo estabelecidos nos estudos anteriores não puderam ser utilizados nas células por falta de equipamentos que permitissem a agitação a 150 rpm e a medida da corrente simultaneamente. Além disso, a alta oxigenação do ânodo poderia intervir na transferência de elétrons das bactérias para o mediador químico, uma vez que esta espécie bacteriana, por ser aeróbica, utiliza O₂ como receptor final de elétrons.

Uma vez encontrado o potencial das células a combustível microbianas, a lei de Ohm foi utilizada para transformar o potencial em corrente, uma vez que uma resistência externa de 500 Ω foi utilizada. Os gráficos apresentados nas figuras seguintes são cronoamperometrias e não cronopotenciometrias.

5.3.1 Cronoamperometrias das células a combustível em caldo nutriente enriquecido com 10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de glicerol

Os primeiros testes com as CCMs foram realizados com caldo nutriente enriquecido com glicose e glicerol. A Figura 23 mostra o primeiro experimento com CCMs com caldo nutriente enriquecido com glicose (estudo já bastante explorado na literatura utilizada) para averiguar a eficiência da célula de acrílico desenvolvida, dos contatos elétricos e da bactéria nas condições de cultivo (temperatura ambiente e sem agitação). Observa-se que existem basicamente dois picos de corrente em 20 horas e 80 horas, mais evidenciados pelo experimento que continha glicose a 5 g.L⁻¹. Comparando os dois experimentos que utilizaram glicose como substrato, fica claro que o aumento da concentração de glicose gerou um

aumento substancial na produção de corrente, que chegou a atingir um valor dez vezes mais alto em 20 horas e quase quatro vezes maior em 80 horas. Este teste mostra que as CCMs deste trabalho são efetivas na produção de energia com a cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Figura 23 – Cronoamperometria da CCM com caldo nutriente enriquecido com 2,5 e 5 g.L⁻¹ de glicose e com cultura pura de *P. aeruginosa* ATCC 278523. Observa-se que a corrente atingida pela célula que possui o dobro de glicose atinge correntes até dez vezes maiores em determinados momentos de experimento.

Após os testes com glicose, foram iniciados os testes com CCMs contendo caldo nutriente enriquecido com 5 e 10 g.L⁻¹ de glicerol (Figura 24). Essas concentrações de glicerol, o dobro do que fora utilizado de glicose, representam, de maneira bem aproximada, as mesmas concentrações de carbono disponível para as bactérias, relativa aos combustíveis (glicose e glicerol).

Quando o glicerol é utilizado como combustível, observa-se que as correntes se mantêm em ascensão para as duas concentrações até 50 horas de experimento (Figura 23). Contudo, a partir deste tempo, a corrente produzida pela célula que utiliza 5 g.L⁻¹ de glicerol

apresenta uma queda constante até o final do experimento. Isso se deve à menor quantidade de carbono disponível, mostrando que a presença do glicerol torna a CCM mais eficiente.

Figura 24 – Cronoamperometria da CCM com caldo nutriente enriquecido com 5 e 10 g.L⁻¹ de glicerol e com cultura pura de *P. aeruginosa* ATCC 278523.

Comparando os melhores resultados obtidos nestes quatro experimentos (Figura 25), observa-se que o desempenho da célula que utiliza glicose a 5 g.L⁻¹ foi maior nas primeiras horas e entre 70-80 horas, comparado com o experimento que utilizou o glicerol a 10 g.L⁻¹. Contudo, o experimento com glicerol apresenta um aumento constante na produção de corrente, enquanto o experimento realizado com glicose apresenta dois picos de corrente, que rapidamente decrescem até correntes que ficam abaixo das correntes produzidas nos experimentos com glicerol.

Figura 25 – Cronoamperometrias de CCM que utilizam diferentes combustíveis. A comparação entre o desempenho de CCMs que utilizam caldo nutriente enriquecido com glicerol a 10 g.L⁻¹ ou glicose a 5 g.L⁻¹ mostra que não existe grande diferença no valor, mas na curva de produção de corrente.

5.3.2 Cronoamperometrias das células a combustível microbianas que utilizam caldo nutriente enriquecido com 25 g.L⁻¹ de glicerol

A partir dos resultados obtidos nos experimentos apresentados pela Figura 25, o interesse do estudo foi aumentar a quantidade de glicerol, para que se pudesse traçar um padrão de aumento de corrente por aumento de substrato/combustível. No entanto, o aumento da concentração de glicerol no meio não gerou os resultados desejados e, por esta razão, diversas repetições foram realizadas. A Figura 26 traz todos os resultados obtidos nos testes com glicerol a 25 g.L⁻¹.

O que se observa é que por mais que as correntes tenham sofrido grande alteração em magnitude de um experimento para o outro, existe uma tendência no comportamento da produção de corrente, evidenciada pela média apresentada na Figura 26 (com exceção do Teste 1). Essa tendência, apresentada pela maior parte dos testes, não segue o que se espera de uma CCM. Com maior critério, pode-se, no entanto, dizer que a maior corrente foi obtida

durante o Teste 2.2, mas o comportamento mais adequado para este tipo de célula foi obtido nos Testes 3.1 e 3.2, onde a produção de corrente acompanha razoavelmente a produção de pigmentos. Em todos os testes, as CCMs foram montadas em câmara de fluxo de ar estéril, com meio de cultura e inóculo rigorosamente padronizados, para que a parte microbiológica não sofresse quaisquer alterações devido ao número inicial de viáveis inoculadas ou mesmo contaminações. Os equipamentos elétricos (contatos e multímetro) foram cuidadosamente examinados e não apresentaram problemas. A baixa reprodutibilidade na produção de corrente entre os testes pode ser explicada pela quantidade de O₂ dissolvido no meio e a temperatura, que durante os experimentos não foram monitoradas ou mesmo controladas. Esses dois fatores são cruciais para o crescimento e produção de pigmentos por bactérias de quaisquer espécies e, por esta razão, não podem ser negligenciados.

Após a realização deste teste, objetivou-se estudar um pouco mais detalhadamente a parte microbiológica envolvida. Somente a partir destes resultados se objetivou construir uma CCM com caldo King para, desta maneira, comparar a produção de corrente em meio específico para a produção deste pigmento com a produção de corrente em caldo nutriente enriquecido com glicerol.

Figura 26 – Cronoamperometrias de células a combustível microbianas com culturas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 em meio de cultura caldo nutriente enriquecido com 25 g.L⁻¹ de glicerol.

5.3.3 Cronoamperometrias das células a combustível microbianas que utilizam meio de cultura King

Os procedimentos estabelecidos anteriormente mostraram que a maior quantidade de piocianina é produzida em condições de agitação e temperatura ambiente e em caldo King. Todavia, a utilização deste meio de cultura na temperatura ambiente e sem agitação mostrou-se também eficaz para que a *P. aeruginosa* ATCC 27853 produzisse piocianina em maior quantidade do que em outros meios de cultura. A Figura 27 mostra os resultados obtidos para duas CCMs que utilizaram caldo King. Pode-se observar que a produção de corrente ocorreu em um mesmo padrão do observado para as CCMs que utilizaram caldo nutriente enriquecido com 25 g.L⁻¹ de glicerol, e até mesmo a quantidade de corrente produzida foi semelhante aos Testes 2.1 e 2.2 (Figura 26). Isso mostra que a produção de corrente não está relacionada com a produção de pigmentos, uma vez que em caldo King foi observada uma absorbância maior do que a observada em caldo nutriente enriquecido com glicerol. Além disso, as absorbâncias a 400 nm (livres de células bacterianas) realizadas a cada 24 horas de experimento com a CCM que utilizou caldo King mostraram que o teste King 1 apresentou menores absorbâncias do que o teste King 2 (Tabela 4). Ou seja, era esperado que a célula que produzisse mais corrente fosse aquela que apresentasse a maior quantidade de pigmentos produzida. Entretanto, o que se observou neste caso foi o contrário.

Esses dados levam a concluir que existem alguns fatores que estão influenciando a produção de corrente que estão além dos parâmetros controlados nestes experimentos. Mesmo para dois experimentos realizados ao mesmo tempo, com o mesmo meio de cultura e mesmo inóculo (Figura 25 e Figura 26), foram observadas variações que não estão relacionadas com possíveis mutações sofridas pelas bactérias, pequenas diferenças que existem na elaboração do meio de cultura, variação na temperatura ambiente ou variação no número de células viáveis presentes no inóculo.

Figura 27 – Cronoamperometrias de células a combustível microbianas com culturas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 em meio de cultura caldo King.

Tabela 4 – Crescimento microbiano (610 nm) e produção de pigmentos (400 nm) em células a combustível microbianas com caldo King.

Tempo (h)	24	48	72	96
D.O. 610 nm				
King 1	0,576	0,921	1,028	1,184
King 2	0,622	1,084	1,419	1,857
Abs 400 nm				
King 1	0,924	1,598	1,930	2,462
King 2	0,896	1,666	2,440	1,843*

*valor obtido com diluição do meio de cultura livre de células em água destilada (1:1)

5.3.4 Cronoamperometria das células a combustível com caldo King sem membrana de Nafion®

Um dos principais fatores que podem ter contribuído também para que houvesse essa baixa reprodutibilidade nos experimentos e a baixa produção de corrente é a presença da membrana de Nafion® (OH; MIN; LOGAN, 2004; OH; LOGAN, 2006; ROZENDAL et al.,

2006; CHENG; LOGAN, 2007) que, embora seja amplamente utilizada em CCMs, apresenta perda na sua eficiência de troca protônica devido às grandes quantidades de cátions Na^+ e K^+ presentes nos meios de cultura utilizados (OKADA et al., 1998). Além disso, a presença da membrana de Nafion® pode ser o principal motivo das CCMs com glicerol a 25 g.L^{-1} e com meio de cultura King apresentarem uma queda contínua na produção de corrente. Com base nestas informações dois novos experimentos foram programados com dois novos tipos de cátodos (Figura 28).

Figura 28 – Cronoamperometrias das células a combustível microbianas com meio de cultura King e cátodo sem membrana trocadora de prótons. Os cátodos apresentaram vazamentos que foi mais intenso para a célula denominada KingSM 2, o que obrigou o encerramento deste teste antes das 70 horas.

Em uma primeira etapa os cátodos sem membrana de Nafion® foram diretamente utilizados nas células. Esse teste revelou que a produção de corrente demonstra um novo perfil, que acompanha o crescimento microbiano e a produção de pigmentos (Figura 28), resultado este que se esperava observar em todos os experimentos. Contudo, o líquido do compartimento anódico começou a fluir através dos cátodos, de modo que uma das células

(KingSM 2, Figura 28) teve que ser desmontada em 68 horas de experimento, mesmo ainda apresentando uma produção de corrente de 48 μ A. A outra célula apresentou vazamento a partir de 90 horas de experimento, mas este ocorria em uma vazão baixa, o que permitiu que continuasse funcionando até o final do experimento em 102 horas.

Outro importante fator a se observar foi a colonização dos cátodos (Figura 29) que até então não havia sido observada em nenhum experimento. As bactérias da espécie *Pseudomonas* sp normalmente são excelentes formadoras de biofilmes, principalmente os gêneros *Pseudomonas aeruginosa* e ainda mais acentuadamente o gênero *Pseudomonas fluorescens*. Em uma pesquisa realizada com uma CCM de sedimentos marinhos e com um cátodo formado por fibra de carbono, Holmes et al. (2004) afirmaram que é impossível impedir que se formem biofilmes sobre os cátodos de uma CCM, devido à exposição deste às bactérias. Todavia, foi encontrado por Hasvold et al. (1997) que a presença de biofilmes na superfície do cátodo aumenta a taxa de redução do oxigênio, enquanto que Bergel et al. (2005) encontraram que, mesmo em uma CCM que utiliza uma membrana trocadora de prótons, a presença do biofilme acarreta em um aumento na produção de corrente. Não é possível sugerir que a presença do biofilme causou um aumento na corrente, mas somente que as CCMs sem membrana apresentaram um comportamento mais próximo do que se esperava observar.

Figura 29 – Fotografia do cátodo de célula a combustível microbiana com culturas puras de *P. aeruginosa* ATCC 27853 sem membrana trocadora de prótons. A coloração verde-musgo observada sobre a superfície do cátodo são as colônias bacterianas produtoras de piocianina.

Para evitar vazamentos ainda um último teste foi realizado, com cátodos que utilizam uma camada extra de Teflon®. Este teste final foi realizado no intuito de se tentar melhorar os resultados das CCMs sem membrana trocadora de prótons, evitando os vazamentos que ocorreram através dos cátodos. Contudo, os dois testes realizados com estes cátodos (denominados SMTF1 e SMTF2), apresentados na Figura 30, demonstram uma produção de corrente baixa comparada ao experimento que não utilizou membrana de troca protônica e Teflon®, a qual se deve, provavelmente, à alta carga de Teflon® na face externa do cátodo que impediu que a redução de oxigênio ocorresse de maneira eficiente.

Figura 30 – Cronoamperometrias das células a combustível microbianas com meio de cultura King e cátodo sem membrana trocadora de prótons e uma camada extra de Teflon

5.4 Avaliação da atividade da membrana de Nafion por meio de reação de redução de oxigênio

Os testes de reação de redução de oxigênio (RRO) foram realizados em uma célula diferente. Isto porque este teste foi utilizado apenas para confirmar os resultados obtidos nas cronoamperometrias, mas com um foco diferente, objetivando apenas certificar a perda da eficiência da membrana de Nafion® na presença de um meio de cultura, neste caso, o caldo King. Na Figura 31 estão apresentados os testes para a RRO com cátodos com e sem membrana de Nafion®. No caso dos experimentos realizados sem a presença da membrana trocadora de prótons, o que se observa é um pequeno aumento no desempenho do cátodo com o passar dos testes (Figura 31a). Contudo, quando se utiliza membrana, observa-se uma queda no desempenho do cátodo que se estende do Teste 1 até o Teste 8 (Figura 31b).

É importante destacar, no entanto, que a presença da membrana provoca uma melhora no desempenho do cátodo, uma vez que nos experimentos com membrana atingi-se uma

corrente de redução de aproximadamente -2,0 mA em 0,1 V, enquanto que a máxima corrente de redução obtida no experimento sem membrana é aproximadamente -0,6 mA neste mesmo potencial. Isso explica porque nas CCMs em que foi utilizada membrana trocadora de prótons foi observado, em alguns casos, correntes superiores ao que foi obtido nos testes sem membrana. Embora o meio de cultura exerça uma ação negativa no desempenho da membrana na troca protônica, a sua presença torna essa transferência mais eficiente, principalmente nas primeiras horas de experimento e, portanto, as células apresentam produção de corrente mais alta, mas que decresce à medida que a membrana perde a capacidade de trocar prótons.

Após os testes de RRO com membrana em meio King, a solução foi substituída por ácido sulfúrico 2 mol.L⁻¹. Este teste comprova que existe uma baixa cinética de reação em caldo King comparado com o meio ácido (Figura 32). Ademais, a atividade da membrana retorna quando utilizada a solução ácida, comprovando que a membrana perde a capacidade de troca de prótons na presença do meio de cultura devido à presença de cátions Na⁺ e K⁺.

Figura 31 – Gráfico de $I \times E$ para reação de redução de oxigênio em cátodos (a) sem membrana trocadora de prótons e (b) com membrana trocadora de prótons.

Figura 32 – Gráfico de $I \times E$ para reação de redução de oxigênio em solução de H_2SO_4 2 mol.L^{-1} . O cátodo utilizado neste experimento foi o mesmo utilizado no experimento anterior com membrana.

6. Conclusões

Este trabalho apresentou uma nova área de pesquisa no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), que trata da utilização de microrganismos para a produção de energia elétrica. Deste estudo conclui-se que é possível produzir energia elétrica com bactérias da espécie *P. aeruginosa* ATCC 27853 em meios de cultura sintéticos enriquecidos com glicerol. A produção de energia é limitada pela presença da membrana trocadora de prótons e, portanto, são necessários novos estudos com meios de cultura mínimos que permitam a utilização da membrana ou ainda testes com cátodos que dispensem a presença de membranas de troca protônica.

Os testes realizados com as diferentes linhagens microbianas e os diferentes meios de cultura mostram que as melhores condições de cultivo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de pigmentos são agitação de 150 rpm, temperatura ambiente e caldo King, e ainda que a linhagem estudada que apresenta o melhor desempenho foi a cepa ATCC 27853. Deve ser realizado um maior número de testes com meios de cultura mínimos que utilizem o glicerol como única fonte de carbono. Deste modo, o consumo deste substrato será maior, tornando mais importante a utilização de CCMs com culturas de *Pseudomonas aeruginosa* na produção de energia. Esta etapa do estudo leva uma conclusão óbvia, mas que pode ser errônea; a cepa ATCC 27853 se mostrou a mais eficiente na produção de piocianina em todos os experimentos, no entanto, o seu desempenho em CCMs pode não ser tão expressivo quanto o de outras linhagens. Para que esta conclusão possa se confirmar, um estudo do desempenho das outras linhagens também deve ser realizado, uma vez que em uma CCM as condições de cultivo são bem diferentes das condições fora da célula, principalmente pela presença dos componentes elétricos.

As caracterizações eletroquímicas do meio de cultura e dos mediadores químicos mostram que o meio de cultura não apresenta interferentes que venham influenciar nas

reações redox dos pigmentos e que estes são eletroquimicamente ativos no meio de cultura caldo King. Ainda pode-se concluir que a fenazina apresenta uma atividade eletroquímica levemente mais alta que a piocianina e que, desta forma, deve-se também estudar meios de cultura que estimulem a produção deste pigmento e sua influência na produção de corrente de células a combustível microbianas com outros tipos de microrganismos (da mesma forma que foi apresentado por Rabaey et al. (2005) para a piocianina).

As cronoamperometrias realizadas para os dois meios caldo nutriente enriquecidos com glicose 10 g.L^{-1} e glicerol 10 g.L^{-1} geraram resultados encorajadores para as etapas seguintes deste trabalho. No entanto, quando foi utilizada uma concentração maior de glicerol (25 g.L^{-1}), os testes não se mostraram reprodutíveis. Nesta etapa cogitou-se que os problemas poderiam estar relacionados com variações ocorridas durante a preservação das culturas, que poderiam influenciar na produção de pigmentos. No entanto, o teste com meio King demonstrou que a produção de corrente não foi proporcional à produção de pigmentos, uma vez que neste meio cultura a quantidade de piocianina produzida foi maior. Portanto, os testes levaram a concluir que o problema estava relacionado à parte eletroquímica, principalmente à membrana de Nafion®. Os testes seguintes comprovaram que esta membrana trocadora de prótons perde atividade devido à presença de íons Na^+ e K^+ no pH próximo à neutralidade.

7. Referências bibliográficas

ANKENBAUER, R. G.; COX, C. D. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants requiring salicylic acid for pyochelin biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 11, p. 5364-5367, 1988.

ARMSTRONG, F. A.; HILL, H. A. O.; WALTON, N. J. Direct electrochemistry of redox proteins. **Accounts of Chemistry Research**, v. 21, p. 407-413, 1988.

BARBOSA, Cláudia R. **Avaliação do glycerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

BARON, S. S.; ROWE, J. J. Antibiotic action of pyocyanin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 20, n. 6, p. 814-820, 1981.

BERGEL, A.; FÉRON, D.; MOLLICA, A. Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. **Electrochemistry Communications**, v. 7, p. 900-904, 2005.

BOND, D. R.; LOVLEY, D. R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1548-1555, 2003.

CAWTHORN, R. G. The platinum and palladium resources of the Bushveld complex. **South Africa Journal of Science**, v. 95, 481-489, 1999.

CHAUDHURI, S. K.; LOVLEY, D. R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cell. **Nature Biotechnology**, set. 2003. Disponível em : < <http://www.nature.com/naturebiotechnology/>>. Acesso em: 9 maio 2011.

CHENG, S.; LOGAN, B. E. Ammonia treatment of carbon cloth anode to enhance power generation of microbial fuel cell. **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 492-496, 2007.

COONEY, M. J.; ROSCHI, E.; MARISON, I. W.; COMNINELLIS, C.; VON STOKAR, U. Physiologic studies with the sulfate-reducing bacterium: Evaluation for use in a biofuel cell. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 358-365, 1996.

COONEY, M. J.; SVOBODA, V.; LAU, C.; MARTIN, G.; MINTEER, S. D. Enzyme catalysed biofuel cell. **Energy & Environmental Science**, v. 1, p. 320-337, 2008.

DEMIRBAS, A. Political, economical and environmental impacts of biofuels: a review. **Applied Energy**, v. 86, p. S108-S177, 2009.

DEMIREL, S.; LUCAS, M.; WÄRNA, J.; SALMI, T.; MURZIN, D.; CLAUS, P. Reaction kinetics and modeling of the gold catalysed glycerol oxidation. **Topics in Catalysis**, v. 44, n. 1-2, p. 299-305, 2007.

DIETRICH, L. E. P.; WHELAN, A. P.; PETERSEN, A.; WHITELEY, M.; NEWMAN, D. K. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1308-1321, 2006.

FENG, Y.; YANG, Q.; WANG, X.; LIU, Y.; LEE, H.; REN, N. Treatment of biodiesel production wastes with simultaneous electricity generation using a single chamber microbial fuel cell. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 411-415, 2011.

FUGIWARA, N.; SIROMA, Z.; YAMAZAKI, S.; IORIO, T.; SENOH, H.; YASUDA, K. Direct ethanol fuel cells using an anion exchange membrane. **Journal of Power Source**, v. 185, p. 621-626, 2008.

FUKUROZAKI, S. H.; SEO, E. S. M. Recuperação de catalisadores de platina da célula a combustível de membrana polimérica trocadora de prótons. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIENCIA DOS MATERIAIS, 2., 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Paraná: Associação Brasileira de Polímeros, 2006. p. 7557-68.

GONZALEZ, E. R. Eletrocatalise e poluição ambiental. **Quimica Nova**, v. 23, n. 2, p. 262-266, 1999.

HASSET, D. J.; CHARNIGA, L.; BEAN, K.; OHMAN, D. E.; COHEN, M. S. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: Mechanisms of resistance, antioxidant defense, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 2, p. 328-336, 1992.

HASLVOLD, O.; HENRIKSEN, H.; MELVAER, E.; CITI, G.; JOHANSEN, B. O.; KJONIGSEN, T.; GALETTI, S. Sea-water battery for subsea control system. **Journal of Power Sources**, v. 65, p. 253-261, 1997.

HE, Z.; ANGENENT, L. T. Application of bacterial biochatodes in microbial fuel cells. **Electroanalysis**, v. 18, n. 19-20, p. 2009-2015, 2006.

HERNANDES, M. E.; NEWMAN, D. K. Extracellular electron transfer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, p. 1562-1571, 2001.

HOLMES, D. E.; BOND, D. R.; O'NEIL, R. A.; REIMERS, C. E.; TENDER, L. R.; LOVLEY, D. R. Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. **Microbial Ecology**, v. 48, p. 178-190, 2004.

LA ROTTA, C. E. H.; CINICIATO, G. P. M. K.; GONZALEZ, E. R. Triphenylmethane dyes, na alternative for mediated electronic transfer systems in glucose oxidase biofuel cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 487-497, 2011.

LOGAN, B. E.; HAMELERS, B.; ROZENDAL, R.; SCHRÖDER, U.; KELLER, J.; FREGUIA, S.; AELTERMAN, P.; VERSTRAETE, W.; RABAEY, K. Microbial fuel cells: methodology and technology. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 17, p. 5181-5192, 2006.

LOGAN, B. E. Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cell. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 375-381, 2009.

LOVLEY, D. R. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 497-508, 2006.

LUO, H.; JIN, S.; FALLGREEN P. H.; PARK, H. J.; JOHNSON, P. A. A novel laccase-catalyzed cathode for microbial fuel cells. **Chemical Engineering Journal**, v. 165, p. 524-528, 2010.

MATSUOKA, K.; IRIYAMA, Y.; ABE, T.; MATSUOKA, M.; OGUMI, Z. Alkaline direct alcohol fuel cells using an anion Exchange membrane. **Journal of Power Sources**, v. 150, p. 27-31, 2005.

MAVRODI, D. V.; BONSALE, R. F.; DELANEY, S. M.; SOULE, M. J.; PHILLIPS, G.; THOMASHOW, L. S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6454-6465, 2001.

MCKINLEY, J. B.; ZEIKUS, G. Extracellular iron reduction is mediated in part by neutral red and hydrogenase in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3467-3474, 2004.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Glicerolquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

OH, S.; MIN, B.; LOGAN, B. E. Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. **Environmental Science and Technology**, v. 38, p. 4900-4904, 2004.

OH, S.; LOGAN, B. E. Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 162-169, 2006.

OKADA, T.; MOLLER-HOLST, S.; GORSETH, O.; KJESTRUP, S. Transport and equilibrium properties of Nafion® membranes with H⁺ and Na⁺ ions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 442, p. 137-145, 1998.

OSMAN, M. H.; SHAH, A. A.; WALSH, F. C. Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part II: Microbial. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 953-963, 2010.

PAGANIN, V. A.; TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. Development and electrochemical studies of gas diffusion electrodes for polymer electrolyte fuel cells. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 26, p. 297-304, 1996.

PARK, D. H.; ZEIKUS, J. G. Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 348-355, 2003.

PHAM, C. A.; JUNG, S. J.; PHUNG, N. P.; LEE, J.; CHANG, I. S.; KIM, B. H.; YI, H.; CHUN, J. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophyla*, isolated from a microbial fuel cell. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 129-134, 2003.

POTTER, M. C. Electrical affects accompanying the decomposition of organic compounds. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, v. 84, n. 571, p. 260-276, 1911.

POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 35, p. 5393-5398, 2007.

PRAKASH, G. K. S.; VIVA, F. A.; BRETSCHGER, O.; YANG, B.; EL-NAGGAR, M.; NEALSON, K. Inoculation procedures and characterization of membrane electrode assemblies for microbial fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 195, p. 111-117, 2010.

RABAEY, K.; VERSTRAETE, W. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 291-298, 2005.

RABAEY, K.; BOON, N.; HÖFTE, M.; VERSTRAETE, W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 3401-3408, 2005.

RAMANAVICIUS, A.; KAUSAITE, A.; RAMANAVICIENE, A. Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 761-766, 2008.

ROZENDAL, R. A.; HAMELERS, H. V. M.; BUISMAN, C. J. N. Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance. **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 5206-5211, 2006.

SANTOS, L.; COLMATI, F.; GONZALEZ, E. R. Preparation and characterization of supported Pt-Ru catalysts with a high Ru content. **Journal of Power Sources**, v. 159, p. 869-877, 2006.

SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 167-178, 2009.

SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunity. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, n. 4, p. 227-242, 1993.

SHUKLA, A. K.; SURESH, P.; BERSCHMANS, S.; RAJENDRAN, A. Biological fuel cells and their applications. **Current Science**, v. 87, n. 4, p. 455-468, 2004.

SIMÕES, M.; BARANTON, S.; COUTANCEAU, C. Electro-oxidation of glycerol at Pd based nano-catalysts for an application in alkaline fuel cells for chemicals and energy cogeneration. **Applied Catalysts B: Environmental**, v. 93, p. 354-362, 2010.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. Células a combustível: Uma alternativa promissora para a geração de eletricidade. **Química Nova**, v. 12, n. 3, p. 268-272, 1988.

VEGA, C. A.; FERNÁNDEZ, I. 951 – Mediating effect of ferric chelate compounds in microbial fuel cells with *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis*, and *Erwinia dissolvens*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 17, p. 217-222, 1987.

VUKOMANOVIC, D. V.; ZOUTMAN, D. E.; MARKS, G. S.; BRIEN, J. F.; VAN LOON. G. W.; NAKATSU, K. Analysis of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* by adsorptive stripping voltammetry. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 36, p. 97-102, 1996.

WATANABE, K.; MANEFIELD, N.; LEE, M.; KOUZUMA, A. Electron shuttles in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 633-641, 2009.

WILKINSON, S. “Gastrobots” – Benefits and challenges of microbial fuel cells in food powered robot applications. **Autonomous robots**, v. 9, p. 99-111, 2000.

WILLNER, I.; YAN, Y. M.; WILLNER, B.; TEL-VERED, R. Integrated enzyme-based biofuel cells – A review. **Fuel Cells**, v. 9, n. 1, p. 7-24, 2009.

WORLDOMETER. Disponível em: <www.worldometers.info/cars>. Acesso em: 19 maio 2011.

YAHIRO, A.T.; LEE, S.M.; KIMBLE, D.O. Bioelectrochemistry I enzyme utilizing biofuel cell studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 88, p.375-383, 1964.

YAMAKI, T.; KOBAYASHI, K.; ASANO, M.; KUBOTA, H.; YOSHIDA, M. Preparation of proton exchange membranes based on crosslinked polytetrafluoroethylene for fuel cells applications. **Polymer**, v. 45, p. 6569-6573, 2004.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 213-219, 2007.