

**Mestrado Integrado em Engenharia Química**

***Otimização de uma célula de combustível  
microbiana***

**Dissertação em ambiente académico desenvolvida por:**

**Daniela Pereira Pinto**



**Departamento de Engenharia Química**

**Orientadora: Alexandra Maria Pinheiro da Silva Ferreira Rodrigues Pinto**

**Co- Orientadora: Vânia Sofia Brochado de Oliveira**

**Fevereiro 2014**

---

## Agradecimentos

A todos os que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho.

À orientadora Professora Alexandra Pinto e à Vânia Oliveira, co-orientadora, agradeço a orientação, o incentivo, a confiança, a disponibilidade e o apoio ao longo de todo o trabalho.

Ao meu colega de trabalho diário e amigo Lucas Marcon pela orientação, disponibilidade, pela interajuda.

Ao Professor Manuel Simões agradeço a disponibilização das instalações e de todos os recursos necessários durante a execução prática deste trabalho.

Aos técnicos, Sílvia Faia, Paula Pinheiro, Carla Ferreira, D. Maria do Céu, Luís Carlos Matos, Liliana Pereira, agradeço toda a colaboração técnica e laboratorial prestada, bem como a amizade, apoio e incentivo.

Agradeço também aos meus amigos Soraia Neves, Tânia Terra, Rui Costa, Helena Gaifem, Ana Luísa Silva e Vítor Pereira, a paciência, a ajuda na escrita deste documento nomeadamente a nível de apresentação bem como de conteúdo e também o incentivo no decorrer do trabalho.

Por último, mas não menos importante gostaria de agradecer o apoio incondicional dos meus Pais e Irmã. Sem eles hoje este documento não estaria escrito, nem este trabalho teria sido realizado.

‘Deus quer, o homem sonha, a obra nasce.’- Fernando Pessoa

‘Você precisa fazer aquilo que pensa que não é capaz de fazer.’- Eleanor Roosevelt

---

## Resumo

A tecnologia das células de combustível tem sido intensivamente estudada e desenvolvida devido ao seu potencial para conversão de energia química em energia eléctrica em diversas aplicações. Dentro dos diversos tipos de células de combustível, as células de combustível microbianas são bastante promissoras, uma vez que produzem eletricidade a partir de resíduos produzidos pelo ser humano, ou águas residuais que contêm substratos orgânicos e microrganismos. São capazes de degradar compostos orgânicos que a nossa sociedade produz e simultaneamente produzir energia. Esta tecnologia ainda não atingiu o nível de eficiência desejável pelo que, apesar da existência de inúmeros estudos já realizados, é necessário ultrapassar vários desafios tecnológicos é necessário para que a CCM se torne competitiva comercialmente.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência das condições operatórias (stress hidrodinâmico e caudais de alimentação) no desempenho de uma célula de combustível microbiana, com vista à otimização da mesma. O desempenho foi avaliado com base nas curvas de polarização, na potência obtida, carência química de oxigénio (CQO) e biofilme formado no eléctrodo do ânodo. A célula usada consistiu num sistema bio-reaccional com dois compartimentos de igual volume e o meio aquoso no ânodo era constituído por água residual sintética que pretendia simular um efluente da indústria do leite e bactérias, *Lactobacillus Pentosus*. O sistema operou em dois modos: contínuo e *batch*. No modo contínuo foi estudado o efeito do caudal de operação (0,05 e 0,11 L/h) e da agitação no desempenho da célula. No reator *batch* estudou-se o efeito da duração do ciclo de operação (24, 48 e 72h) e da concentração do extrato de levedura no desempenho da célula.

Das experiências realizadas concluiu-se que no caso do reator a operar em modo contínuo a utilização de um caudal menor é favorável ao desempenho da célula (8,76 mW/m<sup>2</sup> de potência e 73% de eficiência de remoção de CQO). A agitação foi favorável ao crescimento de biofilme mas desfavorável ao desempenho da célula. O ciclo com melhores resultados, na operação em modo *batch*, foi o de 48h (3,56 mW/m<sup>2</sup> de potência e 70% de eficiência de remoção de máxima CQO). A adição de 10 vezes da quantidade do extrato de levedura revelou melhorias significativas no desempenho da célula, pelo que deverá ser considerado o seu efeito como mediador natural (a potência obtida foi de 6,63 mW/m<sup>2</sup> e a eficiência de remoção máxima de CQO de 85%).

**Palavras-chave:** Células de combustível microbianas, *Lactobacillus Pentosus*, Potência, Batch, Contínuo, CQO, agitação.

## Abstract

Fuel cell technology, since it has unique characteristics, has been intensively studied and developed due to its potential to convert chemical energy into electrical energy for use. Within the various types of fuel cells, microbial fuel cells are very promising, because they produce electricity from waste produced by humans, or wastewater containing organic substrates and microorganisms. In this way they are able to degrade organic compounds that our society produces and simultaneously produce some energy. Despite the existence of numerous studies available in literature, there is still the need to overcome some technological barriers for microbial fuel cells to become more efficient and commercially acceptable.

The present work aimed to study the influence of operating conditions (hydrodynamic stress and feed flow rates) in the performance of a microbial fuel cells, in order to optimize it. The performance was evaluated based on the polarization curves, obtained power, chemical oxygen demand (COD) and biofilm formed at the anode electrode. The cell used consisted in a bio-reaccional system with two compartments of equal volume and the aqueous medium at the anode consisted of residual synthetic water to mimic a milk waste water industry and sewage bacteria, *Lactobacillus Pentosus*. The system operated in two modes: continuous and batch. In the continuous mode the effect of the operation flow (0,05 and 0,11 Lh) and agitation in the performance of the cell was studied. In batch reactor the effect of the duration of operating cycle (24, 48 and 72 hours) and the concentration of yeast extract in the cell performance was studied.

From the experiments it was found that in the case of the continuous mode operatio, the use of a smaller flowrate enhances the cell performance (8,76  $\text{mWm}^2$  and 73 % of COD removal efficiency). The agitation was favourable to the biofilm growth but unfavorable to the all cell performance enhancement. The cycle with better results, in the batch mode operation, was 48 h (3,56  $\text{mWm}^2$  and 70 % of maximum COD removal efficiency). The addition of 10 times the quantity of yeast extract revealed significant improvements in the cell performance, and should therefore be considered as a natural mediator (the power obtained was 6,63  $\text{mWm}^2$  and maximum of COD removal efficiency of 85 %).

**Keywords:** Microbial fuel cells, *Lactobacillus Pentosus*, Power, Batch, Continuous, COD, Agitation.

---

---

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>7</b>
1.2	Objetivos do presente trabalho .....	10
1.3	Estrutura da Tese .....	10
<b>2</b>	<b>Estado da arte .....</b>	<b>12</b>
2.2	Funcionamento das Células de Combustível Microbianas .....	13
2.3	Fundamentos e desafios a ultrapassar numa CCM .....	16
2.4	Estado da Arte .....	19
2.5	Aplicabilidade das Células de Combustível Microbianas .....	21
2.5.1	Tratamento de efluentes/produção de energia .....	21
2.5.2	Fonte de alimentação para sensores remotos.....	22
2.5.3	Monitorização da carência Bioquímica de Oxigénio (CBO) .....	22
2.5.4	Produção de hidrogénio .....	22
<b>3</b>	<b>Descrição Técnica.....</b>	<b>23</b>
3.1	Materiais e Métodos .....	23
3.1.1	Descrição da solução inoculada e do meio de crescimento do ânodo .....	23
3.1.2	Descrição da célula de combustível microbiana .....	24
3.1.3	Modo de Operação .....	26
3.1.4	Arranque das instalações (Contínuo e <i>Batch</i> ) .....	28
<b>4</b>	<b>Discussão dos resultados .....</b>	<b>30</b>
4.1	Reator contínuo .....	30
4.1.1	Efeito do caudal de operação .....	30
4.1.2	Efeito da agitação no ânodo.....	36
4.1.3	Resumo dos resultados .....	41
4.2	Reator <i>batch</i> .....	42
4.2.1	Efeito do ciclo de operação .....	42

---

4.2.2	Efeito da quantidade de extrato de levedura (mediador) .....	49
4.3	Reator contínuo vs Reator batch.....	54
5	Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro .....	56
5.1	Conclusões .....	56
5.2	Sugestões para trabalho Futuro .....	58
6	Referências .....	60
Apêndices .....		64
Apêndice A - Plaqueamento .....		64
Apêndice B - Carência Química de Oxigênio (CQO) .....		65
Apêndice C - Método de Dubois para quantificação dos açúcares.....		66
Apêndice D - Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's modification para quantificação de proteínas .....		67
Apêndice E - Método de extração e quantificação de massa de biofilme .....		68
Apêndice F - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator contínuo para o caudal de 0,05 L/h.....		69
Apêndice G - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator contínuo para o caudal de 0,11 L/h.....		70
Apêndice H - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator contínuo para o caudal de 0,05 L/h com agitação.....		71
Apêndice I - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para o ciclo de 24h .....		72
Apêndice J - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para o ciclo de 48h .....		75
Apêndice L - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para o ciclo de 72h .....		77
Apêndice M - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para o ciclo de 48h com o dobro de extrato de levedura .....		78
Apêndice N - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para o ciclo de 48h com 10 vezes mais extrato de levedura .....		80

---

## Lista de Figuras

Figura 1 - Quantidade anual de petróleo encontrada e valores do seu consumo fornecidos pela agência de Energia até 2030 <sup>[1]</sup> . ....	7
Figura 2 - Previsão da Agência Internacional da Energia para os consumos energéticos, até 2020 <sup>[1]</sup> . ....	8
Figura 3 - Contribuições gasosas para o efeito estufa dos diferentes sectores industriais <sup>[1]</sup> ....	9
Figura 4 - Funcionamento de uma célula .....	14
Figura 5 - Mecanismos de formação de biofilme. ....	16
Figura 6 - Curva de polarização típica. ....	17
Figura 7 - Reator de polimetil-metacrilato com 2 compartimentos. ....	24
Figura 8 - Escovilhão com fibras de carbono (esquerda) e tecido de carbono impregnado com platina (direita). ....	25
Figura 9 - Compartimento anódico. ....	25
Figura 10 - Compartimento catódico. ....	25
Figura 11 - Configuração do reator batch. ....	26
Figura 12 - Estação eletroquímica Zhaner. ....	27
Figura 13- Fotografia do programa de aquisição de dados. ....	27
Figura 15- Processo de extração do biofilme. ....	28
Figura 14- Fotografia do biofilme .....	28
Figura 16- Resultados de tensão Vs corrente específica obtida para o caudal de 0,05 L/h ....	30
Figura 17 - Resultados de tensão Vs corrente específica para um caudal de 0,11 L/h. ....	31
Figura 18 - Efeito do caudal de operação no desempenho da CCM. ....	32
Figura 19 - Resultados da potência específica e da eficiência de remoção de CQO (%) ao longo do tempo (caudal de 0,05 L/h). ....	33
Figura 20 - Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo (caudal de 0,11 L/h). ....	34
Figura 21- Biofilme formado na superfície do eléctrodo para um caudal de 0,11 L/h. ....	35

---

Figura 22 - Resultados de Tensão Vs corrente específica com agitação. ....	37
Figura 23- Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo e com agitação. ....	38
Figura 24- Efeito da agitação no desempenho da CCM. ....	39
Figura 25- Biofilme formado para o reator com agitação no ânodo. ....	39
Figura 26- Resultados comparativos para valores de potência ao longo de 4 semanas nos três ensaios realizados no reator a operar em contínuo. ....	41
Figura 27- Resultados de tensão Vs corrente específica para o reator batch no ciclo de 24h. ....	43
Figura 28- Resultados de tensão Vs corrente específica para o reator batch no ciclo de 48h. ....	43
Figura 29 - Resultados de tensão Vs corrente específica para o reator batch no ciclo de 72h. ....	44
Figura 30 - Efeito do tempo do ciclo no desempenho de uma CCM. ....	44
Figura 31- Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo para o reator batch no ciclo de 24h. ....	46
Figura 32- Resultados de potência específica e eficiência de remoção de CQO obtidos para o reator batch no ciclo de 48h. ....	47
Figura 33- Resultados de potência específica e eficiência de remoção de CQO obtidos para o reator batch no ciclo de 72h. ....	47
Figura 34- Resultados de tensão Vs corrente específica para o reator batch com o dobro de extrato de levedura ....	49
Figura 35- Resultados de tensão Vs corrente específica para o reator batch com 10 vezes o valor de extrato de levedura. ....	50
Figura 36- Resultados obtidos no reator batch para os três ensaios realizados. ....	51
Figura 37- Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo para o reator batch com o dobro de extrato de levedura. ....	52
Figura 38- Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo para o reator batch com 10 vezes o valor de extrato de levedura. ....	52
Figura 39- Efeito do modo de operação no desempenho de uma CCM. ....	54

---

---

## Lista de Tabelas

Tabela 1- Composição da água sintética mimetizando o efluente .....	23
Tabela 2- Plano de ensaios para o reator batch.....	29
Tabela 3- Plano de trabalho para o tempo de duração total de um ensaio do reator batch. ..	29
Tabela 4- Valores obtidos para a quantificação de açúcar, proteína e peso seco. ....	35
Tabela 5- Valor obtido para a constante $\alpha$ .....	36
Tabela 6 - Valores obtidos para a quantificação de açúcar, proteína e peso seco.....	40
Tabela 7- Valor obtido para a constante $\alpha$ .....	40
Tabela 8 - Valores de potência obtidas para diferentes bactérias <sup>[4]</sup> . ....	41
Tabela 9 - Valores obtidos para a quantificação de açúcar, proteína e peso seco do reator batch para os diferentes ciclos. ....	48
Tabela 10 - Valor obtido para o parâmetro $\alpha$ .....	48
Tabela 11 - Valores obtidos para a quantificação de açúcar, proteína e peso seco do reator batch para as diferentes quantidades de extrato de levedura.....	53
Tabela 12 - Valor obtido para a constante $\alpha$ . ....	53
Tabela 13 - Valores obtidos para a quantificação do biofilme para os diferentes modos de operação. ....	55

## Notação e Glossário

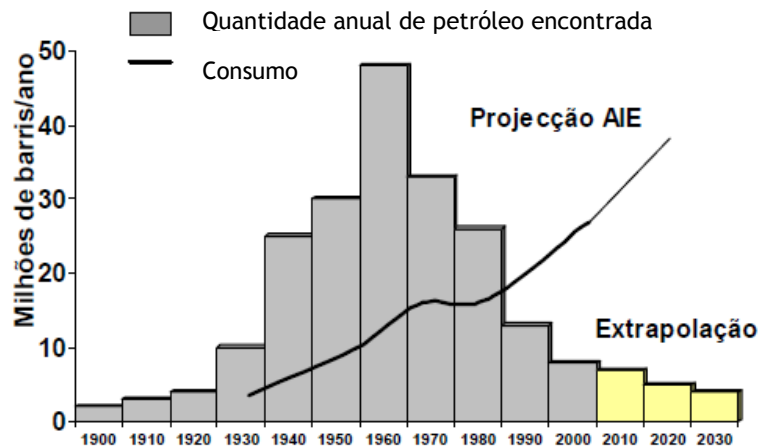
<i>Siglas</i>	
ARS	Água residual sintética
CBO	Carência Bioquímica de oxigênio
CCE	Células de combustível enzimáticas
CCM	Células de combustível microbianas
CQO	Carência química de oxigênio
MRS	Meio de crescimento
PEM	Membrana de permuta protônica
SV	Sólidos voláteis
UFC	Unidade formadora de colônias

<i>Letra</i>	<i>Definição</i>	<i>Unidades</i>
A	Área de membrana ativa	$m^2$
F	Constante de Faraday	$C/mol$
i	Intensidade de corrente	$mA$
I	Densidade de corrente específica	$mA/m^2$
m	Massa de biofilme extraído	$mg$
P	Potência específica	$mW/m^2$
Q	Caudal de água residual	$L/s$
V	Volume de água residual	$m^3$
a	Constante de peso	$UFC/mg$

# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento energético atual

Com as limitações decorrentes das reservas de combustíveis fósseis (*Figura 1*), os problemas inerentes ao sector de distribuição de energia (como os acidentes, a localização e os custos das centrais elétricas), o aumento da poluição e o aumento exponencial da população (impulsionados pelos avanços nas áreas da medicina e da indústria) (*Figura 2*), torna-se cada vez mais necessária a investigação e o desenvolvimento de fontes de energia “amigas” do ambiente, eficientes e renováveis.



*Figura 1* - Quantidade anual de petróleo encontrada e valores do seu consumo fornecidos pela agência de Energia até 2030 (adaptada de [1]) <sup>[1]</sup>.

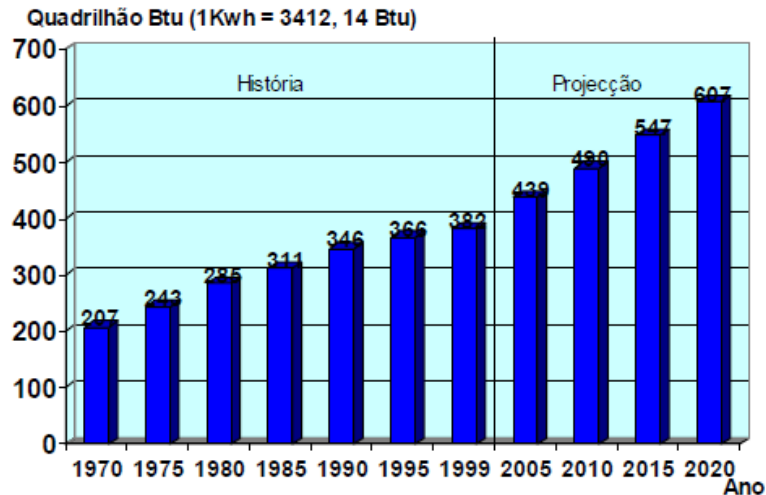


Figura 2 - Previsão da Agência Internacional da Energia para o consumo energético, até 2020 [1].

Tudo começou com a máquina a vapor, que transforma energia química em mecânica e que esteve na origem da Revolução Industrial, primeiro em Inglaterra e depois nos outros países. Com o desenvolvimento dos estudos sobre a eletricidade aprendeu-se a produzir energia elétrica e mais tarde a transformá-la em energia mecânica, química, radiante, etc.

Na verdade com a Revolução Industrial, a produção em série e por sua vez a consequente massificação do consumo de bens conduziu a uma nova estrutura social. O Homem descobriu as vantagens das máquinas, no entanto, foi preciso dispor da energia necessária para o seu funcionamento. O consumo de combustíveis fósseis tem vindo a aumentar desde então com um forte impacto ambiental negativo.

Um dos principais problemas inerentes à utilização dos combustíveis fósseis, como por exemplo o gasóleo, é a emissão de gases para a atmosfera, em especial do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Os gases resultantes da queima de combustíveis fósseis provocam o efeito de estufa com um aumento da temperatura média do planeta (Figura 3). Este aumento poderá ser superior a 2°C se não forem cumpridos os limites de emissões de CO<sub>2</sub> de 44 gigatoneladas até 2020 (segundo o relatório sobre a Lacuna de Emissões do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente [2]).

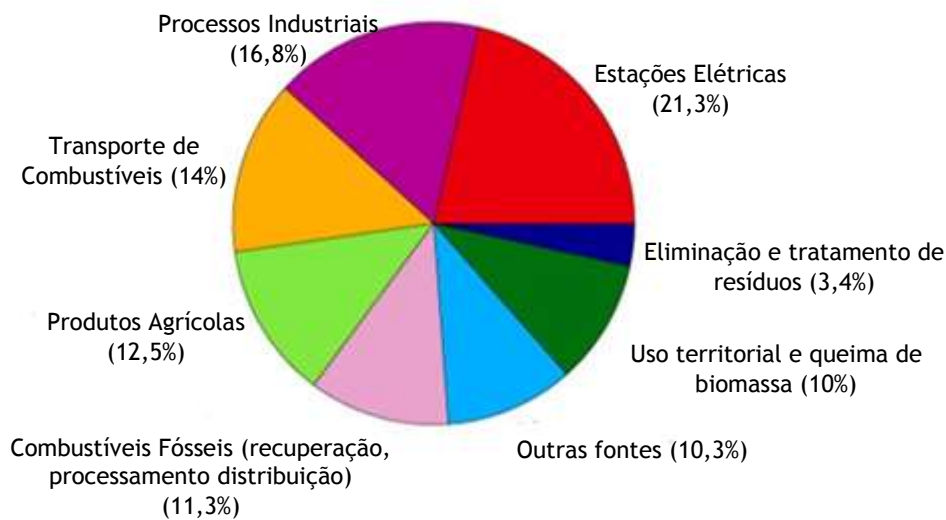


Figura 3 - Contribuições gasosas para o efeito estufa dos diferentes sectores industriais (adaptada de [1]) <sup>[1]</sup>.

Outro grave problema decorrente do uso extremo dos combustíveis fósseis é a sua escassez e eventual desaparecimento (até 2050, segundo especialistas) <sup>[3]</sup> visto que estes não são renováveis.

Assim, resolver este problema implica usar tecnologias que recorram a fontes de carbono renováveis relativamente baratas e que não causem danos ao meio ambiente.

De entre as alternativas atualmente disponíveis destacam-se as células de combustível. Estas são capazes de oxidar combustíveis no ânodo (químicos ou biológicos, p.e. águas residuais) e reduzir oxigénio no cátodo convertendo a energia envolvida nas reações eletroquímicas em energia elétrica. As pilhas de combustível são essencialmente constituídas por eléctrodos metálicos (onde ocorrem as reações eletroquímicas) e um eletrólito condutor de iões. As reações geram calor e produzem água e em alguns casos baixas emissões de CO<sub>2</sub>.

Existem vários tipos de células de combustível, havendo atualmente um grande interesse no desenvolvimento e investigação das células de combustível microbianas (CCMs). Este tipo de células pode ser usado no tratamento de esgoto e outros tipos de resíduos orgânicos, produzindo alguma energia elétrica com várias aplicações possíveis.

A implementação e utilização desta tecnologia vantajosa em termos ambientais poderá contribuir para uma gradual redução da dependência dos combustíveis fósseis.

## 1.2 Objetivos do presente trabalho

A realização deste trabalho foi motivado pelo interesse crescente em desenvolver a tecnologia das células de combustível microbianas para futura utilização em sistemas de tratamento de águas com produção residual de energia elétrica.

O objetivo principal foi estudar a influência das condições de operação (stress hidrodinâmico e caudal de alimentação) no desempenho de uma célula de combustível microbiana a operar em contínuo e com duas câmaras, com vista à sua otimização. No decurso do trabalho o objetivo principal foi estendido e foram também realizados estudos sobre o efeito do modo de operação (*batch* vs contínuo) no desempenho da CCM, sobre a influência da duração do ciclo de operação e o efeito da concentração de mediador no desempenho da célula a operar em modo batch.

O desempenho da célula de combustível foi avaliado em termos globais incluindo a quantificação da sua produção energética através das curvas de polarização e da potência obtida e da quantificação da eficiência de remoção de CQO do efluente e do biofilme agregado no escovilhão de carbono, utilizado como eléctrodo no ânodo.

## 1.3 Estrutura da Tese

Esta tese de mestrado resulta do trabalho desenvolvido no CEFT (Centro de Estudos de Fenómenos de Transporte) no Departamento de Engenharia Química da FEUP (Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto), durante Setembro de 2013 e Fevereiro de 2014.

Este trabalho encontra-se organizado em cinco capítulos principais. No Capítulo 1 apresenta-se uma introdução geral ao tema e são apresentados os objetivos da presente tese.

O Capítulo 2 foca apenas as células de combustível microbianas, além das noções gerais para compreensão do funcionamento de uma célula de combustível deste tipo, inclui a apresentação dos principais desafios desta tecnologia, uma revisão bibliográfica dos principais trabalhos publicados e as suas principais aplicações.

O Capítulo 3 é dedicado à parte experimental: descreve-se a instalação utilizada, a construção e características das células de combustível usadas e apresenta-se o procedimento experimental adotado.

No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados das experiências efetuadas. Os resultados são analisados com base na representação do potencial em função da corrente específica (curva de polarização), na eficiência de remoção de CQO e quantificação do biofilme formado no eléctrodo do ânodo.

Por fim, no Capítulo 5 apresentam-se as principais conclusões obtidas e as sugestões para trabalho futuro.

## 2 Estado da arte

### 2.1 Células de Combustível Microbianas

Combustíveis como o etanol, butanol, metano e hidrogénio podem ser produzidos por microorganismos, mas o conceito de utilização de microorganismos em células de combustível tem vindo a ser explorado desde os anos 70 <sup>[4]</sup>, e as primeiras células de combustível para tratamento de águas residuais domésticas foram apresentadas em 1991 <sup>[4]</sup>.

O primeiro relato científico que relacionou organismos vivos com eletricidade é atribuído a Luigi Galvani que, em 1790, realizou uma experiência na qual observou a contração das pernas de rãs quando submetidas a uma descarga de corrente elétrica. Desta observação surge o termo bioeletricidade. Em 1911, Michael Cresse Potter, professor de botânica na Universidade de Durham, UK, demonstrou a libertação de energia elétrica quando bactérias *E. coli* atuavam sobre um substrato orgânico <sup>[5]</sup>.

Em 1931 Cohen, um pesquisador de Cambridge, reavivou a ideia de Potter, e descreveu um grupo de células de combustível biológicas capazes de produzir uma tensão de cerca de 35 V <sup>[6]</sup>.

Durante muito tempo o tema foi visto apenas como curiosidade científica mas em 1960 as células de combustível biológicas tornaram-se populares, quando a empresa de exploração espacial dos Estados Unidos da América, NASA, mostrou interesse nas mesmas <sup>[7]</sup>. O objetivo era gerar eletricidade ao mesmo tempo que existiria a degradação de resíduos orgânicos produzidos durante as viagens espaciais.

Em 1962, Rohrback projetou uma CCM na qual *Clostridium butyricum* foi usada para gerar hidrogénio através da fermentação da glicose <sup>[8]</sup>. No ano seguinte algumas células de combustível foram comercializadas, sendo utilizadas como fonte de energia para rádios recetores e luzes sinalizadoras em alto mar. Em pouco tempo se mostrariam um insucesso <sup>[7]</sup>.

No ano de 1966 foram apresentadas várias CCM que usavam a palha de arroz e ligadas em série, produziram uma tensão de 6 V <sup>[9]</sup>.

No entanto, com o desenvolvimento bem-sucedido de alternativas mais viáveis tecnicamente, como as células fotovoltaicas, houve um rápido desinteresse pelas CCM. Mais tarde, durante a crise do petróleo (década de 80), renovou-se o interesse no desenvolvimento das CCMs.

Um dos motivos pelo qual as CCMs não são consideradas como parte do portfólio das tecnologias que utilizam fontes renováveis é o facto de esta tecnologia ainda não estar suficientemente bem desenvolvida a ponto de gerar quantidades substanciais de energia com uma boa relação custo/benefício <sup>[10]</sup>.

No entanto, nos últimos anos a sua aplicabilidade tem-se verificado em inúmeras áreas como: geradores domésticos, alimentação de pequenos dispositivos eletrónicos como portáteis, entre outros. Outra área interessante e onde a sua aplicação seria possível em larga escala seria na conversão de esgotos e outros resíduos orgânicos em eletricidade e na biorremediação de ambientes contaminados <sup>[11]</sup>. Na realidade, há ainda um longo caminho a percorrer pois as CCM podem produzir corrente suficiente para alimentar pequenos dispositivos eletrónicos num curto espaço de tempo, mas o seu tamanho impede a sua incorporação nos dispositivos que exigem potência elevadas.

## 2.2 Funcionamento das Células de Combustível Microbianas

Dentro das células de combustível que fazem uso de biomassa existem as CCM e as CCE (células de combustível enzimáticas, que dependem da catálise enzimática para o seu funcionamento). Relativamente às células enzimáticas, as CCMs eliminam a necessidade de isolamento de enzimas e possibilitam a extração de mais de 90% dos eletrões a partir de compostos orgânicos <sup>[11]</sup>.

As células de combustível microbianas são dispositivos que usam bactérias para transformar a energia de ligações químicas em corrente elétrica, por oxidação da matéria orgânica e inorgânica. De um modo geral, estas aproveitam a energia proveniente do metabolismo das bactérias como energia elétrica (*Figura 4*) <sup>[24]</sup>.

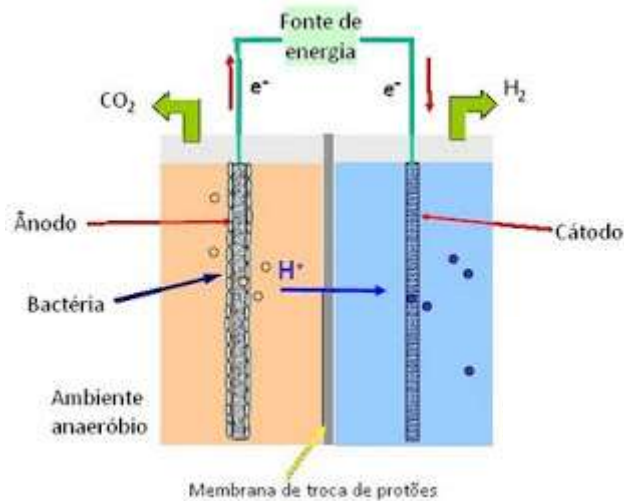
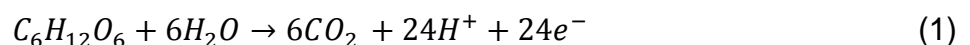


Figura 4 - Funcionamento de uma célula de combustível microbiana.

Deste tipo de dispositivos fazem parte um ânodo e um cátodo, separados por uma membrana ou outro dispositivo que permita uma separação seletiva de prótons e elétrons.

Para que ocorra a libertação de elétrons provenientes da degradação da matéria orgânica, é necessário que sejam promovidas no ânodo, condições anaeróbias. A fermentação foi inicialmente apresentada como um bom mecanismo para a oxidação anaeróbia da matéria orgânica mas, recentemente, e por ser um método pouco eficiente e com pouca geração de elétrons foi desconsiderada. Atualmente a oxidação do substrato é o método mais utilizado e o que permite um melhor reaproveitamento de todos os elétrons que se formam da degradação do substrato <sup>[10]</sup>. Desta forma, no ânodo de uma CCM, as bactérias encontram-se em condições anaeróbias, isto é, não há oxigênio no ambiente em que se encontram, por isso estas usam o eletrodo como aceitador de elétrons. Os prótons, provenientes da degradação da matéria orgânica, passam através de uma membrana seletiva (PEM) até chegarem ao cátodo onde o oxigênio é reduzido a água, o que implica que no lado do cátodo o oxigênio funcione como aceitador de elétrons.

Assim, os elétrons e prótons provenientes da degradação da matéria orgânica (*Equação 1*- Equação de degradação da glicose) movimentam-se da zona anaeróbia para a aeróbia, aceitadora de elétrons (*Equação 2*), existindo uma barreira, a membrana seletiva, que permite apenas a passagem de prótons, sendo os elétrons forçados a ir através de um circuito externo. E esta é a condição de funcionamento de uma CCM.



Se o ânodo não funcionasse em condições anaeróbias, o oxigênio seria utilizado pelas células na sua respiração, e portanto a célula seria um fracasso ou a quantidade que chegaria ao cátodo seria tão pequena que o rendimento seria demasiado insignificante para o processo ser viável.

O ânodo, é então constituído por uma determinada quantidade de microrganismos (consórcio de bactérias ou bactéria isolada), matéria orgânica que funciona como substrato para os mesmos e também, por um eléctrodo composto essencialmente por carbono (em forma de placa ou escovilhão). De acordo com a geometria utilizada, a eficiência da célula poderá alterar-se de forma significativa. No caso da utilização de um escovilhão com fibras de carbono, a área para formação de biofilme aumentará, o que poderá conduzir a uma maior produção e captação de eletrões provenientes da vizinhança do mesmo e da atividade microbiana presente na sua superfície.

Uma grande variedade de microrganismos tem sido estudada e tidos em consideração, especialmente quando o inóculo é um efluente provindo de uma qualquer unidade industrial <sup>[12-16]</sup>. Um dos microrganismos mais estudados até hoje e ao qual foram associados bons resultados na produção de energia numa CCM é a *Geobacter sulfurreducens*. Foi mesmo distinguida pela revista Times como estando no top das 50 invenções importantes no ano de 2009 <sup>[17]</sup>. Este microrganismo tornou-se um modelo no estudo destas células <sup>[18-20]</sup> uma vez que as culturas puras de *G. sulfurreducens* produzem potências elevadas quando comparadas com os valores obtidos para culturas mistas <sup>[21]</sup>, a sua sequência de DNA é conhecida por completo <sup>[22]</sup> e é passível de manipulação. Além disso, esta bactéria pertence à classe de organismos denominados por '*electricigens*', aqueles que transferem diretamente os eletrões <sup>[10]</sup>.

O biofilme formado no eléctrodo é uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos, envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderidos entre si a uma superfície ou interface <sup>[23]</sup>. O desenvolvimento de biofilme envolve várias etapas: a adesão inicial à superfície, seguida da formação de microcolónias e, na maioria dos casos, uma diferenciação das microcolónias em macrocolónias envolvidas numa matriz de exopolissacárido, formando biofilmes maduros (*Figura 5*) <sup>[24]</sup>.

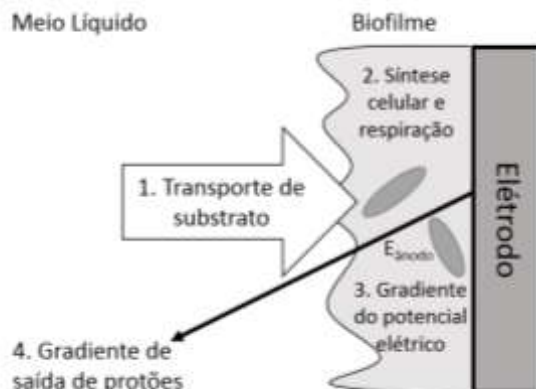


Figura 5 - Mecanismos de formação de biofilme (adaptada de [24]).

Na década de 90, demonstrou-se que as bactérias presentes no biofilme são metabólicas e morfológicamente diferentes das bactérias em suspensão, isoladas em cultura pura, e possuem normalmente maior resistência a determinados agentes.

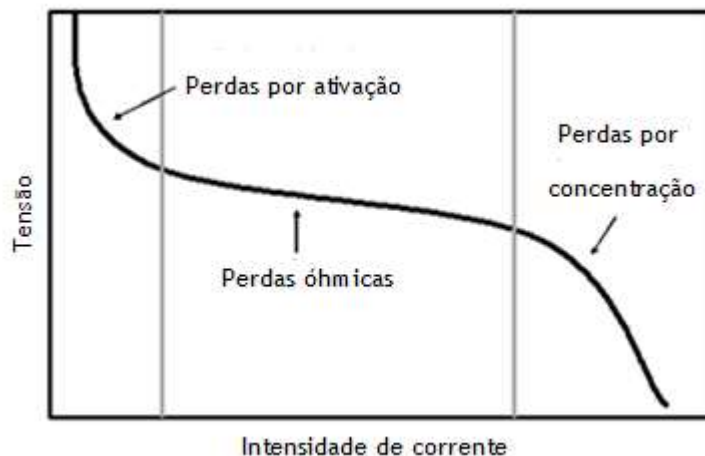
O cátodo das CCM (idêntico ao das células de combustível de membrana de permuta protônica- PEM) é, geralmente, constituído por um catalisador metálico, como por exemplo a platina (que facilita a redução do oxigênio) sob uma superfície também constituída por carbono.

## 2.3 Fundamentos e desafios a ultrapassar numa CCM

Nos últimos anos, as CCM tem sido desenvolvidas para gerar eletricidade diretamente a partir de águas residuais orgânicas complexas, como efluentes das indústrias alimentares, marinha, suiniculturas, químicas e de galvanoplastia, e efluentes domésticos [20,25-27]. Embora, o conceito desta tecnologia tenha sido criado há décadas atrás, a baixa potência obtida com uma CCM continua a ser problemática.

A forma mais usual de caracterizar o desempenho de uma célula de combustível é através da sua curva de polarização, sendo esta uma representação da tensão (V) em função da intensidade de corrente (A) (Figura 6). Idealmente, e desde que fosse alimentado um combustível e um oxidante, uma célula de combustível, deveria fornecer sempre a mesma tensão, tensão essa ditada pelo equilíbrio termodinâmico. Na prática tal não acontece, porque sempre que é extraída uma corrente da célula, ocorrem várias perdas de rendimento. Estas perdas são classificadas em três tipos, estando cada um dos tipos relacionado com uma

zona da curva de polarização. Na *Figura 6* encontra-se representada uma curva de polarização típica e o tipo de perdas dominante em cada região.



*Figura 6* - Curva de polarização típica.

As perdas por ativação predominam sobretudo a baixas intensidades de corrente e devem-se à ativação das reações químicas. Quando a cinética das reações é lenta uma parte da tensão é perdida. Uma forma de reduzir estas perdas é aumentando a área ativa dos elétrodos ou a atividade dos mesmos (uso de catalisadores mais eficientes) e adicionando mediadores ao meio. Os mediadores (químicos ou naturais) funcionam como captadores de elétrons, aumentando o fluxo de elétrons até ao elétrodo (funcionam como 'shuttles'). Para intensidades de corrente intermédias, a perda predominante é a perda ôhmica que se deve à resistência ao fluxo dos elétrons nos materiais do elétrodo, eletrólito e nas várias conexões da célula, bem como à resistência ao fluxo de iões através do eletrólito e membrana (protons). Usualmente, a resistência dominante é a iónica, pois o mecanismo de transporte de iões é mais complicado e difícil que o transporte de elétrons. Esta perda pode ser minimizada com a diminuição da distância entre os elétrodos e aumentando a condutividade dos mesmos. Para altos valores de intensidade de corrente a perda que predomina é a perda por concentração que é devida à incapacidade de ser mantida a quantidade inicial de substrato no meio e a limitações à transferência de massa.

Tal como se pode verificar, as curvas de polarização indicam as diversas perdas e a extensão de cada uma apontando para possíveis medidas para minimizá-las de modo a aproximar da tensão ideal. Estas medidas podem incluir a seleção de novos microrganismos, mediadores, substratos, desenho de uma CCM (menor espaçamento entre os elétrodos) e uso

de diferentes materiais (melhoria na estrutura dos eletrodos, eletrólitos, novos catalisadores).

É aceite pela comunidade científica que para serem obtidos valores desejáveis de potência vários obstáculos necessitam de ser ultrapassados. Estes vão desde o tipo e quantidades de substrato, ao tipo de eletrodos (cátodo e ânodo), dimensões da célula, modo de operação, tipo de membrana seletiva e até ao próprio metabolismo dos microorganismos. De forma a tornar uma célula de combustível totalmente viável terá de existir um compromisso entre as várias variáveis, nas quais também se deverão incluir os custos de aquisição e manutenção tanto das bactérias como da célula em si.

Quanto aos eletrodos levantam-se questões como: qual o tipo de material que favorece o crescimento de biofilme, cátodos que promovam uma mais rápida transferência dos eletrões, cátodos com maior potencial eletroquímico, entre outros.

Já no caso das membranas, seria interessante a existência de membranas que aumentassem a velocidade de transferência de protões evitando a existência de outro tipo de aceitadores protónicos.

No que diz respeito à bactéria seria importante um compromisso entre o seu crescimento e o custo do substrato utilizado visto que esta utilizará os componentes provenientes da degradação do substrato, tanto para promover o seu crescimento, como para a produção de energia. É, também, importante, o uso de um substrato que permita uma elevada taxa de transferência de eletrões para o ânodo (sem eles também a produção de energia é baixa). Embora o mecanismo de transferência de eletrões seja minimamente conhecido para algumas bactérias, seria vantajosa a modificação genética de muitas espécies de forma a serem obtidos melhores valores no que diz respeito à tensão gerada pelas mesmas [28] e posteriormente efetuar o completo estudo das suas capacidades e dos mecanismos para a transferência de eletrões [29].

Outro fator chave para o aumento de desempenho da CCM é a agregação do biofilme no eletrodo do ânodo bem como a adesão de qualquer tipo de partículas e a deteriorização do cátodo. Um biofilme define-se como uma matriz polimérica de aspeto compacto e gelatinoso que adere a uma superfície sólida (quando imersa num meio líquido). É constituída essencialmente por microrganismos, substâncias extracelulares poliméricas e água [30-32].

Outro ponto importante para a viabilidade das CCM é a sua eficiência na remoção de compostos orgânicos, visto que grande parte dos estudos tentam aliar a produção de energia com a remoção de compostos indesejados de um determinado efluente. Desta forma a variável custo do substrato seria minimizada.

As condições de operação são outra importante variável que têm uma elevada influência no desempenho da célula. Sendo assim, será importante estudar e prever o efeito do modo de operação e das condições de operação, tais como o pH, temperatura, caudal de arejamento, caudal e concentração de mediador no desempenho da CCM.

O principal desafio na implementação das CCM em grande escala é manter os custos baixos e maximizar a sua produção energética [33].

## 2.4 Estado da Arte

Tal como já mencionado, nos primeiros estudos com CCMs, a energia elétrica foi produzida a partir de culturas de *Escherichia coli* e *Saccharomyces spp.*, utilizando elétrodos de platina, no entanto, a potência obtida era muito baixa. Este conceito apenas suscitou um maior interesse, quando se descobriu que a potência poderia ser extremamente aumentada pela adição de mediadores [34,35]. Um bom mediador deve ser capaz de atravessar, facilmente, a membrana celular, possuir uma elevada taxa transferência de eletrões, deverá ser não-biodegradável e não tóxico para os microrganismos e ter baixo custo. Os mediadores mais usados são os mediadores exógenos sintéticos tais como: neutral red (NR), methylene blue (MB), Fe(III)EDTA, mas a sua elevada toxicidade, custo, instabilidade e baixa eficiência limitam o seu uso nas CCMs [34,35]. Estas desvantagens fizeram os cientistas observar mais profundamente as características microbiológicas no ânodo e usar bactérias tais como a *Geobacter* e *Rhodofera spp.*, que poderiam transferir eletrões diretamente para o eletrodo e aumentar a eficiência Coulombica da célula [36]. O uso destas espécies é de elevado interesse porque este tipo de microrganismos têm sido encontrados nos ânodos das células de combustível que produzem energia elétrica a partir de sedimentos aquáticos e resíduos orgânicos complexos [20,37]. Além disso, estas espécies têm a capacidade de oxidar completamente os substratos orgânicos em dióxido de carbono, com um ânodo a servir como o aceitador final de eletrões. Este tipo de bactérias desenvolve biofilmes sobre os elétrodos, permitindo uma considerável capacidade de conversão e, portanto, um sistema microbiano mais eficaz e com uma elevada produção elétrica [38,39]. Apesar do esforço efetuado a fim de selecionar os melhores consórcios bacterianos por forma a atingir as densidades de potência necessárias para as aplicações reais de uma CCM, os desempenhos deste tipo de células de combustível ainda são inferiores aos necessários. Para uma CCM é, também, possível melhorar o seu desempenho através da otimização das condições de operação (caudal de alimentação e stress hidrodinâmico) e modo de operação (*batch* e contínuo).

As condições hidrodinâmicas são um dos principais parâmetros que afetam a adesão microbiana e a formação de biofilme <sup>[40,41]</sup>. Além disso, o desenvolvimento do biofilme e a eletroquímica do mesmo afetam o desempenho e a capacidade de uma CCM tratar a água residual <sup>[40,41]</sup>. Sendo assim, é importante ter uma profunda compreensão da influência do stress hidrodinâmico na formação do biofilme e no desempenho de uma CCM. Estudos sobre este assunto revelam que um aumento da agitação origina uma potência mais elevada e um biofilme com uma espessura média superior <sup>[40]</sup>. O desenvolvimento de um biofilme mais espesso pode ser devido a um aumento da coesão do biofilme em resposta a altas forças de descolamento e a um aumento de produção de biomassa, resultante de uma maior transferência de massa. Nessas condições, a concentração de elétrons na superfície do eletrodo é superior, logo a produção de energia é também superior. Um aumento da agitação origina, também, uma diminuição da diversidade de biofilme, logo uma espécie domina a comunidade bacteriana, diminuindo a maturação do biofilme e originando um biofilme mais jovem e com altos níveis de atividade metabólica. Um biofilme com estas características melhora a transferência de elétrons <sup>[41]</sup>. No entanto, para uma agitação muito alta, verificou-se uma diminuição da corrente e da espessura do biofilme, demonstrando um desprendimento de células <sup>[40]</sup>. Nestas condições as bactérias presentes no eletrodo transferem elétrons por outro mecanismo, em vez de utilizar apenas os mediadores redox, levando a uma diminuição da produção de energia e reduzindo o desempenho da CCM.

A capacidade de um microrganismo degradar a matéria orgânica sujeito a diferentes caudais de operação é uma característica valiosa para uma estação de tratamento de águas residuais. Deste modo, é desejável e essencial operar uma CCM em contínuo, com diferentes caudais de alimentação e com um biofilme bem desenvolvido e ativo. Tendo como objetivo maximizar o desempenho de uma CCM, o tempo necessário para a formação de um biofilme com tais características é outro parâmetro importante que deve ser considerado no estudo de uma CCM. Assim o caudal de alimentação e o tempo de residência resultante (HRT) são, outros dois, importantes parâmetros que precisam de ser estudados aquando da otimização de uma CCM <sup>[42-46]</sup>. Estudos sobre o efeito do caudal no desempenho de uma CCM mostraram que a potência obtida aumenta com um aumento do caudal até um valor máximo, onde o aumento do caudal conduz a uma diminuição da produção energética <sup>[42-46]</sup>. Caudais mais elevados podem arrastar uma maior quantidade microbiana, diminuindo a sua concentração no meio reacional e, conseqüentemente, produção de energia da célula. Estas condições extremas podem, também, afetar a formação, maturação e estabilização do biofilme originando biofilmes mais finos na superfície do eletrodo, levando a baixos desempenhos da

CCM. Assim, verifica-se que para ser obtido um bom desempenho da célula deverão estar criadas condições de maturação do biofilme. A eficiência Coulombica e a remoção de CQO são igualmente afetados com o aumento do caudal, diminuindo [42-46]. Isto é devido a uma diminuição do tempo disponível para a comunidade microbiana digerir os compostos orgânicos e ao facto de afetar negativamente a formação do biofilme.

Tal como já foi mencionado uma célula de combustível microbiana pode operar em modo contínuo e batch. Ambos os modos de operação têm sido muito estudados e têm vantagens e desvantagens associados, no entanto, com vista à aplicação das CCM em sistemas reais o modo contínuo é o mais adequado [47,48]. Além disso o modo de operação batch tem como desvantagens o facto de conduzir a uma diminuição da concentração de substrato no meio reacional o que leva a um défice nutricional e também a uma acumulação dos produtos da reação no meio que podem trazer alguma toxicidade para a comunidade microbiana. Contrariamente, o modo de operação em contínuo permite uma otimização da composição do meio reacional por forma a obter um rendimento máximo, a produção de metabólitos secundários pode também ser controlada, as cinéticas de crescimento e as constantes cinéticas são determinada com precisão, o processo conduz a resultados reprodutíveis e dados de confiança, permite uma elevada produtividade por unidade de volume, permite uma correta reposição de substrato e remoção dos produtos da reação [47,48].

O modo de operação batch tem sido essencialmente usado para a produção de bioeletricidade por um longo período de tempo. No entanto, o modo de operação em contínuo também permite esta situação e, tal como já foi mencionado, é o mais adequado para as aplicações futuras das CCMs.

## 2.5 Aplicabilidade das Células de Combustível Microbianas

As CCMs têm sido estudadas como processo alternativo de produção de energia alternativa mas, a sua aplicação está atualmente muito limitada a certas áreas e certas utilidades. No entanto com melhorias no design, custo vs eficácia vs eficiência, a curto prazo, será possível o *Scale-Up* das mesmas [32].

### 2.5.1 Tratamento de efluentes/produção de energia

As bactérias podem gerar energia ao mesmo tempo que degradam contaminantes de efluentes. Muitos estudos são elaborados neste sentido: produção de energia elétrica no

decurso do tratamento de águas residuais (industriais, agrícolas e municipais). O controlo da quantidade de matéria degradada é monitorizada através de análises de CQO (carência química de oxigénio, que é um parâmetro que mede a quantidade de matéria orgânica suscetível de ser oxidada por meios químicos). Além disso, as CCMs também são conhecidas por gerar um menor excesso de lamas quando o comparadas com o processo de tratamento aeróbio <sup>[24]</sup>.

### 2.5.2 Fonte de alimentação para sensores remotos

Com o desenvolvimento da micro-eletrônica a exigência energética dos dispositivos eletrônicos reduziu drasticamente. Tipicamente, as baterias são usadas para sensores químicos de alimentação, mas em algumas aplicações a regular substituição das mesmas pode ser dispendioso, demorado e pouco prático. Uma possível solução para este problema é a utilização de fontes de energia auto-renováveis, como se utiliza nas CCMs, que podem operar por um longo tempo usando recursos locais <sup>[49]</sup>.

### 2.5.3 Monitorização da carência Bioquímica de Oxigénio (CBO)

Outra potencial aplicação da tecnologia das CCMs é o seu uso como sensor de CBO para a análise *in situ* de um poluente, a sua monitorização e controlo do processo em geral. A CBO corresponde à quantidade de oxigénio consumido na degradação da matéria orgânica em meio aquoso.

Um sensor de CBO, pode ser mantido operacional para mais de 5 anos, sem manutenção extra <sup>[50]</sup>.

### 2.5.4 Produção de hidrogénio

A produção de hidrogénio com CCMs “modificadas” pode ser conseguido fazendo uso dos mesmos substratos que se utilizam nas CCMs gerais, fazendo com que existam condições anaeróbias na zona do cátodo e com que célula seja operada com uma tensão adicional de cerca de 0,25 V. Sob estas condições, os prótons são reduzidos a hidrogénio <sup>[50]</sup>. Estes reatores são designados de *BioElectrochemically Assisted Microbial Reactor* (BEAMR). Poderá ainda, demorar algum tempo a chegar a resultados que sejam tão bons quanto os obtidos com a utilização de outras fontes de energias renováveis mas as CCMs são uma tecnologia bastante promissora.

## 3 Descrição Técnica

### 3.1 Materiais e Métodos

#### 3.1.1 Descrição da solução inoculada e do meio de crescimento do ânodo

A bactéria utilizada na experiência foi a *Lactobacillus Pentosus*, bactéria presente nos efluentes da indústria de produção de leite. Não é uma bactéria sobre a qual se tenha informação quando usada em células de combustível microbianas, mas tendo em conta a localização das empresas produtoras de leite, é uma bactéria que tem todo o interesse em ser estudada, em Portugal. Assim, o meio de crescimento pretendeu simular um efluente proveniente de uma empresa de leite. A sua composição sintética foi a que se apresenta na tabela seguinte (*Tabela 1*)<sup>[51]</sup>:

*Tabela 1*- Composição da água sintética mimetizando o efluente

Reagente	mg/L	Gramas	
		5L	10L
Glicose	85	0,425	0,85
Extrato de Levedura	5	0,025	0,05
Leite em Pó	1300	6,5	13
Amido	5	0,025	0,05
Cloreto de Amónio	50	0,25	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22	0,011	0,22
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11	0,055	0,11
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	78	0,39	0,78
CaCO <sub>3</sub>	35	0,175	0,35

Para o adequado crescimento das *L. pentosus*, estas foram previamente inoculadas em meio MRS (meio de crescimento) durante 2 a 3 dias sendo ao final destes transferidas para o meio da água sintética (ARS) acima descrito durante o mesmo número de dias.

### 3.1.2 Descrição da célula de combustível microbiana

Tal como já foi referido anteriormente, a célula de combustível utilizada pretendia reproduzir o escoamento num reator (em modo contínuo e *batch*), ligado a um circuito externo onde circulariam os eletrões libertados na reação de oxidação da matéria orgânica que ocorre no ânodo.

Logo, o reator de polimetil-metacrilato era composto por 2 compartimentos de igual volume (1 L). A membrana que separava o cátodo e o ânodo, seletiva a  $H^+$  (protões), foi a Nafion 112 da empresa *Clean Fuel Cell Energy (USA)* (Figura 7). No reator contínuo a área da membrana foi de  $25\text{ cm}^2$  e no reator batch de  $42,25\text{ cm}^2$ .



Figura 7 - Reator de polimetil-metacrilato com 2 compartimentos.

O cátodo operou com um elétrodo de tecido de carbono ( $10 \times 10\text{ cm}$ ), com  $1\text{ mg/cm}^2$  de platina impregnada, também adquirida à empresa *Clean Fuel Cell Energy (USA)* (Figura 7, direita). No ânodo foi colocado um escovilhão com filamentos de fibra de carbono ( $7,5\text{ cm}$ ) da empresa *The Mill-Rose Company (USA)*, e com cabo de aço de  $15\text{ cm}$  (Figura 8, esquerda).



*Figura 8* - Escovilhão com fibras de carbono (esquerda) e tecido de carbono impregnado com platina (direita).

O compartimento anódico foi utilizado sobre condições de anaerobiose e portanto a parte superior foi coberta com esferovite, sendo apenas deixados pequenos orifícios que serviam para o elétrodo, para o medidor de pH e temperatura (*Figura 10*). (No cátodo foi colocado um tubo para promover o borbulhamento do meio aquoso, de forma a facilitar a dissolução do oxigénio (*Figura 9*).



*Figura 9*- Compartimento catódico.



*Figura 10*- Compartimento anódico.

As *Figuras 9 e 10* acima apresentadas representam o reator em funcionamento contínuo. Como já foi referido anteriormente, realizaram-se também ensaios com um reator *batch*. Os elétrodos utilizados foram iguais aos já descritos e o reator apresentava a mesma configuração (mesmo material, tamanho, número de compartimentos) (*Figura 11*).

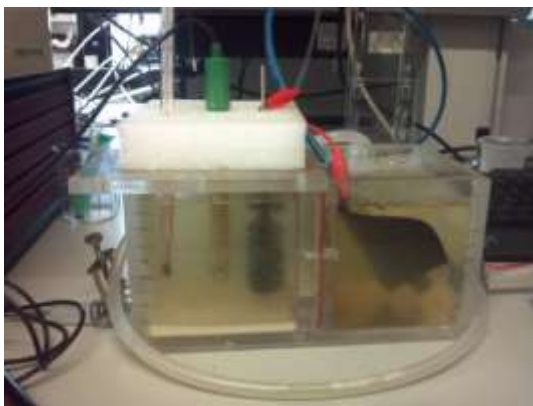


Figura 11 - Configuração do reator *batch*.

### 3.1.3 Modo de Operação

O reator em contínuo foi operado a dois caudais: 0,05 e 0,11 L/h. Após análise dos mesmos, foi escolhido o melhor caudal analisando-se quer a potência obtida quer a CQO e a esse adicionou-se agitação de forma a estudar a influência da agitação no desempenho da célula.

Cada experiência teve a duração de um mês, durante a qual era realizada, semanalmente, a curva de polarização (potencial em função da corrente específica). Juntamente com a curva de polarização, foram realizados plaqueamentos (*Apêndice A*) à mistura de saída, permitindo a contagem de unidades formadoras de colónias (UFCs) e foi também analisada a CQO (*Apêndice B*).

Para o cálculo da potência específica a equação utilizada foi a que se apresenta de seguida:

$$P = \frac{iU}{A} \quad (3)$$

onde  $i$  representa a intensidade de corrente (mA),  $U$  a tensão da célula (V) e  $A$  área da célula (área de membrana em  $m^2$ ).

Por sua vez o cálculo do valor da eficiência de remoção de CQO da CCM é calculado através da seguinte equação:

$$CQO_{removido} = \frac{CQO_{ARS} - CQO_{\text{ânodo}}}{CQO_{ARS}} \quad (4)$$

onde  $CQO_{ARS}$  representa o valor da CQO da água residual alimentada ao reator e  $CQO_{ânodo}$  é o valor da CQO do ânodo.

O reator batch foi operado em ciclos de 24, 48 e 72h, com a duração de 15 dias cada um deles. O procedimento foi similar ao já descrito, com polarização e medição da CQO ao final de cada ciclo (24, 48 e 72h) e nos quais foram realizados plaqueamentos à mistura do interior do compartimento do ânodo e da mistura inserida após o termino dos testes. Após o estudo da influência do ciclo de operação no desempenho da CCM e análise dos respectivos resultados estudou-se o efeito da quantidade de extrato de levedura, usando o ciclo que apresentou melhores resultados.

Como forma de complementar o estudo do crescimento bacterial no reator *batch* foram retiradas amostras que permitiram a quantificação de açúcares e de proteínas. Estes foram analisados pelo Método de Debois (Apêndice C- e com o Kit “Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson’s Modification”), respectivamente (Apêndice D).

Tal como já foi mencionado anteriormente em ambos os modos de operação foram realizadas curvas de polarização por forma a avaliar o desempenho das CCMs. Para isso, foi utilizada uma estação de testes eletroquímica (Zhaner- Electric GmbH & CO). Estas curvas foram realizadas no modo galvanostático, modo onde é imposto um valor para a corrente da célula e é medido o valor da tensão correspondente (Figuras 12 e 13).

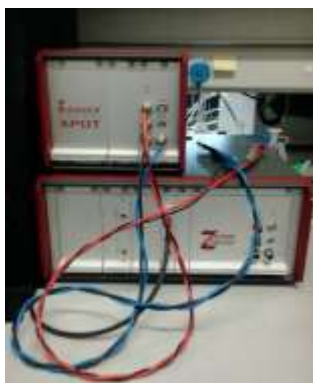


Figura 12 - Estação eletroquímica Zhaner.



Figura 13- Fotografia do programa de aquisição de dados.

Foi padronizado um protocolo a seguir em todos os testes de forma reproduzir as mesmas condições para todas as experiências: estabilização do sistema por 15 min no potencial do circuito aberto. Após este tempo eram aplicados incrementos de 0,01 A no valor da intensidade de corrente e ao fim de 3 min era registado o valor correspondente da tensão da célula.

Depois de cada experiência (em contínuo e *batch*), foi feita a extração do biofilme (*Apêndice E*) que ao longo desta se acumulou junto do eletrodo do ânodo, o escovilhão de fibras de carbono. O biofilme foi caracterizado através das quantificações de açúcar e proteínas, bem como da massa de biofilme (*Figuras 14 e 15*).



*Figura 14*- Fotografia do biofilme no escovilhão de fibras de carbono



*Figura 15*- Processo de extração do biofilme.

#### 3.1.4 Arranque das instalações (Contínuo e *Batch*)

Antes de iniciar o processo em contínuo colocou-se 1/3 do volume de meio, a ser utilizado no compartimento do ânodo (1 L), com bactéria e o restante volume foi preenchido com a água residual sintética produzida (ARS). O crescimento dos microrganismos ocorreu ao longo de toda a experiência. O compartimento do cátodo foi cheio com água destilada.

Para o reator *batch* o procedimento adotado foi o seguinte: Cada experiência foi realizada durante duas semanas de acordo com as condições apresentadas na *Tabela 2*. Consideraram-se ciclos de operação com tempos diferentes: 24, 48 e 72 horas.

No início de cada novo ciclo (Dia 1) procedeu-se de acordo com a informação apresentada na *Tabela 3* tendo-se analisado a CQO e feito o plaqueamento.

Tabela 2- Plano de ensaios para o reator *batch*.

Característica	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Tempo do Ciclo (h)	48	72	24
Agitação	0	0	0

Tabela 3- Plano de trabalho para o tempo de duração total de um ensaio do reator *batch*.

Dia 1	Até dia 15
30 % solução com meio (270 ml) 70 % de ARS Plaqueamento CQO	Procedimento Padrão*

Entre os dias 1 a 15 seguiu-se um procedimento padrão em dias que dependeram do tempo de cada ciclo:

- Fazer uma curva de polarização (potencial versus intensidade de corrente);
- Retirar com o auxílio de uma pipeta 2/3 do volume total da câmara do ânodo e preencher com ARS;
- Com a quantidade retirada fazer análise de CQO e plaqueamento para contagem de colônias.

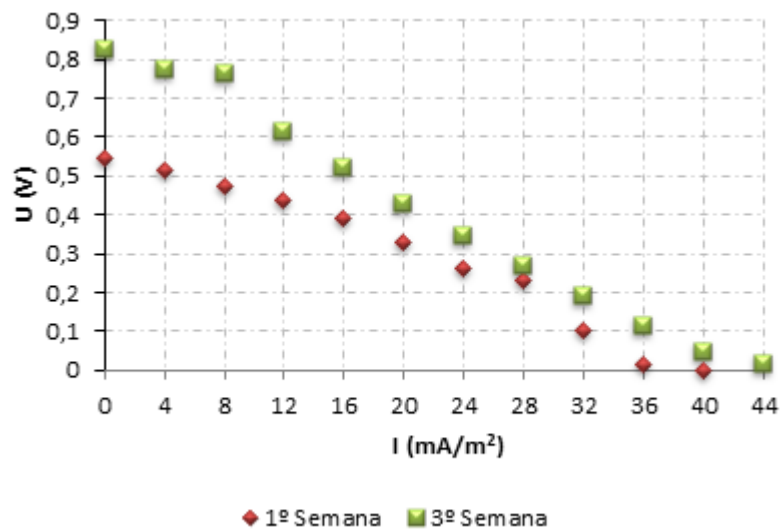
## 4 Discussão dos resultados

### 4.1 Reator contínuo

#### 4.1.1 Efeito do caudal de operação

Por forma a estudar o efeito do caudal de operação no desempenho da CCM, tanto a nível de produção de energia como remoção de matéria orgânica a célula foi operada a dois caudais diferentes: 0,05 L/h e 0,11 L/h.

Nas *Figuras 16 e 17*, encontram-se, respetivamente, representadas duas das curvas de polarização obtidas ( $U(V)$  em função de  $I$  ( $\text{mA}/\text{m}^2$ )) para um caudal de 0,05 L/h e 0,11 L/h, para a primeira e terceira semana de operação da célula.



*Figura 16*- Resultados de tensão vs corrente específica obtida para o caudal de 0,05 L/h

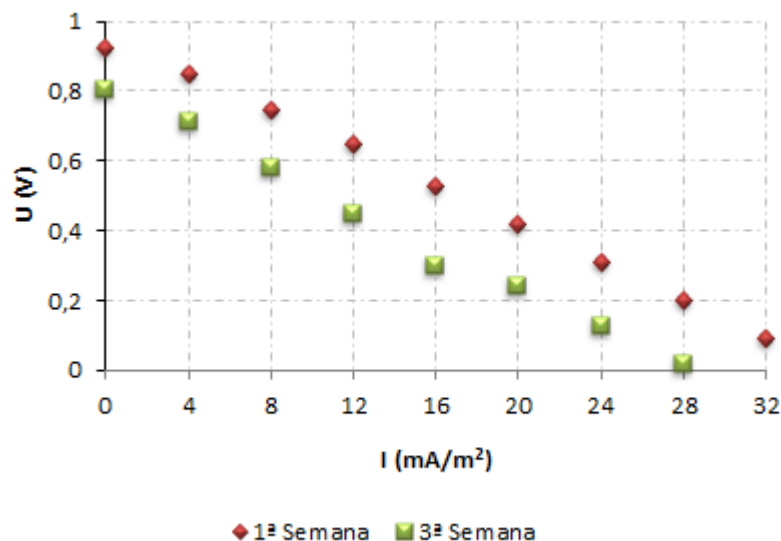
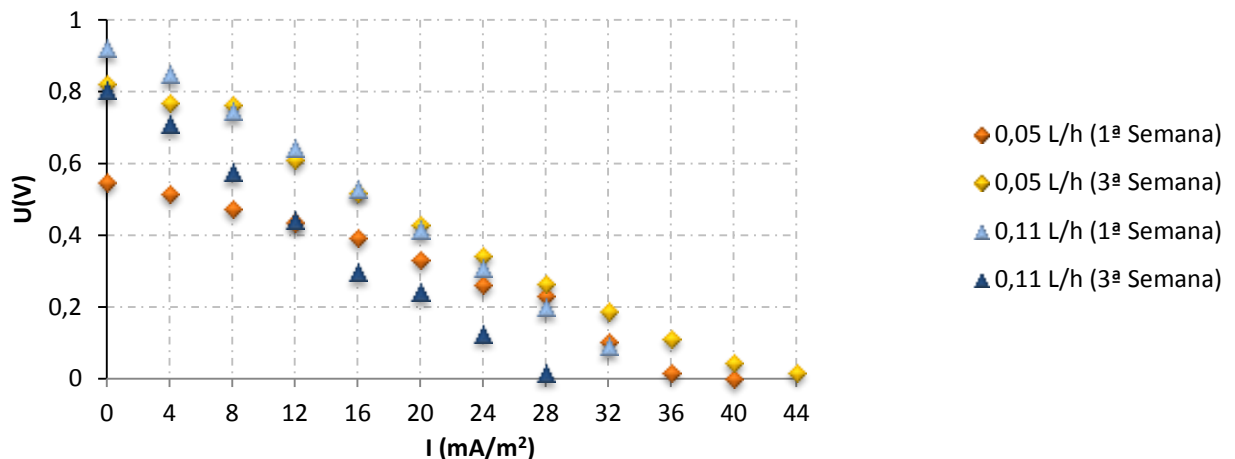


Figura 17 - Resultados de tensão vs corrente específica para um caudal de 0,11 L/h.

Da análise das Figuras 16 e 17 observa-se que a célula apresentou um melhor desempenho para a primeira semana. Tal como mencionado anteriormente uma curva de polarização indica as diferentes perdas que ocorrem numa célula de combustível e aponta possíveis medidas para as diminuir. Estas perdas variam de relevância de acordo com a corrente aplicada. Para baixas correntes específicas a perda predominante é de ativação, para correntes intermédias as perdas óhmicas e para elevadas correntes específicas as perdas predominantes são as de concentração. Analisando a Figura 16 (caudal 0,05L/h) verifica-se que as maiores diferenças de desempenho para as duas semanas em estudo são para correntes específicas baixas e intermédias. Sendo assim é possível dizer que a diferença de desempenho não será devido a uma falta de substrato ou resistência ao transporte de massa (mais evidente na zona das perdas por concentração), mas sim devido à resistência ao transporte de eletrões e oxidação do substrato à superfície do eléctrodo. Isto porque, à medida que a célula opera a quantidade de biofilme aderida à superfície do eléctrodo vai aumentando e vai criando uma resistência adicional ao transporte de substrato para a superfície do eléctrodo, diminuindo assim a taxa de oxidação do mesmo. Desta forma, as perdas por ativação, perdas relacionadas com a extensão das reacções químicas, vão aumentando e diminuindo o desempenho global da célula. Como o biofilme formado na terceira semana será mais espesso que o formado na primeira irá induzir uma resistência adicional ao substrato e ao transporte de eletrões para a superfície do eléctrodo, logo o desempenho da célula diminui [32]. Na

operação com o caudal maior (*Figura 17*), as diferenças entre o desempenho na primeira e na terceira semanas são menos pronunciadas.

Por forma a avaliar melhor o efeito do caudal no desempenho da célula na *Figura 18*, apresentam-se as curvas de polarização para os dois caudais estudados e para a primeira e terceira semana de operação da célula.



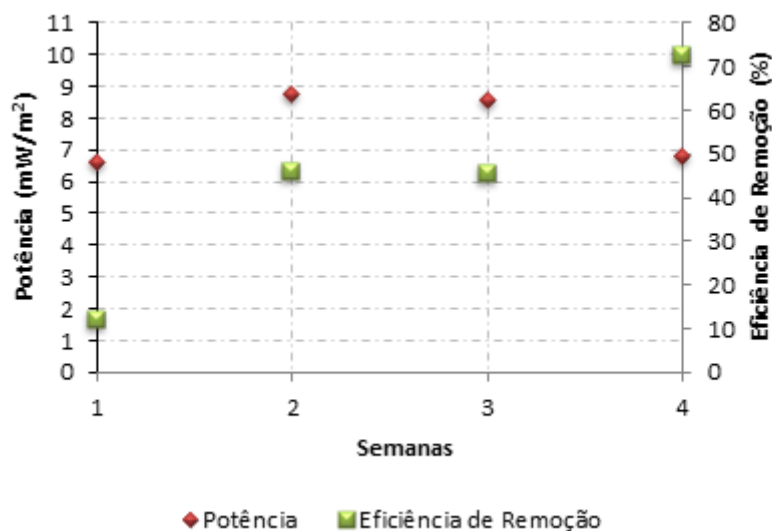
*Figura 18* - Efeito do caudal de operação no desempenho da CCM.

Comparando as perdas de potencial no mesmo intervalo de corrente específica para ambos os caudais conclui-se que são superiores para o maior caudal. Para o menor caudal são entre 5-10 % e para o caudal maior estão compreendidas entre 10-15%. Verifica-se também que a tensão em circuito aberto é superior para o caudal mais elevado.

Analisando a curvas de polarização para os dois caudais estudados verifica-se que para baixas correntes específicas um caudal maior leva a um aumento do desempenho da célula, enquanto que para correntes específicas superiores um aumento de caudal origina uma perda de desempenho da célula. Usualmente um aumento do caudal origina um aumento de desempenho da célula, devido a uma maior reposição de substrato que será oxidação pelos microrganismos presentes no compartimento do ânodo. No entanto, tal como se pode verificar na *Figura 18*, se o caudal for demasiado elevado o desempenho da célula tende a diminuir <sup>[32]</sup>. Um elevado caudal leva a uma maior remoção e diluição da comunidade microbiana presente no meio reacional, diminuindo assim a sua concentração e

consequentemente a sua capacidade para oxidar o substrato. Desta forma, a produção energética e o desempenho da célula diminui (*Figuras 19 e 20*). Um elevado caudal, também, afeta a formação, maturação e estabilização do biofilme na superfície do eletrodo, devido a uma diminuição da concentração de microorganismos presentes no meio. Desta forma, o biofilme formado na superfície do eletrodo tende a ser mais instável diminuindo a taxa de produção e transferência de elétrons para o eletrodo (*Tabelas 4 e 5*). Os resultados apresentados mostram que existe um valor de caudal óptimo e que o melhor desempenho da célula é conseguido após um correto desenvolvimento da comunidade microbiana favorecendo o consumo de nutrientes e a oxidação do substrato.

Nas *Figuras 19 e 20* são apresentados, respetivamente, os valores de potência específica e eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo de operação da célula (4 semanas), para os dois caudais estudados, 0,05 L/h e 0,11 L/h.



*Figura 19* - Resultados da potência específica e da eficiência de remoção de CQO (%) ao longo do tempo (caudal de 0,05 L/h).

Para o caudal menor a temperatura média de 23,2°C e um pH na ordem dos 6,7. O valor máximo de potência foi obtido na segunda semana e tem um valor de 8,76 mW/m<sup>2</sup> e a eficiência de remoção de CQO correspondente foi de 46% (*Equação 4, Figura 19*). Apesar de a potência máxima ter sido obtida na segunda semana, o valor máximo da eficiência de remoção de CQO foi obtido na quarta semana, 73%, para uma potência específica de 6,78 mW/m<sup>2</sup>.

O reator foi iniciado com  $5,00 \times 10^6$  UFC/mL, no final da primeira semana o número reduziu para  $4,95 \times 10^5$  UFC/mL mas na terceira semana o valor de colónias obtido foi de  $7,50 \times 10^6$  UFC/mL, valor que explica o resultado obtido para a eficiência de remoção de CQO.

Relativamente à CCM operada com um maior caudal, a temperatura média de operação foi de  $18,3^\circ\text{C}$  e o pH de 5,2. O valor máximo de potência foi obtido na primeira semana e tem um valor de  $8,46 \text{ mW/m}^2$  (Figura 20). O número de UFC neste dia de polarização foi de  $1,1 \times 10^6$  UFC/mL, notando-se um crescimento satisfatório de bactérias pois a contagem da mistura inicial foi de  $3,5 \times 10^5$  UFC/mL. Este valor manteve-se relativamente constante, começando a diminuir na quarta semana ( $2,67 \times 10^4$  UFC/mL). A eficiência máxima de remoção de CQO foi de 73% e ocorreu na segunda semana.

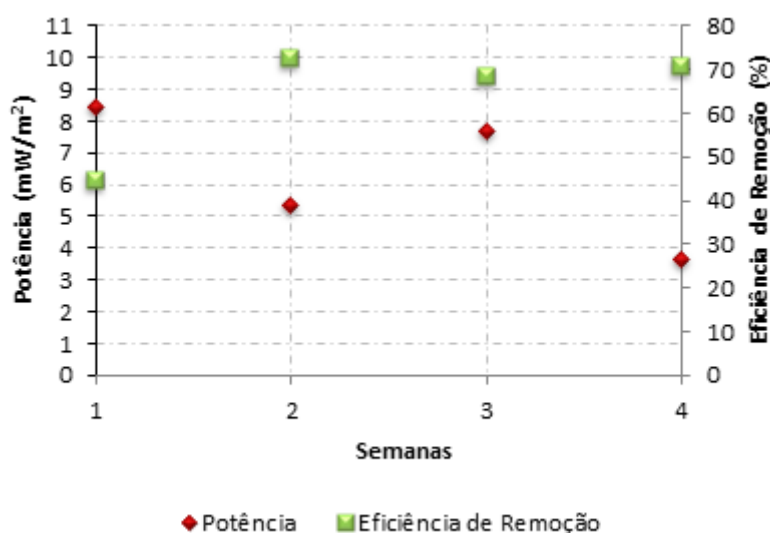


Figura 20 - Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo (caudal de 0,11 L/h).

Comparando os resultados da eficiência de remoção de CQO (Figuras 19 e 20) para os dois caudais estudados, verifica-se que um caudal mais elevado apresenta valores mais baixos para a eficiência de remoção de CQO. Isto porque, um aumento do caudal leva a uma redução do tempo de residência no interior do reator, logo o tempo disponível para os microorganismos oxidarem a matéria orgânica é menor. Sendo assim, para um caudal maior, o efluente de saída apresenta uma concentração mais elevada de matéria orgânica.

Tal como foi referido anteriormente, a condução dos eletrões e a degradação do substrato, foi feita pelas bactérias presentes no ânodo e agregadas no biofilme formado no eléctrodo do ânodo (escovilhão de carbono) (Figuras 8 e 14), sendo por isso importante a

quantificação do biofilme. Após cada uma das experiências, o biofilme foi caracterizado, segundo as técnicas descritas na secção anterior e apresentadas em pormenor nos Apêndices. Na *Tabela 4*, apresentam-se os valores obtidos para a quantificação de açúcares, proteínas e peso seco para o biofilme formado nas duas condições operatórias testadas.

*Tabela 4*- Valores obtidos para a quantificação de açúcar, proteína e peso seco.

Caudal (L/h)	Açúcar (mg/mg SV)	Proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg SV}$ )	Peso seco (mg/mL)
0,05	0,074	330,77	0,97
0,11	0,176	370,82	2,63

Pela análise da *Tabela 4* pode dizer-se que para o menor caudal a quantidade de açúcar presente no biofilme é menor o que implica que tenha havido uma maior e mais bem sucedida degradação de substrato e conseqüentemente uma maior transferência de eletrões. Relativamente às proteínas e ao peso seco do biofilme, os valores são superiores para um caudal maior indicando um biofilme mais espesso neste caso. Este facto foi comprovado aquando do término da experiência onde foi visível uma espessura de biofilme muito superior no escovilhão para a experiência com um maior caudal (*Figuras 8 e 21*). No entanto, nem sempre um biofilme mais espesso indica um melhor desempenho da célula (*Figura 18*), uma vez que para elevadas correntes específicas a maior perda que afeta o desempenho da célula é a perda por concentração, que está relacionada com as limitações ao transporte de massa [7]. Quanto mais espesso é o biofilme, maior é a resistência à transferência de massa das diferentes espécies no interior do biofilme, logo maiores são as perdas associadas e menor será o seu desempenho (*Figura 18*). Desta forma, é possível dizer que o biofilme formado no eléctrodo do ânodo apresenta um valor ótimo de espessura e que a partir deste valor, é criada uma resistência extra que faz com que a geração de energia da célula seja comprometida.



*Figura 21*- Biofilme formado na superfície do eléctrodo para um caudal de 0,11 L/h.

Por forma a validar o efeito do caudal no biofilme formado e uma vez que é praticamente impossível garantir a mesma quantidade de colónias no início de cada estudo experimental efetuado, achou-se importante criar uma variável,  $\alpha$ , que permita avaliar o valor de peso seco obtido (em cada experiência), com a quantidade de bactérias inicialmente colocadas no reator (*Tabela 5*). Tal como se pode verificar pelos resultados apresentados na *Tabela 5*, o valor do peso seco do biofilme formado para o menor caudal estudado é inferior sendo que a quantidade de colónias colocadas no início da experiência foi maior. Sendo assim, após cálculo do parâmetro  $\alpha$  verifica-se que o biofilme formado para o menor caudal precisou de um número menor de colónias. Desta forma, considerando a mesma massa de biofilme, o biofilme com o menor caudal têm um maior número de colónias. Isto, origina um biofilme mais ativo, com uma maior produção energética e degradação de substrato (*Figura 18*).

*Tabela 5*- Valores obtidos para o parâmetro  $\alpha$ .

Caudal (L/h)	Peso seco (mg/mL)	Colónias (UFC/mL)	$\alpha$ (UFC/mg)
0,05	0,97	$5,00 \times 10^6$	$5,15 \times 10^6$
0,11	2,63	$3,50 \times 10^5$	$1,33 \times 10^5$

Analisando os resultados apresentados, com base na produção energética, biofilme formado e percentagem de remoção de CQO é possível concluir que um caudal menor origina um maior desempenho global da CCM.

#### 4.1.2 Efeito da agitação no ânodo

Nas *Figuras 22 e 23*, são apresentados os resultados relativos ao efeito da agitação no desempenho da célula. Como o menor caudal conduziu a um melhor desempenho global da CCM foi escolhido esse caudal (0,05 L/h) para estudar o efeito de agitação no desempenho da célula. Neste ensaio, a temperatura média do reator foi de 19,5°C e o pH na ordem dos 5,6.

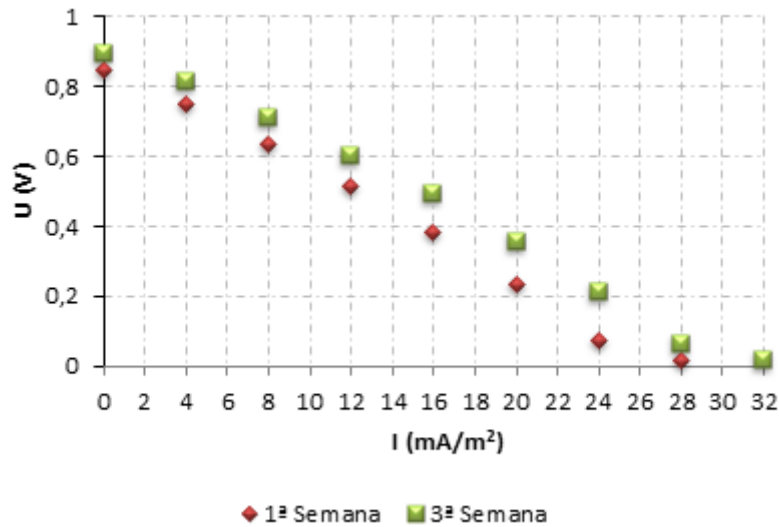
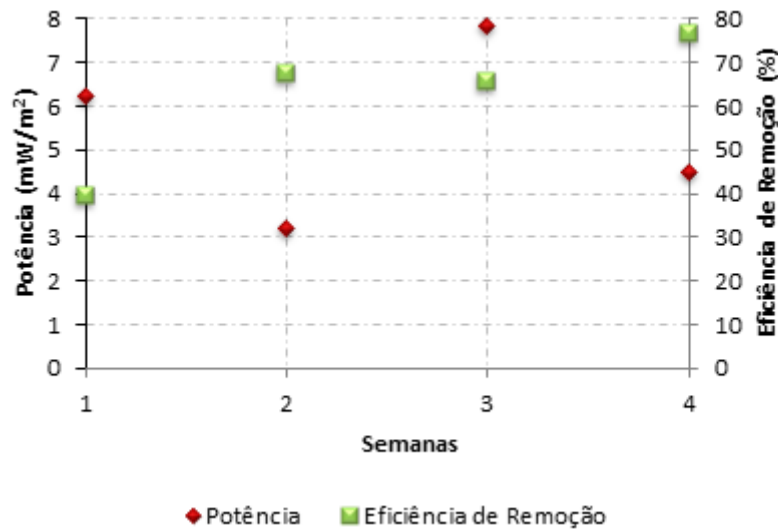


Figura 22 - Resultados de Tensão vs corrente específica com agitação.

Contrariamente ao que aconteceu quando a célula foi operada sem agitação, o desempenho da célula com agitação foi melhorando com o passar do tempo. Tal como se pode verificar na *Figura 22*, o desempenho obtido na terceira semana foi superior ao obtido na primeira semana. Neste caso, uma vez que o meio reacional estava sujeito a uma força externa induzida pela agitação, parece que demorou mais tempo a desenvolver e a adaptar-se e conseqüentemente a atingir um melhor desempenho.

Na análise dos resultados, observa-se, também, que a tensão em circuito aberto é relativamente alta, uma vez que a agitação favorece a taxa de transferência de elétrons e das diferentes espécies no meio reacional, diminuindo assim as respectivas perdas de ativação. No entanto, é igualmente alto o valor das perdas de potencial para o mesmo intervalo de corrente específica com o aumento da corrente específica, sendo os valores superiores para correntes específicas mais baixos (tal como se verificou anteriormente). Estes resultados revelam, uma vez mais, a instabilidade do meio reacional.



*Figura 23-* Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo e com agitação.

Verifica-se, também, que o valor máximo de potência foi obtido na terceira semana e tem um valor de  $7,84 \text{ mW/m}^2$  e o de remoção de CQO verifica-se na quarta semana e foi de 76,3%. O número de UFC neste dia de polarização foi de  $2,1 \times 10^6$  UFC/mL, notando-se um grande decréscimo da quantidade de bactérias pois a contagem da mistura inicial dentro do reator foi de  $9,1 \times 10^7$  UFC/mL. Assim pode dizer-se que a agitação provoca uma grande perda de bactérias que tem grande influência nos resultados obtidos comparando o reator com e sem agitação (*Figura 24*).

Por forma a estudar o efeito da agitação do ânodo no desempenho da célula na *Figura 24*, apresentam-se as curvas de polarização para as duas situações estudadas (com e sem agitação), para um caudal de 0,05 L/h e para a segunda e terceira semana de operação da célula.

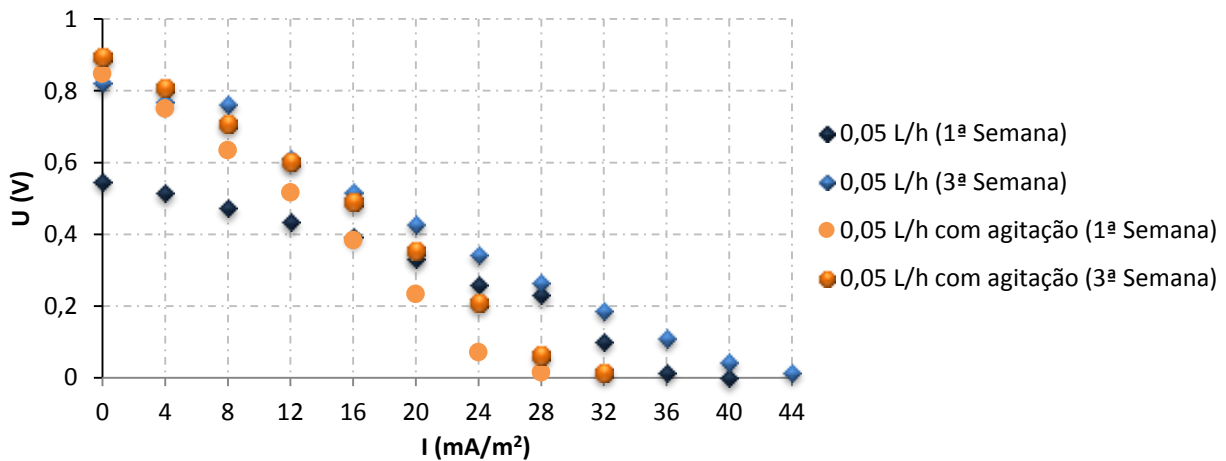


Figura 24- Efeito da agitação no desempenho da CCM.

Como se pode observar na *Figura 24*, para baixas correntes específicas são obtidos desempenhos mais baixos para a célula sem agitação, no entanto, para correntes específicas superiores os resultados invertem-se. Apesar de uma maior tensão em circuito aberto, perda de potencial para a mesma gama de valores de corrente específica é mais elevada no caso do reator com agitação (10-15%). Tal como já foi referido, para baixas correntes específicas a perda dominante é de ativação que está diretamente relacionada com as reações químicas, que neste caso são claramente beneficiadas pela agitação. Isto porque, a agitação leva a um aumento da taxa de transferência e oxidação do substrato e conseqüentemente leva a uma maior produção de eletrões. A agitação também leva à formação de biofilmes mais coesos e espessos, como resposta às forças externas de desagregação impostas pela agitação (*Figura 25 e Tabela 6*) <sup>[32]</sup>. No entanto, um biofilme mais espesso nem sempre é benéfico, isto porque cria uma resistência ao transporte de massa do substrato para o meio reacional e dos eletrões no elétrodo. Assim, as perdas devidas ao transporte de massa aumentam e a concentração de substrato no elétrodo diminui. Logo, a quantidade de substrato oxidado nestas condições é menor diminuindo a corrente específica limite e o desempenho da célula para correntes específicas superiores, tal como se pode ser na *Figura 24*.



Figura 25- Biofilme formado para o reator com agitação no ânodo.

Na *Tabela 6*, apresentam-se os valores obtidos para a quantificação de açúcares, proteínas e peso seco para o biofilme formado nas duas condições operatórias testadas.

*Tabela 6* - Valores obtidos para a quantificação de açúcar, proteína e peso seco.

Caudal	Açúcar (mg/mg SV)	Proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg SV}$ )	Peso seco (mg/mL)
Sem agitação	0,074	330,769	0,97
Com agitação	0,115	166,970	1,39

Pela análise das quantidades de açúcar verificou-se que a afirmação feita anteriormente de que a CCM com agitação tem menor desempenho é verificada pois o valor é bem superior ao do ensaio sem agitação.

O elevado valor obtido para o peso seco de biofilme, já era esperado tendo em conta a observação feita da quantidade de biofilme existente aquando do término da experiência (*Figura 25*). A obtenção deste valor vem ainda a comprovar a afirmação de que a formação de um biofilme muito espesso e denso afeta o desempenho da célula. Tal como já foi dito, e pelo facto de não se conseguir um controlo da quantidade inicial de bactérias no reator, é necessária a análise da quantidade de biofilme com a quantidade de bactérias introduzidas inicialmente. Essa análise é feita na *Tabela 7*.

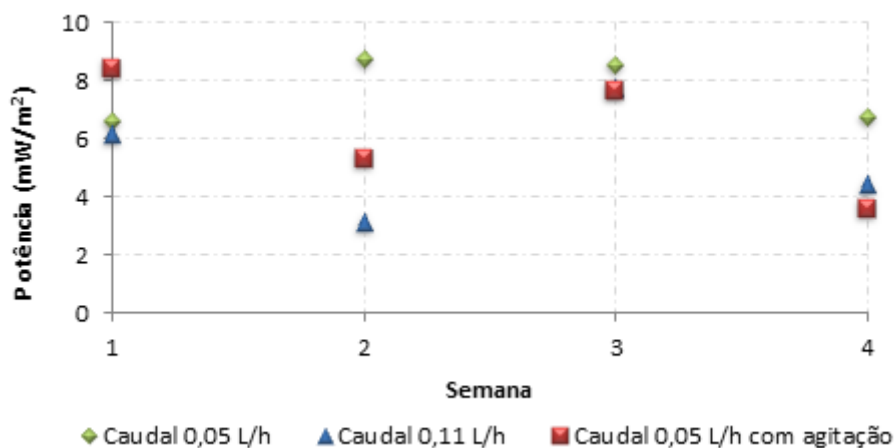
*Tabela 7*- Valor obtido para a constante  $\alpha$ .

Caudal	Peso seco (mg/mL)	Colónias (UFC/mL)	$\alpha$ (UFC/mg)
Sem agitação	0,97	$5,00 \times 10^6$	$5,15 \times 10^6$
Com agitação	1,39	$9,10 \times 10^7$	$6,55 \times 10^7$

De facto, tendo em conta a quantidade inicial de bactérias inseridas no reator, o reator com agitação foi favorecido uma vez que se observa que o seu alto valor para o peso seco, em comparação com o reator sem agitação não é só devido à quantidade de bactérias inicial. Mais uma vez se comprova uma camada densa de colónias no eléctrodo o que provoca limitações à transferência de massa.

### 4.1.3 Resumo dos resultados

Fazendo uma análise global à potência obtida nos três ensaios realizados (*Figura 26*) conclui-se que o ensaio mais estável é de facto aquele que se realiza a um caudal de 0,05 L/h sem agitação, visto que nos restantes dois ensaios, existe uma oscilação considerável entre os valores de potência específica obtidos. Isto indica uma instabilidade da CCM.



*Figura 26*- Resultados comparativos para valores de potência ao longo de 4 semanas nos três ensaios realizados no reator a operar em contínuo.

Comparando os resultados obtidos, com resultados presentes na literatura para outras bactérias isoladas <sup>[10]</sup>, pode-se afirmar que a bactéria usada é uma boa opção de estudo e com condições de funcionamento otimizadas e que poderá ser no futuro uma opção viável, uma vez que tal como se pode ver na *Tabela 8* algumas das potências obtidas no presente estudo são superiores às apresentadas para a bactéria *Rhodoferrax ferrireducens* e próximas das obtidas para a *Geobacter sulfurreducens*.

*Tabela 8* - Valores de potência obtidas para diferentes bactérias <sup>[4]</sup>.

Bactéria	Substrato	Potência (mW/m <sup>2</sup> )	Tipo de elétrodo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucose	88	Placa de grafite
<i>Escherichia coli</i>	Lactato	91	
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	Glucose	8	
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Acetato	13	

## 4.2 Reator *batch*

### 4.2.1 Efeito do ciclo de operação

Por forma a analisar o efeito do ciclo de operação no desempenho de uma CCM a operar em batch efetuaram-se estudos para três ciclos (24, 28 e 72h) e os resultados são apresentados em seguida.

As curvas de polarização referentes à operação do reator batch no ciclo de 24h, 48h e 72h para o 6º e o 12º dia encontram-se, respetivamente nas *Figuras 27, 28 e 29*. Para o ciclo de 24 h a temperatura média do reator foi de 19,5°C e o pH de 4,8 e a contagem inicial de colónias foi de  $9,67 \times 10^6$  UFC/mL. No ciclo de 48h, o reator funcionou a uma temperatura média de 21,6°C e um pH de 5,06 e a contagem inicial de colónias foi de  $1,10 \times 10^8$  UFC/mL. Por fim, para o ciclo de 72h, o reator foi operado a uma temperatura média de 19,5°C e um pH de 4,63. A contagem inicial de colónias foi de  $2,33 \times 10^7$  UFC/mL.

Analisando os resultados apresentados nas três figuras, verifica-se que à medida que o tempo de ciclo ia aumentando a célula tornou-se mais estável. Para o ciclo de 24h o desempenho foi sempre aumentando ao longo dos dias, pelo que se pode afirmar que o tempo do ciclo foi pequeno, não se sabendo a real tendência da CCM (se se manterá crescente, se terá um valor máximo, etc.) ou se ao final de 24h não houve um crescimento adequado das bactérias <sup>[31]</sup> (*Figura 27*). Para o ciclo de 48 horas o desempenho aumentou ao longo dos dias até a um ponto em que o desempenho começou a diminuir, sugerindo um desempenho ótimo (*Figura 28*). No ciclo de 72h o desempenho permaneceu sem grandes variações ao longo dos dias, sugerindo uma estabilidade da CCM (*Figura 29*), no entanto os valores da eficiência de remoção de CQO obtidos foram bastante inferiores aos obtidos para os restantes ciclos (*Figura 30*).

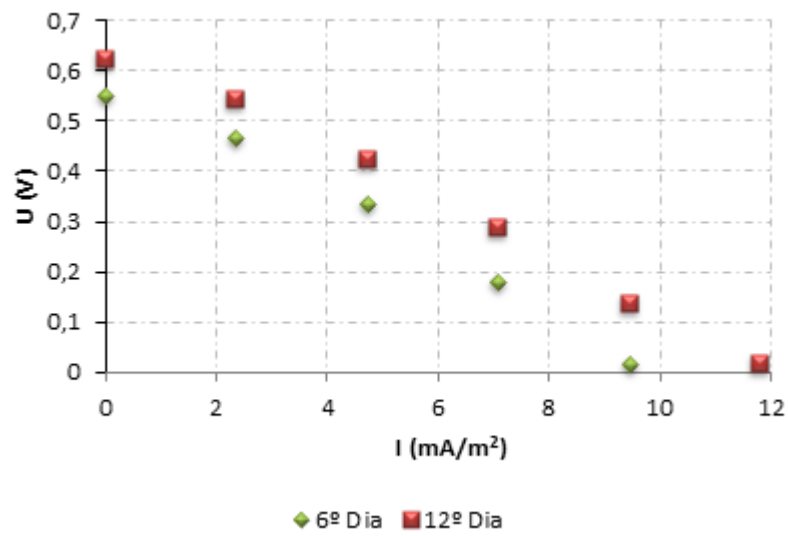


Figura 27- Resultados de tensão vs corrente específica para o reator batch no ciclo de 24h.

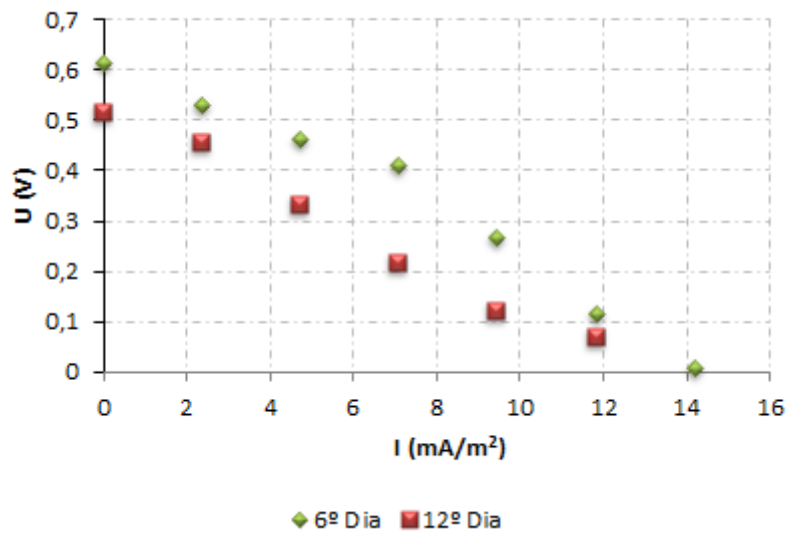


Figura 28- Resultados de tensão vs corrente específica para o reator batch no ciclo de 48h.

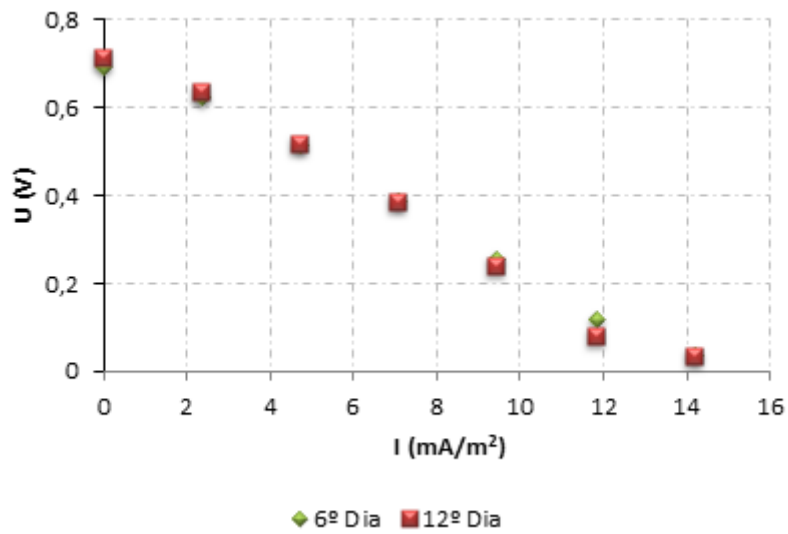


Figura 29 - Resultados de tensão vs corrente específica para o reator batch no ciclo de 72h.

Por forma a uma melhor comparação sobre o efeito dos ciclos de operação no desempenho da CCM, a Figura 30 compara as curvas de polarização para os 3 ensaios realizados em dois dias de operação diferentes (6º e 12º dia).

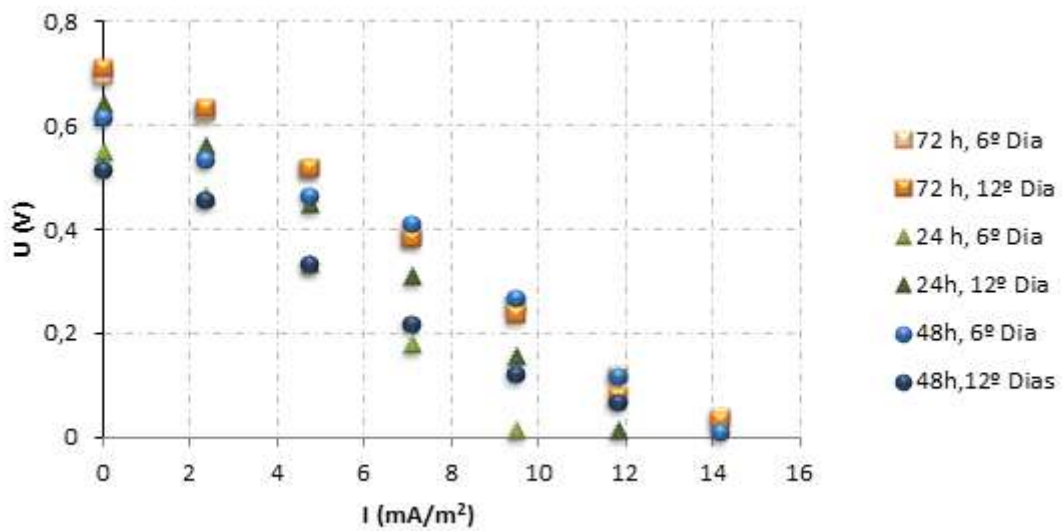
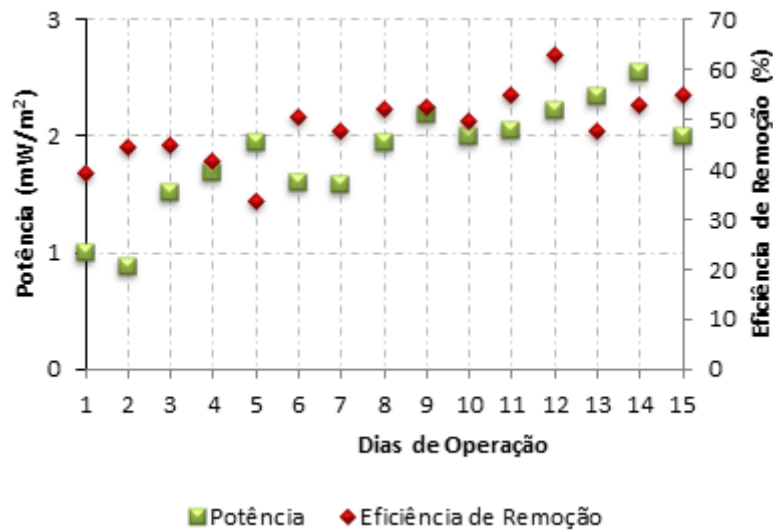


Figura 30 - Efeito do tempo do ciclo no desempenho de uma CCM.

Como se pode observar na *Figura 30*, o ciclo de 72h é o que apresenta valores mais elevados para a tensão em circuito aberto, sendo que a perda de potencial para o mesmo intervalo de corrente específica é elevada em todos os ciclos (10-15%). Um dos problemas de usar uma CCM em modo batch é o facto de os nutrientes presentes no meio reacional começarem a diminuir com o tempo. Desta forma, é necessário estudar e ajustar o tempo de ciclo a fim de conseguir evitar essa situação e por outro lado dar tempo suficiente à célula para que ela atinga a estabilidade microbiana necessária. Pela análise da *Figura 28*, pode-se verificar que um tempo de ciclo demasiado pequeno (24h) leva a uma perda do desempenho da célula, devido a um baixo tempo de residência no compartimento anódico, não permitindo uma adequada adaptação da comunidade microbiana ao meio reacional. Desta forma, as bactérias tornam-se menos ativas, degradam em média uma menor quantidade de substrato e produzem menos energia (*Figura 31*). Se por outro lado o ciclo é demasiado elevado (72h), apesar da célula ter um desempenho superior para baixas correntes específicas, o seu desempenho diminui à medida que a corrente específica vai aumentando. Para baixas correntes específicas, onde a perda dominante é a perda por ativação, um maior tempo de ciclo é favorável, uma vez que permite uma maior estabilização dos microrganismos ao meio reacional, logo existe uma maior degradação de substrato e uma maior taxa de reação. Para correntes específicas superiores a perda dominante é a referente ao transporte de massa e é devida sobretudo a uma diminuição da concentração de substrato no meio reacional, que ocorre sobretudo para operação de CCM em modo batch e com ciclos elevados. Isto origina uma diminuição da taxa de oxidação do substrato e a uma falta de nutrientes no meio (*Figura 31*). Desta forma, os microrganismos tendem a diminuir a sua atividade metabólica, produzindo uma menor quantidade de energia (*Figura 31*).

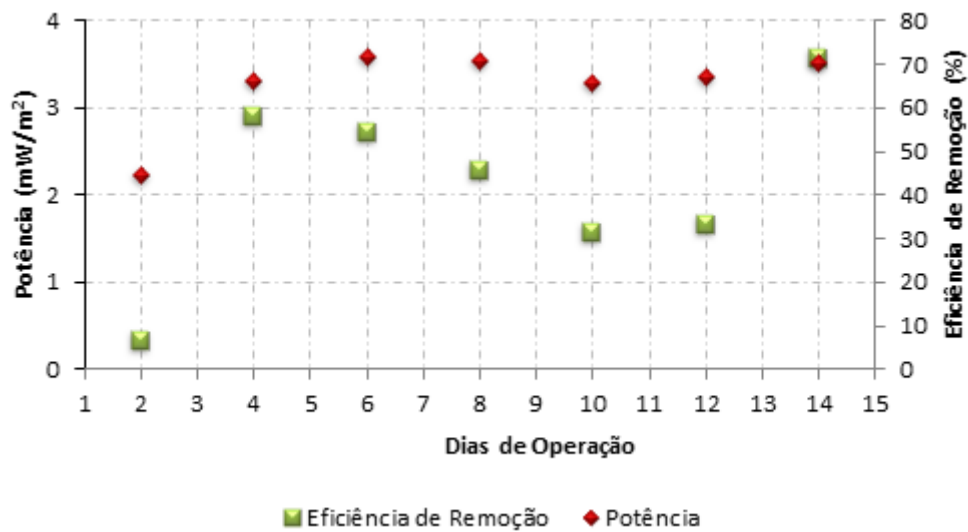


*Figura 31*- Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo para o reator batch no ciclo de 24h.

Pela análise da *Figura 31* referente ao ciclo de 24 h, o valor máximo de potência foi obtido no penúltimo dia de experiência e tem um valor de  $2,53 \text{ mW/m}^2$  e a eficiência máxima de remoção de CQO foi de 55%.

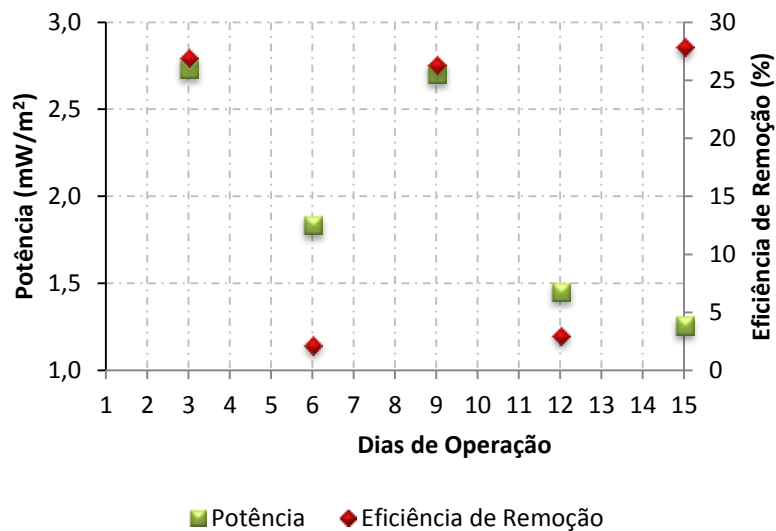
Tal como se pode observar o valor da eficiência de remoção de CQO foi aproximadamente constante ao longo do ensaio. Já a curva de potência tem ao longo do tempo uma tendência crescente.

Para o ciclo de 48 h, o valor máximo de potência foi obtido no último dia de experiência e tem um valor de  $3,56 \text{ mW/m}^2$  e a eficiência de remoção máxima de CQO foi de 72% (*Figura 32*).



*Figura 32-* Resultados de potência específica e eficiência de remoção de CQO obtidos para o reator batch no ciclo de 48h.

De acordo com a *Figura 33*, referente ao ciclo de 72h, o valor máximo de potência foi obtido no terceiro dia de experiência e tem um valor de 2,73 mW/m<sup>2</sup> e a eficiência de remoção máxima de CQO foi de 27%. A eficiência de remoção de CQO desta configuração mostrou-se insuficiente, pelo que não será de todo um tempo de ciclo que se deverá estudar melhor no futuro.



*Figura 33-* Resultados de potência específica e eficiência de remoção de CQO obtidos para o reator batch no ciclo de 72h.

Na *Tabela 9*, apresentam-se os valores obtidos para a degradação de açúcar, proteínas e peso seco do biofilme extraído do escovilhão de carbono em cada um dos ensaios.

*Tabela 9* - Valores obtidos para a quantificação de açúcar, proteína e peso seco do reator *batch* para os diferentes ciclos.

Reator Batch	Açúcar (mg/mg SV)	Proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg SV}$ )	Peso Seco (mg/mL)
Ciclo 24h	0,160	262,57	1,48
Ciclo 48h	0,346	186,92	1,04
Ciclo 72h	0,158	155,19	0,63

Na *Tabela 10* apresentam-se os valores obtidos para o parâmetro,  $\alpha$ , que relaciona a quantidade de bactérias por peso seco de biofilme.

*Tabela 10* - Valor obtido para o parâmetro  $\alpha$ .

Reator Batch	Peso seco (mg/mL)	Colónias (UFC/mL)	$\alpha$ (UFC/mg)
Ciclo 24h	1,48	$9,67 \times 10^6$	$6,53 \times 10^6$
Ciclo 48h	1,04	$1,10 \times 10^8$	$1,06 \times 10^8$
Ciclo 72h	0,63	$2,33 \times 10^7$	$3,70 \times 10^7$

As conclusões anteriormente referidas são sustentadas pela *Tabela 9 e 10*. Apesar de o peso seco do biofilme formado para o ciclo de 24h ser bastante superior aos restantes, o que leva a concluir que o biofilme formado neste caso é mais espesso, a quantidade de colónias colocadas no meio reacional, foi também bastante inferior.

Desta forma, analisando o parâmetro  $\alpha$  pode-se concluir que foi o ciclo de 48h que apresentou uma maior quantidade de colónias por massa de biofilme. Esta situação resulta num biofilme mais ativo e conseqüentemente com uma maior produção de energia e degradação do substrato (*Figura 32*).

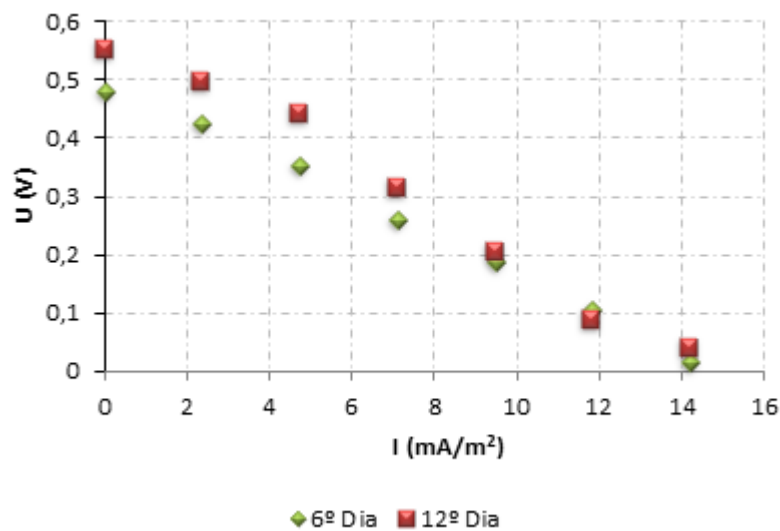
É necessário também, realçar que nem sempre um biofilme mais espesso é benéfico para o desempenho de uma CCM, uma vez que induz uma maior resistência quer ao transporte de massa do substrato quer ao transporte dos eletrões para o eletrodo.

Analisando os resultados apresentados, com base na produção energética, biofilme formado e percentagem de remoção de CQO é possível concluir que um ciclo de 48h origina um melhor desempenho global da CCM.

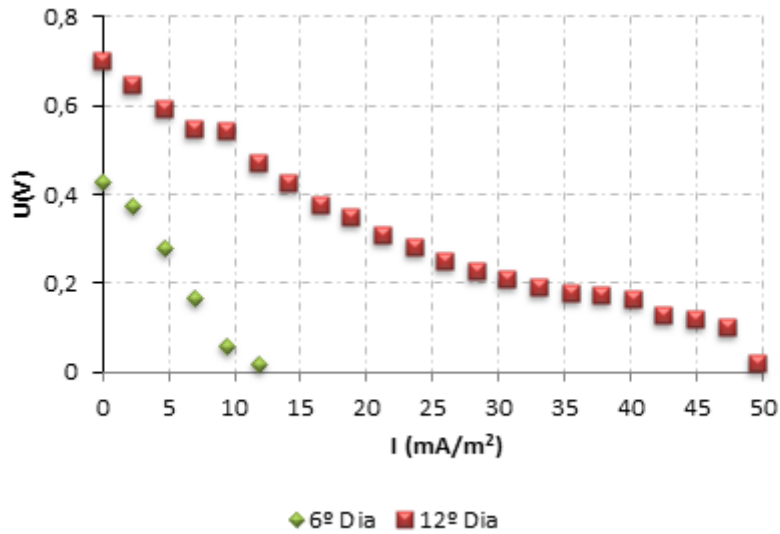
#### 4.2.2 Efeito da quantidade de extrato de levedura (mediador)

Uma vez que o extrato de levedura presente no meio sintético preparado funciona como um mediador natural (aumentando a taxa de transferência dos elétrons), efetuou-se o estudo do efeito da quantidade de extrato de levedura no desempenho da célula. Foram efetuados ensaios com 2 vezes mais a quantidade de levedura (0,045 mg/L) e 10 vezes mais (0,25 mg/L). O ciclo de ensaios escolhido foi o de 48h, aquele que foi considerado o ótimo em termos de desempenho global da CCM.

De seguida nas *Figuras 34 e 35* são apresentados, respetivamente, as curvas de polarização para o dobro e para 10 vezes a quantidade de levedura. No primeiro caso o reator foi operado a uma temperatura média de 19,5°C, um pH de 4,74 e a contagem inicial de colónias foi de  $2,35 \times 10^7$  UFC/mL. No segundo caso (10 vezes a quantidade de levedura) o reator foi operado a uma temperatura média de 19,5°C, um pH de 4,63 e a contagem inicial de colónias foi de  $2,98 \times 10^7$  UFC/mL.



*Figura 34-* Resultados de tensão vs corrente específica para o reator batch com o dobro de extrato de levedura



*Figura 35-* Resultados de tensão vs corrente específica para o reator batch com 10 vezes o valor de extrato de levedura.

Em ambas as situações verifica-se um aumento do desempenho da célula com o dia de operação, devido essencialmente a uma estabilização da comunidade microbiana ao meio reacional. Nestas condições os microorganismos tornam-se mais estáveis e ativos, degradando uma maior quantidade de matéria orgânica e produzindo uma maior quantidade de eletrões, aumentando assim o desempenho da CCM.

Na *Figura 36* são apresentadas as curvas que resultaram dos 3 ensaios: 48h quantidade normal de extrato de levedura, 48h com o dobro da quantidade e por último 48h para 10 vezes mais.

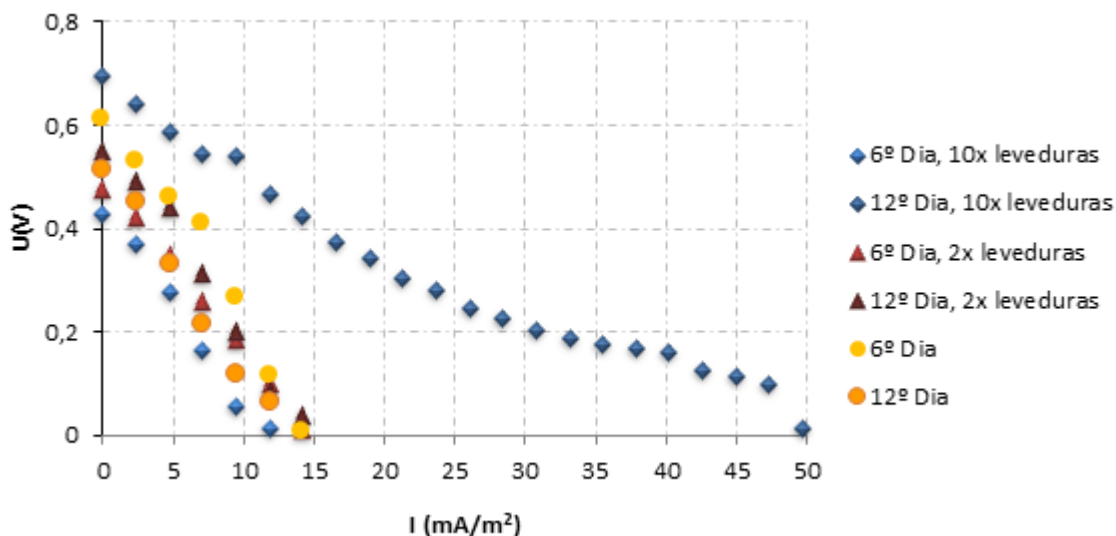


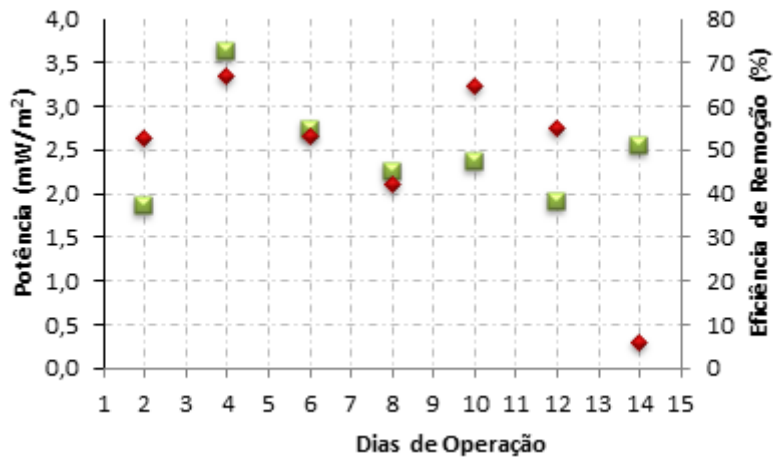
Figura 36- Resultados obtidos no reator *batch* para os três ensaios realizados.

Avaliando os resultados apresentados na Figura 36, pode observar-se que para a receita com 10 vezes mais a quantidade de extrato de levedura, o desempenho da célula para o 12º dia foi bastante superior aos restantes e que houve ainda uma subida acentuada relativamente aos resultados obtidos no sexto dia. Para os ensaios de 48h sem adição de levedura e com o dobro da quantidade de levedura, as perdas de potencial no mesmo intervalo de corrente específica são elevadas (10-15%). Já no ensaio com 10 vezes mais e sobretudo no décimo segundo dia, o valor destas é bastante inferior que nos restantes ensaios (<5%).

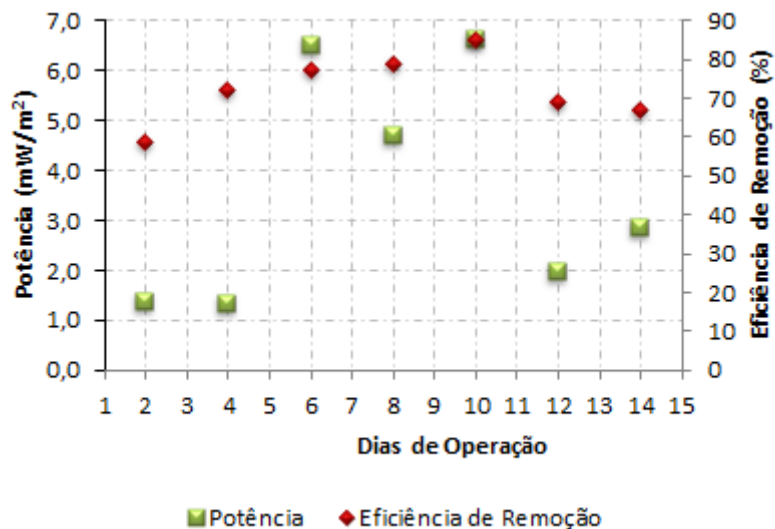
Os mediadores são compostos que são adicionados ao meio de reacional e tem como característica retirar os eletrões das células em crescimento e fornecer os mesmos ao eléctrodo. Os mediadores são compostos com um baixo potencial de redução e que são capazes de formar pares redox, são estáveis em ambas as formas, oxidada e reduzida e não devem ser tóxicos para a comunidade microbiana. Assim, eles extraem os eletrões formados na reação de oxidação do substrato pelas bactérias e transferem estes eletrões para o eléctrodo, que se encontra a um potencial inferior ao do mediador. Uma vez, que a área superficial do eléctrodo não é suficiente para abranger todas as bactérias em crescimento, os mediadores funcionam como transportadores de eletrões. Desta forma, é espectável que a eficiência de transferência de eletrões numa CCM seja beneficiada com o uso de mediadores e com o aumento da sua concentração. Isto está de acordo com os resultados obtidos experimentalmente (Figura 36), onde se observa um aumento do desempenho da célula com

um aumento da quantidade de mediador utilizada. Um aumento da concentração de mediador origina um aumento da taxa de transferência de elétrons para o eletrodo, um aumento da taxa de degradação do substrato e um aumento da produção energética (*Figura 38*).

Nas *Figuras 37 e 38* são apresentados, respetivamente, os valores de potência específica e eficiência de remoção para o dobro e para 10 vezes a quantidade de levedura.



*Figura 37*- Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo para o reator batch com o dobro de extrato de levedura.



*Figura 38*- Resultados de potência específica e da eficiência de remoção de CQO ao longo do tempo para o reator batch com 10 vezes o valor de extrato de levedura.

Para, o dobro da quantidade de levedura, o valor máximo de potência foi obtido no quarto dia de experiência e tem um valor de 3,61 mW/m<sup>2</sup> e a eficiência de remoção de CQO máxima foi de 67% (*Figura 37*). Para 10 vezes a quantidade de levedura, o valor máximo de potência foi obtido no décimo dia de experiência e tem um valor de 6,63 mW/m<sup>2</sup> e a eficiência de remoção máxima CQO foi de 85% (*Figura 38*).

Estes resultados bem como os apresentados na *Figura 36* realçam a elevada potência obtida para 10 vezes mais o valor da levedura comparativamente com os restantes dois ensaios. Verifica-se também a não alteração significativa entre os ensaios sem adição de levedura e com o dobro da mesma.

Nas *Tabelas 11 e 12* apresentam-se os dados relativos à quantificação do biofilme formado no elétrodo do ânodo em cada um dos ensaios.

*Tabela 11* - Valores obtidos para a quantificação de açúcar, proteína e peso seco do reator *batch* para as diferentes quantidades de extrato de levedura.

Reator Batch 48h	Açúcar (mg/mg SV)	Proteína (µg/mg SV)	Peso Seco (mg/mL)
Sem adição de levedura	0,346	186,92	1,04
2 x levedura	0,079	125,19	1,22
10 x levedura	0,119	178,05	3,33

Na *Tabela 12* apresentam-se os valores obtidos para a constante,  $\alpha$ , que relaciona a quantidade de bactérias com o peso seco de biofilme.

*Tabela 12* - Valor obtido para a constante  $\alpha$ .

Reator Batch 48h	Peso seco (mg/mL)	Colónias (UFC/mL)	$\alpha$ (UFC/mg)
Sem adição de levedura	1,04	1,10x10 <sup>8</sup>	1,06x10 <sup>8</sup>
2 x levedura	1,22	2,35x10 <sup>7</sup>	1,93x10 <sup>7</sup>
10 x levedura	3,33	2,98x10 <sup>7</sup>	8,95x10 <sup>6</sup>

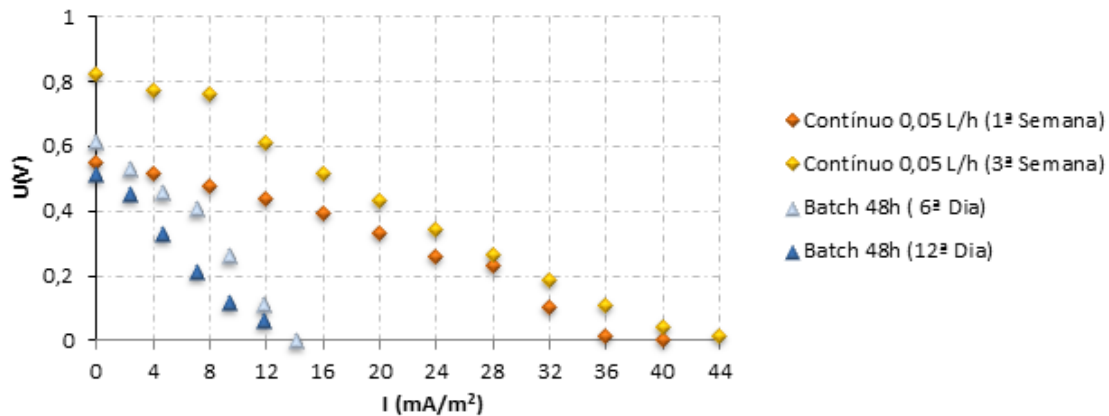
Tal como se pode verificar o biofilme formado para uma concentração de mediador dez vezes superior apresenta um maior peso seco, indicando uma maior espessura. No entanto, analisando o parâmetro,  $\alpha$ , verifica-se que o biofilme formado nestas condições tem uma menor quantidade de colónias por massa de biofilme, o que revela um biofilme menos

denso. Isto é favorável em termos de desempenho da célula porque diminui a resistência ao transporte de massa no interior do biofilme (*Figura 36*).

### 4.3 Reator contínuo vs Reator batch

Para analisar o efeito do modo operação no desempenho da CCM, a célula foi operada em dois modos diferentes: contínuo e batch.

Na *Figura 39*, apresenta-se as curvas de polarização para o dois modos de operação e na *Tabela 13* os valores referentes à quantificação do biofilme formado em ambos os casos. No modo de operação em contínuo escolheu-se os resultados referentes a um caudal de 0,05 L/h e sem agitação para a 1ª e 3ª semana e para o reator batch escolheram-se dois dias (6º e 12º) referentes ao ciclo de 48 h.



*Figura 39*- Efeito do modo de operação no desempenho de uma CCM.

Tal como se pode verificar pela análise da *Figura 39* um melhor desempenho foi obtido quando a célula foi operada em modo contínuo, modo de operação mais favorável para as aplicações em grande escala. Isto porque, o sistema em contínuo tem como vantagem o facto de permitir uma otimização da composição do meio por forma a maximizar a produtividade e controlar a produção metabólica, uma vez que está a ser continuamente alimentada ao reator um meio fresco, rico em substrato, e os produtos da reação estão continuamente a ser retirados. No caso da operação em batch os nutrientes presentes no meio vão sendo continuamente consumidos pelas bactérias o que provoca uma diminuição da sua concentração no meio reacional. A diminuição do substrato no meio leva a uma diminuição da

produção de eletricidade e conseqüentemente uma diminuição do desempenho global da célula. Relativamente à remoção de CQO, modo de operação em batch permitiu obter, em média, eficiências de remoção superiores devido, essencialmente, à diminuição da concentração de matéria orgânica no meio (*Figura 19 e 32*). Essa diminuição é vantajosa em termos de tratamento do efluente, mas prejudicial em termos de produção energética.

Tal como já mencionado, na *Tabela 13* apresentam-se os dados relativos à quantificação do biofilme formado para as duas situações em estudo. Tal como se pode verificar a CCM operada em batch apresentou um maior peso seco e uma maior quantidade de colónias por massa de biofilme, logo um biofilme mais espesso no elétrodo do ânodo. No entanto, em termos de produção energética, um biofilme mais espesso pode levar a uma maior resistência ao transporte de eletrões e de substrato para o elétrodo, diminuindo a quantidade de energia produzida. Estes resultados estão de acordo com os apresentados na *Figura 39*, onde se verifica um menor desempenho para a CCM operada em modo batch.

*Tabela 13* - Valores obtidos para a quantificação do biofilme para os diferentes modos de operação.

Modo operação	Açúcar (mg/mg SV)	Proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg SV}$ )	Peso Seco (mg/mL)	$\alpha$ (UFC/mg)
Batch	0,346	186,92	1,04	$1,06 \times 10^8$
Contínuo	0,074	330,77	0,97	$5,15 \times 10^6$

## 5 Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

O principal objetivo desta tese foi a compreensão do efeito de algumas condições de operação no desempenho global (produção energética, biofilme e remoção de CQO) de uma célula de combustível microbiana com dois compartimentos e usando um efluente sintético que recriasse um efluente da indústria do leite.

A principal motivação desta tese foi a possibilidade de construir rapidamente uma célula de combustível deste tipo, tendo em vista uma dada aplicação, usando componentes (membrana e eletrodos) facilmente disponíveis no mercado. Este trabalho permitiu também a avaliação da melhor combinação modo de operação/condições de operação para que a célula apresente um desempenho otimizado.

Para alcançar os objetivos propostos foram efetuados os seguintes passos:

- Desenho e construção da célula de combustível microbiana;
- Melhoramento da instalação experimental já existente, nomeadamente com a aquisição da estação de testes eletroquímica, Zhaner, e instalação de uma sonda de pH e sensor de temperatura no compartimento do ânodo;
- Desenvolvimento de um procedimento experimental que permitisse a quantificação do biofilme formado no eletrodo do ânodo;

As conclusões obtidas e as recomendações para trabalhos futuros são discutidas nas secções seguintes.

### 5.1 Conclusões

Apesar do esforço efetuado nos últimos anos, no sentido melhorar o desempenho de uma CCM, a potência obtida é ainda inferior à desejável. Para uma CCM é possível melhorar o seu desempenho através da otimização das condições de operação, tais como caudal de alimentação, agitação e concentração de mediador e através da escolha do melhor modo de operação, contínuo ou batch. A fim de superar alguma falta conhecimento sobre estes tópicos, neste trabalho foi estudada a influência do modo de operação, caudal, agitação, tempo de ciclo e concentração de mediador, no desempenho da célula de combustível

microbiana. Os resultados experimentais foram explicados recorrendo aos dados referentes à quantificação do biofilme formado no eléctrodo do ânodo, à percentagem de remoção de CQO e à potência obtida em cada um dos estudos.

Para o caudal de 0,05 L/h foi obtida uma potência específica máxima de 8,76 mW/m<sup>2</sup> e uma eficiência de remoção de CQO de 46%. Já para o reator a operar com caudal de 0,11 L/h, foi obtido um valor máximo de 8,46 mW/m<sup>2</sup> para uma eficiência de remoção de CQO de 44%.

Usualmente um aumento do caudal origina um aumento de desempenho da célula, devido a uma maior reposição de substrato que será oxidação pelos microrganismos presentes no compartimento do ânodo. No entanto, tal como se pode verificar e a produção energética e o desempenho da célula diminui. Para o menor caudal foi ainda verificado que, a quantidade de açúcar presente no biofilme é menor o que implica que tenha havido uma maior e mais bem sucedida degradação de substrato e consequentemente uma maior transferência de eletrões. Relativamente às proteínas e ao peso seco do biofilme, os valores são superiores para um caudal maior indicando um biofilme mais espesso neste caso.

Com a adição de agitação ao meio reacional do ânodo obteve-se uma potência específica de máxima de 7,84 mW/m<sup>2</sup> e de remoção de CQO de 42,3%. Esta experiência conduziu também à formação de um biofilme mais coeso e espesso, como resposta às forças externas de desagregação impostas pela agitação e que representou uma resistência extram, levando a um pior desempenho da CCM.

Quanto ao desempenho do reator *batch* nos ciclos considerados, podemos afirmar que no ciclo de 24h foi obtida uma potência específica máxima de 2,53 mW/m<sup>2</sup> e uma eficiência de remoção de CQO de 75% . Para o ciclo de 48h o valor máximo de potência específica foi de 3,56 mW/m<sup>2</sup> .A eficiência de remoção máxima de CQO foi de 70%. Por último o ciclo de 72h, a potência máxima teve um valor de 2,73 mW/m<sup>2</sup> e a eficiência de remoção de CQO máxima foi de 27% . Pode-se verificar que um tempo de ciclo demasiado pequeno (24h) leva a uma perda do desempenho da célula, devido a um baixo tempo de residência no compartimento anódico, não permitindo uma correta adaptação da comunidade microbiana ao meio reacional. Desta forma, as bactérias tornam-se menos ativas, degradam em média uma menor quantidade de substrato e produzem menos energia. Se por outro, lado o ciclo é demasiado elevado (72h), apesar da célula ter um desempenho superior para baixas correntes específicas, o seu desempenho diminui à medida que a corrente específica vai aumentando.

Já avaliando a degradação de açúcar, para o ciclo de 24h, os resultados são muito bons, dada a quantidade inicial de bactérias no meio. O ciclo de 72h também mostra uma boa degradação de açúcar para uma quantidade muito menor de massa de biofilme, mas como foi visto os restantes parâmetros (eficiência remoção de CQO) e potência, ficaram longe das expectativas. Com base na produção energética, biofilme formado e percentagem de remoção de CQO é possível concluir que um ciclo de 48h origina um melhor desempenho global da CCM.

Da análise da quantidade de extrato de levedura com a adição de 2 vezes mais a quantidade de levedura os resultados obtidos são muito similares aos do ensaio de 48h, sendo o valor da potência específica máxima de  $3,61 \text{ mW/m}^2$  e a eficiência de remoção de CQO máxima foi de 67%. Com a adição de mediadores a uma concentração considerável, era esperável que a eficiência de transferência de elétrons numa CCM fosse beneficiada, o que se verificou. Para a adição de 10 vezes a quantidade de extrato de levedura, verifica-se que o biofilme formado tem uma menor quantidade de colônias por massa de biofilme, o que revela um biofilme menos denso (diminuindo a resistência ao transporte de massa) e explicando também os bons resultados do desempenho da CCM.

Assim conclui-se que o desempenho do reator a operar em contínuo é superior ao desempenho do reator em modo *batch*. No caso do reator a operar em modo contínuo a utilização de uma caudal menor é favorável ao desempenho da célula. Quanto ao efeito da agitação, o stress causado foi favorável ao crescimento do biofilme e desempenho da célula. O ciclo com melhores resultados, na operação em modo batch, foi o de 48h verificando-se também que o ciclo com menor duração é o mais instável. A adição de 10 vezes do extrato de levedura revelou melhorias significativas no desempenho da célula.

Este estudo demonstra claramente a influência e importância do stress e alimentação hidrodinâmico na produção de energia MFC e tratamento de águas residuais e enfatiza a importância do desenvolvimento de biofilme e controle sobre o desempenho da CCM. O presente trabalho pode ser considerado um ponto de partida para a otimização da CCM para ser usado em aplicações reais.

## 5.2 Sugestões para trabalho Futuro

Tendo em conta as conclusões anteriormente referidas, sugerem-se as seguintes abordagens para trabalho futuro:

- Estudo do efeito da agitação no compartimento anódico para diferentes incrementos de velocidade rotacional;
- Estudo do efeito de um mediador químico de forma a ser possível uma comparação com os estudos já efetuados;
- Estudo da curva de crescimento da *L.Pentosus* com vista à obtenção dos ótimos de maturação das bactérias vs desempenho da CCM;
- Estudo pormenorizado ao longo dos ensaios do crescimento e desenvolvimento do biofilme;
- Aumento/diminuição da área da membrana de troca iónica;
- Trabalhar com diferentes distâncias entre elétrodos.

## 6 Referências

- [1] [http://www.wikienergia.pt/~edp/index.php?title=Gases\\_com\\_efeito\\_de\\_estufa](http://www.wikienergia.pt/~edp/index.php?title=Gases_com_efeito_de_estufa), acessado a 5 Janeiro 2014;
- [2] <http://www.unep.org/publications/ebooks/emissionsgapreport2013/>, acessado a 5 Janeiro 2014;
- [3] Saxena, R. C., Adhikari, D. K., & Goyal, H. B. (2009). Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(1), 167-178. doi:10.1016/j.rser.2007.07.011
- [4] Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in biotechnology*, 23(6), 291-8. doi:10.1016/j.tibtech.2005.04.008
- [5] Gil, G. C.; Chang, I. S.; Kim, B. H.; Kim, M.; Jang, J. K.; *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 327.
- [6] Cohen, B.; *J. Bacteriol.* 1931, 121, 18.
- [7] Logan B. E.. "Microbial Fuel Cells" - 1st edition. John Wiley & Sons, Inc. (2008).
- [8] Rohrback, G. H.; Scott, W. R.; Canfield, J. H.; *Proceedings of the 16th Annual Power Sources Conference, Fort Monmouth, USA, (1962).*
- [9] Williams, K. R.; *An Introduction to Fuel Cells, Elsevier: Amsterdam, (1966).*
- [10] Lovley, D. R.; *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (2006) 497
- [11] Zhao, F., Slade, R. C. T., & Varcoe, J. R. Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective. *Chemical Society reviews*, (2009), 38(7), 1926-39. doi:10.1039/b819866g
- [12] Bond, D.R.; Holmes, D.E.; Tender, L.M.; Lovley, D.R. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295 (2002) 483-485.
- [13] Rabaey, K.; Boon, N.; Siciliano, S.D.; Verhaege, M.; Verstraete, W. Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* (2004), 5373-5382.
- [14] Phung, N.; Lee, J.; Kang, K.; Chang, I.; Gadd, G.; Kim, B. Analysis of microbial diversity in oligotrophic microbial fuel cells using 16S rDNA sequences. *FEMS Microb. Lett.* (2004), 77-82.
- [15] Aelterman, P.; Rabaey, K.; Pham, H.T.; Boon, N.; Verstraete, W. Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* (2006), 3388-3394.

- 
- [16] Kim, B.H.; Park, H.S.; Kim, H.J.; Kim, G.T.; Chang, I.S.; Lee, J.; Phung, N.T. Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *App. Microbiol. and Biotechnol.* (2004), 672-681.
- [17] Time. The 50 Best Inventions of 2009. Available online: [http://www.time.com/time/specials/packages/article/0,28804,1934027\\_1934003\\_1933965,00.html](http://www.time.com/time/specials/packages/article/0,28804,1934027_1934003_1933965,00.html), acedido a 10 Fevereiro de 2014.
- [18] Tender, L.M.; Reimers, C.E.; Stecher, H.A.; Holmes, D.E.; Bond, D.R.; Lowy, D.A.; Pilobello, K.; Fertig, S.J.; Lovley, D.R. Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nat. Biotechnol.* (2002), 821-825.
- [19] Bond, D.R.; Lovley, D.R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 1548-1555.
- [20] 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 Ecol.* 48 (2004)178-190.
- [21] Rezaei, F.; Richard, T.L.; Logan, B.E. Enzymatic hydrolysis of cellulose coupled with electricity generation in a microbial fuel cell. *Biotechnol. Bioeng.* 101 (2008) 1163-1169.
- [22] Coppi, M.V.; Leang, C.; Sandler, S.J.; Lovley, D.R. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 3180-3187.
- [23] [https://www.escmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID\\_Library/4OLL/2005/Lecture\\_10.pdf](https://www.escmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/4ESCMID_Library/4OLL/2005/Lecture_10.pdf), acedido a 5 Janeiro 2014;
- [24] Shukla, A., Suresh, P., Berchmans, S. and Rajendran, A. Biological fuel cells and their applications. *Current Science* 87 (2004) 455-468.
- [25] S.J. You, Q.L. Zhao, J.Q. Jiang, J.N. Zhang, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 20 (2006) 407-412.
- [26] L. Zhongjian, Z. Xingwang, L. Lecheng, *Process Biochemistry* 43 (2008) 1352-1358.
- [27] L. Yong, Z. Renduo, L. Guangli, L. Jie, Q. Bangyu, L. Mingchen, C. Shanshan, *Bioresource Technology* 102 (2011) 3827-3832.
- [28] Derek R, L.. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology* (2008), 564-571.
- [29] Franks, A.E., and Nevin, K.P.. *Microbial Fuel Cells, A Current Review Energies* 3 (2010) 899-919.
- [30] Cheng, S., Liu, H., and Logan, B.E. Power Densities Using Different Cathode Catalysts (Pt and CoTMPP) and Polymer Binders (Nafion and PTFE) in Single Chamber Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology* 40 (2005), 364-369.
-

- 
- [31] Dossmann, M. U., Vogel, R. F., & Hammes, W. P. Mathematical description of the growth of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus pentosus* under conditions prevailing in fermented sausages. *Applied microbiology and biotechnology*, 46(4) (1996) 334-9.
- [32] Oliveira, V. B., Simões, M., Melo, L. F., & Pinto, a. M. F. R. Overview on the developments of microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal* 73 (2013) 53-64. doi:10.1016/j.bej.2013.01.012.
- [33] Schwartz, K. *Microbial fuel cells: Design elements and application of a novel renewable energy sources*. Basic biotech (2007).
- [34] I.A. Ieropoulos, J. Greenman, C. Melhuish, J. Hart, *Enzyme and Microbial Technology* 37 (2005) 238-245.
- [35] Z. Du, H. Li, T. Gu, *Biotechnology Advances* 25 (2007) 464-82.
- [36] D.R. Lovley, K.P. Nevin, Electricity production with electricigens, in *Bioenergy*, Chap. 23, 295-306, ASM Press, Washington, DC, 2008.
- [37] S. Jung, J.M. Regan, *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (2007) 393-402.
- [38] B.E. Rittmann, *Biotechnology and Bioengineering* 100 (2008) 203-212.
- [39] D.R. Lovley, *Geobiology* 6 (2008) 225-231.
- [40] H.T. Pham, N. Boon, P. Aelterman, P. Clauwaert, L.D. Schamphelaire, P. Oostveldt, K. Verbeken, K. Rabaey, W. Verstraete, *Microbial Biotechnology* 6 (2008) 487-496.
- [41] Alice Rochex, Jean-Jacques Godon, Nicolas Bernet, Renaud Escudie, *Water Research* 42 (2008) 4915-4922.
- [42] P. Aelterman, M. Versichele, M. Marzorati, N. Boon, W. Verstraete, *Bioresource Technology* 99 (2008) 8895-8902.
- [43] M.D. Lorenzo, K. Scott, T.P. Curtis, I.M. Head, *Chemical Engineering Journal* 156 (2010) 40-48.
- [44] D. Aaron, C. Tsouris, C.Y. Hamilton, A.P. Borole, *Energies* 3 (2010) 592-606.
- [45] D.F. Juang, P.C. Yang, T.H. Kuo, *International Journal of Environmental Science and Technology* 9 (2012) 267-280.
- [46] I. Ieropoulos, J. Winfield, J. Greenman, *Bioresource Technology* 101 (2010) 3520-3525.
- [47] M. Rahimnejad, A.A. Ghoreyshi, G. Najafpour, T. Jafary, *Applied Energy* 88 (2011) 3999-4004.
- [48] V. Lanas, Y. Ahn, B.E. Logan, *Journal of Power Sources* 247 (2014) 228-234.
- [49] Shantaram, A., Beyenal, H., Veluchamy, R. and Lewandowski, Z.. Wireless sensors powered by microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology* 39 (2005), 5037-5042.
-

- [50] [http://peswiki.com/index.php/Directory:Penn\\_State\\_Microbial\\_Fuel\\_Cells\\_Produce\\_Hydrogen\\_from\\_Waste\\_Water](http://peswiki.com/index.php/Directory:Penn_State_Microbial_Fuel_Cells_Produce_Hydrogen_from_Waste_Water), acessado a 5 Janeiro 2014;
- [51] Remya, L. R., & Shibu, K. (n.d.). Dairy wastewater treatment coupled with electricity production using microbial fuel cell.

## Apêndices

### Apêndice A - Plaqueamento

O objetivo desta técnica é quantificar o número de colônias de bactérias presentes em fase líquida, utilizando dois meios de crescimento MRS (específico) e PCA (geral).

#### Método (Figura A1):

- Acender uma chama (todo o procedimento deve ser realizado próximo de uma chama);
- Pipetar 1 mL da amostra e transferir para o primeiro tubo, fechar o tubo, descartar a ponta e colocar o tubo no vórtice (5 s), transferir 1 mL da solução do tubo 1 para o tubo 2 e repetir o mesmo procedimento para o conjunto de tubos que foram considerados;
- Após terem sido feitas as diluições, fazer uso de uma micropipeta de 100  $\mu$ L, pipetar esse volume no centro da placa com o meio sólido, e espalha por toda a placa;
- Incubar a amostra.

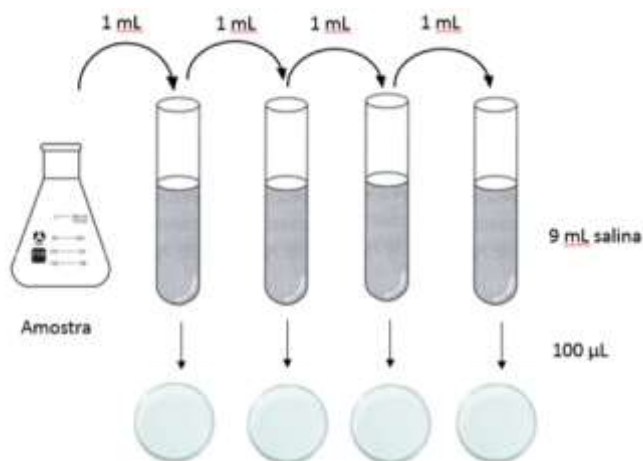


Figure A1- Plaqueamento para contagem de unidades formadoras de colônias.

Posteriormente fez-se uso do método das 3 gotas com 100  $\mu$ L para o espalhamento. Este consiste em colocar 3 gotas de amostra, numa mesma caixa de petri e assim obter diretamente 3 réplicas para uma mesma diluição.

## Apêndice B - Carência Química de Oxigênio (CQO)

Representa a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica biodegradável presente no efluente que se pretende tratar.

Existem vários métodos para a determinação desse parâmetro, mas o escolhido para as análises foi o método do refluxo com dicromato de potássio. A sua escolha prendeu-se com o facto de neste método (comparativamente com os restantes) ser elevado o poder oxidante do químico e devido à sua aplicabilidade a uma grande variedade de amostras, bem como à facilidade de manuseamento (já que esta análise seria feita diversas vezes ao longo de cada experiência).

O procedimento baseia-se na oxidação da matéria orgânica, utilizando-se dicromato de potássio, como oxidante na presença de ácido sulfúrico. A solução aquosa é aquecida em refluxo fechado durante 2 h a 150 °C. Após a sua digestão a leitura dos valores é feita com um fotómetro.

As amostras foram analisadas em triplicado para minimizar os erros associados aos equipamentos utilizados. Usaram-se tubos de cultura de borossilicato de 16 mm x 150 mm, onde se colocaram para análise os seguintes elementos: 2,5 mL de amostra, 1,5 mL de solução de digestão de dicromato de potássio e 3,5 mL de reagente de ácido sulfúrico concentrado.

Dada a elevada quantidade de matéria orgânica presente das amostras retiradas de ambos os reatores, foi adotado o seguinte método:

- Centrifugação da amostra a 4000 Rpm por 15 minutos;
- Diluição da amostra: 1/10 nas amostras retiradas do reator *batch* aquando do início do novo ciclo; 1/5 nas amostras retiradas do reator em contínuo e das amostras retiradas no reator *batch* após conclusão do ciclo.

Caso não fossem feitas as diluições o método não poderia ser aplicado visto que, quando a matéria orgânica em solução é grande ao adicionar o dicromato, ele é rapidamente consumido e a digestão não é possível.

## Apêndice C - Método de Dubois para quantificação dos açúcares

### Método:

- Colocar 250  $\mu\text{L}$  da amostra num tubo de ensaio de vidro;
- Acrescentar 0,5 mL de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico;
- Vortexizar na hotte;
- Deixar repousar 5 min à temperatura ambiente;
- Ler a absorvência em cuvette de vidro, a 490 nm, com branco (água);
- Usar a curva de calibração para obter os valores de C (açúcares).

### Curva de Calibração:

$$Y = 0,0037x + 0,00512 \quad (1C)$$

Ou seja:

$$C \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = 0,0037 \times \text{Absorvência} + 0,00512 \quad (2C)$$

---

## Apêndice D - Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's modification para quantificação de proteínas

- Método: Em cada eppendorf colocar 250  $\mu\text{L}$  de amostra (se necessário, diluir com água);
- Acrescentar 250  $\mu\text{L}$  de Lowry Reagent Solution;
- Deixar repousar 20 min à temperatura ambiente;
- De forma imediata e rápida, acrescentar 125  $\mu\text{L}$  Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent Working Solution;
- Deixar repousar 30 min à temperatura ambiente para desenvolver a cor;
- Ler a absorvância em cuvettes de plástico, a 595 nm, com branco (água);
- Usar a curva de calibração para obter os valores de concentração (proteínas).

Curva de Calibração:

$$Y = 0,0048x + 0,2535 \quad (1D)$$

Ou seja:

$$C \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = 0,0048 \times \text{Absorvância} + 0,2535 \quad (D)$$

## Apêndice E - Método de extração e quantificação de massa de biofilme

### Método de extração:

- Diluição da amostra até 20 mL em tampão de extração de EPS (Extraction Protein Solution);
- Adição de 2 g de resina Dowex® Marathon® C sodium form (Naform, strongly acidic, 20-50 mesh, Sigma-Aldrich, Portugal);
- A extração de EPS ocorre a 400 rpm, 4 °C, durante 4 h;
- Centrifugação da amostra, após separação da resina, a 3777 g durante 5 min.
- Congelamento do pellet (células) e do sobrenadante (EPS em suspensão) para posteriores quantificações;
- Quantificação na matriz (sobrenadante) e no pellet (ressuspenso em tampão fosfato).

### Quantificação da massa de biofilme:

- Pesar os cadinhos durante a experiência:  $Massa_{húmida} = m_{\text{cadinho com biofilme}} - m_{\text{cadinho limpo}}$
- Medir os sólidos voláteis totais;
- Numerar cadinhos e colocá-los na estufa a secar, a 105 °C, durante a noite;
- Arrefecer os cadinhos 30-45 min no exsiccador e pesar:  $m_{\text{Cadinho}}$ ;
- As amostras de cada biofilme devem estar bem ressuspensas e homogeneizadas;
- Juntar 5 mL de matriz e 5 mL pellet no cadinho identificado;
- Colocar na estufa a secar a C, 24h;
- Arrefecer os cadinhos 30-45 min no exsiccador e pesar:  $m_1 = m_{\text{estufa}} - m_{\text{Cadinho}}$   
[Esta é a massa seca (só se eliminou a água)]
- Colocar na mufla a secar a 550 °C, 2h;
- Arrefecer os cadinhos 1 h no exsiccador e pesar:  $m_2 = m_{\text{mufla}} - m_{\text{Cadinho}}$ ;
- Peso seco =  $m_1 - m_2$

**Apêndice F - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator contínuo para o caudal de 0,05 L/h**

**Tabela 1F-**Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 1<sup>o</sup> semana.

1 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,547	0,00
0,01	4	0,516	2,06
0,02	8	0,474	3,79
0,03	12	0,436	5,23
0,04	16	0,393	6,29
0,05	20	0,331	6,62
0,06	24	0,261	6,26
0,07	28	0,231	6,47
0,08	32	0,102	3,26
0,09	36	0,015	0,54
0,1	40	0	0,00
0,05	20	0,331	6,62

**Tabela 2F-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 2<sup>o</sup> semana.

2 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,649	0,00
0,01	4	0,617	2,47
0,02	8	0,555	4,44
0,03	12	0,505	6,06
0,04	16	0,444	7,10
0,05	20	0,399	7,98
0,06	24	0,368	8,83
0,07	28	0,360	10,08
0,08	32	0,318	10,18
0,09	36	0,288	10,37
0,1	40	0,258	10,32
0,11	44	0,220	9,68
0,12	48	0,185	8,88
0,13	52	0,141	7,33
0,14	56	0,097	5,43
0,15	60	0,05	3,00
0,16	64	0,017	1,09
0,09	36	0,288	10,37

**Tabela 3F-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 3<sup>o</sup> semana.

3 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,73	0,00
0,01	4	0,677	2,71
0,02	8	0,6	4,80
0,03	12	0,517	6,20
0,04	16	0,424	6,78
0,05	20	0,333	6,66
0,06	24	0,25	6,00
0,07	28	0,169	4,73
0,08	32	0,057	1,82
0,09	36	0,008	0,29
0,04	16	0,424	6,78

**Tabela 4F-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 4<sup>o</sup> semana.

4 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,776	0,00
0,01	4	0,711	2,84
0,02	8	0,622	4,98
0,03	12	0,524	6,29
0,04	16	0,419	6,70
0,05	20	0,33	6,60
0,06	24	0,227	5,45
0,07	28	0,153	4,28
0,08	32	0,093	2,98
0,04	16	0,419	6,70

**Apêndice G - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator contínuo para o caudal de 0,11 L/h**

**Tabela 1G-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 1<sup>o</sup> semana.

1 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,923	0,00
0,01	4	0,849	3,40
0,02	8	0,747	5,98
0,03	12	0,645	7,74
0,04	16	0,529	8,46
0,05	20	0,416	8,32
0,06	24	0,31	7,44
0,07	28	0,201	5,63
0,08	32	0,09	2,88
0,04	16	0,529	8,46

**Tabela 2G-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 2<sup>o</sup> semana.

2 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,748	0,00
0,01	4	0,7	2,80
0,02	8	0,626	5,01
0,03	12	0,53	6,36
0,04	16	0,419	6,70
0,05	20	0,301	6,02
0,06	24	0,177	4,25
0,07	28	0,053	1,48
0,04	16	0,626	6,70

**Tabela 3 G-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 3<sup>o</sup> semana.

3 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,98	0,00
0,01	4	0,883	3,53
0,02	8	0,729	5,83
0,03	12	0,61	7,32
0,04	16	0,479	7,66
0,05	20	0,375	7,50
0,06	24	0,246	5,90
0,07	28	0,137	3,84
0,08	32	0,023	0,74
0,03	12	0,479	7,66

**Tabela 4 G-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 4<sup>o</sup> semana.

4 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,65	0,00
0,01	4	0,57	2,28
0,02	8	0,449	3,59
0,03	12	0,301	3,61
0,04	16	0,165	2,64
0,05	20	0,052	1,04
0,06	24	0,015	0,36
0,03	12	0,301	3,61

**Apendice H - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator contínuo para o caudal de 0,05 L/h com agitação**

**Tabela 1 H-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 1<sup>ª</sup> semana.

1 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,848	0,00
0,01	4	0,751	3,00
0,02	8	0,635	5,08
0,03	12	0,517	6,20
0,04	16	0,384	6,14
0,05	20	0,234	4,68
0,06	24	0,072	1,73
0,07	28	0,015	0,42
0,03	12	0,517	6,20

**Tabela 2 H-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 2<sup>ª</sup> semana.

2 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,63	0,00
0,01	4	0,533	2,13
0,02	8	0,398	3,18
0,03	12	0,251	3,01
0,04	16	0,103	1,65
0,05	20	0,04	0,80
0,06	24	0,015	0,36
0,02	8	0,398	3,18

**Tabela 3 H-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 3<sup>ª</sup> semana.

3 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,895	0,00
0,01	4	0,81	3,24
0,02	8	0,71	5,68
0,03	12	0,603	7,24
0,04	16	0,49	7,84
0,05	20	0,355	7,10
0,06	24	0,21	5,04
0,07	28	0,064	1,79
0,08	32	0,015	0,48
0,04	16	0,49	7,84

**Tabela 4 H-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para a 4<sup>ª</sup> semana.

4 <sup>a</sup> Semana			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0	0,751	0,00
0,01	4	0,671	2,68
0,02	8	0,596	4,77
0,03	12	0,376	4,51
0,04	16	0,251	4,02
0,05	20	0,206	4,12
0,06	24	0,059	1,42
0,07	28	0,015	0,42
0,03	12	0,596	4,77

## Apêndice I - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para o ciclo de 24h

**Tabela 1 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 1<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 1			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,398	0,00
0,01	2,37	0,319	0,76
0,02	4,73	0,209	0,99
0,03	7,10	0,057	0,40
0,04	9,47	0,015	0,14
0,02	4,73	0,209	0,99

**Tabela 2 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 2<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 2			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,938	0,00
0,01	2,37	0,365	0,86
0,02	4,73	0,015	0,07
0,01	2,37	0,365	0,86

**Tabela 3 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 3<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 3			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,517	0,00
0,01	2,37	0,444	1,05
0,02	4,73	0,32	1,51
0,03	7,10	0,159	1,13
0,04	9,47	0,015	0,14
0,02	4,73	0,32	1,51

**Tabela 4 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 4<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 4			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,564	0,00
0,01	2,37	0,471	1,11
0,02	4,73	0,356	1,69
0,03	7,10	0,193	1,37
0,04	9,47	0,05	0,47
0,05	11,83	0,015	0,18
0,02	4,73	0,356	1,69

**Tabela 5 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 5<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 5			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,62	0,00
0,01	2,37	0,538	1,27
0,02	4,73	0,41	1,94
0,03	7,10	0,247	1,75
0,04	9,47	0,088	0,83
0,05	11,83	0,015	0,18
0,02	4,73	0,41	1,94

**Tabela 6 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 6<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 6			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,551	0,00
0,01	2,37	0,464	1,10
0,02	4,73	0,336	1,59
0,03	7,10	0,18	1,28
0,04	9,47	0,015	0,14
0,02	4,73	0,336	1,59

**Tabela 7 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 7<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 7			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,625	0,00
0,01	2,37	0,503	1,19
0,02	4,73	0,334	1,58
0,03	7,10	0,158	1,12
0,04	9,47	0,009	0,09
0,02	4,73	0,334	1,58

**Tabela 8 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 8<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 8			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,611	0,00
0,01	2,37	0,532	1,26
0,02	4,73	0,41	1,94
0,03	7,10	0,266	1,89
0,04	9,47	0,105	0,99
0,05	11,83	0,009	0,11
0,02	4,73	0,41	1,94

**Tabela 9 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 9<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 9			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,65	0,00
0,01	2,37	0,57	1,35
0,02	4,73	0,448	2,12
0,03	7,10	0,308	2,19
0,04	9,47	0,143	1,35
0,05	11,83	0,005	0,06
0,03	7,1	0,31	2,19

**Tabela 10 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 10<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 10			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,607	0,00
0,01	2,37	0,531	1,26
0,02	4,73	0,415	1,96
0,03	7,10	0,28	1,99
0,04	9,47	0,128	1,21
0,05	11,83	0,006	0,07
0,03	7,10	0,28	1,99

**Tabela 11 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 11<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 11			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,62	0,00
0,01	2,37	0,542	1,28
0,02	4,73	0,423	2,00
0,03	7,10	0,288	2,04
0,04	9,47	0,133	1,26
0,05	11,83	0,015	0,18
0,03	7,1	0,288	2,04

**Tabela 12 I-** Valores experimentais de tensão Vs corrente específica para o 12<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 12			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,642	0,00
0,01	2,37	0,562	1,33
0,02	4,73	0,45	2,13
0,03	7,10	0,311	2,21
0,04	9,47	0,158	1,50
0,05	11,83	0,015	0,18
0,03	7,1	0,311	2,21

**Tabela 13 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 13<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 13			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,653	0,00
0,01	2,37	0,579	1,37
0,02	4,73	0,463	2,19
0,03	7,10	0,329	2,34
0,04	9,47	0,183	1,73
0,05	11,83	0,015	0,18
0,03	7,1	0,329	2,34

**Tabela 14 I-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 14<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 14			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,663	0,00
0,01	2,37	0,567	1,34
0,02	4,73	0,495	2,34
0,03	7,10	0,357	2,53
0,04	9,47	0,223	2,11
0,05	11,83	0,065	0,77
0,06	14,20	0,015	0,21
0,03	7,1	0,357	2,53

**Tabela 15 I-** Resultados de Tensão vs corrente específica para o 15<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 15			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,584	0,00
0,01	2,37	0,522	1,24
0,02	4,73	0,412	1,95
0,03	7,10	0,281	2,00
0,04	9,47	0,145	1,37
0,05	11,83	0,015	0,18
0,03	7,1	0,281	2,00

## Apêndice J - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para o ciclo de 48h

**Tabela 1 J-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 2<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 2			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,21	0,00
0,01	2,37	0,14	0,33
0,02	4,73	0,03	0,13
0,03	7,10	0,02	0,13
0,01	2,37	0,14	0,33

**Tabela 2 J-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 4<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 4			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,61	0,00
0,01	2,37	0,53	1,25
0,02	4,73	0,46	2,18
0,03	7,10	0,41	2,90
0,04	9,47	0,27	2,51
0,05	11,83	0,12	1,37
0,06	14,20	0,01	0,07
0,03	7,10	0,41	2,90

**Tabela 3 J-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 6<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 6			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,69	0,00
0,01	2,37	0,63	1,49
0,02	4,73	0,51	2,42
0,03	7,10	0,38	2,72
0,04	9,47	0,26	2,45
0,05	11,83	0,12	1,36
0,06	14,20	0,01	0,07
0,03	7,10	0,38	2,72

**Tabela 4 J-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 8<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 8			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,51	0,00
0,01	2,37	0,45	1,07
0,02	4,73	0,33	1,57
0,03	7,10	0,22	1,53
0,04	9,47	0,12	1,13
0,05	11,83	0,07	0,77
0,02	4,73	0,33	1,57

**Tabela 5 J-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 10<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 10			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,5	0,00
0,01	2,37	0,43	1,02
0,02	4,73	0,33	1,56
0,03	7,10	0,23	1,66
0,04	9,47	0,17	1,64
0,05	11,83	0,13	1,55
0,06	14,20	0,1	1,35
0,07	16,57	0,04	0,58
0,02	4,73	0,33	1,66

**Tabela 6 J-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 12<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 12			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,62	0,00
0,01	2,37	0,56	1,32
0,02	4,73	0,45	2,13
0,03	7,10	0,37	2,61
0,04	9,47	0,32	3,01
0,05	11,83	0,28	3,30
0,06	14,20	0,24	3,47
0,07	16,57	0,22	3,56
0,08	18,93	0,19	3,52
0,09	21,30	0,15	3,17
0,1	23,67	0,12	2,84
0,11	26,04	0,09	2,42
0,12	28,40	0,07	1,99
0,02	4,73	0,45	3,56

## Apêndice L - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para para o ciclo de 72h

**Tabela 1 L-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 3<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 3			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,659	0,00
0,01	2,37	0,596	1,41
0,02	4,73	0,5	2,37
0,03	7,10	0,383	2,72
0,04	9,47	0,267	2,53
0,05	11,83	0,13	1,54
0,06	14,20	0,036	0,51
0,03	7,1	0,383	2,72

**Tabela 2 L-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 6<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 6			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,694	0,00
0,01	2,37	0,622	1,47
0,02	4,73	0,515	2,44
0,03	7,10	0,385	2,73
0,04	9,47	0,255	2,41
0,05	11,83	0,117	1,38
0,06	14,20	0,036	0,51
0,03	7,1	0,385	2,73

**Tabela 3 L-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 9<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 9			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,558	0,00
0,01	2,37	0,489	1,16
0,02	4,73	0,388	1,84
0,03	7,10	0,256	1,82
0,04	9,47	0,125	1,18
0,05	11,83	0,015	0,18
0,02	4,73	0,388	1,84

**Tabela 4 L-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 12<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 12			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,709	0,00
0,01	2,37	0,631	1,49
0,02	4,73	0,515	2,44
0,03	7,10	0,381	2,71
0,04	9,47	0,235	2,22
0,05	11,83	0,076	0,90
0,06	14,20	0,029	0,41
0,03	7,1	0,381	2,71

**Tabela 5 L-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 15<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 15			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,491	0,00
0,01	2,37	0,415	0,98
0,02	4,73	0,307	1,45
0,03	7,10	0,193	1,37
0,04	9,47	0,052	0,49
0,05	11,83	0,015	0,18
0,02	4,73	0,307	1,45

**Apêndice M - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para o ciclo de 48h com o dobro de extrato de levedura**

**Tabela 1 M-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 2<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 2			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,0	0,13	0,00
0,01	2,4	0,07	0,17
0,02	4,7	0,013	0,06
0,01	4,0	0,07	0,17

**Tabela 2 M-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 4<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 4			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,48	0,00
0,01	2,37	0,427	1,01
0,02	4,73	0,352	1,67
0,03	7,10	0,261	1,85
0,04	9,47	0,187	1,77
0,05	11,83	0,105	1,24
0,06	14,20	0,015	0,21
0,03	7,1	0,261	1,85

**Tabela 3 M-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 6<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 6			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,692	0,00
0,01	2,37	0,641	1,52
0,02	4,73	0,566	2,68
0,03	7,10	0,477	3,39
0,04	9,47	0,381	3,61
0,05	11,83	0,273	3,23
0,06	14,20	0,158	2,24
0,07	16,57	0,015	0,25
0,04	9,47	0,381	3,61

**Tabela 4 M-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 8<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 8			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,622	0,00
0,01	2,37	0,563	1,33
0,02	4,73	0,479	2,27
0,03	7,10	0,385	2,73
0,04	9,47	0,232	2,20
0,05	11,83	0,131	1,55
0,06	14,20	0,015	0,21
0,03	7,1	0,563	2,73

**Tabela 5 M-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 10<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 10			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,554	0,00
0,01	2,37	0,497	1,18
0,02	4,73	0,444	2,10
0,03	7,10	0,315	2,24
0,04	9,47	0,204	1,93
0,05	11,83	0,088	1,04
0,06	14,20	0,04	0,57
0,03	7,1	0,315	2,24

**Tabela 6 M-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 12<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 12			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,564	0,00
0,01	2,37	0,509	1,20
0,02	4,73	0,422	2,00
0,03	7,10	0,332	2,36
0,04	9,47	0,234	2,22
0,05	11,83	0,119	1,41
0,06	14,20	0,015	0,21
0,03	7,1	0,422	2,36

**Tabela 7 M-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 14<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 14			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,513	0,00
0,01	2,37	0,458	1,08
0,02	4,73	0,373	1,77
0,03	7,10	0,268	1,90
0,04	9,47	0,155	1,47
0,05	11,83	0,038	0,45
0,06	14,20	0,015	0,21
0,03	7,1	0,422	1,90

**Apêndice N - Valores experimentais da tensão e corrente específica para o reator batch para para o ciclo de 48h com 10 vezes mais extrato de levedura**

**Tabela 1 N-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 2<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 2			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,432	0,00
0,01	2,37	0,365	0,86
0,02	4,73	0,282	1,33
0,03	7,10	0,179	1,27
0,04	9,47	0,065	0,62
0,05	11,83	0,015	0,18
0,02	4,73	0,282	1,33

**Tabela 2 N-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 4<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 4			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,429	0,00
0,01	2,37	0,372	0,88
0,02	4,73	0,277	1,31
0,03	7,10	0,165	1,17
0,04	9,47	0,058	0,55
0,05	11,83	0,015	0,18
0,02	4,73	0,277	1,31

**Tabela 3 N-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 6<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 6			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,794	0,00
0,01	2,37	0,755	1,79
0,02	4,73	0,695	3,29
0,03	7,10	0,648	4,60
0,04	9,47	0,59	5,59
0,05	11,83	0,52	6,15
0,06	14,20	0,456	6,48
0,07	16,57	0,348	5,77
0,08	18,93	0,306	5,79
0,09	21,30	0,247	5,26
0,1	23,67	0,187	4,43
0,11	26,04	0,154	4,01
0,12	28,40	0,11	3,12
0,13	30,77	0,05	1,54
0,06	14,2	0,456	6,48

**Tabela 4 N-** Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 8<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 8			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,856	0,00
0,01	2,37	0,79	1,87
0,02	4,73	0,698	3,30
0,03	7,10	0,599	4,25
0,04	9,47	0,494	4,68
0,05	11,83	0,386	4,57
0,06	14,20	0,275	3,91
0,07	16,57	0,158	2,62
0,08	18,93	0,015	0,28
0,04	9,47	0,494	4,68

Tabela 5 N- Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 10<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 10			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,698	0,00
0,01	2,37	0,643	1,52
0,02	4,73	0,59	2,79
0,03	7,10	0,546	3,88
0,04	9,47	0,541	5,12
0,05	11,83	0,468	5,54
0,06	14,20	0,424	6,02
0,07	16,57	0,374	6,20
0,08	18,93	0,345	6,53
0,09	21,30	0,306	6,52
0,1	23,67	0,28	6,63
0,11	26,04	0,247	6,43
0,12	28,40	0,226	6,42
0,13	30,77	0,204	6,28
0,14	33,14	0,19	6,30
0,15	35,50	0,176	6,25
0,16	37,87	0,17	6,44
0,17	40,24	0,161	6,48
0,18	42,60	0,127	5,41
0,19	44,97	0,117	5,26
0,2	47,34	0,1	4,73
0,21	49,70	0,015	0,75
0,1	23,67	0,28	6,63

Tabela 6 N- Valores experimentais de tensão vs corrente específica para o 12<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 12			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,548	0,00
0,01	2,37	0,477	1,13
0,02	4,73	0,382	1,81
0,03	7,10	0,278	1,97
0,04	9,47	0,165	1,56
0,05	11,83	0,078	0,92
0,06	14,20	0,015	0,21
0,03	7,1	0,278	1,97

Tabela 7 N- Valores experimentais de tensão Vs corrente específica para o 14<sup>a</sup> dia de operação.

Dia 14			
I (mA)	I (mA/m <sup>2</sup> )	U (V)	P (mW/m <sup>2</sup> )
0	0,00	0,688	0,00
0,01	2,37	0,616	1,46
0,02	4,73	0,514	2,43
0,03	7,10	0,401	2,85
0,04	9,47	0,285	2,70
0,05	11,83	0,165	1,95
0,06	14,20	0,048	0,68
0,07	16,57	0,015	0,25
0,03	7,1	0,401	2,85