

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

RENATA APARECIDA ALVES

AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA DE BIOFILME ELETRO-ASSISTIDO EM ÁGAR
SUPPORTADO EM FIBRA VEGETAL (*Luffa cylindrica*) PARA ANODO EM
TECNOLOGIAS ELETROQUÍMICAS MICROBIANAS

VOLTA REDONDA

2023

RENATA APARECIDA ALVES

AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA DE BIOFILME ELETRO-ASSISTIDO EM ÁGAR
SUPPORTADO EM FIBRA VEGETAL (*Luffa cylindrica*) PARA ANODO EM
TECNOLOGIAS ELETROQUÍMICAS MICROBIANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. André Marques dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Gilmar Clemente Silva

Volta Redonda, RJ

2023

Ficha Catalográfica a ser elaborada pela Biblioteca da EEIMVR/ UFF

A474a Alves, Renata Aparecida
AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA DE BIOFILME ELETRO-ASSISTIDO EM ÁGAR
SUPPORTADO EM FIBRA VEGETAL (*Luffa cylindrica*) PARA ANODO EM
TECNOLOGIAS ELETROQUÍMICAS MICROBIANAS / Renata Aparecida
Alves. - 2023.
65 f.: il.

Orientador: André Marques Dos Santos.
Coorientador: Gilmar Clemente Silva.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Escola de Engenharia Industrial e Metalúrgica de Volta
Redonda, Volta Redonda, 2023.

1. Tecnologia Microbiana. 2. Biofilme. 3. Eletrodo
ecológico. 4. *Shewanella amazonensis*. 5. Produção
intelectual. I. Dos Santos, André Marques, orientador. II.
Silva, Gilmar Clemente, coorientador. III. Universidade
Federal Fluminense. Escola de Engenharia Industrial e
Metalúrgica de Volta Redonda. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

RENATA APARECIDA ALVES

AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA DE BIOFILME ELETRO-ASSISTIDO EM ÁGAR
SUPPORTADO EM FIBRA VEGETAL (*Luffa cylindrica*) PARA ANODO EM
TECNOLOGIAS ELETROQUÍMICAS MICROBIANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Aprovada em 22 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ANDRE MARQUES DOS SANTOS
Data: 30/01/2024 13:56:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. André Marques dos Santos – UFRRJ

Orientador

BRUNO CHABOLI
GAMBARATO:330893398
54

Assinado de forma digital por
BRUNO CHABOLI
GAMBARATO:33089339854
Dados: 2024.01.29 17:15:40 -03'00'

Prof. Dr. Bruno Chaboli Gambarato - UniFOA

Documento assinado digitalmente
 CARLOS EDUARDO DE SOUZA TEODORO
Data: 30/01/2024 12:15:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Teodoro - UFF

Volta Redonda

2023

Dedico essa dissertação a Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da sabedoria e perseverança.

Agradeço a minha família por me apoiarem nas minhas decisões e estar sempre presente comigo.

Agradeço ao professor Gilmar pelos conhecimentos passados, pela compreensão da minha rotina, por todo apoio fornecido durante esse curso.

Agradeço em especial a minha parceira de estudos da UFF, Gabriela, por trabalharmos junto nesse estudo, pelas horas dedicadas em nossas práticas, nossas reuniões e pelo grande conhecimento adquirido.

Agradeço também aos parceiros de estudo do PGTA, Samara e Mateus, por ajudar nas atividades de laboratório, pelo suporte nas disciplinas e discussões em grupo.

Agradeço ao professor André pela orientação, pela compreensão do projeto.

E por fim, mas tão importante, agradeço a Universidade Federal Fluminense, pelo curso de Tecnologia Ambiental, com todos os esforços, manteve o curso, conseguindo realizar sonhos de muitos alunos e formando cidadãos com senso crítico, pois só a Educação pode mudar o mundo.

“A insistência vence a resistência!”

RESUMO

Pesquisas recentes mostram que as Células de Combustível Microbianas (CCMs), tem sido usadas amplamente, pois podem operar com diversos substratos, inclusive com resíduos industriais. O efluente da produção de biodiesel tem recebido atenção devido ao grande volume gerado em processo, uma vez que a produção do biodiesel tende a aumentar a geração do efluente é diretamente proporcional. Por mais que as indústrias otimizem meios de reutilizar as águas residuais no processo de purificação do biodiesel, há um momento que ocorre a saturação e o mesmo deve ser descartado, mas para que isso ocorra é necessário um tratamento que onera muito os custos de processo. Portanto faz se necessário o desenvolvimento de um novo processo tecnológico que possa contribuir nesse tratamento desse efluente, garantindo contribuições para o meio ambiental e econômico. Este trabalho traz uma proposta de tecnologia para o tratamento de efluente proveniente da indústria de biodiesel, utilizando a bucha vegetal, *Luffa cylindrica*, como um eletrodo, sendo o mesmo estimulado eletroquimicamente para acelerar a formação de biofilme, partindo de microrganismos, cepa de *Shewanella amazonensis*. Análises dos experimentos, através da técnica de Espectroscopia de Impedância eletroquímica - EIE mostraram um tendencia favorável ao reator estimulado, pois obteve uma resistência ôhmica de aproximadamente 15 vezes menor em relação ao reator sem estímulo, quando aplicado o potencial de 0,5 V versus o eletrodo de Ag/AgCl. Houve também uma remoção de demanda química e bioquímica de oxigênio de 60% nas 48h de tratamento. Apesar dos resultados promissores, ainda há necessidade de estudos mais profundos em relação ao tema, para entender como a aceleração do crescimento do biofilme pode ser impactada pelo potencial aplicado, assim como aprofundamento dos estudos para redução do tempo de tratamento do efluente industrial.

Palavras-chave: Tecnologia microbiana; Eletrodo ecológico; *Shewanella amazonensis*; biofilme.

ABSTRACT

Recent research shows that Microbial Fuel Cells (MFCs) have been widely used because they can operate with various substrates, including industrial waste. The effluent from biodiesel production has received attention due to the large volume generated in the process, as the production of biodiesel tends to increase the generation of effluent proportionally. Despite industries optimizing means to reuse wastewater in the biodiesel purification process, there comes a point of saturation where it must be discarded. However, for this to happen, a treatment is required that significantly burdens the process costs. Therefore, the development of a new technological process that can contribute to the treatment of this effluent, ensuring environmental and economic benefits, becomes necessary.

This work presents a proposed technology for the treatment of effluent from the biodiesel industry, using the sponge gourd, *Luffa cylindrica*, as an electrode. It is electrochemically stimulated to accelerate biofilm formation, starting from microorganisms, specifically the *Shewanella amazonensis* strain. Analyses of the experiments, through the Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) technique, showed a favorable trend towards the stimulated reactor, as it obtained an ohmic resistance approximately 15 times lower compared to the non-stimulated reactor when applying a potential of 0.5 V versus the Ag/AgCl electrode. There was also a removal of chemical and biochemical oxygen demand of 60% within 48 hours of treatment. Despite the promising results, further studies are still needed on the subject to understand how the acceleration of biofilm growth can be impacted by the applied potential, as well as further exploration of studies to reduce the treatment time of industrial effluent.

Keywords: Microbial Technology; Ecological Electrode; *Shewanella amazonenses*; Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Funcionamento de uma Célula Combustível Microbiana	20
Figura 2 - Formação de biofilme eletroativo por transferência mediada de elétrons	23
Figura 3 - Efeito da polarização no eletrodo na formação do biofilme	28
Figura 4 - Diagrama de Nyquist e circuito equivalente	32
Figura 5 - Fluxograma resumido do processo de produção do biodiesel a partir de matriz oleaginosa	36
Figura 6 - Comparação entre eletrodo construído com a bucha vegetal (Esquerda) e o Eletrodo Comercial de Carbono (direita)	46
Figura 7 - Montagem do Eletrodo de bucha vegetal	47
Figura 8 - Montagem dos Reatores	47
Figura 9 - Coleta nas primeiras 24h de tratamento	48
Figura 10 - Diagrama de Nyquist para teste experimental com o eletrodo de bucha vegetal e biofilme de <i>S. amazonensis</i>	49
Figura 11 - Circuitos gerados para reator com estímulo (a) e reator sem estímulo (b)	50
Figura 12 - Resultados obtidos de DQO total	52
Figura 13 - Remoção de DQO total	53
Figura 14 - Resultados obtidos da DQO Solúvel	54
Figura 15 - Remoção de DQO Solúvel	55
Figura 16 - Resultados obtidos de DBO	56
Figura 17 - Remoção de DBO	57
Figura 18 - Análise de correlação entre amostras - PCA	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados físico-químicos da caracterização do Efluente	41
Tabela 2 - Resultado gerado de cada coeficiente - PCA	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag/AgCl – Prata / Cloreto de Prata

APHA - American Public Health Association

ATCC - American Type Culture Collection

CA - Cronoamperometria

CCM – Célula Combustível Microbiana

CNPE - Conselho Nacional de Política Energética

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CV - Voltametria Cíclica

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DET - Transferência Direta de Elétrons

DQO – Demanda Química de Oxigênio

ECM - Matriz Extracelular

EIE - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

EPS - Substância Polimérica Extracelular

MET – Transferência Mediada de Elétrons

MFC – Microbial Fuel Cell (Célula a Combustível Microbiana)

OD – Oxigênio Dissolvido

PCA - Análise dos Componentes Principais

PGTA – Pós Graduação em Tecnologia Ambiental

PEM – Membrana trocadora de Prótons

pH – potencial hidrogeniônico

V – Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p. 14

2 OBJETIVOS, p. 17

2.1 Objetivo Geral, p.17

2.2 Objetivos Específicos, p.17

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA, p.18

3.1 Células Combustíveis Microbianas – CCMS, p. 18

3.2 Formação de Biofilme e Transferência Eletrônica dos Microrganismos em Técnicas de Tratamento de Efluente, p. 21

3.3 Eletrodos e Inovações Aplicadas ao Tratamento de Efluentes, p. 25

3.4 Aplicação de Técnicas Eletroquímicas na Formação de Biofilme, p. 28

3.5 Indústria de Biodiesel e a Geração de Efluente, p. 33

3.6 Importância das Análises de DBO e DQO no Processo de Tratamento de Efluentes, p. 38

4 MATERIAIS E MÉTODOS, p. 40

4.1 Metodologia, p.40

4.2 Procedimentos, p. 40

4.2.1 Efluente: A coleta e caracterização, p. 40

4.2.2 Preparação do biofilme e condições de crescimento e inoculação na *Luffa cylindrica*, p. 42

4.2.3 Preparação do reator e do eletrodo, p. 43

4.2.4 Método analítico bioeletroquímico, p. 44

4.2.5 Análise dos dados, p. 45

5 RESULTADOS, p. 46

5.1 Esquematização dos Testes Experimentais, p. 46

5.2 Análise do Desempenho Eletroquímico, p. 48

5.3 Avaliação do Tratamento Através de DQO e DBO, p. 51

6 CONCLUSÃO, p. 60

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 61

1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da demanda energética mundial, tornou-se importante e necessário buscar por fontes alternativas e limpas de geração de energia. Neste sentido, nos últimos anos, as pesquisas em Células Combustíveis Microbianas (CCMs,) aumentaram significativamente. Este é um dispositivo eletroquímico capaz de capturar os elétrons oriundos do metabolismo de uma classe de microrganismos conhecidos como eletroativos. Diversos substratos podem ser utilizados nestes dispositivos, incluindo resíduos domésticos ou industriais (CHOUDHURY et al, 2021).

O tratamento de resíduos industriais constitui uma demanda em ascensão, pois devido ao consumismo desenfreado vivido na era do desenvolvimento, há um aumento na geração de resíduos. Estes muitas vezes não recebem tratamento adequado antes de serem descartado no ambiente, o que acarreta sérios danos. Por outro lado, muitos dos resíduos industriais possuem concentração elevada de compostos orgânicos biodegradáveis, portanto, com potencial para serem utilizados como substrato nas CCMs (DEL CAMPO, 2013).

As CCMs convencionais são compostas por um compartimento anódico e um compartimento catódico, interligados por uma membrana de troca de prótons (PEM– *sigla da língua inglesa*, Proton Exchange Membrane) (CHIRANJEEVI; PATIL, 2020). Portanto, as inovações nesta área geralmente são voltadas para um destes componentes, principalmente com ênfase para a utilização de cepas de bactérias exoeletrogênicas mais eficientes, materiais de anodo e catodo mais barato e de fácil escalagem e membranas mais seletivas (GADHAMSHETTY et al, 2013; LEE E NIRMALAKHANDAN, 2011).

De fato, os eletrodos são parte crucial de uma célula combustível microbiana, pois é por meio destes que são conduzidas as cargas elétricas, influenciando diretamente na densidade de energia produzida pela CCM. Assim dentre outros fatores, é o componente que pode limitar desempenho do anodo. Estudos apontam grande oportunidade de avanço tecnológico em modificação dos eletrodos, fazendo com que haja um ganho energético, pois o desenvolvimento de eletrodo com maior afinidade com os microrganismos influenciaria em uma maior eficiência energética. Anodos que possuem uma maior área de superfície ativa, tem se mostrado melhores

para crescimento dos microrganismos e consequentemente oxidação do substrato, ocasionando um aumento da taxa de reação bioquímica (LEE E NIRMALAKHANDAN, 2011).

Conforme mencionado por XIE et al. (2012), os materiais influenciam com grande significância o desenvolvimento de uma CCM. Normalmente, os eletrodos são a base de grafite comumente encontrado em formato de haste, feltro, tecido e entres outras formas, este material faz parte de um longo desenvolvimento de pilhas e baterias químicas, funciona para conduzir energia, mas não leva em consideração a função biológica, de habitat para os microrganismos. Levando em consideração essas funções biológicas, o anodo deve facilitar a fixação e colonização dos microrganismos, promover de forma mais eficiente o transporte de substratos aos microrganismos, sendo assim, faz-se necessário que seja um anodo macroporoso tridimensional. No entanto, poros muito pequenos dificultam o acesso de substratos aos microrganismos no interior do eletrodo, podendo a longo prazo causar entupimento.

Neste contexto, esponjas de fibras vegetais possuem características interessantes para o desenvolvimento de um anodo com afinidades biológicas, como o caso da bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), pertencente à família *Cucurbitaceae*. A *L. cylindrica* que é abundante em muitos países tropicais e subtropicais, sua estrutura natural é composta por lignina e celulose, possui um sistema fibroso vascular em forma reticular, conhecido como esponjas *Luffa*, onde macroporos tendem a facilitar a fixação e desenvolvimento de microrganismos (YUAN et al., 2013; ALTINIŞIK et al., 2010).

Contudo, este material ainda é pouco explorado no campo das CCMs. Espera-se que a implementação desse processo inovador permita conhecer a atividade eletroquímica de biofilmes eletroativos formados na superfície da *L. cylindrica* e num futuro próximo melhorar a competitividade na área das tecnologias eletroquímicas microbianas, pois o anodo a base de fibras é de baixo custo, derivado de material vegetal, portanto é biodegradável e de fácil obtenção (YANG et al., 2017). Por outro lado, a condutividade elétrica da fibra é muito baixa, entretanto sabe-se que durante a formação do biofilme as bactérias eletroativas exsudam substâncias poliméricas que possuem certa condutividade elétrica.

Neste sentido o trabalho de dissertação utilizou uma célula eletroquímica com eletrodos de referência e auxiliar, além do anodo de fibra onde será impregnado biofilme eletroativo. Espera-se acelerar a formação do biofilme pela imposição de correntes de baixa intensidade no

anodo, ou seja, a superfície estará como funcionalizada ou modificada, além disso espera-se a remoção da carga orgânica,

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar eletroquimicamente um anodo à base de *L. cylindrica*, eletro ativado em solução contendo culturas da bactéria eletrogeradora, para e aplicação tecnológica.

2.2 Objetivo Específico

- Desenvolver um anodo à base de *L. cylindrica*, que sustentem o microrganismo *Shewanella amazonensis*;
- Estimular o crescimento do biofilme formado sobre a *L. cylindrica*, por meio de técnicas eletroquímicas, visando sua aplicação em tecnologias eletroquímicas microbianas;
- Determinar e aplicar as principais técnicas eletroquímicas para avaliação de eletroatividade do biofilme anódico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Células Combustíveis Microbianas – CCMS

Foi registrada oficialmente no início do século XX, a primeira geração de corrente elétrica a partir de microrganismos, foi documentada por Michael Cresser Potter. Em seus estudos, Potter observou a produção de energia elétrica através de culturas de *Escherichia coli* e *Saccharomyces spp.* quando expostas a eletrodos de platina (POTTER, 1911). Em 1931, Barnet Cohen avançou no campo ao desenvolver células a combustível microbianas conectadas em série, obtendo um sistema com uma tensão de 35 V e uma corrente elétrica de 2 mA. Desde então, esse domínio tem sido reconhecido como um campo de interesse em constante expansão na ciência e tecnologia (SANTORO et al., 2017).

Assim sendo a comunidade acadêmica está empenhada no desenvolvimento de tecnologias inovadoras que permitam aproveitar os rejeitos de biomassa e resíduos, em virtude de atender às crescentes demandas globais por energia. Nesses esforços, destacam-se três questões principais: a ambiental, a econômica e a tecnológica propriamente dita. As células combustíveis microbianas (CCM), têm a capacidade de gerar eletricidade, demonstram eficácia na abordagem da questão ambiental. Além disso, estão em desenvolvimento de estudos que visam solucionar as complexidades econômicas e tecnológicas, a fim de suprir as necessidades cada vez mais elevadas de energia e ambiental (RIFKIN, 2002; KATZ, 2023).

Uma Célula a Combustível Microbiana (CCM) emprega micro-organismos para catalisar a oxidação de matéria orgânica, resultando na produção de eletricidade através da transferência de elétrons para um circuito externo, inserido prévia à etapa de redução de um receptor de elétrons. Desde modo, considera-se que uma CCM é um dispositivo capaz de transformar energia química em energia elétrica por meio de reações químicas catalisadas por micro-organismos (GRZEBYK, 2004).

Existem várias configurações de CCM descritas na literatura. Em linhas gerais, uma CCM é constituída por quatro componentes fundamentais: ânodo, cátodo, microrganismos eletroquimicamente ativos e eletrólito (conforme mencionado por LOGAN, 2008)

No compartimento anódico, microrganismos eletroquimicamente ativos, conhecidos como exoeletrogênicos, isto é, microrganismos com a capacidade de transferir elétrons para fora da célula, propagam se no ânodo e realizam a transferência de elétrons para este, através de interações químicas e físicas com o substrato, através do processo de oxidação. O substrato, por sua vez, pode ser constituído por glicose, acetatos, efluentes industriais, efluentes domésticos e diversos compostos orgânicos. É importante destacar que o compartimento anódico requer condições operacionais essenciais para o desenvolvimento bacteriano, tais como a quantidade de matéria orgânica, pH, temperatura, carga de eletrólitos e baixa concentração de oxigênio dissolvido (LOGAN et al., 2019).

Em CCM, os materiais a base de carbono são frequentemente utilizados para base do material do ânodo, devido às suas características de boa condutividade elétrica, estabilidade química, estrutura resistente, propriedades de superfície favoráveis ao desenvolvimento do biofilme flexível em termos de possibilidade de arranjos que promovam uma maior área específica de contato, os materiais mais encontrados são: haste de grafite, pincel de fibra de grafite e tecido de carbono/carbono vítreo reticulado (KHANAL, 2008). Na figura 1 segue algumas vantagens e desvantagens da utilização desses materiais em CCM.

Quadro 1 - Matérias anódicas disponíveis na literatura

Materiais Anódicos	Vantagens	Desvantagens
Haste de Grafite	Boa Condutividade elétrica e estabilidade química, custo baixo e facilmente disponível	Área específica baixa
Pincel de Fibra de Grafite	Área específica alta e facilmente disponível	Acúmulo de Partículas (“Entupimento”)
Tecido de Carbono	Alta porosidade	Custo alto
Carbono Vítreo Reticulado	Boa condutividade elétrica	Apresenta resistência e fragilidade

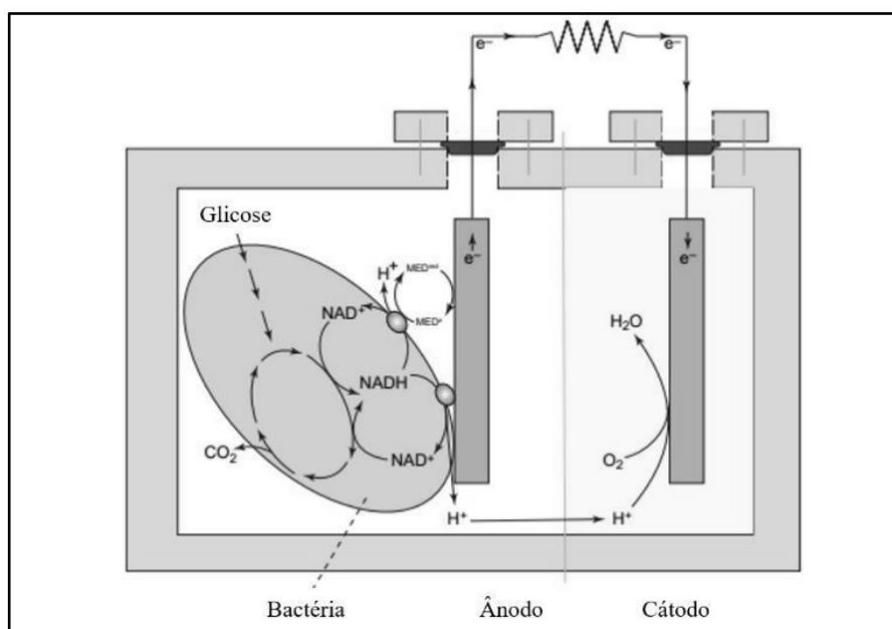
Fonte: Zhou et al, 2011.

Originados no compartimento anódico, os elétrons liberados durante a reação de oxidação são conduzidos em direção ao cátodo através de um circuito elétrico externo. Simultaneamente, os prótons, também produtos dessa reação, difundem-se por meio de uma membrana trocadora de prótons em direção ao compartimento catódico. Assim, a diferença de potencial (DDP) entre o ânodo e o cátodo, expressa em volts (V), aliada à corrente gerada pelo movimento dos elétrons no circuito externo, resulta na geração de potência elétrica para o sistema, medida em watts (W) (CHENG; LOGAN, 2011).

Quanto ao compartimento catódico, diversos agentes oxidantes podem ser empregados. Contudo, em virtude de seu elevado potencial de redução e abundância, o oxigênio emerge como o receptor final de elétrons mais comumente adotado, conforme a literatura. Em relação a variedade de configurações de Células a Combustível Microbianas (CCM) descritas, a CCM ao ar se destaca como uma escolha alinhada com escalas industriais para o tratamento de efluentes. Tal preferência é atribuída à sua capacidade de gerar elevadas densidades de potência, à estrutura simplificada e aos custos relativamente moderados (CHENG; LOGAN, 2011).

Em uma CCM utilizando o ar, o oxigênio atua como receptor final dos elétrons, reagindo com prótons e elétrons para formar água na superfície do cátodo, conforme exposto na Figura 1.

Figura 1 - Funcionamento de uma Célula Combustível Microbiana



Fonte: Adaptado de Rabaey e Verstraete, 2005

Os elementos constituintes do cátodo em uma CCM, exercem uma influência significativa em seu desempenho principalmente no que se refere à geração de densidades de potência. Para que uma CCM possa ser implantada em larga escala, é crucial que o cátodo apresente não apenas um desempenho elevado, mas também custos acessíveis (ZHOU et al., 2011).

3.2 Formação de Biofilme e Transferência Eletrônica dos Microrganismos em Técnicas de Tratamento de Efluente

Atualmente, pesquisas na área de tecnologias microbianas para tratamento de efluentes, a mais conhecida é a CCM, célula a combustível microbiana, essas tecnologias são suportadas por microrganismos da classe “exoeletrogenica”, sendo estes dispostos naturalmente em ambientes anaeróbicos. Os mesmos se desenvolvem na superfície dos eletrodos constituindo um biofilme, utilizam de variadas vias metabólicas para oxidar as fontes de carbono – substrato (VENKATA MOHAM, 2014).

Os microrganismos utilizados para esse tipo de tratamento têm uma capacidade especial de transferência de elétrons, para que ocorra reações químicas e por conseguinte o tratamento do efluente, simultaneamente à geração de corrente elétrica. Com a evolução dos estudos foi identificado que as bactérias dos gêneros *Geobacter* e *Shewanella* possuem nanofios, os quais facilitariam o processo de transferência de elétrons da camada extracelular para o meio externo (GORBY et al., 2006).

De acordo com Logan et al., 2009 os de microrganismos envolvidos nessa finalidade de tratamento e geração de eletrons está relacionado aos gêneros *Geobacter spp.* e a *Shewanella spp.*, pelo fato delas desenvolverem maior densidade de corrente, há vias pela qual ocorrem as transferências de elétrons envolvendo esses microrganismos exoeletrogênicos, sendo elas:

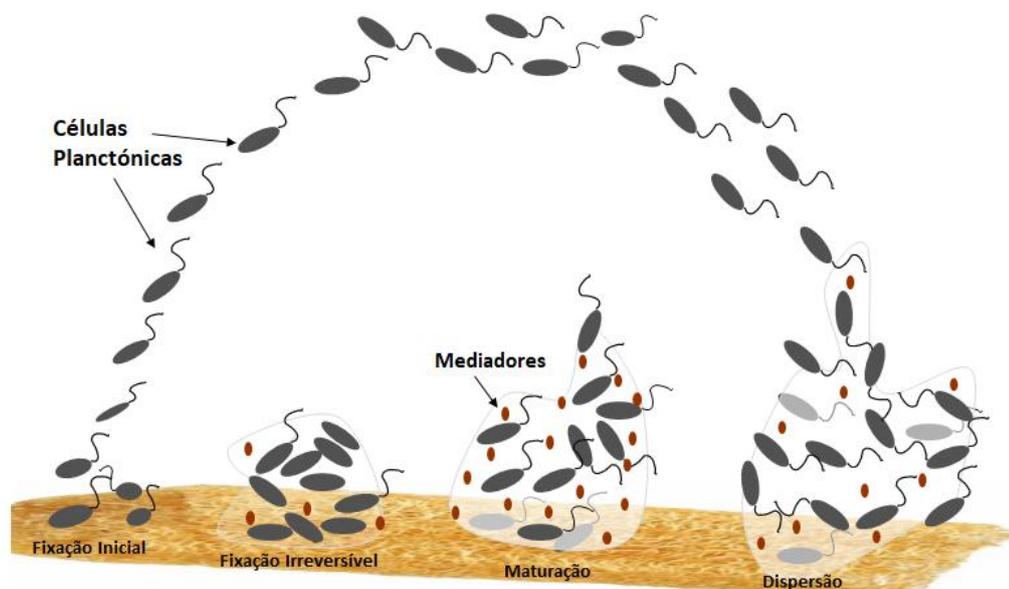
- **Transferência Direta de Elétrons (DET - sigla em inglês, *Direct Electron Transfer*):** o qual é caracterizado pela transferência direta de elétrons aos sólidos não solúveis,

geralmente requer contato direto entre as células e os condutores de elétrons no estado sólido, que são os próprios eletrodos (BEEGLE; BOROLE, 2018; LIU; SHI; GU, 2018);

- **Transferência Mediada de Elétrons (MET - sigla em inglês, *Mediated Electron Transfer*):** esta pode ocorrer de diversas formas a depender da natureza e fonte da espécie mediadora. Normalmente, são metabolitos secretados por microrganismos exoeletrogênicos ou mediadores artificiais adicionados ao meio (PANKRATOVA; HEDERSTEDT; GORTON, 2019), conforme pode ser visto na figura 2 abaixo. Diversos microrganismos produzem moléculas solúveis ativas que desempenham o papel de conduzir os elétrons, como o exemplo as quinonas, fenazinas e flavinas (ANGELAALINCY et al., 2018).

Essas transferências eletrônicas são características do processo de formação do biofilme, esse processo se dá a partir da fixação de microrganismos adjuntos, formado por uma ou mais de uma espécie, devido a fixação de microrganismos planctônicos à uma superfície abiótica ou biótica. A fixação é a primeira etapa e uma das principais para a formação do biofilme eletroativo, a adesão em grande maioria dos casos ocorre na superfície de receptores de elétrons (anodo ou catodo). Por essa razão, o eletrodo deve ser bio-compatível e condutor, com a finalidade do desenvolvimento do biofilme e que o transporte de elétrons ocorra até o catodo (caso das CCMs) (ANGELAALINCY et al., 2018; ARUNASRI; MOHAN, 2019; SEMENEC; FRANKS, 2015; KIRAN; PATIL, 2019).

Figura 2 - Formação de biofilme eletroativo por transferência mediada de elétrons



Fonte: adaptado de Mukherjee et al. (2020) e Arunasri e Moham (2019).

Conforme ilustrado na Figura 2, as principais etapas de formação de um biofilme são apresentadas, ou seja, a fixação inicial, fixação irreversível, maturação e dispersão.

- **Fixação inicial:** É o primeiro estágio da formação, sendo este o momento de adesão dos microrganismos na superfície do anodo, são células planctônicas, essa adesão é reversível, normalmente é mantida por interações físico-químicas não especificadas, tornando-se uma base para o crescimento do biofilme (CZER WINSKA-GLÓKWA; KRUKIEWICZ, 2020).
- **Fixação irreversível:** Avançando nos estágios de formação do biofilme, tem-se o momento em que os microrganismos começam a excretar substâncias responsáveis por manter e aderir o biofilme, ou seja, há o início de uma Matriz de Substância Polimérica Extracelular (EPS) (CZER WINSKA-GLÓKWA; KRUKIEWICZ, 2020).

Existem diferentes fatores e mediadores envolvidos no processo de fixação bacteriana, a saber:

Pili ou Fímbrias: Muitas bactérias possuem estruturas na superfície chamadas pili ou fímbrias, que são apêndices filamentosos que ajudam na aderência às superfícies. Essas estruturas são frequentemente especializadas na aderência a receptores específicos nas células-alvo;

Adesinas: São proteínas específicas de aderência encontradas na superfície bacteriana. Elas se ligam a receptores na superfície das células hospedeiras ou em substratos sólidos, facilitando a fixação bacteriana;

Matriz Extracelular (ECM, sigla da língua inglesa, extracellular matrix): Em ambientes naturais, as bactérias frequentemente encontram uma matriz extracelular. Algumas bactérias produzem enzimas que quebram os componentes da matriz extracelular, permitindo que se fixem a tecidos e superfícies;

Glicocálix: O glicocálix é uma camada de polissacarídeos ou proteínas na superfície da célula bacteriana. Pode ajudar na aderência, formando uma camada viscosa que facilita a fixação às superfícies. Algumas bactérias têm flagelos que podem desempenhar um papel na aderência, agindo como estruturas sensoriais que detectam superfícies sólidas.

Fatores de Virulência: Em muitos casos, as bactérias produzem fatores de virulência, que são moléculas que ajudam na colonização e infecção do hospedeiro. Isso pode incluir toxinas, enzimas e outras moléculas que influenciam o ambiente em torno das bactérias.

Condições Ambientais: Fatores ambientais, como pH, temperatura e composição química do ambiente, podem influenciar a capacidade das bactérias de se fixarem a superfícies.

Interações Químicas: interações químicas específicas entre moléculas na superfície bacteriana e na superfície-alvo também desempenham um papel. (SAUER K., 2003)

- **Maturação:** Processo pelo qual a matriz de substância polimérica extracelular é melhor desenvolvida para formação do biofilme, sendo a formação de EPS diretamente proporcional a densidade do biofilme (ANGELAALINCY; KRISHNARAJ; SHAKAMBARI, 2018).

- **Dispersão:** A etapa de dispersão é o momento que células microbianas não estão favoráveis a formação do biofilme, então se desprende e podem dar início a um novo ciclo em novo ambiente (OTTO M. 2008).

Como pode-se perceber um fator muito importante para a formação do biofilme é o EPS, no entanto o biofilme possui uma composição de majoritária de polissacarídeos e o restante formado por porções de glicoproteínas, glicolipídeos e nucleotídeos (ANGELAALINCY; KRISHNARAJ; SHAKAMBARI, 2018).

O processo de transferência de elétrons do biofilme ainda é algo em constante estudo, no entanto, considera-se que o EPS represente grande influência nesse processo. Em estudos com a bactéria *Geobacter sulfurreduces*, relatou-se o desempenho do EPS para fixação de proteínas redox periféricas o que resulta que comunidades multicelulares transfiram elétrons para receptores (ANGELAALINCY; KRISHNARAJ; SHAKAMBARI, 2018).

Outro fator importante determinado em estudos com a bactéria *G. sulfurreduces*, foi que a formação e o envelhecimento do biofilme está ligado ao processo de transferência de cargas, ou seja, densidade de carga elétrica do sistema. No processo de envelhecimento com a morte de alguns microrganismos, estes se acumulam interiormente no biofilme, gerando uma resistência no sistema, a partir desse momento a corrente elétrica medida/gerada passa a ser das novas células platônicas dando um novo ciclo ao processamento de formação de biofilme (SUN, et al., 2017).

3.3 Eletrodos e Inovações Aplicadas ao Tratamento de Efluentes

Os eletrodos desempenham um papel essencial em tecnologias microbianas para tratamento de efluentes, principalmente quando se refere a saída de energia. No entanto, é de extrema importância avaliar o material constituinte do mesmo, conforme ZHOU et al. (2011) definiram características para se considerar um bom eletrodo em relação ao anodo e catodo.

Para um ótimo desempenho, Zhou et al. (2011) apresentaram cinco principais características: ser um bom condutor elétrico, portanto possuir baixa resistência; ter forte biocompatibilidade; possuir estabilidade química e não ser susceptível à corrosão e por fim; ser resistente mecanicamente e possuir tenacidade. Por estas características, conforme mencionado anteriormente, atualmente usam-se principalmente materiais carbonosos, como por exemplo, o tecido de carbono, grafite e grafeno.

Eletrodos a base de grafite são bons condutores e alguns são relativamente baratos, no entanto, em tecnologias microbianas, o anodo executará um melhor desempenho se houver grande afinidade com células bacterianas vivas e se possuírem área superficial de grande contato, ou seja, grandes poros para que as bactérias se interajam. Eletrodos de grafite possuem poros pequenos, sendo assim, os microrganismos se tornam inacessíveis ao interior do eletrodo (YONG et al., 2013).

Estudos indicam que avançaram em laboratórios testes para desenvolvimento de um eletrodo tridimensional macroporoso, onde é incorporado uma superfície de polímeros para ajudar na formação de biofilme. Esse tipo de eletrodo vem ganhando destaque no desenvolvimento das tecnologias microbianas, pois são conhecidos como eletrodos de alta performance, pois seu objetivo é aumentar o desempenho das dessas tecnologias de tratamento dos efluentes.

Um exemplo dessa teoria de anodo foi o desenvolvimento de uma esponja de carbono, revestida com nanotubos de carbono, as características aspirantes no desenvolvimento desse material eletródico é que seja superfícies macro porosas abertas e funcionalizadas, assim sendo, favoráveis a fixação de bactérias e transferência de elétrons extracelulares. No entanto, nesses eletrodos já desenvolvidos, há uma desvantagem, pois possuem alto valor agregado devido aos nanotubos de carbono e também à sua complexibilidade de desenvolvimento, além de possuírem baixa compatibilidade com os microrganismos e alta biodegradabilidade. Também foram avaliados os tamanhos dos poros formados, que são pequenos, não promovendo a interação necessária e possivelmente susceptível ao entupimento dos poros o que afetaria sua utilização em CCMs a longo prazo (YONG et al., 2013).

Portanto, através desses estudos, sabe-se que estruturas porosas melhoram significativamente o desempenho do anodo em tecnologias microbianas, portanto parte-se do

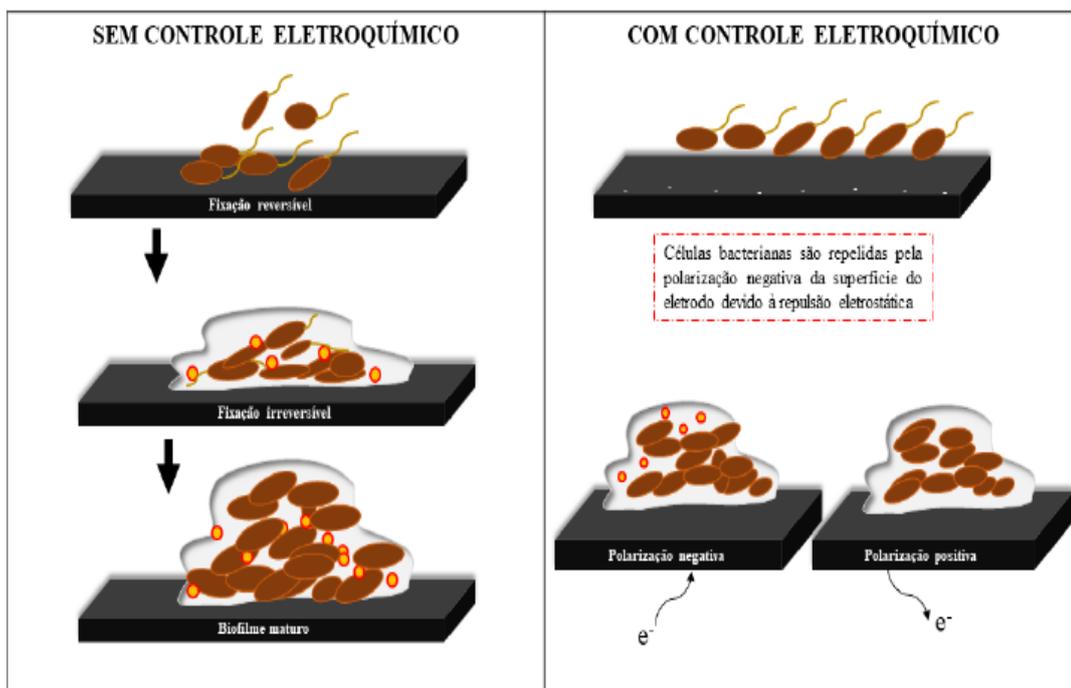
princípio de inovar a utilização da fibra vegetal (*L. cylindrica*), popularmente conhecida como bucha vegetal. Esse elemento trata-se do fruto de trepadeira bucha, possui grande abundância na natureza em quase todas as regiões do Brasil, comumente é utilizada para higiene pessoal e limpezas em geral, também vem ganhando destaque em estudos na área de agricultura, química, biotecnologia, medicina e engenharia. Por se tratar de um material vascular fibroso tem sido muito pesquisada para uso de biofiltros. Há indícios de sua utilização para auxiliar o crescimento bacteriano, apresentando um bom desempenho em sistemas aeróbicos submersos em substratos (YONG et al., 2013; FERNANDES et al., 2015).

FURTADO et al. (2020) afirmam que há muitas vantagens em se trabalhar com a fibra vegetal, entre elas estão: a sua fácil disponibilidade, seu baixo custo e boas propriedades mecânicas e térmicas, sua relação massa/volume < 1 , além do fato de serem renováveis, recicláveis e podem ser modificados por agentes químicos. Conforme mencionado, as características da *L. cylindrica* são propícias para grandes projetos de desenvolvimento tecnológico microbiano, principalmente na área de CCMs, sua utilização como eletrodo, anodo, possui um grande potencial e inovação frente aos estudos no atual cenário científico.

3.4 Aplicação de Técnicas Eletroquímicas na Formação de Biofilme

Estudos em relação ao crescimento e eficiência do biofilme demonstram que há uma grande interação entre o estímulo eletroquímico e o crescimento dos biofilmes. Quando se aplica um potencial positivo na interface do eletrodo, ocorre o processo de polarização positiva, pois as células de microrganismos possuem uma carga negativa, levando a uma interação eletrostática o que tende a ocorrer uma melhor e maior fixação dessas células. Se ocorrer o contrário, ou seja, aplicação de um potencial negativo, tem-se uma polarização negativa, assim ocorrerá o processo de repulsão das cargas e pode levar a redução do processo inicial de fixação das células bacterianas para dar início a formação do biofilme, conforme a figura 3. (SULTANA; BABAUTA; BEYNAL, 2015).

Figura 3 - Efeito da polarização no eletrodo na formação do biofilme



Fonte: Adaptado de Sultana, Babauta e Beyenal (2015).

A avaliação do biofilme na superfície da *L. cylindrica* pode ser realizada mediante o uso de técnicas eletroquímicas como cronoamperometria, espectroscopia de impedância e

voltametria cíclica, pois fornecem informações referente ao crescimento e a cinética de transferência de elétrons na interface biofilme/solução (CZERWIŃSKA-GLÓWKA:KRUKIEWICZ, 2020).

O Quadro 2 apresenta a relação entre as características e propriedades medidas e as técnicas eletroquímicas que foram utilizadas nesse trabalho, para avaliar o biofilme eletroassistido em ágar e suportado em *L. cylindrica*.

Quadro 2 – Técnicas eletroquímicas comumente usadas em CCMs

Técnicas eletroquímicas	Características	Propriedades Medidas
Voltametria Cíclica (CV)	<p>Teste eletroquímico onde a corrente é registrada varrendo o potencial de positivo para negativo e negativo para positivo entre os limites escolhidos.</p> <p>A análise gráfica de um voltamograma cíclico fornece picos redox que são picos de oxidação e redução do material (CHOUDHARY; JOTHI; NAGESWARAN, 2017)</p>	- Transferência Extracelular de elétrons.
Cronoamperometria (CA)	<p>Um potencial constante é aplicado ao eletrodo de trabalho, e a corrente é medida em função do tempo (CHOUDHARY; JOTHI; NAGESWARAN, 2017)</p> <p>Mínimo e máximo de densidade de corrente obtida a partir do biofilme pode ser calculado com ajuda da CA sob um valor constante de potencial aplicado (KUMAR; KUMAR; BASU, 2019)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Produção bioeletrocatalítica; -Atividade elétrica no bioânodo; - Processo de formação do biofilme.
Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	A EIE fornece a resistência elétrica (impedância) da interface eletrodo/solução e permite determinar a resistência de polarização (região de baixa frequência), a capacitância de dupla camada elétrica e outros elementos que possam estar presente no sistema (TELEGDI; SHABAN; VASTAG, 2018)	<ul style="list-style-type: none"> - Capacitância de dupla camada; - Propriedades elétricas da interface eletrodo/biofilme; - Resistência de transferência de carga; - Resistência da solução.

Fonte: adaptada de Czerwińska-Główka:Krukiewicz (2020)

A formação de biofilme em sistemas eletroquímicos, como em células a combustível microbianas (CCMs) ou outros dispositivos bioeletroquímicos, pode ter diferentes potenciais anódicos dependendo dos microrganismos envolvidos, das condições ambientais e do tipo de eletrodo de referência utilizado. O biofilme em si pode atuar como um sistema redox, onde os microrganismos presentes desempenham papéis específicos na transferência de elétrons. Em

sistemas bioeletroquímicos, os microrganismos podem oxidar compostos orgânicos e transferir elétrons diretamente para o eletrodo anódico. A potencial anódica pode depender da atividade metabólica dos microrganismos, bem como da natureza do substrato orgânico utilizado como fonte de elétrons. Geralmente, a escala de potenciais anódicos em células de combustível microbianas varia de -0,2 V a +0,6 V (referenciado ao eletrodo padrão de hidrogênio), dependendo das condições específicas. No entanto, esses valores podem variar e são influenciados por fatores como o tipo de microrganismo, o tipo de substrato orgânico, a temperatura, o pH e outros fatores ambientais (YANG et al., 2019).

É importante notar que os valores exatos podem variar dependendo das condições experimentais específicas, e a obtenção de dados precisos pode exigir experimentos específicos em um sistema particular. O potencial anódico é uma característica crítica para otimizar o desempenho de dispositivos bioeletroquímicos e entender a dinâmica do biofilme envolvido. Estudos de Yang et al. (2019) demonstram que biofilmes formados por *Geobacter spp.* apresentaram respostas a potenciais anódicos, principalmente quanto às substâncias poliméricas extracelulares - EPS, sugerindo uma melhor performance na viabilidade de formação do biofilme e em atividades bioquímicas na faixa de potencial entre 0,4 – 0,6 V, isso quando comparados a potenciais menores -0,2 e 0 V, versus ao eletrodo de referência.

Assim, podemos afirmar que a cronoamperometria é uma técnica onde se aplica um potencial constante no eletrodo de trabalho, em relação a um determinado eletrodo de referência, em função de um determinado tempo. Assim, é possível estimular o crescimento e melhorar o processo de aderência do biofilme no eletrodo (PINTO; CORADIN; LABERTY-ROBERT, 2018).

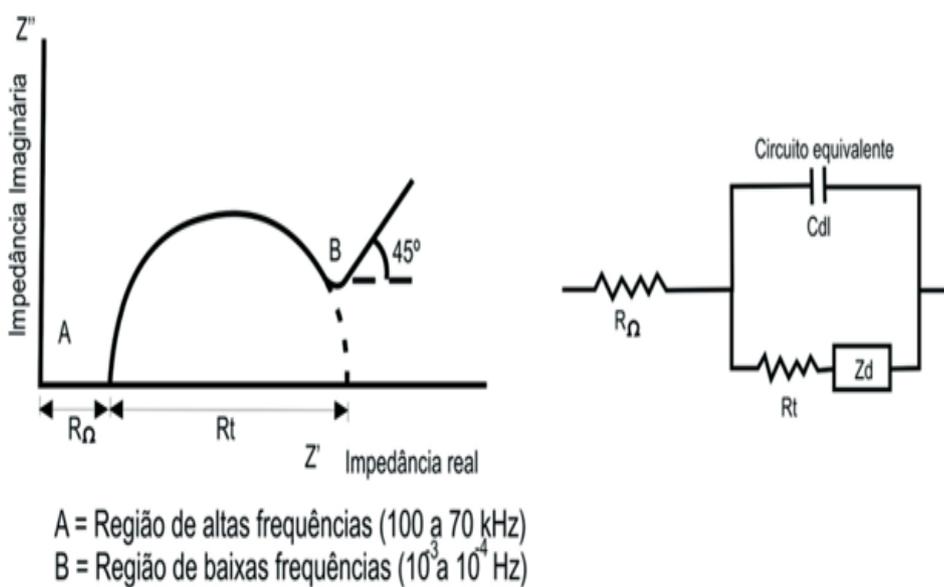
A técnica eletroquímica de cronoamperometria vem ganhando uma grande importância no estudo do biofilme, pois além de fornecer excelente dados para interpretação dos estudos é uma técnica não invasiva que pode ser facilmente utilizada.

Outra técnica muito utilizada para melhor compreender esse estudo é a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), onde normalmente os resultados são expressos em circuitos equivalentes através do diagrama de Nyquist (FARIA; SILVA; PAIVA, 2020).

Há diversos fatores que contribuem para um modelo de impedância, entre eles a resistência ôhmica (R_{Ω}) ou resistência da solução, refere-se a um conglomerado de resistências do coletor de corrente, do aglutinante, do eletrodo e do eletrólito, sendo a do eletrólito predominante, portando é muito dependente da concentração iônica (ISLAM; PARK; BALASINGAM, 2020).

Além da resistência ôhmica, tem-se a resistência de transferência de carga (R_t), que está relacionada à atividade catalíticas de uma superfície. No diagrama de Nyquist, Figura 4, está representada como diâmetro do semicírculo, sendo assim tendo uma eventual diminuição no diâmetro do semicírculo tem-se uma evidência de alterações na formação do biofilme e/ou do eletrodo (RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015).

Figura 4 - Diagrama de Nyquist e circuito equivalente



R_{Ω} , Resistência ôhmica e R_t , resistência de transferência de carga

Fonte: Adaptado de RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES (2015).

3.5 Indústria de Biodiesel e a Geração de Efluente

A energia é algo fundamental para a humanidade nos tempos atuais, e ela vem sendo essencial desde no início da revolução industrial, grande parte da energia utilizada no mundo, aproximadamente 88%, provém de recursos não renováveis, fósseis, sendo que 35% advêm do petróleo, 29% do carvão e 24% do gás natural, assim apenas 11% do consumo mundial de energia é derivado de fontes limpas como 5% da energia nuclear e 6% da energia provinda de hidroelétricas (LIN et al., 2018).

Preocupações a respeito da matriz energética começam a surgir pelo fato da escassez dos recursos fósseis, mas também pela preocupação ambiental, ou seja, os efeitos causados pelos combustíveis fósseis no meio ambiente. Deste modo, com a finalidade também de estar em harmonia com o meio ambiente e o ser humano, foi impulsionado o desenvolvimento de biocombustíveis, como uma rota alternativa (LIN et al., 2018).

No Brasil temos grandes vantagens quanto ao desenvolvimento e uso de biocombustíveis, pois é um país com muita biodiversidade e com grande geração de biomassa, sendo tão vasto que não sofreria impactos para produção alimentar (OLIVEIRA & RAMALHO, J., 2006).

No Brasil, a evolução no processo de produção de biodiesel foi marcado inicialmente marcado pelos incentivos governamentais, como o Plano Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB), e também a obrigatoriedade do uso do Biodiesel no Diesel, conforme ilustrado no Quadro 3 (PINHO; TEIXEIRA, 2016).

Quadro 3 - Marco histórico do Biocombustível no Brasil

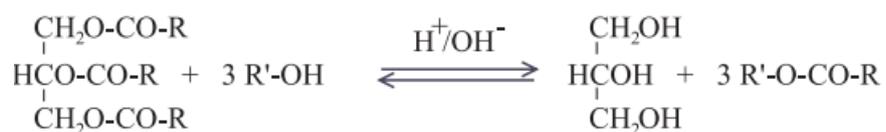
Ano	Evento
1920	Experiências pioneiras com combustíveis renováveis através do INT.
1930	Implantação de políticas voltadas para os biocombustíveis.
1948	Criação de incentivos à fabricação de álcool para uso em motores de combustão.
1970	Realização de pesquisas na Ceplac e IPT sobre geração de combustíveis a partir de óleos vegetais.
1975	Criação do Proálcool. Criação do Pró-Óleo.
1979	Produção de álcool hidratado, em substituição à gasolina
1983	Lançamento do Programa de Óleos Vegetais (Oveg).
1986	Encerramento da expansão do Proálcool, com retirada do subsídio ao álcool.
2003	Lançamento dos veículos com motores flexfuel e aumento da produção e o consumo do etanol hidratado.
2005	Criação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB).
2008	Início da obrigatoriedade de uso do B2.
2010	Início da obrigatoriedade de uso do B5
2014	Início da obrigatoriedade de uso do B6 e B7.

Fonte: Adaptado de PINHO; TEIXEIRA, 2016.

De acordo com o Diário Oficial da União, através da resolução nº 16 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), a partir de abril de 2023, a obrigatoriedade do uso de Biodiesel no Diesel passou de 10% para 12%, ou seja, há planos desse percentual ser cada vez maior e assim termos um aumento no uso da produção desse biocombustível.

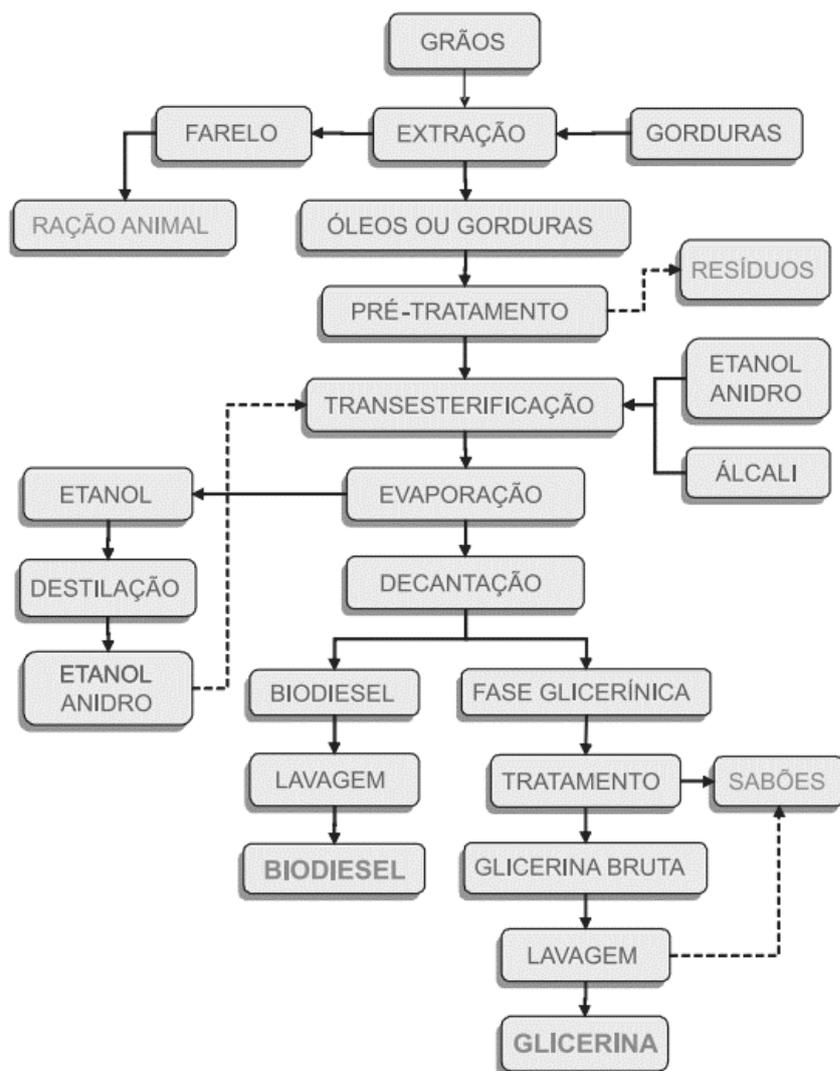
A produção de Biodiesel em grande maioria ocorre por reação de transesterificação via catálise em meio alcalino, é uma reação entre triglicerídeos (matriz oleoginosa) e álcool, formando ésteres e glicerol, pode-se notar esta transesterificação na reação 1. No processo de purificação do biodiesel para atender as especificações da legislação, é realiza uma etapa chamada de lavagem do biodiesel, cuja finalidade é neutralizar e retirar os resíduos da reação, tais como mono, di e triglicerídeos, ácidos graxos livres, glicerol, catalisador e sabões, todas as etapas do processo de produção do biodiesel pode ser compreendas através da Figura 5, fluxograma do processo de produção do biodiesel (HOLANDA; MACIEL; SANTOS, 2012).

Reação 1 - Reação de transesterificação do Biodiesel



Fonte: Adaptado de RAMOS et al. (2013).

Figura 5 - Fluxograma resumido do processo de produção do biodiesel a partir de matriz oleaginosa



Fonte: Adaptado de RAMOS *et al.*, 2013.

De acordo com DE BONI, L. A. B. et al. (2007), para a produção de 1 litro de biodiesel, gera-se 3 litros de água de lavagem, que é destinado como resíduo. Com a tendência de aumento da produção de biodiesel, tem-se uma grande preocupação quanto às características e tratamento desse efluente. Muitas indústrias reutilizam esse efluente no processo, mas chega um período que ocorre a saturação e o mesmo deve ser descartado. De acordo com fonte própria, 2023, o custo médio anual do tratamento e transporte do resíduo para 100 toneladas de efluente era de R\$ 430.000,00.

O tratamento de efluentes industriais é regulamentado pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), através da resolução nº430/2011, que indica padrões de qualidade para o descarte de águas residuais como especificações para as análises de temperatura, materiais sedimentados, solubilidade de substâncias em hexano, potencial hidrogeniônico (pH), Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) (BRASIL, 2011). O estudo de tratamento de efluente deriva da grande demanda da geração do mesmo e do custo para tratamento desse resíduo.

3.6 Importância das Análises de DBO e DQO no Processo de Tratamento de Efluentes

Como mencionado anteriormente a DQO e DBO, são parâmetros de especificação para descarte de efluentes industriais, ou seja, são métodos analíticos utilizados para avaliar o tratamento de um efluente pelo decréscimo da concentração de oxigênio dissolvido assim como também através concentração de matéria que é estabelecida pela concentração de oxigênio imprescindível para oxidação.

Para compreender melhor esses métodos analíticos em termos de definição temos:

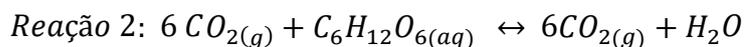
OD – Oxigênio Dissolvido: Trata-se de um parâmetro que indica concentração de oxigênio dissolvido em água pela razão de mg L^{-1} . A solubilidade do gás oxigênio em água é baixa, da ordem de $8,11 \text{ mgL}^{-1}$, para pressão de 1 atm e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, e a mesma ainda varia em relação à presença de sais dissolvidos (SILVA et al., 1997).

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio: É um método analítico que indica indiretamente a concentração de matéria orgânica biodegradável, ocorre pela respiração de microrganismos e é determinada pela demanda de oxigênio em sua respiração, o teste ocorre em temperatura constante de $20 \text{ }^\circ\text{C}$, cuja incubação é realizada por cinco dias, trata-se de um método estimativo, pois não leva alguns fatores reais do dia a dia, como exemplo a aeração, turbulência das águas e insolação. Efluentes industriais normalmente não possuem oxigênio suficiente e nem microrganismos, portanto é comum para análise de DBO, realizar diluição e inserir nutrientes e “semente”, sendo uma porção de microrganismo com DBO conhecida (SILVA et al., 1997).

De acordo com a legislação brasileira CONOMA nº 430 é obrigatório para as indústrias realizar análises para qualificar seus efluentes antes do descarte e certificar que exista quantidade mínima de oxigênio para não influenciar nos fluxos naturais ambientais dos corpos hídricos, nesta resolução é estimada que o processo remova um percentual mínimo de DBO, sendo ele de 60%.

De acordo com SPERLING (2007), na técnica de DBO é calculado através da decomposição da matéria orgânica pelos microrganismos presentes no meio e estes por sua vez

utilizam-se do oxigênio dissolvido para suas sínteses metabólicas como exemplificado na reação 2.



O método para análise de DBO é seguido conforme o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association (APHA). Inclusive para legislação brasileira de acordo com a portaria GM/MS nº 88, que se trata de parâmetros para qualidade de água para consumo humano, é obrigatório que os parâmetros sejam analisados conforme o método.

DQO – Demanda Química de Oxigênio: também funciona como um indicador de concentra da matéria orgânica tendo como base o oxigênio consumido necessário para oxidar a matéria orgânica, seja ela biodegradável ou não, é realizada em um meio ácido e por um oxidante forte, então ocorre reações energéticas. Assim como a DBO esse método apenas estima a concentração de oxigênio. A reação ocorre em temperatura próxima de 150 °C e em meio ácido, utilizando -se um oxidante forte (SILVA et al., 1997; APHA,2012).

Para determinar a concentração de Oxigênio é realizada leitura da amostra em espectrofotômetro, e estimado através do cálculo de uma curva de calibração conhecida de uma substância padrão (APHA, 2012). O cálculo para determinar a DQO pode ser interpretado pela equação 2 e a eficiência de redução através da equação 3.

$$\text{Equação 2: } DOQ(\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{\text{mg O}_2 \text{Volume final} \times 100}{\text{mL Amostra}}$$

$$\text{Equação 3: } \eta DQO = \left(\frac{DQO_{\text{Inicial}} - DQO_{\text{Final}}}{DQO_{\text{Inicial}}} \right) \times 100$$

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Metodologia

A metodologia de desenvolvimento desse trabalho seguiu as premissas do método científico hipotético-dedutivo, onde iniciou-se com a observação, como já apresentado sobre a necessidade de inovações em materiais de eletrodos em tecnologias microbianas para tratamento de efluentes industriais; Prosseguiu-se pelo levantamento de hipóteses; planejamento e execução dos experimentos para confirmar as hipóteses; realizou-se análise críticas dos resultados à luz do conhecimento atual e por final foi realizada uma conclusão embasada nos resultados e estimado sugestões para continuação do trabalho.

O plano de execução do projeto foi elaborado considerando uma sequência coordenada de seis atividades visando otimizar o trabalho e atingir os objetivos do projeto de acordo com o tempo de execução. Estas atividades compreendem o levantamento bibliográfico, a caracterização físico-química, a montagem do dispositivo eletroquímico, os testes do anodo eletro ativado, o tratamento analítico dos resultados e a redação dessa dissertação.

4.2 Procedimentos

4.2.1 Efluente: A coleta e caracterização

O efluente utilizado nesse estudo como substrato é derivado de processos da indústria de processamento de biodiesel, pertencente ao município de Porto Real – RJ, este é composto basicamente de água de lavagem do éster biodiesel, obtido em síntese de transesterificação. Foram realizadas coletas do efluente bruto, sem nenhum tipo de pré-tratamento, ao todo foram

realizadas coletas de aproximadamente 10 L, a mesma foi armazenada sob refrigeração a 4 °C a fim de se evitar degradação.

Realizou-se uma bateria de análises para caracterizar o efluente, conforme Tabela 1. O efluente proveniente da lavagem de biodiesel é altamente rico em carga orgânica, devido a alta concentração de DBO e DQO. Além disso, um outro parâmetro importante para esse trabalho foi analisar o pH, naturalmente como o processo de lavagem do biodiesel é em grande maioria uma lavagem ácida, o pH do efluente é levemente ácido, $5,05 \pm 0,0141$, porém de acordo com VELJKOVIĆ; STAMENKOVIĆ; TASIĆ (2014) o melhor meio de crescimento para *Shewanella* é pH neutro, deste modo o efluente foi ajustado para um pH neutro, meio de crescimento ideal para desenvolvimento do biofilme, sendo assim as chances de maturação se tornam mais evidentes. As análises de DBO e DQO seguiram as metodologias 5210B(5-Day BOD Test) e 5220C (Closed Reflux, Titrimetric Method) do Standard Methods for analysis for water and wastewater (SMWW), respectivamente (APHA, 2012).

Tabela 1 - Resultados físico-químicos da caracterização do efluente

Análise	Resultado
DBO (mg/L)	$10.652 \pm 230,5$
DQO Total (mg/L)	$313.960 \pm 6.126,37$
DQO Solúvel (mg/L)	$290.905 \pm 4.714,9$
Condutividade ($\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$)	$52,4 \pm 0,0136$
pH Efluente Bruto	$5,05 \pm 0,0141$
pH Efluente Ajustado	$7,03 \pm 0,0098$

Fonte: Própria autora (2023)

4.2.2 Preparação do Biofilme e condições de crescimento e inoculação na *Luffa cylindrica*

O microrganismo utilizado para esse estudo foi uma cepa da bactéria *Shewanella amazonensis* (ATCC® 700329TM), cepa da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). A cepa foi ativada em meio Luria Bertani (LB) e incubada a $37 \pm 0,1$ °C, em atmosfera aeróbica de acordo com as instruções do fornecedor.

Durante o preparo do experimento foi necessário tomar alguns cuidados, como autoclavar todos os materiais a serem manipulados a fim de não existir presença de fungos, foi utilizada uma autoclave vertical (CS Primatec).

Os pré-inóculos da cultura de *S. amazonensis*, foram padronizados com concentração de 5×10^5 UFC/mL e dispersados em ágar impregnado na superfície da bucha vegetal.

O meio desidratado conhecido como Ágar Luria Bertani, quando transformado em estado líquido, proporciona os nutrientes essenciais para a manutenção dos microrganismos. Este meio é caracterizado como um biopolímero e, neste estudo específico, desempenhou o papel de envolver as fibras da bucha vegetal (SELVALAKSHMI, et al., 2017). Adicionalmente, foram incorporadas quantidades de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) visando a garantia da condutividade inicial, conforme descrito a seguir.

O procedimento envolveu a adição de 8,0 g de Ágar Luria Bertani, 2,0 g de glicose e 1,0 g de cloreto de magnésio a um béquer de 250 mL. Esses reagentes foram diluídos em 200 mL de água destilada e a solução foi aquecida sob agitação magnética até a completa dissolução. A inclusão do sal iônico, cloreto de magnésio, foi crucial para garantir a condutividade inicial ao eletrodo vegetal, um requisito necessário para o estímulo elétrico da *S. amazonensis*.

Em um segundo recipiente de 250 mL, preparou-se um meio nutritivo contendo 2,5 g de primatone, 2,5 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,25 g de extrato de carne e 250 mL de água destilada. Esse caldo nutritivo foi adicionado às células contendo presença bacteriana, estabelecendo um ambiente propício para o crescimento bacteriano. Essa solução nutritiva permaneceu nas células durante todo o período de estimulação pela técnica cronoamperometria.

As células, o caldo nutritivo e o ágar foram esterilizados por 15 minutos em autoclave a 120 °C. Essa esterilização foi realizada para assegurar a ausência de microrganismos endógenos que pudessem comprometer a integridade da cepa isolada (*S. Amazonensis*).

4.2.3 Preparação do reator e do eletrodo

Neste projeto foi empregada uma célula eletroquímica de 3 eletrodos, sendo a fibra de *L. cylindrica* com o biofilme o eletrodo de trabalho, o eletrodo Ag/AgCl o eletrodo de referência e uma espiral de platina como o eletrodo auxiliar. Para avaliação da fibra como anodo, padronizou-se o peso da mesma para cada reator de $4g \pm 0,5$ além disso utilizou-se de técnicas eletroquímicas convencionais, tais como voltametria, medir a voltagem em circuito aberto e circuito fechado, cronoamperometria, e técnicas eletroquímicas avançadas com a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), especialmente para determinar separadamente os processos faradaicos e não-faradaicos (HOAREAU et al., 2019). A capacidade de o biofilme degradar efluente com alta carga orgânica também foi testada utilizando como substrato efluente da produção de biodiesel.

Na cabina de segurança biológica, após a esterilização integral de todos os materiais, as buchas vegetais foram submergidas no Ágar Luria Bertani em seu estado líquido. Decorridos aproximadamente cinco minutos, constatou-se a impregnação do Ágar ao redor das fibras da bucha vegetal, as quais foram, então, restituídas aos seus respectivos béqueres.

Cada vez que uma batelada era iniciada, três reatores eram preparados para o experimento. Cada reator tinha propósitos distintos, sendo previamente designados da seguinte maneira: a) Reator com estimulação: Neste, ocorria a inoculação do microrganismo eletroativo, juntamente com a aplicação da técnica eletroquímica cronoamperometria. b) Reator sem estimulação: Era apenas inoculado com o microrganismo eletroativo de interesse. c) Reator controle: Não tinha inoculação do microrganismo, sendo utilizado para estudar os processos eletroquímicos, analisando apenas o desempenho dos possíveis endógenos já presentes na bucha vegetal e/ou no efluente.

4.2.4 Método analítico bioeletroquímico

Após a inoculação, as células eletroquímicas (reatores) foram seladas com parafilme. Nos reatores identificados, tanto com quanto sem estimulação, foram feitos três furos para facilitar a entrada dos eletrodos. Os três eletrodos utilizados foram: a bucha vegetal, um eletrodo de referência do tipo Ag/AgCl e um contra-eletrodo composto por um fio de Pt. As três células foram mantidas a 37 °C em uma estufa. A estimulação, realizada por meio da técnica de cronoamperometria, teve início imediatamente após a inoculação e foi aplicada apenas ao reator designado como "com estímulo". Nessa fase, um potencial constante de +0,5 V em relação a Ag/AgCl foi aplicado continuamente por 12 horas utilizando um potenciostato Modulab Electrochemical System (Solartron Analytical, Farnborough, Reino Unido). Após esse período, o meio nutritivo foi removido dos reatores, sendo substituído pela água residual do biodiesel, marcando o início do tempo de tratamento.

Efetuaram-se medidas de impedância nas células ao longo de todos os dias do experimento, excluindo-se a célula designada para controle, na qual não se procedeu à inoculação de biofilmes nem à condução de qualquer análise eletroquímica. Amostras de 25 mL foram extraídas de cada um dos três reatores a cada intervalo de 24 horas de tratamento.

O equipamento utilizado para as análises de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi o Modulab Electrochemical System, fornecido pela Solartron Analytical, situada em Farnborough, Reino Unido. Este potenciostato foi acoplado ao módulo FRA, permitindo uma variação de frequência de 100 kHz a 5 mHz durante os ensaios, com uma amplitude constante de 10 mV. Para gerar as curvas no plano complexo e facilitar a análise dos processos na interface entre o eletrodo e o biofilme, utilizou-se o software Zview da Scribners Associates, com sede em Southern Pines, NC.

Ao término do período de tratamento de 72 horas, procedeu-se à realização das análises de pH, condutividade, DBO e DQO. Cabe salientar que as técnicas empregadas para a determinação da DQO e DBO pautaram-se nos métodos 5210B e 5220D, conforme preconizado no Standard Methods for Analysis for Water and Wastewater. As análises de DBO foram conduzidas mediante a abordagem respirométrica, utilizando o equipamento Modelo System 6

(VELP Scientifica, sediada em Usmate, Itália). Adicionalmente, procedeu-se à mensuração da condutividade e do pH das amostras.

4.2.5 Análise dos dados

Para realizar a análise estatística dos dados analíticos, foi empregado o software SISVAR (FERREIRA, 2011). Inicialmente, verificou-se se a distribuição dos dados coletados seguia uma distribuição normal. Em outras palavras, os dados de DQO e DBO foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk. A normalidade dos testes é crucial para prosseguir com a análise estatística das concentrações obtidas no tratamento do efluente. Com um valor de $p > 0,05$, concluímos que os dados obtidos neste experimento seguem uma distribuição normal. Também foi utilizado o auxílio do software, PAST (HAMMER et al, 2011) para realização da análise de componentes principais (PCA, sigla do inglês, Principal Component Analysis).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Esquematização dos Testes Experimentais

Antes de iniciar os procedimentos, foi analisado o melhor cenário para montagem dos reatores de estudo, então teve-se como inspiração um eletrodo comercial de carbono, conforme a Figura 6, deste modo montou-se um método para manter o mesmo padrão de montagem em todos os reatores, para alcançar uma maior superfície da bucha, determinou-se utilizar uma ponta da mesma para que a garra tenha melhor dissipação do potencial, sobre os microrganismos, assim conectou-se a garra a bucha, conforme Figura 7. A montagem final dos reatores pode ser visualizada conforme Figura 8.

Figura 6 - Comparação entre eletrodo construído com a bucha vegetal (Esquerda) e o Eletrodo Comercial de Carbono (direita)



Fonte: Própria autora, 2023.

Figura 7 - Montagem do Eletrodo de bucha vegetal



Fonte: Própria autora, 2023.

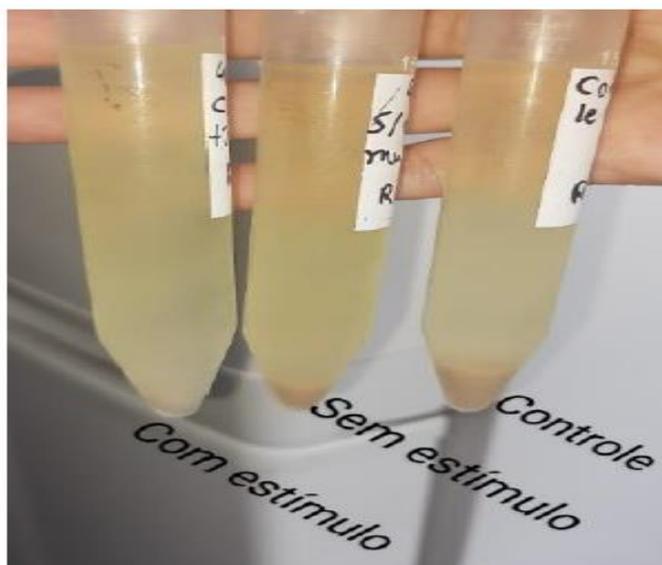
Figura 8 - Montagem dos Reatores



Fonte: Própria autora, 2023.

Ao início do tratamento com o efluente, observou-se que uma diferença visível na coleta das amostras de 24h, cujo a presença de sólidos decantados no reator estimulado eletronicamente em relação dos demais, vale ressaltar que todas as amostras foram coletadas de maneira padrão, sendo somente o sobrenadante do reator, a Figura 9 nos demonstra a diferença entre os sólidos da coleta de 24 h.

Figura 9 - Coleta nas primeiras 24h de tratamento



Fonte: Própria autora, 2023.

5.2 Análise do Desempenho Eletroquímico

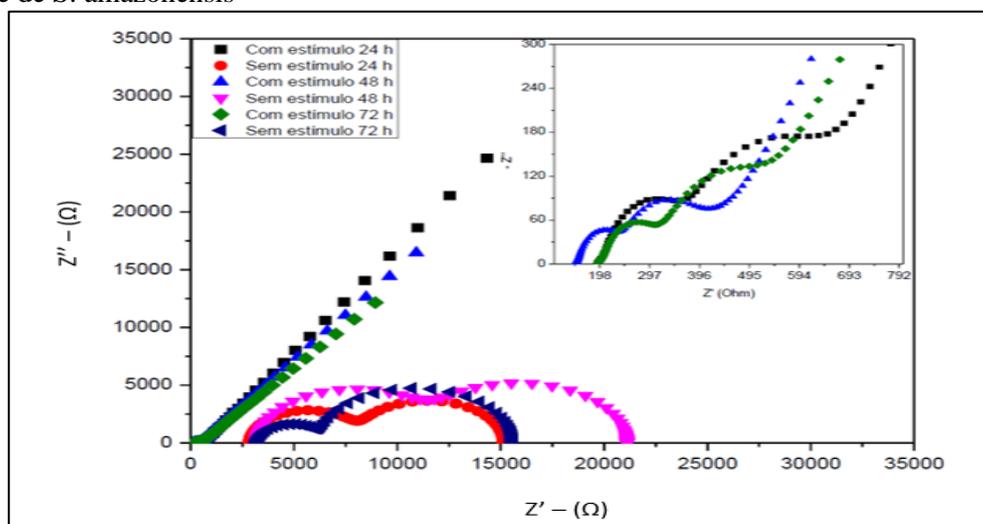
O processo de estimulação para crescimento do biofilme foi planejado para utilizar a técnica de cronoamperometria aplicando um potencial de 0,5 V por 12 h, no eletrodo elaborado com bucha vegetal em comparação ao eletrodo de referência de Ag/AgCl.

Já as análises de comparação do desempenho eletroquímico entre o reator estimulado e não estimulado, deu-se por meio da técnica de EIS. Na Figura 10, ilustrando o diagrama de Nyquist, podemos observar que as curvas para o reator com estímulo e sem estímulo em tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas são bem distintos. Em todos os tempos de tratamento, o

reator sem estímulo apresenta dois semicírculos com diâmetros diferentes. Há um pequeno aumento da resistência da solução conforme aumenta-se o tempo de tratamento, mostrado na região de alta frequência. Este comportamento pode estar relacionado ao aumento de biofilme durante o tratamento (LOGAN et al., 2006). Por outro lado, a resistência de transferência de carga maior se deu após 48 h de tratamento, a menor apenas após 24 h de tratamento e ao final de 72 h de tratamento o sistema apresentou uma resistência de transferência de carga próxima ao valor obtido após 24 h de tratamento. Este resultado, em princípio, é incomum, porém pode estar ligado ao fenômeno de bioincrustação (YANG et al., 2018). Assim sendo, o sistema precisa de estudos mais aprofundados para compreendê-lo melhor.

Para o tratamento onde se aplicou estímulo através da cronoamperometria, observa-se que após os dois semicírculos segue-se uma reta linear crescente. De acordo com o diagrama de Nyquist essa característica é provocada por elementos difusionais no reator, conhecida como impedância de Warburg resistência por difusão) (SEKAR; RAMASAMY, 2013). Deste modo temos que no reator estimulado há a possibilidade, através do meio eletrolítico processos de transferências de íons e/ou moléculas (espécies eletroativas). Esse comportamento relaciona-se à presença do biofilme na superfície da bucha, material de anodico (MIN et al., 2017). Por outro lado, este fenômeno não pode ser observado nos diagramas dos reatores que não tiveram o estímulo elétrico, sugerindo que neste não houve a formação de biofilme com espessura suficiente para provocar a difusão (OLIVEIRA et al, 2009).

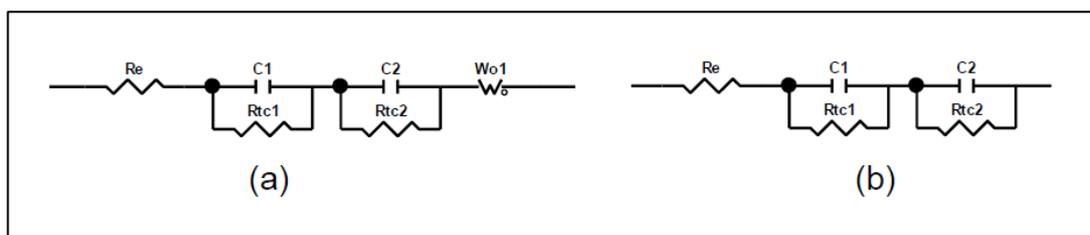
Figura 10 - Diagrama de Nyquist para teste experimental com o eletrodo de bucha vegetal e biofilme de *S. amazonensis*



Fonte: Própria autora, 2023

Para se determinar os valores dos elementos apresentados no diagrama de impedância é realizada ajuste mediante a comparação com circuitos equivalentes que simulam a interface do sistema. A Figura 11 mostra dois circuitos equivalentes utilizados para se fazer o ajuste dos diagramas obtidos nos reatores. O diagrama do reator com estímulo se ajustou a dois circuitos RC em série seguido do componente de difusão $Wo1$ (elemento de Warburg), enquanto que o reator sem estímulo se ajustou apenas aos dois circuitos RC.

Figura 11 - Circuitos gerados para reator com estímulo (a) e reator sem estímulo (b)



Fonte: Adaptado de Zview (2023).

Nos resultados obtidos, nota-se que a resistência ôhmica do reator estimulado foi expressivamente menor em relação ao sem estímulo, com estímulo obteve-se valores de R_s aproximadamente de $191,6 \Omega$, já para o sem estímulo obteve-se valores de 2872Ω , ou seja, diferença de aproximadamente 15 vezes, sendo assim, pode-se ter como base que o reator estimulado foi favorável em termos de resistência ôhmica em relação ao reator sem estímulo de acordo com a análise de EIS.

No diagrama de Nyquist pode-se observar que os ensaios para eletrodos polimerizados apresentam dois semicírculos, sendo o primeiro, R_{tc1} , resistência provinda da interface eletrodo/biofilme, já o segundo semicírculo R_{tc2} , provém da interface polímero/solução, dados teóricos de acordo com JOHNSON, B.W. et al., 1994. Assim sendo nas primeiras 24 h de tratamento para o reator estimulado obteve-se um R_{tc1} de $112,2 \Omega$, ou seja, para a camada eletrodo / biofilme, já o R_{tc2} , biofilme / solução o resultado foi de $173,6 \Omega$, resultados bem significativos quando se compara aos resultados do reator sem estímulo $R_{tc1} 5250 \Omega$ e $R_{tc2} 8104 \Omega$.

Já nas 48h de tratamento o resultado foi mais satisfatório ainda, pois apresentou melhor desempenho, $R_s 147,7$, R_{tc1} de $62,54 \Omega$ e R_{tc2} de $103,2 \Omega$. Ou seja, nesse período de tratamento obteve-se maior fluxo de troca iônica entre o eletrodo (bucha vegetal) com o meio.

Já em relação ao tratamento após 72h, observou-se uma queda de resistência do sistema, levando a compreender que houve uma perda de eficiência, R_s 190,4 Ω , R_{tc1} 71,73 Ω e R_{tc2} de 125,7 Ω , no entanto, mesmo perdendo a eficiência em relação as 48h de tratamento esses resultados mostram superioridade em relação ao reator não estimulado, R_{tc1} de 8356 Ω e R_{tc2} de 9541 Ω . A performance do reator estimulado, com baixos valores de R_{tc} é um indicativo de que o biofilme no eletrodo pode ter se desenvolvido mais rapidamente, em relação ao não estimulado. Este resultado é similar ao relatado por Jung (2014), cujo o diagrama de Nyquist apresentou uma morfologia similar a desta pesquisa e quando observado em ânodos incorporado por biofilmes de *G. sulfurreducens*.

5.3 Avaliação do Tratamento Através de Análises de DBO e DQO

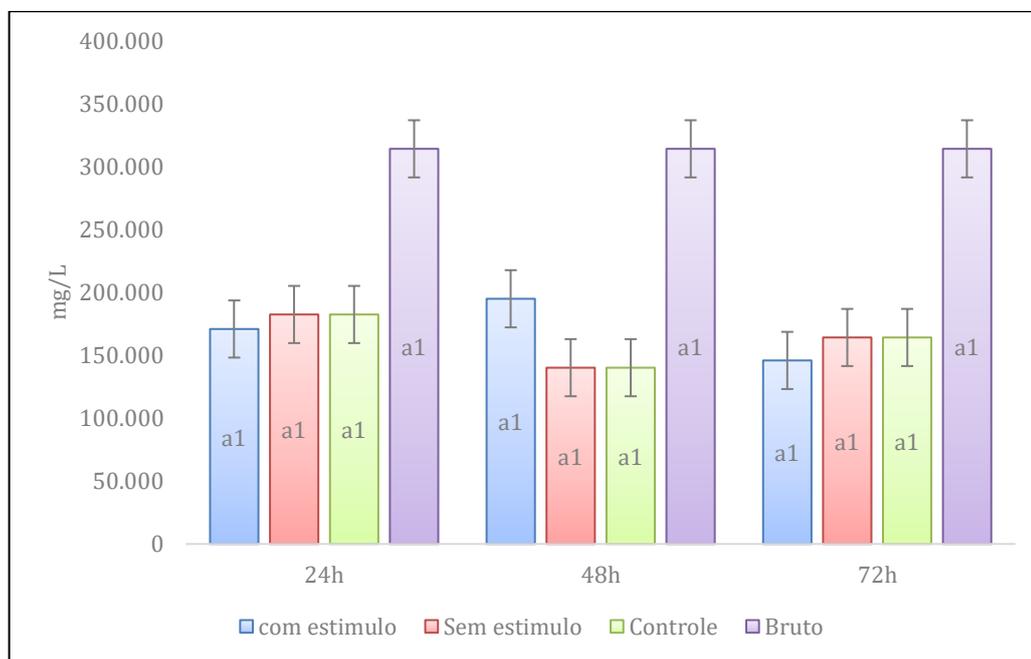
Para se avaliar o tratamento do efluente nos diferentes reatores, com estímulo eletroquímico, sem estímulo eletroquímico e controle, teve-se como base dois parâmetros de análise, a DQO e a DBO. Realizou-se triplicata das análises e os resultados foram tratados com teste estatísticos, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Após detectar a normalidade dos testes, realizou-se Análise de Variância, ANOVA, e teste de Tukey com nível de significância de 5%, assim obteve-se os resultados representados das médias experimentais nos gráficos abaixo. Em relação ao Coeficiente de variação dos dados temos um resultado de 23,85 % para DQO total, 31,61% para DQO solúvel e 4,24% para os dados de DBO. De acordo com os critérios de Pimentel Gomes & Couto (1985), os valores obtidos no coeficiente de variação para os dados de DQO total e DQO solúvel, são considerados relativamente altos, o que indica que houve uma variabilidade nas amostras e certa imprecisão nos dados.

Em relação ao teste de Tukey para os dados de DQO total, o pvalor foi de 0,6408, ou seja, maior que 0,05 indicando que não houve diferença significativa entre as médias estatisticamente, conforme demonstrativo pela Figura 12, todos os resultados obtiveram se comportaram como α_1 , no entanto, quando se observa em relação os três reatores dentro do

mesmo período de tempo é perceptível uma diferença no tratamento do reator estimulado para os demais, sendo mais eficiente no mesmo período de tempo.

Figura 12 - Resultados obtidos de DQO total

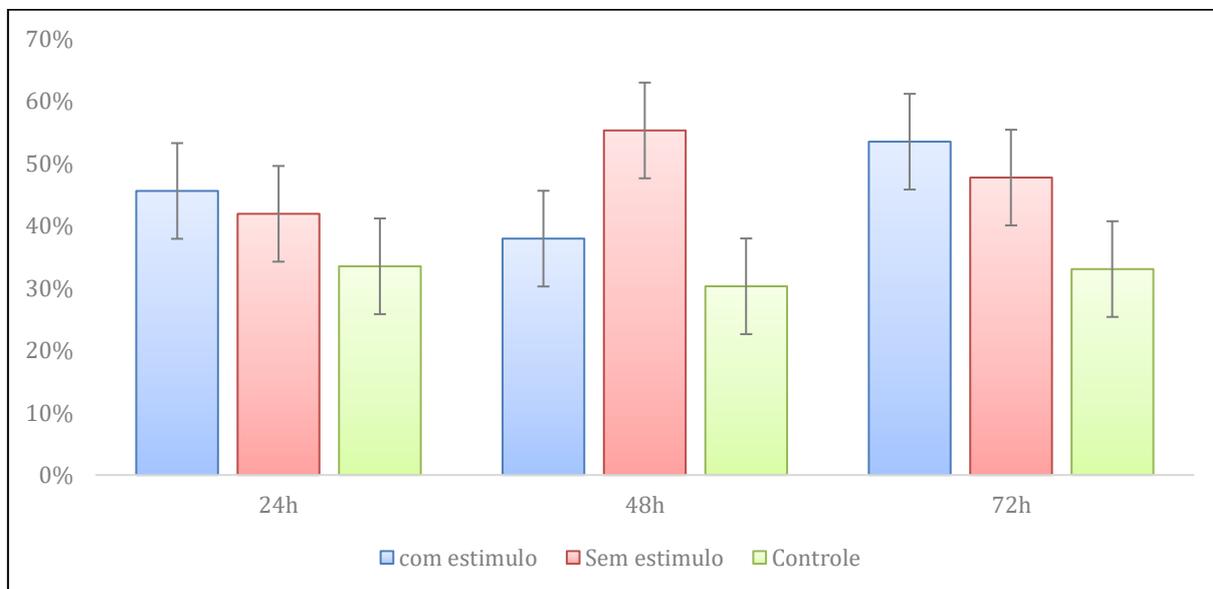


Fonte: Própria autora, 2023.

A redução da matéria orgânica na CCM ao longo do tempo é registrada em termos de eficiência de remoção. Tal eficiência é calculada mediante a consideração das concentrações inicial e final do processo (AHN; LOGAN, 2012). Assim sendo, a partir dos dados obtidos de redução de DQO total, calculou-se a eficiência de redução, onde pode-se observar que nas primeiras 24h de tratamento houve redução de DQO de quase 50% em relação ao efluente bruto e esse valor chega a ser maior, aproximadamente 60% nas 72h de tratamento, ou seja, não se tem indicação de um melhor tratamento estatístico em relação a Demanda Química de Oxigênio Total, mas é possível analisar e verificar que o reator estimulado possui uma tendência de tratamento positiva. Esses resultados podem ser comparados com os estudos de Sukkasem Laehlah (2013), cujo analisaram a eficiência da remoção de DQO de um efluente da indústria de biodiesel, através de uma CCM, e obtiveram resultados de remoção máxima de 67%.

Outro fator importante observado na figura 13 é que em ambos os tempos de tratamento os reatores contendo a *S. amazonensis*, obtiveram melhor resultado de redução de DQO total, em relação ao reator “Controle”, que continha apenas a bucha vegetal e endógenos.

Figura 13 - Remoção de DQO total



Fonte: Própria autora, 2023.

Em relação a DQO Solúvel obtivemos um comportamento do efluente bem parecido com o descrito acima, não houve diferenças significativas estatisticamente conforme a Figura 14, foram encontrados médias equivalentes com resultados a1 obtidos para todos os tratamentos.

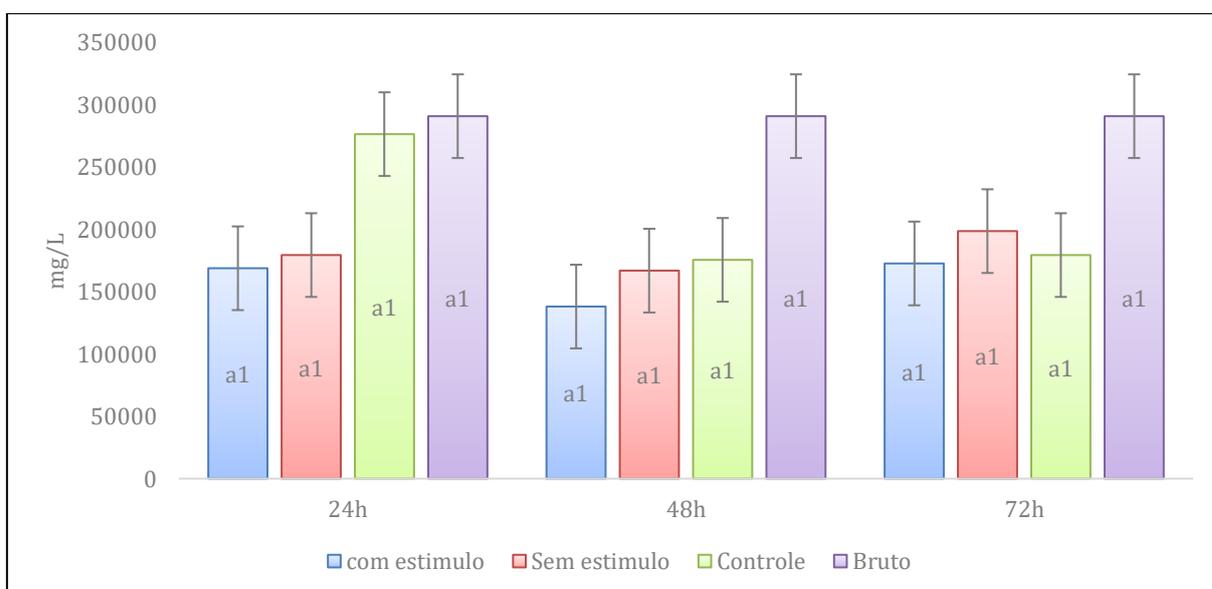
Contudo, analisando a DQO solúvel através da Figura 14, graficamente, é possível observar que mesmos não obtendo medias significativas estatisticamente, o tratamento nas 48h foi bem eficiente, tendo uma baixa demanda química de oxigênio do reator com biofilme estimulado, em relação ao reator sem estímulo e controle e efluente bruto.

A redução da Demanda Química de Oxigênio (DQO) de uma CCM pode estar associada a diversos fatores, como o desenvolvimento dos microrganismos com produção de energia, o crescimento de microrganismos aeróbios devido à difusão de oxigênio no meio reacional, a área específica dos eletrodos, entre outros. Para indústrias como as de biodiesel, cuja a vazão é superior a 3,5m³/dia, temos a diretriz do INEA para o estado do Rio de Janeiro, a DZ 205.R06 limita que a concentração de DQO do efluente tratado seja de 250 mg/L ou de 5,0 kg/dia.

Sendo assim quando se compara aos resultados obtidos nesse presente estudo, os valores ainda estão fora do limite para descarte, mas tem-se resultados bem propícios para que seja realizado outros tratamentos de remoção de DQO (INEA, 2007).

Contudo os resultados obtidos se sobressaem em comparação aos estudos de Kelly e He (2014), cujo empregaram um efluente de elevada carga orgânica como substrato em uma CCM, sendo inoculada com lodo biológico proveniente de uma estação de tratamento de esgoto. Após 13 dias, observou-se uma redução de 54,9% na DQO para a célula, com uma concentração inicial de 16485 mgO₂/L

Figura 14 - Resultados obtidos da DQO Solúvel



Fonte: Própria autora, 2023.

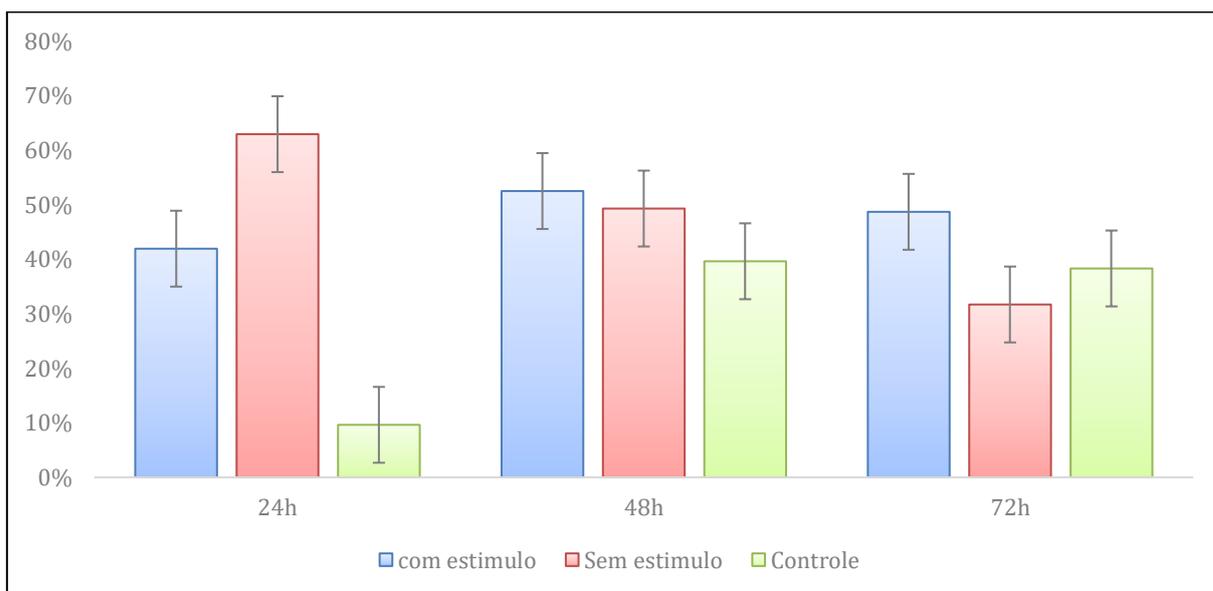
De acordo com a Figura 15 a remoção de DQO solúvel, comprova-se que nas 48h de tratamento houve uma redução de mais de 50% em relação ao efluente bruto. Alguns Estudos realizados em relação de redução de DQO, temos dois casos importantes para o meio acadêmico, o primeiro foi um estudo cujo o intuito era analisar temperatura e tempo de reação na remoção de DQO, o melhor resultado obtido de eficiência na remoção foi entre 43,8 e 44,3% de acordo com PEREIRA, et al. (2017).

Similar a uma pesquisa que investigou a eficiência da remoção de DQO, utilizando tratamento com o microrganismo *Rhodococcus opacus*, seguindo de etapas de microfiltração

por filtro de cerâmica, os autores obtiveram resultado de remoção de 56,8% de DQO para um efluente provindo de indústria láctea (GOSWAMI et al., 2019).

Ou seja, esse experimento mostrou-se que o uso da *S. amazonensis* apresentou grandes resultado, principalmente a estimulação do biofilme, pois o tempo de resposta foi menor em relação ao sem estímulo, pois obteve-se resultados próximos e superiores aos encontrados na literatura.

Figura 15 - Remoção de DQO Solúvel



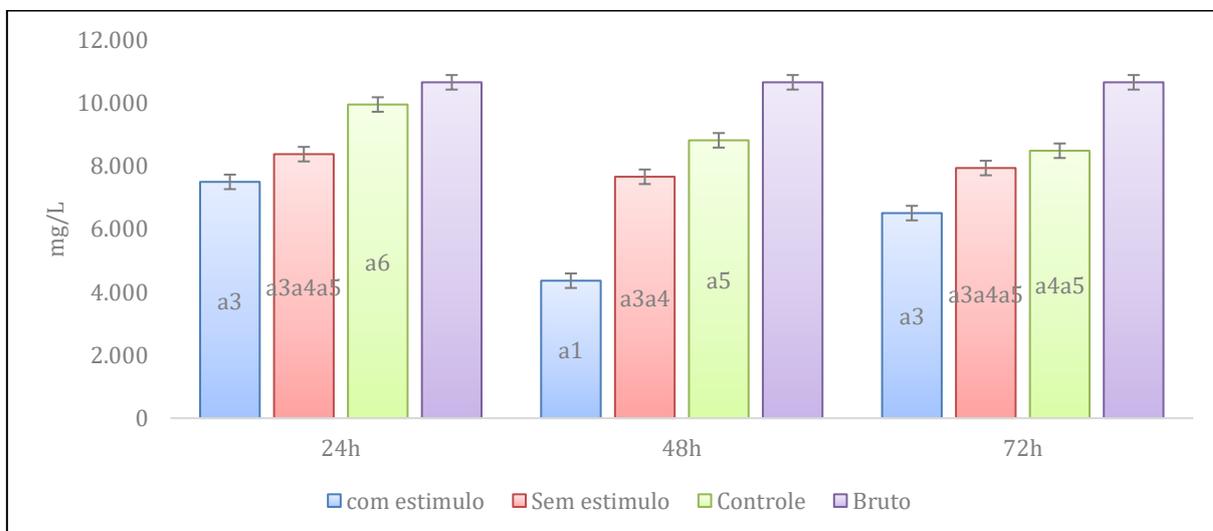
Fonte: Própria Autora, 2023.

Em relação ao outro parâmetro de análise do tratamento do efluente, a Demanda Bioquímica de Oxigênio, temos que os resultados também seguiram os mesmos padrões estatísticos, ao realizar o teste de Tukey ao nível de significância de 5% obteve-se um pValor de 0,01, ou seja, menor que 0,05, o que indica que estatisticamente um tratamento se diferenciou dos demais, tal fato pode ser melhor analisado a partir da Figura 16, cuja a representação das médias é dado pela diferença das letras.

De acordo com os dados obtidos estatisticamente e de acordo com o gráfico (e) tem-se que o tratamento de 48h com estímulo demonstrou-se ser o tratamento mais indicado, pois

apresentou-se o menor resultado de DBO, destacando-se significativamente entre as demais médias.

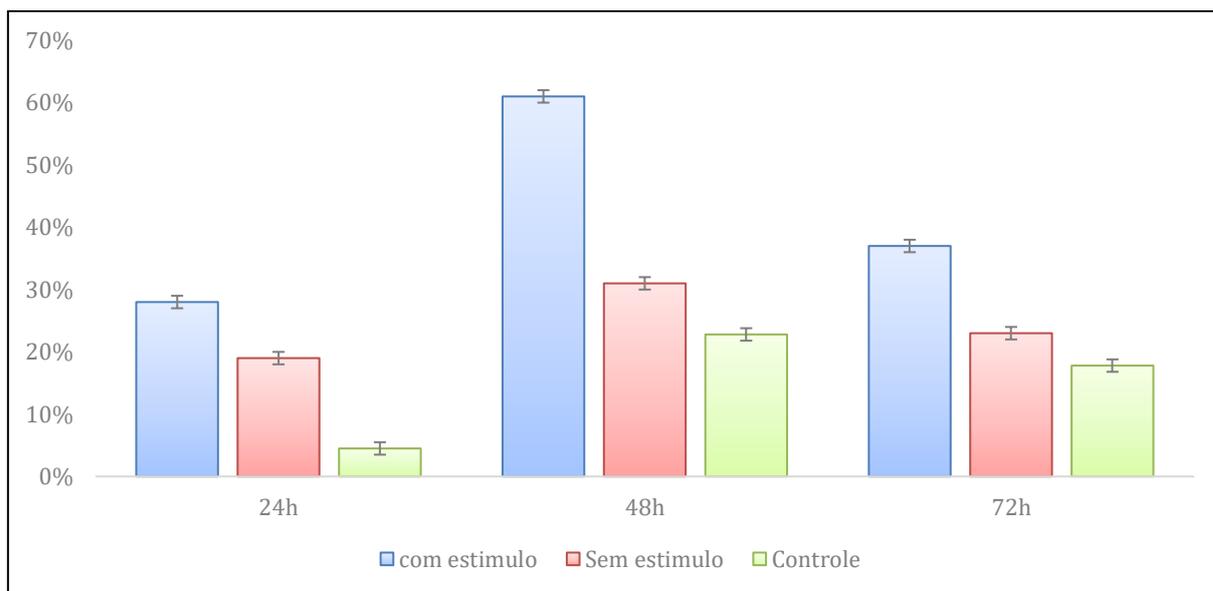
Figura 16 - Resultados obtidos de DBO



Fonte: Própria autora, 2023.

Como já esperado, analisando a Figura 17, obteve-se que o reator estimulado nas 48h de tratamento, apresentou uma redução na DBO de aproximadamente 60%, fato muito significativo ao trabalho, pois a exigência da resolução CONAMA em relação a DBO que seja removido mínimo de 60% de DBO para que seja considerado um bom tratamento e descarte do mesmo.

Figura 17 - Remoção de DBO



Fonte: Própria Autora, 2023.

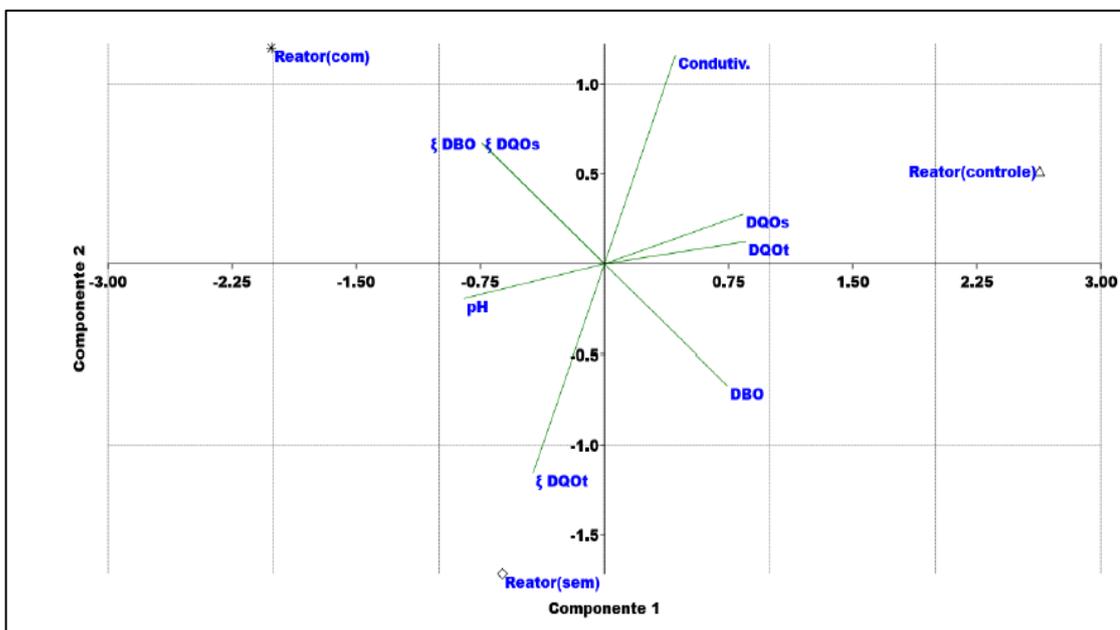
De acordo com Mozaffarikhah et al. (2017), foi estudado a remoção de DBO de efluente de biodiesel utilizando membrana (TW30, NE90 and NE70), através de nanofiltração, resultados obtidos de que a membrana TW30, sob o controle de alguns parâmetros operacionais, mostrou que foi possível atingir 85,6% de eficiência de redução de DBO, quando se compara a presente pesquisa com os estudos de Mozaffarikhah et al, 2013, temos que para um efluente com alta carga orgânica inicial e utilizando de meios alternativos e ecológicos, tem-se um resultado muito favorável ambientalmente, principalmente quando se comparado com a legislação .

A Demanda Bioquímica de Oxigênio apresenta resultados superiores à Demanda Química de Oxigênio está associada aos estímulos eletroquímicos. Esses estímulos favorecem o crescimento do biofilme microbiano, estabelecendo, assim, uma relação direta com o desenvolvimento das bactérias, o que, por sua vez, promove o consumo biológico de oxigênio (PEREIRA, 2004).

Para outros parâmetros químicos, foi realizado teste das variantes de pH e condutividade e ambos apresentaram resultados dentro da normalidade nenhum desvio de média e variância. Por fim para se ter um parâmetro comparativo entre as análises realizadas, foi submetido o teste de Análise dos Componentes Principais (PCA), este estudo é uma técnica estatístico que

possibilita reduzir a complexidade de conjunto de dados multivariados, relacionando os componentes presentes, o resultado desse trabalho aplicado ao PCA pode ser analisado na Figura 18.

Figura 18 - Análise de correlação entre amostras - PCA



Fonte: Própria Autora, 2023.

Obteve-se resultado da variância de PC igual a 70,94% o que indica que a maioria dos parâmetros que foram testados se correlacionam ao eixo do componente 1, o resultado do PC2 a variância foi de 29%.

No reator com estímulo temos que os parâmetros de DQO solúvel e DBO se correlacionam, o reator controle está posicionado na direção oposta o que indica que não há correlação. Assim também observa-se que o reator sem estímulo está localizado oposto aos demais, ou seja, pela análise de PCA, os reatores são diferentes entre si. Todos os dados foram representados pela Tabela 2, indicando os valores para cada eixo PC1 e PC2.

Tabela 2 - Resultado gerado de cada coeficiente - PCA

Parâmetros	PC1 (Com estímulo)	PC2 (Sem estímulo)
DQO Solúvel	0,41077	0,13512
DQO Total	0,41797	0,060646
pH	-0,41547	-0,093677
Condutividade	0,20951	0,56831
DBO	0,36315	-0,32894
ξDQO Solúvel	-0,21151	-0,5665
ξDQO Total	-0,36272	0,33012
Ξdbo	-0,36315	0,32894

Fonte: Própria autora, 2023.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, é possível inferir que a estimulação eletroquímica da bucha vegetal funcionalizada, empregada como ânodo e incorporando microrganismos eletroativos, apresenta um notável potencial para otimizar a eficiência do tratamento do efluente decorrente do processo de lavagem do biodiesel. A funcionalização do ânodo foi lograda mediante uma sequência de procedimentos, que incluiu a construção de uma conexão do ânodo com o meio externo mediante a aplicação de uma fina camada de cola condutora na extremidade da bucha vegetal. Adicionalmente, a referida bucha foi revestida com uma camada de ágar Luria Bertani, estabelecendo um ambiente propício para o crescimento do biofilme de *S. amazonensis*.

A análise da técnica de cronoamperometria em um dos reatores, com o objetivo de acelerar a formação do biofilme no ânodo, foi conduzida por meio do diagrama de Nyquist obtido através da espectroscopia de impedância. Os resultados indicaram um desenvolvimento avançado do biofilme no reator estimulado, caracterizado por uma resistência (R_s) de aproximadamente $191,6 \Omega$, enquanto o reator não estimulado apresentou uma R_s de 2872Ω . Além disso, a aplicação desta técnica promoveu um aumento no fluxo de trocas iônicas entre o eletrodo estimulado e o meio, evidenciado pelos menores valores de resistência de transferência de carga (R_{tc1} e R_{tc2}).

No que concerne às eficiências de remoção de DBO, DQO solúvel e DQO total, observa-se que o desempenho global do reator estimulado supera aqueles dos demais. Após 48 horas de tratamento, o reator estimulado registrou uma eficiência de remoção de DBO de 61%, contrastando com os 31% do reator não estimulado e 22% do controle. Este cenário sugere uma elevada presença de carga orgânica biodegradável no efluente.

Para a DQO solúvel, os primeiros e últimos dias de tratamento se destacaram pelos melhores valores de eficiência de remoção, situando-se em torno de 45% e 54%, respectivamente.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ALTINIŞIK et al. A natural sorbent, *Luffa cylindrica* for the removal of a model basic dye. *Journal of Hazardous Materials*, v.179, p. 658-664, 2010.

ALTOÉ, L. M. S.; VOESE, B. S. Gestão de Resíduos da Indústria do Biodiesel: Um Estudo da Criação de Valor na Cadeia de Suprimentos. *GeAS – Revista de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 107-123, 2014.

ANGELAALINCY, M.J. et al. Biofilm Engineering Approaches for Improving the Performance of Microbial Fuel Cells and Bioelectrochemical Systems. *Frontiers in Energy Research*. V.6, n. Julho, p.1-12, 2018.

ANP/ SPC. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2022. Ministério de Minas e Energia, Governo Federal, Brasil. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/>. Acesso em: 15 nov. 2022.

ARUNASRI, K; MOHAN, S. V. Biofilms: Microbial life on the electrode surface. *Biomass, Biofuels, Biochemical: Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemical and Remediation*, p.295-313, 2019.

B.W. Johnson, D.C. Read, P. Christensen, A. Hamnett, R.D. Armstrong. Impedance characteristics of conducting polythiophene films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Volume 364, Issues 1–2, 31 January 1994, Pages 103-109. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(93\)02923-6](https://doi.org/10.1016/0022-0728(93)02923-6)

BEEGLE, J.R.; BOROLE, A.P. Exoelectrogens for Microbial Fuel Cells. In: *Progress and Recent Trends in Microbial Fuel Cells*. Elsevier p.193-230, 2018.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. Resolução CONAMA no 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*, 2005. Disponível em: <http://www.siam.mg.gov.br/>. Acesso em: 10 abril. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/>. Acesso em: 11 abril, 2023.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011.

CHOUDHURY, PAYEL et al. Process engineering for stable power recovery from dairy wastewater using microbial fuel cell. *ScienceDirect. International Journal of Hydrogen Energy*, v.46, p.3171-3182, 2021.

CZERWIŃSKA-GLÓWKA, D. KRUKIEWICZ, K. A journey in the complex interactions between electrochemistry and bacteriology: From electroactivity to electromodulation of bacterial biofilms. *Bioelectrochemistry*, v.131, 2020.

DE BONI, L. A. B. et al, 2007. Tratamento físico-químico da água de lavagem proveniente da purificação do biodiesel. *Periódico Tchê Química*, Porto Alegre, v. 4, n. 7, p. 41-50, 2007. Disponível em: <http://www.deboni.he.com.br/revista7.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2022.

DEL CAMPO, ARACELI GONZÁLEZ et al. Microbial fuel cell with an algae-assisted cathode: A preliminary assessment. *Journal of Power Sources*, v.242, p.638-645, 2013.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378775317304159>.

DOBBS, R. A.; WILLIAMS, R. T. Elimination of Chloride Interference in the Chemical Oxygen Demand Test. *Analytical Chemistry*, Washington, V. 35, n. 8, p. 1064–1067, 1963. DOI:10.1021/ac60201a043. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.10.008.

FARIA, L.; SILVA, G.C.; PAIVA, T.C. DE. Geração de Energia em uma Célula Combustível Microbiana com Efluentes da Produção de Biodiesel. [s.l:s.n].

FERNANDES, W. et al. Assessment of organic matter removal from wastewater of septic tank by using anaerobic filter filled with *Luffa cylindrica* as support médium. *Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais (GESTA)*, v.3, n.1, p.1-13, 2015.

FURTADO, J.B.M. et al. Compósitos de Polietileno/Fibra - Caracterização e Degradação. *Revista Virtual de Química*, v.12, n.1, p.272-285, 2020.

GADHAMSHETTY, VENKATARAMANA et al. Evaluation of Laminaria-based microbial fuel cells (LbMs) fo electricity production. *Bioresource Tecnology*, v.127, p.378-385, 2013.

GORBY, Y.A. et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by shewanella oneidensis strain MR-1 and other microorganisms, v.106, n.17, p. 7028-7033, 2006.

Grzebyk, P.; *Sep. Purif. Technol.* 2004, 41, 321

HOAREAU, MORGANE; ERABLE, BENJAMIN; BERGEL, ALAIN. Microbial electrochemical snorkels (MESSs): A budding technology for multiple applications. A mini review. *Electrochemistry Communications*, 104, 106473, 2019.

HOLANDA, N. J.; MACIEL, P. A.; SANTOS, R. L. Avaliação ecotoxicológica da água de lavagem da purificação de biodiesel de soja metílico utilizando *Danio Rerio* como organismo-teste. *BOLETIM DO LABORATÓRIO DE HIDROBIOLOGIA*, São Luis, v. 25, n. 1, p.13-20, 2012. DOI: 10.18764.

ISLAM, M.A. et al. Biofilm re-vitalization using hydrodynamic shear stress for stable power Generation in microbial fuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.844, n. Maio, p.14-22, 2019.

- JOUANNEAU, S. et al. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review. *Water Research*, v. 49, n. 1, p. 62-82, 2014.
- KATZ, E.; Shipway, N.; Willner, I.; Vielstich, W.; Gasteiger, H. A.; Lamma, A.; *Handbook of Fuel Cells - Fundamentals, Technology and Applications, Fundamentals and Survey of Systems*, Wiley: New York, 2003.
- KHANAL, Samir Kumar. *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications*. Iowa: John Wiley & Sons, 2008. 301 p.
- KIRAN, R.; PATIL, S. A. *Microbial Electroactive Biofilms*. ACS Symposium Series, v. 1323, p. 159-186, 2019.
- L. GOSWAMI et al. A novel integrated biodegradation-microfiltration system for sustainable wastewater treatment and energy recovery *J. Hazard. Mater.* 2019.
- LEE, YUNHEE; NIRMALAKHANDAN, NAGAMANY. Electricity production in membrane-less microbial fuel cell fed with livestock organic solid waste. *Bioresource Technology*, v.102, n.10, p.5831-5835, 2011.
- LIN, T. et al. Engineered *Shewanella oneidensis*-reduced graphene oxide biohybrid with Enhanced biosynthesis and transport of flavins enabled a highest bioelectricity output in microbial fuel cells. *Nano Energy*, v.50, n. Maio, p.639-648,2018.
- LIU, X.; SHI, L.; GU, J. D. Microbial electrocatalysis: Redox mediators responsible for extracellular electron transfer. *Biotechnology Advances*, v.36, n.7, p.1815-1827, 2018.
- LOGAN, B. E. Exoeletrogenic bacteria that power microbial fuel cell. *Nature reviews Microbiology*, v.7, p.375-382, 2009.
- OLIVEIRA, A. J.; RAMALHO, J. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Produção e Agroenergia. *PLANO NACIONAL DE AGROENERGIA 2006–2011*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília - DF, p. 7-8, 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.
- OTTO, M. *Staphylococcal Biofilms*. In: Romeo, T., Ed., *Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 322, Springer, Berlin, 207-228.2008.
- PANKRATOVA, G.; HEDERSTEDT, L.; GORTON, L. Extracellular electron transfer features of Gram-positive bacteria. *Analytica Chimica Acta*, v.1076, p. 32-47, 2019.
- PAVIA, D. L. et al. *Introdução à espectroscopia* 4. 2010.
- PEREIRA, Régis S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. *Revista eletrônica de recursos hídricos*. v.1, n.1 p. 20-36. Porto alegre, 2004
- PEREIRA, E. L. et al. Factors Influencing Anaerobic Biodegradation of Biodiesel Industry Wastewater. *Water, Air, & Soil*

PINHO, L. D. A., & TEIXEIRA, F. L. C. (2016). BIODIESEL NO BRASIL: Uma análise da regulação e seus reflexos na diversificação das matérias-primas usadas no processo de produção. *Revista Brasileira De Administração Política*, 8(2), 141. Recuperado de <https://periodicos.ufba.br/index.php/rebap/article/view/17212>

PINTO, D.; CORADIN, T.; ROBERT, L. C. Effect of anode polarization on biofilm formation and electron transfer in *Shewanella oneidensis*/graphite felt microbial fuel cells. *Journal of Bioelectrochemistry*, v. 120, n. 1, p. 1-9, 2018.

POTTER, Michael. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 84, n. 571, p. 260276, 1911. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspb.1911.0073>.

RAMOS, Luiz Pereira et al. Tecnologias de produção de biodiesel. *Revista virtual de química*, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.

RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. *Diário Oficial da União [da República Federativa do Brasil, Brasília - DF, 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/>. Acesso em: 15 ago. 2023.*

RESOLUÇÃO nº 430, de 13 de maio de 2011. Disponível em: <http://www.suape.pe.gov.br>. Acesso em: 15 ago. 2023.

RIBEIRO, D.V.; SOUZA, C.A.C.; ABRANTES, J.C.C. Uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. *Rev. IBRACON de Estruturas*, São Paulo, vol. 8 e n. 4, p. 529-546, 2015. DOI: 10.1590/S1983-41952015000400007.

RIFKIN, J.; *The Hydrogen Economy*, Tarcher/Putnam: New York, 2002.

SANTORO, Carlo et al. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of power sources*, v. 356, p. 225-244, 2017

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* 4, 219 (2003).

SEMENEC, L.; FRANKS, A. Delving through electrogenic biofilms: from anodes to cathodes to microbes. *AIMS Bioengineering*, v.2, n.3, p.222-248, 2015.

SILA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 1997. 259p.

SKOOG, D. A.; Leary, J. J. *Principles of Instrumental Analysis* 4. Bookman, 1992.

SPERLING, M. V. *Biological Wastewater Treatment Series: Basic principles of wastewater treatment*. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, v.2, p. 8, 2007. Disponível em: <https://limaens.paginas.ufsc.br/files/2020/09/volume-2.pdf>.

SULTANA, T. S. et al. Electrochemical scaffold generates localized, low concentration of hydrogen peroxide that inhibits bacterial pathogens and biofilms. *Scientific Reports*, v. 5, n. 14908, p. 1-10, 2015. DOI: 10.1038/srep14908.

SUN Y, SUN F, FENG W, QIU X, LIU Y, YANG B, CHEN Y & XIA P. Hyperoside inhibits biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp Ther Med* 14: 1647-1652. 2017 doi: 10.3892/etm.2017.4641.

VELJKOVIĆ, V.B.; STAMENKOVIĆ, O. S.; TASI, M.B. The wastewater treatment in the biodiesel production with álcali-catalyzed transesterification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 32, p.40-60, 2014.

VENKATA, M.S. et al., Microbial fuel cell: Critical factors regulating bio-catalyzed electrochemical process and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 40, p.779-797, 2014.

XIE, X.; et al. Carbon nanotube-coated microporous sponge for microbial fuel cell electrodes. *Energy Environ. Sci.*, v.5, p. 5265–5270, 2012.

YANG, WULIN et al. The impact of new cathode materials relative to baseline performance of microbial fuel cells all with the same architecture and solution chemistry. *Energy & Environmental Science*, v. 10, n. 5, p. 1025-1033, 2017.

YONG, Y. et al. Nanostructured Macroporous Bioanode Based on Polyaniline-Modified Natural Loofah Sponge for High-Performance Microbial Fuel Cells. *Environmental Science & Technology*, v. 47. P.14525-14532, 2013.

YUAN, YONG; ZHOU, SHUNGUI; YI LIU, YI; TANG, JIAHUAN. Nanostructured Macroporous Bioanode Based on Polyaniline- Modified Natural Loofah Sponge for High-Performance Microbial Fuel Cells. *nviron. Sci. Technol.*

ZHOU, M.et al. Anode modification by electrochemical oxidation: A new practical method to improve the performance of microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal*, v.60, n. 15, p. 151-155, 2012.

ZHOU, MINGHUA et al. An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, v. 196, n. 10, p. 4427-4435, 2011

ZUCCARI, M. L. et. al. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes por método colorimétrico alternativo. *Energ. Agric., Botucatu*, v. 20, n. 4, p. 69- 82, 2005.