



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – FANAT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS – PPGCN
MESTRADO EM CIÊNCIAS NATURAIS – MCN
LINHA DE PESQUISA: TECNOLOGIA AMBIENTAL



LYLIANE DE FREITAS TRIGUEIRO

**INATIVAÇÃO DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* POR
ELETROOXIDAÇÃO**

MOSSORÓ - RN

2015

LYLIANE DE FREITAS TRIGUEIRO

**INATIVAÇÃO DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* POR
ELETROOXIDAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais. Área de Concentração: Recursos Naturais. Linha de Pesquisa: Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suely Souza Leal de Castro

MOSSORÓ - RN

2015

Dedico este trabalho às pessoas mais presentes em minha vida:

Minha mãe, Nicácia, pelo exemplo de vida que é.

Meu pai, Oton, o mais generoso de todos os pais.

Meus irmãos, Lucilene e Lázaro, pelo incentivo direto ou indireto.

*Ao meu filho, Vicente, meu maior orgulho, por quem eu luto, e minha sobrinha Sofia que já é
tão importante pra mim, quanto o meu filho.*

*E três amigas importantes nesses dias de batalhas Cris, Larissa e Patrícia, nos melhores e
piores momentos dessa jornada.*

Com muito orgulho, dedico.

AGRADECIMENTOS

À professora Suely Souza Leal de Castro pela disposição, apoio, dedicação, confiança e incentivos conferidos e, principalmente, pela excelente orientação que aprimoraram meu desempenho como pesquisadora.

À professora Luciana Alves Bezerra Dantas Itto pela contribuição no desenvolvimento desse trabalho, com sugestões construtivas e enriquecedoras.

À toda minha maravilhosa e melhor família: mãe, pai, irmãos, sobrinha, cunhada e esposo. Em especial meu filho, que foi e será sempre a minha fonte de inspiração, que estará presente eternamente em meu coração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, pela oportunidade.

Aos professores que tive imensa satisfação de ser aluna e que me transmitiram valiosos conhecimentos: Alfredo Marcelo Grigio, Danielle Peretti, Janete Jane Fernandes Alves, Luiz Di Souza, Marco Antônio Diodato, Ramiro Gustavo Valera Camacho e Suely Souza Leal de Castro.

Ao secretário Thiago Mendes Fernandes pela boa comunicação, organização e transparência nas informações.

À todos os amigos do Laboratório de Eletroquímica e Química Analítica (LEQA), que fizeram parte dessa história: Crislânia, Maycon, Ruyliane, Jeferson, Matheus, Anderson e Thiago.

Aos amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos, especialmente à Larissa, Patrícia e Crislânia que aos poucos nos tornamos mais que amigas, quase irmãs. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias. Foi bom poder contar com vocês!

À parceria com o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), Laboratório de Biologia Funcional (LBF), pelo apoio instrumental, em especial Fábio Mesquita por ter sido tão atencioso.

À De Nora do Brasil[®] Ltda pelo fornecimento dos eletrodos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, à todos que de alguma maneira contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

*É que o desejo de alcançar meus objetivos é tão alto
que acabo fazendo dos obstáculos um novo degrau para ir mais longe*

Autor: desconhecido

RESUMO

Nos últimos anos, a poluição e contaminação ambiental vêm sendo reportada como um dos grandes problemas da sociedade moderna. Dentre os contaminantes biológicos destacam-se os microrganismos, devido ao fato de estarem distribuídos praticamente em todos os ambientes, tornando necessária a sua desinfecção, pois alguns grupos são patogênicos. Este tem sido um desafio, principalmente nos ambientes aquáticos, devido à ineficiência dos métodos de tratamento convencionais. Dentre a diversidade de microrganismos, encontram-se os fungos, onde a levedura *Saccharomyces cerevisiae* está inserida, e a qual pode servir como modelo de estudo, devido à resistência de sua parede celular. Na busca de alternativas de inativação, cresce o interesse pela utilização dos Processos Eletroquímicos de Oxidação Avançada (PEOAs), por degradarem compostos orgânicos utilizando o elétron como reagente; e pela versatilidade, alta eficiência energética e uso de processo operacional simples. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de ânodos dimensionalmente estáveis (ADEs) no processo eletrolítico de inativação da levedura *S. cerevisiae*. Utilizou-se a levedura de panificação, *S. cerevisiae* comercial, a qual foi cultivada em meio líquido Sabouraud 4%. Para os estudos eletroquímicos foram avaliados os ânodos Ti/RuO₂-TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ (ambos de 18,5 cm²) usando placas de titânio (37 cm²) como cátodo, imersos em 100 mL da solução contendo a levedura e 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄. Foi verificado, ainda, o efeito da adição de 0,05 mol L⁻¹ de íons cloreto no meio eletrolítico. As eletrólises foram realizadas sob condições galvanostáticas, usando densidades de corrente aplicadas de 20, 40 e 60 mA cm⁻² durante 360 minutos; foram monitorados o potencial da célula, temperatura, pH, condutividade, OD e turbidez; e o processo de inativação das leveduras foi acompanhado pela contagem direta de células viáveis no microscópio óptico. Os resultados mostraram a inativação de 100% dos microrganismos em 120 minutos de eletrólise quando o eletrodo de Ti/RuO₂TiO₂ foi utilizado nas densidades de 20, 40 e 60 mA cm⁻², e em 180 minutos quando o eletrodo de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ foi usado a 60 mA cm⁻², indicando maior eficiência do eletrodo Ti/RuO₂TiO₂. Quando íons cloreto foi adicionado ao meio eletrolítico, foi observado um aumento de eficiência no processo de inativação, o que resultou em 100% de inativação das leveduras, quando a densidade de corrente aplicada foi de 20 mA cm⁻², durante 120 minutos, para ambos os eletrodos. Em termos de consumo energético, na presença de íons cloreto foram obtidos os valores de 30,24 kWh m⁻³ e 30,99 kWh m⁻³ quando uma densidade de corrente de 20 mA cm⁻² foi aplicada aos eletrodos Ti/RuO₂TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂, respectivamente; enquanto que na ausência de íons cloreto (eletrólito de 0,05 mol L⁻¹ Na₂SO₄), o menor valor foi de 34,80 kWh m⁻³, aplicando-se 20 mA cm⁻² ao ânodo de Ti/RuO₂TiO₂. A inativação ocorreu a partir do processo de eletroporação da membrana e parede celular, que ocasionou uma permeabilização nas leveduras, levando a perda de material celular e consequente inativação e lise celular. Os estudos mostraram que o uso dos ADEs foi eficiente na inativação das leveduras, e pode ser uma alternativa de uso para a desinfecção de água e efluentes.

Palavras-chave: Inativação de microrganismos. *Saccharomyces cerevisiae*. Eletroxidação de microrganismos.

ABSTRACT

In recent years, environmental pollution and contamination have been reported as one of the major problems of modern society. Among the biological contaminants stand out microorganisms, due to the fact that they are distributed in almost all environments, making it necessary to be disinfected, as some groups are pathogenic. This has been a challenge, especially in aquatic environments, due to the inefficiency of conventional treatment methods. Among the diversity of microorganisms are fungi, in which the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is inserted, and which can serve as a model because of its cell wall strength. In the search for alternative inactivation, growing interest in the use of Electrochemical Processes of Advanced Oxidation, by degrading organic compounds using the electron as a reagent; and the versatility, high efficiency of energy and use of simple operational process. The objective of the study was to evaluate the efficiency of the dimensionally stable anodes (DSA) in the electrolytic process of inactivation of *S. cerevisiae*. We used the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* commercial, which was cultured in Sabouraud liquid medium 4%. For the electrochemical studies were evaluated anodes Ti/RuO₂TiO₂ and Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ (both 18.5 cm²) using titanium plates (37 cm²) as the cathode, immersed in 100 mL of the solution containing the yeast and 0.05 mol L⁻¹ Na₂SO₄. It was also verified the effect of the addition of 0.05 mol L⁻¹ of chloride ions in the electrolytic medium. The electrolyses were carried out under galvanostatic conditions using current densities applied at 20, 40 and 60 mA cm⁻² for 360 minutes; were monitored potential of the cell, temperature, pH, conductivity, turbidity and OD; and the process of inactivation of yeast was monitored by direct counting of viable cells in the light microscope. The results showed 100% inactivation of microorganisms in 120 minutes of electrolysis, when the electrode of Ti/RuO₂TiO₂ was used at densities of 20, 40 and 60 mA cm⁻² and 180 minutes when the electrode of Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ was used at 60 mA cm⁻², indicating higher efficiency of anode of Ti/RuO₂TiO₂. When chloride ions was added to the electrolyte medium, we observed an increase in the efficiency of inactivation process, which resulted in 100% inactivation of yeasts, when the applied current density was 20 mA cm⁻² for 120 minutes, to both electrodes. In terms of energy consumption, in the presence of chloride ions were obtained the values of 30.24 kWh m⁻³ and 30.99 kWh m⁻³ when a current density of 20 mA cm⁻² was applied to the electrodes Ti/RuO₂TiO₂ and Ti/RuO₂IrO₂TiO₂, respectively; while in the absence of chloride ions (electrolyte 0.05 mol L⁻¹ Na₂SO₄), the lowest value was 34.80 kWh m⁻³, applying 20 mA cm⁻² to the anode of Ti/RuO₂TiO₂. The inactivation occurred from the electroporation process of the membrane and cell wall, which led to a permeabilization in yeast, leading to loss of cellular material and consequent inactivation and cell lysis. Studies have shown that the use of DSA was efficient in the inactivation of the yeast, and can be an alternative use for inactivation of microorganisms present in waters and effluents.

Keywords: Inactivation of microorganisms. *Saccharomyces cerevisiae*. Electrooxidation of microorganisms.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Figura esquemática apresentando a composição e estrutura da parede celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Figura 2. Processo de divisão por brotamento da levedura <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 3. Curva normal de crescimento bacteriano.....	21
Figura 4. Esquema de oxidação (A) direta e indireta. A oxidação indireta pode ser dividida em (B) reversível e (C) irreversível, com eletrogeração de espécies oxidantes “P” representa um poluente e “R” um reagente.....	24
Figura 5. Ânodos Dimensionalmente Estáveis utilizados na pesquisa: (A) Ti/RuO ₂ TiO ₂ e (B) Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	32
Figura 6. Meio de cultivo sólido, realizado para selecionar a levedura mais pura possível.....	34
Figura 7. Esquema do processo de inoculação das leveduras em meio sólido e líquido.....	34
Figura 8. Câmara de Neubauer, evidenciando-se, em azul, os quadrados contados em todos os laterais.....	35
Figura 9. Células coradas com azul de metileno/citrato de sódio, mostrando as células viáveis (não coradas) e inviáveis (coradas).....	36
Figura 10. Sistema eletrolítico: 1) ADEs; 2) Cátodos; 3) Eletrodos de referência; 4) Agitador magnético; 5) Fonte de alimentação.....	37
Figura 11. Identificação dos dias favoráveis para o tratamento eletrolítico, através da curva de crescimento das leveduras <i>S. cerevisiae</i>	39
Figura 12. Influência da densidade de corrente aplicada (20, 40 e 60 mA cm ⁻²) na porcentagem de inativação das leveduras <i>S. cerevisiae</i> (1 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹) em função do tempo de eletrólise, em meio de 0,05 mol L ⁻¹ de Na ₂ SO ₄ , usando os ânodos de (A) Ti/RuO ₂ TiO ₂ e (B) Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	41
Figura 13. Influência da densidade de corrente aplicada (20, 40 e 60 mA cm ⁻²) na porcentagem de redução da densidade populacional (lise celular) de 1 x 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ de leveduras <i>S. cerevisiae</i> , em meio de 0,05 mol L ⁻¹ de Na ₂ SO ₄ , em função do tempo de eletrólise, usando ânodos (A) Ti/RuO ₂ TiO ₂ e (B) Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	42
Figura 14: Células coradas com azul de metileno/citrato de sódio após eletrólise em diferentes densidades de corrente aplicadas, em comparação ao controle inicial e final.....	44

Figura 15. Influência da adição de íons cloreto na inativação de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de leveduras *S. cerevisiae* em função do tempo de eletrólise a 20 mA cm⁻², usando eletrodos de (A) Ti/RuO₂TiO₂ e (B) Ti/RuO₂IrO₂TiO₂..... 48

Figura 16. Influência da adição de íons cloreto na redução da densidade populacional de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de leveduras *S. cerevisiae* em função do tempo de eletrólise a 20 mA cm⁻², usando eletrodos de (A) Ti/RuO₂TiO₂ e (B) Ti/RuO₂IrO₂TiO₂..... 49

Figura 17. Influência da densidade de corrente aplicada na remoção de COT da solução de *S. cerevisiae* usando os eletrodos, Ti/RuO₂TiO₂ (colunas sólidas) e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ (colunas tracejadas). Condições experimentais: meio eletrolítico de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, densidades de corrente aplicada de 20, 40 e 60 mA cm⁻² e tempo de eletrólise de 360 minutos..... 51

Figura 18. Influência dos íons cloreto na remoção de COT da solução de *S. cerevisiae*, usando eletrodos de Ti/RuO₂TiO₂ (colunas sólidas) e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ (colunas tracejadas). Condições experimentais: meio eletrolítico de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ e 0,05 mol L⁻¹ de NaCl, densidade de corrente aplicada de 20 mA cm⁻² e tempo de eletrólise de 360 minutos..... 53

Figura 19. Porcentagem de consumo energético em função do inativação celular, durante os tempos de eletrólise da solução de *S. cerevisiae* em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, nas densidades de corrente de (—♦—) 20 mA cm⁻², (—▲—) 40 mA cm⁻² e (—▼—) 60 mA cm⁻² e, em meio de 0,05 mol L⁻¹ Na₂SO₄ e 0,05 mol L⁻¹ de NaCl em (—■—) em 20 mA cm⁻², usando ânodos de (A) Ti/RuO₂TiO₂ e (B) Ti/RuO₂IrO₂TiO₂..... 59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação Taxonômica de <i>S. cerevisiae</i>	17
Tabela 2. Sistemas típicos de processos oxidativos avançados.....	23
Tabela 3. Potencial padrão de diferentes oxidantes.....	23
Tabela 4. Lista de reagentes e soluções com suas respectivas marcas.....	30
Tabela 5. Porcentagens de inativação e lise celular de 1×10^6 UFC mL ⁻¹ de leveduras <i>S. cerevisiae</i> em 120 minutos de eletrólise a 20 mA cm ⁻² , usando eletrodos de Ti/RuO ₂ TiO ₂ e de Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂ , em diferentes meios de eletrólito.....	50
Tabela 6. Concentração de íons cloreto obtida antes e após as eletrólises realizadas usando os ânodos Ti/RuO ₂ TiO ₂ e Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂ . Condições experimentais: densidades de corrente aplicadas de 20, 40 e 60 mA cm ⁻² em meio de Na ₂ SO ₄ e de 20 mA cm ⁻² em meio de Na ₂ SO ₄ e íons cloreto como eletrólito suporte.....	54
Tabela 7. Parâmetros físico-químicos iniciais e finais do tratamento eletrolítico das leveduras <i>S. cerevisiae</i> , nas densidades de corrente de 20, 40 e 60 mA cm ⁻² , em meio de eletrólito 0,05 mol L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ e adicionado íons cloreto, usando os ânodos de Ti/RuO ₂ TiO ₂ e Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	56

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ADE® - Ânodos dimensionalmente estáveis
- AFC - Ácido Ferroceno Mono Carboxílico
- APHA - American public health association
- ATP - Adenosina Trifosfato
- BC - Banda de Condução
- BOD - Demanda Biológica de Oxigênio
- BV - Banda de Valência
- C - Condutividade
- CE - Consumo energético
- CoA - Acetil Coenzima A
- COT - Carbono Orgânico Total
- CVD - Chemical Vapor Deposition
- DDB - Diamante Dopado com Boro
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico
- ADE - Ânodos Dimensionalmente Estáveis
- EC - Eficiência de Corrente
- FDA - Food and Drug Administration
- GRAS - Generally Recognized as Safe
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura
- MS - Ministério da Saúde
- OD - Oxigênio dissolvido
- PCL - Parede Celular de Leveduras
- PEOA - Processo Eletroquímico de Oxidação Avançada
- POA - Processo oxidativo avançado
- RDO - Reação Desprendimento de Oxigênio
- RDCL - Reação Desprendimento de Cloro
- SRO - Espécies Reativas de Oxigênio
- UFC mL⁻¹ - Unidade Formadora de Colônia por mililitro
- US - Ultra- som
- UV- Ultravioleta
- j - Densidade de Corrente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Impacto ambiental.....	16
2.2 Características gerais das leveduras.....	17
2.2.1 <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	17
2.2.2 <i>Propriedades da parede celular</i>	18
2.3 Metabolismo celular.....	19
2.4 Crescimento e multiplicação celular.....	20
2.5 Processos Oxidativos Avançados.....	21
2.6 Desinfecções por processos eletrolíticos.....	26
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Geral.....	29
3.2 Específicos.....	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	30
4.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	31
4.2.1 <i>Análises físico-químicas</i>	31
4.2.2 <i>Determinação microbiológica</i>	31
4.2.3 <i>Eletrólises</i>	31
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.3.1 <i>Análises físico-químicas</i>	32
4.3.2 <i>Determinação microbiológica</i>	33
4.3.2.1 <i>Condições do meio de cultivo sólido e líquido</i>	33
4.3.2.2 <i>Procedimento de contagem celular pelo método de microscopia</i>	35
<i>direta</i>	
4.3.3 <i>Eletrólises</i>	36
4.3.4 <i>Determinação do consumo energético</i>	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Estudo microbiológico.....	39
5.2 Tratamento eletrolítico.....	40
5.2.1 <i>Influência da densidade de corrente aplicada na inativação e lise</i>	40
<i>celular</i>	
5.2.2 <i>Influência dos íons de cloreto na inativação e lise celular</i>	46
5.2.3 <i>Influência da densidade de corrente na remoção de COT</i>	50

5.2.4 <i>Influência de íons cloreto na remoção de COT</i>	52
5.2.5 <i>Parâmetros físico-químicos</i>	55
5.3 Estimativas do consumo energético	58
6. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os problemas ambientais vêm sendo reportados como um dos grandes problemas da sociedade moderna. Este panorama é decorrente de uma série de fatores, dentre os mais importantes estão o aumento desenfreado da população; o reduzido investimento em saneamento básico, que não acompanha o crescimento populacional, acarretando o aumento da contaminação dos ambientes naturais; e o sistema econômico, que preconiza uma grande demanda por bens de consumo, resultando em um grande aumento na exploração dos recursos naturais.

A poluição dos ambientes naturais é proveniente, principalmente, de atividades antropogênicas que geram resíduos sólidos, líquidos e gasosos. Por esta razão, as leis ambientais estão com exigências cada vez mais restritivas, e há um maior interesse no desenvolvimento de novos processos de tratamento de efluentes, que sejam mais eficientes e que reduzam o uso de compostos químicos perigosos. Entre os contaminantes biológicos encontram-se os microrganismos, distribuídos praticamente em todos os ambientes, onde quer que as condições físicas e químicas o permitam (BLACK, 2002). Alguns grupos de microrganismos podem ser patogênicos, sendo necessária a utilização de métodos de desinfecção do meio onde se encontram, o que tem sido um grande desafio, devido a não eficiência dos métodos convencionais, além de que, o uso excessivo de reagentes químicos impacta negativamente o ambiente, contaminando os recursos naturais, principalmente a água, destino final da maioria dos poluentes.

Diante da diversidade de microrganismos, destaca-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é considerado um microrganismo atrativo de se trabalhar por ser não patogênico, mostrando-se satisfatório quanto à biossegurança em sua manipulação, devido a sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis (OSTERGAARD, OLSSON e NIELSEN, 2000).

Além disso, esta levedura pode ser utilizada como modelo de estudo em métodos de inativação e lise celular, pois é uma célula eucarionte e possui na sua estrutura a parede celular, que promove uma maior resistência aos diversos tipos de tratamentos. Quando as células de um microrganismo são inativadas, elas deixam de realizar a atividade metabólica, inibindo sua patogenicidade, mas permanecendo com suas estruturas preservadas. No caso de lise celular, essas estruturas são destruídas (LUBICKI e JAYARAM, 1997; MOREIRA, DEL PINO, VENDRUSCOLO, 2003).

Diversos métodos de degradação de contaminantes, químicos e biológicos, têm sido reportados na literatura. Dentre estes, destacam-se os chamados Processos Oxidativos Avançada (POAs), que têm se mostrado uma tecnologia eficiente, uma vez que os compostos podem ser totalmente mineralizados, resultando em dióxido de carbono, água e compostos inorgânicos; ou degradados, de forma a diminuir a sua reatividade e tornando-os inofensivos do ponto de vista ambiental (FERNÁNDEZ ALBA *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2002; ALEBOYEH, OLYA e ALEBOYEH, 2008). Os POAs se baseiam na geração de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que são poderosos agentes oxidantes ($E^\circ = 2,8 \text{ V vs. EPH}$).

As metodologias envolvem reações em fase homogênea, que ocorrem em apenas uma fase, como aquelas que usam o processo Fenton, ozônio e radiação UV, e em fase heterogênea, que usam semicondutores como catalisadores sólidos (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Dentre os POAs heterogêneos encontram-se os Processos Eletroquímicos de Oxidação Avançada (PEOAs), que são capazes de promover rapidamente a degradação de vários compostos poluentes. Estes processos ainda apresentam como vantagens o uso do elétron como principal reagente (“reagente limpo”), a versatilidade, a alta eficiência energética e o processo operacional simples (MARTÍNEZ-HUITLE e BRILLAS, 2009).

Dentre os materiais eletródicos atualmente utilizados na oxidação de compostos orgânicos, devido a eficiência, simplicidade de execução e menor tempo demandado no processo, destacam-se os ânodos dimensionalmente estáveis (ADEs), que consistem em um suporte de metal, geralmente titânio, revestido com óxidos de metais nobres, tais como RuO_2 e IrO_2 . As suas principais características são: extensa área superficial, sobrepotencial anódico reduzido, estabilidade dimensional, maior durabilidade e menor consumo de energia (ZANTA, 2000).

Tais propriedades, associadas à potencialidade dos PEOAs, favorecem a utilização dos ADEs como alternativa para a desinfecção de águas e efluentes contaminados por microrganismos patogênicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Impactos ambientais

Atualmente, as atividades antrópicas vêm ocasionando alterações significativas no meio ambiente e comprometendo a qualidade da água. A água é um recurso natural essencial à vida, e sua qualidade é de fundamental importância para a manutenção da saúde humana. Sendo assim, a água destinada ao consumo humano deve atender aos padrões de qualidade que são recomendados pelo Ministério da Saúde - MS por meio da Portaria nº 2.914 de 2011, que define valores máximos permissíveis para as características organolépticas, físico-químicas e bacteriológicas (BRASIL, 2006; BRASIL, 2011).

Seguindo um enfoque microbiológico, a água para consumo humano tem que estar isenta de microrganismos patogênicos, compreendendo as bactérias, vírus, protozoários e helmintos, que veiculados pela água podem, através da sua ingestão, parasitar o organismo humano ou animal. Porém, na Portaria 2.914/2011 do MS a exigência se faz apenas em relação às bactérias do grupo coliformes totais e fecais, especificamente *Escherichia coli*.

A água contaminada é um dos principais veículos de doenças (MATOS, 2001) e segundo a pesquisa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), somente 78,6% da população brasileira tem acesso à água de boa qualidade. Ainda com relação aos resultados da pesquisa, a falta de acesso à água tratada, junto com os demais componentes do saneamento básico, como a falta de esgotamento sanitário adequado, a disposição de resíduos sólidos e o manejo inadequado de águas pluviais, podem comprometer a saúde, o bem-estar e a qualidade de vida da sociedade, contribuindo também com a degradação ambiental. Portanto, a manutenção da água com quantidade e qualidade é essencial à saúde humana.

No Brasil, a desinfecção da água é realizada pela cloração, por ser um método simples e de baixo custo. Porém, requer alguns cuidados na dosagem estabelecida ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) para a desinfecção (SANTOS e GOUVEIA, 2011), uma vez que quando usados sem controle promove a formação de subprodutos indesejáveis, como trihalometanos, ácidos haloacéticos, haloacetonas, haloacetonitrilas etc., alguns dos quais são cancerígenos e mutagênicos.

2.2 Características gerais das leveduras

As leveduras são unicelulares (apenas uma célula), eucarióticas (células mais complexas), heterotróficas (não produz seu próprio alimento), pertencem ao reino *fungi*, são amplamente distribuídas na natureza, se reproduzem geralmente de forma assexuada por brotamento e, em poucos casos, por fissão binária (WOESE *et al.*, 1990).

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

É uma levedura unicelular, pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetaceae*, Reino *Fungi* (GERSHON e GERSHON, 2000). A classificação taxonômica da espécie *S. cerevisiae* foi proposta em 1883 por E. C. Hansen e encontra-se descrita na Tabela 1 (KURTZMAN, 1997).

Tabela 1. Classificação Taxonômica de *S. cerevisiae*

Super Reino	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordem	<i>Saccharomycetales</i>
Família	<i>Saccharomycetaceae</i>
Gênero	<i>Saccharomyces</i>
Espécie	<i>S. cerevisiae</i> Hansen 1883

Fonte: Kurtzman, (1997)

Esta classificação baseia-se num conjunto de características definidas por vários autores (KREGER-VAN RIG, 1984; BARNETT, PAYNE e YARROW, 1990; RATLEDGE e HULL, 1991), tais como: morfologia, capacidade de fermentar diferentes substratos, capacidade de utilizar diferentes substratos, temperatura de crescimento, entre outros.

Morfologicamente, suas células podem ser esféricas, cilíndricas ou elipsoidais, ocorrendo isoladas, em pares ou em cadeias (PELCZAR, MICHAEL e CHAN, 1997). Por ser um eucarioto unicelular, de rápido crescimento celular e de fácil manipulação genética, é bastante utilizada como organismo modelo em diversos estudos fisiológicos e bioquímicos (NASHEUER *et al.*, 2002; BIDDICK e YOUNG, 2009; KARATHIA *et al.*, 2011).

As *S. cerevisiae* são anaeróbios facultativos, sendo a fermentação a via preferencial durante o crescimento em glicose (SHERMAN, 2002). Essas células convertem a glicose em

alguns subprodutos como o etanol e o CO₂, por meio do metabolismo fermentativo. Pode sobreviver tanto de forma aeróbica quanto anaeróbica, e a escolha entre estes metabolismos depende da disponibilidade de oxigênio e da concentração de hidratos de carbono no meio de cultivo (PASTERIS e STRASSER DE SAAD, 1998).

A *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a ter o seu genoma totalmente sequenciado, possuindo cerca de seis mil genes distribuídos por dezesseis cromossomos, e os doze milhões de pares de bases do seu genoma estão sequenciados (GOFFEAU *et al.*, 1996), facilitando os estudos de clonagem e expressão gênica, permitindo uma melhor compreensão de funções celulares diversas devido à rapidez na identificação e caracterização dos genes (HUGHES *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 2008).

Algumas propriedades que tornam as leveduras bastante adequadas para estudos biológicos incluem o rápido crescimento celular e a segurança na manipulação (GRAS – Generally Recognized as Safe), determinadas pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério técnico para aplicações alimentícias e farmacêuticas (VAN DER BERG *et al.*, 1990).

2.2.2 Propriedades da parede celular

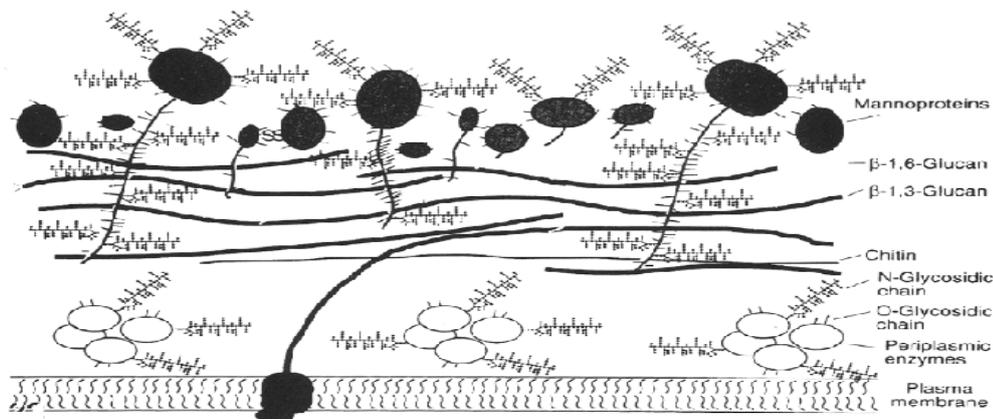
A Parede Celular das Leveduras (PCL) é porosa, onde estes poros apresentam pequena dimensão, funcionando como um filtro por onde passam apenas substâncias de baixo peso molecular. Por isso, moléculas de alto peso molecular, como proteínas, dextrana e outros polissacarídeos, entre outros nutrientes, não são absorvidos pelas leveduras (CHAUD e SGARBIERI, 2006).

A camada externa da PCL é quem confere o formato da célula e fornece suporte osmótico, conferindo a sua elasticidade e proteção física (resistência) (ARNOLD, 1981; MAGNELLI, CIPOLLO e ROBBINS, 2005). Assim, a PCL pode ser considerada como uma organela multifuncional de proteção, forma, interação celular, recepção, adesão e atividade de enzimas específicas (FLEET, 1991).

Quanto à composição, a PCL compreende cerca de 20 - 30% do peso seco da célula (SMITH *et al.*, 1999), sendo que 60 a 90% do peso seco da parede celular de *S. cerevisiae* é constituída de glucanas e mananas, e uma pequena quantidade de lipídios e proteínas (CHAUD e SGARBIERI, 2006). Geralmente a glucana, um polímero de β -(1,3) e β -(1,6) glicose (48 - 60%); as mananaproteínas (20 - 23%) e a quitina, um polímero de β -(1,4) N-

acetilglicosamina (0,6 - 2,7%), estão presente nas cicatrizes da divisão celular (KLIS, 2006). A quitina é um dos responsáveis pela rigidez da parede celular e define a sua forma (GOMES, 2009), como ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Figura esquemática apresentando a composição e estrutura da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Adaptado de Osumi (1998)

O conteúdo do lipídio da *S. cerevisiae* representa de 2 - 14% da PCL, os fosfolípidios e esteróis são ausentes e os gliceróis estão presentes com predominância dos insaturados, como palmítico e oléico. As proteínas representam aproximadamente 13% da PCL e representam um complexo de moléculas, podendo estar ligadas covalentemente a manana ou polímeros da parede. Na composição de aminoácidos da parede há predominância de ácido glutâmico e aspártico, serina, treonina, glicina, alanina, valina e prolina, com notável deficiência de aminoácidos sulfurosos (FLEET, 1991).

2.3 Metabolismo celular

A via glicolítica do processo metabólico das leveduras varia para diferentes espécies, podendo ocorrer por via aeróbica (respiração) ou anaeróbica (fermentação). O processo mais característico é a fermentação alcoólica, que conduz à formação de etanol e dióxido de carbono, catalisado por enzimas.

Esse processo é realizado principalmente por leveduras, em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas, e ainda para o seu crescimento e reprodução, sendo o etanol, tão somente, um

subproduto desse processo (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). No metabolismo aeróbico, a oxidação direta da glicose ocorre na presença de oxigênio, fornecendo CO₂ e água.

2.4 Crescimento e multiplicação celular

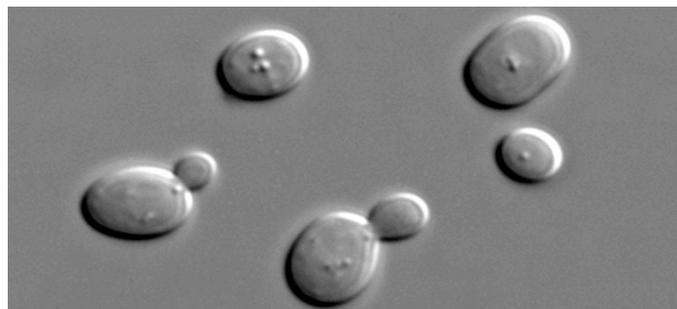
As leveduras exigem uma fonte de carbono elaborada (glicose ou outro açúcar), que fornece a energia química, e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares são constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. O meio de cultivo deve fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Além de uma composição capaz de suprir as exigências do microrganismo, para seu melhor desempenho, deve estar devidamente condicionado em termos de pH, temperatura e esterilidade (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Quanto ao ambiente, as leveduras se desenvolvem numa ampla faixa de temperatura, sendo que o intervalo ótimo de crescimento situa-se entre 26 e 35 °C, com média de 30 °C. Em relação à variação de pH, os limites estão entre 4,5 e 5,5. Esses microrganismos também apresentam elevada resistência osmótica, devido à parede celular (LIMA, AQUARONE e BORZANI, 1975).

A reprodução da levedura é assexuada, ocorrendo por meio de um processo denominado de gemulação ou brotamento (SHIMODA, 2004), Figura 2.

Figura 2. Processo de divisão por brotamento da levedura *S. cerevisiae*

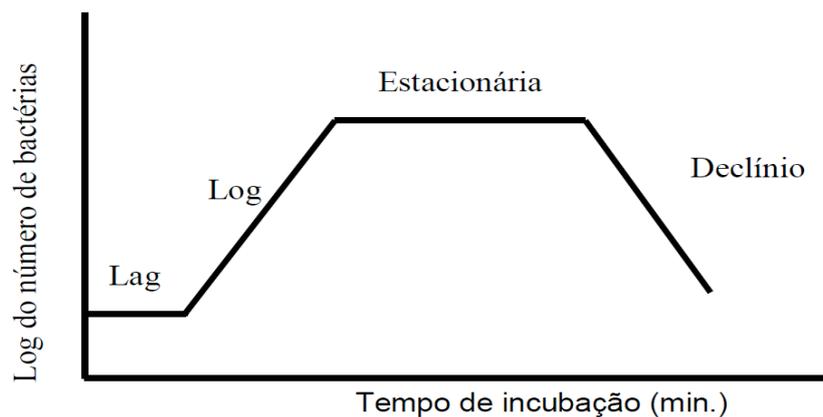


Fonte: <https://www.sciencenews.org/article/first-chromosome-made-synthetically-yeast> (2015)

Em relação ao crescimento celular, a Figura 3 representa o perfil característico do crescimento de um microrganismo unicelular, na qual corresponde a uma fase “Lag” de latência, ou seja, de adaptação fisiológica das células ao meio de cultura. Nesta fase, as

células não estão se dividindo. A fase “Log” é conhecida como fase logarítima ou exponencial de crescimento, porque o número de células aumenta exponencialmente com o tempo. A fase “Estacionária” é onde o número de células viáveis se mantém constante, isto é, são iguais os números correspondentes as células que nascem e as que morrem. A fase “Declínio” é a fase da morte celular, pois as condições do meio vão se tornando cada vez mais impróprias para as células sobreviverem (PELCZAR, REID e CHAN, 1980; MADIGAN, 2004; TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Figura 3. Curva normal de crescimento bacteriano



Fonte: Tortora, Funke e Case (2005); Nascimento (2010)

2.5 Processos Oxidativos Avançados

Nas últimas décadas, em todo o mundo, as exigências em relação às leis ambientais têm se tornado cada vez mais restritivas, principalmente devido ao aumento da conscientização em relação à saúde humana e aos riscos ecológicos associados à poluição ambiental. Por esse motivo, várias pesquisas têm sido realizadas visando ao desenvolvimento e ao aprimoramento de tecnologias de tratamento e redução de poluentes em geral, sempre com base no requisito custo e benefício. Desta forma, é observada uma grande necessidade de desenvolver procedimentos que apresentem maior eficiência no tratamento de águas e efluentes.

Dentre essas tecnologias, estão em destaque a utilização dos POAs, os quais se baseiam na utilização de espécies altamente oxidantes, em especial o radical $\cdot\text{OH}$, para promover uma degradação mais efetiva do poluente. Este radical pode promover a degradação de vários poluentes em poucos minutos (BRITO e SILVA, 2012; BRILLAS e MARTÍNEZ-HUITLE, 2015).

Os POAs possibilitam que o composto não apenas seja transferido de fase, mas seja destruído e transformado em dióxido de carbono, água e íons inorgânicos, através de reações de degradação que envolvem espécies intermediárias oxidantes (PANIZZA e CERISOLA, 2009; REZENDE *et al.*, 2010; GARCIA-SEGURA *et al.*, 2012).

Estes processos apresentam uma série de vantagens (TEIXEIRA E JARDIM, 2004; FIOREZE, SANTOS e SCHMACHTENBERG, 2014), entre elas:

- Mineralização dos poluentes e não somente mudança de fase;
- Utilização na destruição de compostos refratários resistentes a outros tratamentos;
- Conversão de compostos recalcitrantes e contaminantes refratários em produtos degradáveis e biodegradáveis;
- Possibilidade de uso junto com outros processos, como pré ou pós-tratamento;
- Forte poder oxidante, com elevada cinética de reação;
- Ideais para diminuir a concentração de compostos formados por pré-tratamento alternativo, como a desinfecção;
- Em alguns casos não há necessidade de um pós-tratamento ou disposição final;
- Aplicabilidade em efluentes altamente tóxicos que podem causar indesejáveis dificuldades na operação de sistemas biológicos, levando a operação em altos tempos de residência ou podendo ocasionar até a morte de microrganismos;
- Melhoria, em geral, das qualidades organolépticas da água tratada;
- Possibilidade de tratamento *in situ*.

No entanto, de acordo com Morais (2005), como qualquer outra forma de tratamento, existem limitações na sua aplicação, dentre as quais se destacam:

- Nem todos os processos estão disponíveis em escalas apropriadas;
- Os custos podem ser elevados, principalmente devido ao consumo de energia;
- Apresentam restrições de aplicação em elevadas concentrações de poluentes;

Os POAs podem ser divididos em sistemas homogêneos e heterogêneos. Os homogêneos ocorrem em apenas uma fase, usando H_2O_2 , O_3 , Fe^{2+} e/ou luz ultravioleta; e nos heterogêneos as reações ocorrem em fases distintas, na presença de catalisadores sólidos, como os óxidos de metais fotoativos e os semicondutores (Tabela 2).

Tabela 2. Sistemas típicos de processos oxidativos avançados

PROCESSO	HOMOGÊNEOS	HETEROGÊNEOS
COM IRRADIAÇÃO	O ₃ /UV	Fotocatálise heterogênea (TiO ₂ /O ₂ /UV, TiO ₂ /H ₂ O ₂ /UV) Fotoeletroquímica
	H ₂ O ₂ /UV	
	Feixe de elétrons Ultra- som (US)	
	H ₂ O ₂ /US UV/US	
SEM IRRADIAÇÃO	O ₃ /H ₂ O ₂	Elétron-Fenton Oxidação eletroquímica
	O ₃ / OH ⁻	
	H ₂ O ₂ / Fe ²⁺ (Fenton)	

Fonte: Adaptado Rezende *et al.* (2010)

Entre os sistemas heterogêneos encontram-se os PEOAs, os quais utilizam semicondutores como catalisadores e, diferentemente dos sistemas homogêneos, têm como principal vantagem evitar a adição de produtos químicos.

Nos PEOAs os radicais [•]OH são produzidos eletroquimicamente em uma reação anódica, a partir da hidrólise da água. O seu potencial redox é bastante elevado ($E^0 = 2,8 \text{ V vs. EPH}$), sendo inferior apenas ao do flúor (Tabela 3), e são capazes de reagir com praticamente todas as classes de compostos orgânicos, podendo levar à sua completa mineralização (conversão a CO₂ e H₂O) em um tempo reacional relativamente curto (MARTÍNEZ-HUITLE e FERRO, 2006).

Tabela 3. Potencial padrão de diferentes oxidantes

AGENTE OXIDANTE	POTENCIAL REDOX (V)
Flúor (F)	3,03
Radical hidroxila (HO [•])	2,8
Oxigênio atômico	2,42
Ozônio (O ₃)	2,07
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	1,78
Radical peridroxila (HO ₂ [•])	1,7

Fonte: Adaptado de Hunsberger (1977); Pera-Titus *et al.* (2004)

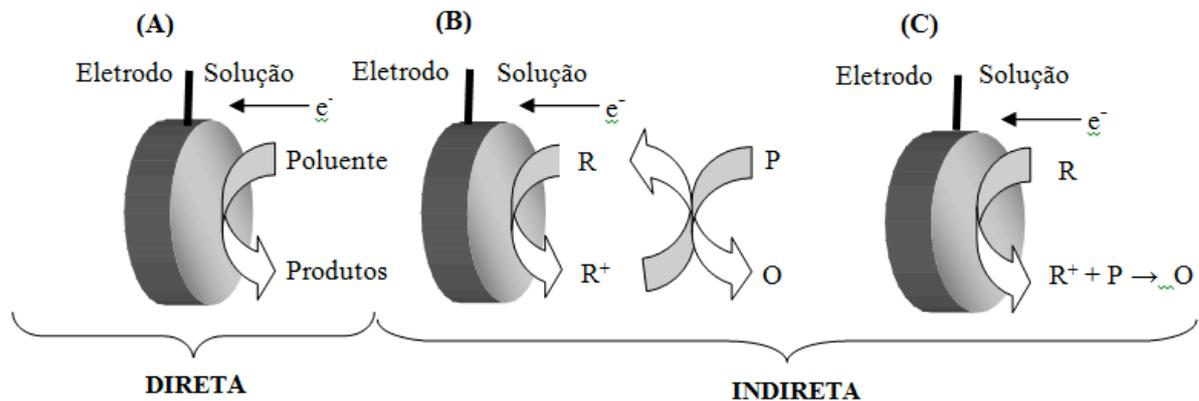
Os processos eletroquímicos fundamentam-se na aplicação de um potencial capaz de oxidar ou reduzir a molécula de interesse. Eles têm sido muito utilizados no tratamento de efluentes, pois apresentam facilidade de operação e automação; utilizam o elétron e fortes oxidantes para degradar os poluentes; usam o catalisador na forma de revestimento de eletrodos metálicos e possibilitam a formação de espécies reativas na superfície do eletrodo,

fornecendo uma alternativa promissora aos métodos tradicionais (PANIZZA e CERISOLA, 2009). Além disso, apresentam compatibilidade ambiental.

Os mecanismos de oxidação eletroquímica podem ser subdivididos em duas categorias: oxidação direta no ânodo e oxidação indireta por meio de oxidantes formados anodicamente (PANIZZA e CERISOLA, 2009; ALVES, 2010; SIRÉS e BRILLAS, 2012).

No processo de oxidação anódica direta, os poluentes são primeiramente adsorvidos na superfície do anodo e em seguida destruídos pela reação direta de transferência de elétrons entre o eletrodo e a espécie eletroativa. Já no processo de oxidação indireta, formas oxidantes potentes (ozônio, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e espécies de cloro ativo) são eletroquimicamente geradas e os compostos poluentes são degradados em solução por reagirem com estas espécies oxidantes (RAJKUMAR e PALANIVELU, 2004; MARTÍNEZ-HUITLE e BRILLAS, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2012; SIRÉS e BRILLAS, 2012). A Figura 4 mostra uma representação esquemática da oxidação eletroquímica direta e indireta.

Figura 4. Esquema de oxidação (A) direta e (B e C) indireta. A oxidação indireta pode ser dividida em (B) reversível e (C) irreversível, com eletrogeração de espécies oxidantes. “P” representa um poluente e “R” um reagente



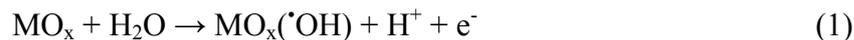
Fonte: Oliveira e Castro (2014)

A eletroxidação direta tem como principal problema a redução da atividade catalítica, devido à possível adsorção de intermediários e, conseqüentemente, à desativação do ânodo. Por outro lado, a oxidação eletroquímica de compostos orgânicos pode ser obtida sem passivação do eletrodo efetuando a eletrólise em altos potenciais anódicos, na região de eletrólise da água, devido à participação de intermediários de evolução de oxigênio. No entanto, a eficiência de corrente é diminuída pela reação secundária de evolução de oxigênio.

Desta forma, a eficiência de remoção tem sido estritamente relacionada com as condições operacionais e, principalmente, com o material de eletrodo selecionado (MARTÍNEZ-HUITLE e FERRO, 2006; PANIZZA e CERISOLA, 2009).

A pesquisa sobre novos materiais eletroquímicos tem sido dirigida à procura de revestimentos relativamente finos e que apresentem alto poder catalítico e alta resistência mecânica. Entre os vários tipos de eletrodos, os ânodos dimensionalmente estáveis (ADE, patenteado pela Diamond Sham rock Technologies S.A. em Genebra - Suíça com o nome de Dimensionally Stable Anodes, DSA®) têm apresentado resultados promissores, pois é constituído de um suporte metálico de baixo custo, frequentemente titânio, sobre o qual é depositado, por decomposição térmica, misturas de óxidos (TRASATTI, 2000), como RuO₂, SnO₂, TiO₂, Co₃O₄, IrO₂ e Ta₂O₅, sendo que os óxidos industriais mais comuns são formados por RuO₂ e TiO₂, onde o rutênio é o agente catalítico e o titânio fornece a estabilidade mecânica.

O mecanismo de oxidação de compostos orgânicos em eletrodos de óxidos tipo ADE, segundo Comninellis e De Battisti (1996), ocorre da seguinte forma: numa primeira etapa a H₂O (meio ácido) ou OH⁻ (meio básico) é oxidada(o) no sítio ativo do óxido formando o radical hidroxila adsorvido (Equação 1):



Quando o óxido possui estados de oxidação elevados, como o RuO₂ e o IrO₂, a reação de formação do radical hidroxila é seguida pela reação descrita na Equação 2:



Neste caso, a espécie MO_{x+1} passa a intermediar a reação de desprendimento de oxigênio (RDO) e a oxidação dos compostos orgânicos (R), representadas pelas Equações 3 e 4, respectivamente:



Uma característica favorável apresentada pelo ADE é sua extensa área superficial, decorrente de sua preparação pela técnica de decomposição térmica numa faixa de temperatura entre 350 °C a 500 °C, o que ocasiona na camada de óxido inúmeras fendas, fissuras e micro rachaduras. Este fato acontece principalmente por conta das diferenças no coeficiente térmico dos óxidos constituintes e da propriedade de segregação apresentada por alguns óxidos. Estes eletrodos apresentam as seguintes vantagens (ZANTA, 2000; SANTOS, 2006):

- Sobrepotencial anódico reduzido;

- Estabilidade dimensional, permitindo desenho mais favorável de célula industrial;
- Maior durabilidade;
- Facilidade de utilização como tela expandida, resultando numa forma física a qual favoreça a liberação do gás produzido;
- Mais leve e maior versatilidade de fabricação conforme exigência do desenho da célula;
- Maior área eletroquímica ativa;
- Menor custo de operação;
- Menor consumo de energia.

Devido às suas excelentes propriedades, os ADE têm sido utilizados comercialmente há décadas pela indústria cloro-álcali, na indústria de recuperação de metais, na eletrossíntese de compostos orgânicos e na degradação de resíduos industriais (TRASATTI, 2000). Recentemente, os ADEs de diferentes composições também têm sido estudados para aplicações na oxidação de compostos orgânicos, tais como inseticidas (MIWA *et al.*, 2006), corantes sintéticos (PANIZZA e CERISOLA, 2007; MORAIS *et al.*, 2013) e fenóis (COTEIRO e ANDRADE, 2007; SANTOS, AFONSO e DUTRA, 2011), e aqueles presentes em efluentes têxteis reais (MALPASS *et al.*, 2007); efluentes petroquímicos (SILVA *et al.*, 2013) e biológicos como as bactérias *Mycobacterium smegmatis* (BRUGNERA *et al.*, 2012) e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (GUSMÃO, 2006), dentre outros.

2.6 Desinfecções por processos eletrolíticos

Atualmente, a aplicação da eletroquímica na redução da poluição ambiental tem sido exaustivamente estudada (FIOREZE, SANTOS e SCHMACHTENBERG, 2014). A viabilidade da degradação eletroquímica de substratos orgânicos tem atraído muita atenção desde os estudos pioneiros de Dabrowski nos anos 70; Kirk, Stucki, Kotz, Chettiar e Watkinson nos anos 80; Comninellis nos anos 90, até o presente (ARAÚJO *et al.*, 2014). Essa tecnologia constitui uma classe especial de técnicas de oxidação apontadas como promissoras.

Em relação à desinfecção de microrganismos através de tratamentos eletrolíticos, um dos estudos pioneiros aconteceu no ano de 1965 (ROSEMBERG, CAMP e KRIGAS, 1965). Os autores observaram que o uso de eletrodos de platina em suspensões de *Escherichia coli* causava a inibição do processo de divisão celular; constataram ainda que outros metais como o ferro, cobalto, rutênio, ródio, paládio e irídio, quando adicionados ao meio de cultura, também provocaram inibição celular.

Matsunaga *et al.* (1992) utilizaram um reator eletroquímico empregando eletrodos de carbono, visando a obtenção de água potável. Após 10 minutos de tratamento, obtiveram uma taxa de 98% de desinfecção de bactérias *Escherichia coli* K-12, que foi explicada devido à oxidação direta da CoA.

Bratfich *et al.* (1999) aplicaram corrente contínua em eletrodos de aço inoxidável imersos em suspensões de *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis*, obtendo uma diminuição de *B. subtilis* em 99,9%; já nas leveduras *S. cerevisiae* observaram uma floculação após 60 minutos de eletrólise.

Nakajima *et al.* (2004) utilizaram o processo eletrolítico no tratamento de água de torneira contaminada com bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. No trabalho foram utilizados eletrodos de platina-irídio em modo batelada. Foi observado que com 5 min de tratamento utilizando valores de corrente entre 20 e 50 mA cm⁻² foi possível obter a esterilização em relação à *P. aeruginosa*, *E. coli*, *L. pneumophila* e *S. aureus*. Quanto à *B. subtilis*, esta mostrou ser mais resistente, mesmo aplicando-se uma densidade de corrente de 50 mA cm⁻² durante 30 minutos.

Liang *et al.* (2005) aplicaram o processo eletrolítico em uma solução contendo cianobactérias *Microcystis aeruginosa*, utilizando Ti/RuO₂ e densidades de corrente de 1 a 10 mA cm⁻² durante 52 minutos, em voltagens entre 3,5 e 9,2 V. Os autores concluíram que a lise das algas foi devido ao stress oxidativo ou devido à geração de espécies oxidantes como [•]OH gerados pela eletrólise. Após 3,5 min, a população de *M. aeruginosa* baixou rapidamente (queda brusca) e após 52 min foi reduzida de 3 × 10⁹ a 0,6 × 10⁹ L⁻¹, quando densidades de corrente de 5 a 10 mA cm⁻² foram aplicados. A densidade celular e a densidade óptica de *M. aeruginosa* diminuiu proporcionalmente à densidade de corrente e ao tempo de detenção.

Gusmão (2006) utilizou o ADE TiO₂/RuO₂ em um reator com vazões de recirculação de 200 L h⁻¹ e 500 L h⁻¹, e correntes de 1,0 A, 2,0 A e 3,0 A durante 60 minutos de tratamento para inativar os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomices cerevisiae*. O processo foi eficiente na inativação de *E. coli* e *S. aureus* e ineficiente para as leveduras *S. cerevisiae*. A inativação aumentou a medida que a vazão diminuiu e que a densidade de corrente aumentou, chegando a uma taxa de 0% de sobrevivência, com exceção da *S. cerevisiae*.

Gusmão *et al.* (2010) eletrolisaram uma suspensão de *Escherichia coli* de alta densidade (10⁶ UFC mL⁻¹) usando TiO₂-RuO₂ em um reator com taxas de fluxo de 200 e 500 L h⁻¹, com densidades de corrente aplicada de 25, 50 e 75 mA cm⁻² por 60 minutos. A

sobrevivência bacteriana caiu de 98,9%, com uma taxa de consumo de energia não mais de 5,60 kWh m⁻³, quando uma taxa de fluxo de 200 L h⁻¹ e 75 mA cm⁻² foram utilizados.

Brugnera *et al.* (2012) utilizaram o processo fotoeletroquímico usando eletrodo revestido com 16% (w/w) de nanopartículas de Ag (Ti/TiO₂-Ag) e radiação UV na inativação de bactérias *Micobacterium smegmatis*. O processo resultou em 100% de inativação das bactérias *M. megmatis* em 3 minutos de tratamento.

Schaefer, Andaya e Urtiaga (2015) utilizaram ânodos de Ti/IrO₂ na desinfecção de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os resultados mostraram que a taxa de desinfecção é proporcional à densidade de corrente aplicada, ou seja, quanto maior a densidade de corrente maior foi a taxa de desinfecção, devido aos níveis elevados de produção de cloro ativo.

Como indica a pesquisa bibliográfica descrita acima, os processos eletrolíticos têm apresentado bons resultados na inativação de microrganismos, sendo que destes, a *S. cerevisiae* tem sido um dos mais resistentes aos processos de degradação.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a eficiência dos ânodos $\text{Ti/RuO}_2\text{TiO}_2$ e $\text{Ti/RuO}_2\text{IrO}_2\text{TiO}_2$ no processo eletrolítico de inativação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, de forma a contribuir com o desenvolvimento de metodologias para a eliminação de micro-organismos patogênicos presentes em águas ou efluentes, e com a proteção do meio ambiente e da saúde da população.

3.2 Específicos

1. Realizar análises físico-químicas (pH, temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD) e condutividade elétrica (C)) das amostras antes e após o tratamento eletroquímico;
2. Determinar as condições ótimas de eletrólise, para ambos os ânodos avaliados, na inativação da levedura;
3. Verificar a eficiência dos diferentes ânodos na inativação das leveduras, por meio da contagem direta por microscopia óptica.
4. Investigar a eficiência dos diferentes ânodos na remoção da matéria orgânica;
5. Analisar a eficiência do processo de inativação em termos de tempo e consumo energético, para ambos os ânodos.

4. METODOLOGIA

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as análises foram executadas com reagentes e soluções de grau padrão analítico (Tabela 4), sem purificação prévia, e água deionizada. O meio de cultivo foi preparado utilizando-se levedura de panificação (fermento biológico), *S. cerevisiae*, adquirida no comércio local.

Tabela 4. Lista de reagentes e soluções com suas respectivas marcas

REAGENTES E SOLUÇÕES	MARCA
D- Glicose Anidra (dextrose) C ₆ H ₁₂ O ₆ P.A.- A.C.S	SYNTH
Peptona de carne bacteriológica (peptone)	SYNTH
Agar bacteriológico (Agar Agar)	SYNTH
NaCl	QUIMEX
Na ₂ SO ₄	VETEC
Azul de Metileno	VETEC
Citrato de Sódio	QUIMEX
Ferroin	VETEC
AgNO ₃	VETEC
Dicromato de Potássio	VETEC
Cromato de Potássio	VETEC
Sulfato Ferroso Amoniacal	VETEC
Ácido Sulfúrico	VETEC

Fonte: Dados da pesquisa (2015)

4.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.2.1 Análises físico-químicas

Para as análises de pH, C, OD e T foi utilizado um Medidor Multiparamétrico modelo 5 Star, da marca Orion; e as medidas de turbidez foram acompanhadas através de um turbidímetro digital portátil modelo TB - 1000P, da marca TECNOPON.

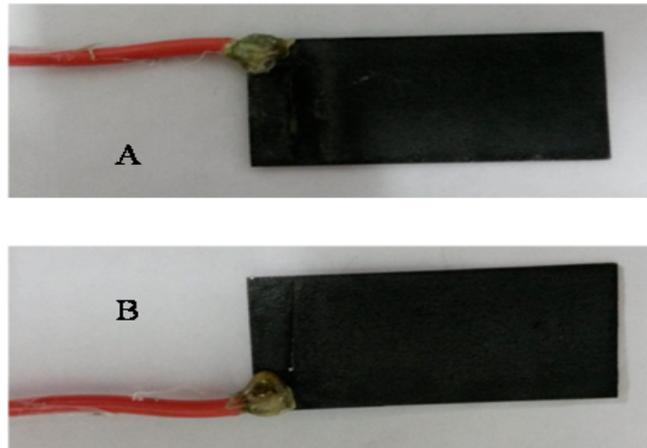
4.2.2 Determinação microbiológica

Para esterilização das vidrarias e do meio de cultivo foi utilizado um autoclave vertical de marca PHOENIX; a inoculação das leveduras foi feita em uma bancada de fluxo laminar vertical (PCR T2(ECO)) de marca PACHANE; para incubação foi utilizada uma incubadora Demanda Biológica de Oxigênio - BOD, 411D de marca NOVA ÉTICA; e para a contagem direta das células de leveduras foi utilizada uma Câmara de Neubauer modelo 9030-06 de marca NEW OPTIK e um microscópio óptico modelo N-180M de marca OLEMAN.

4.2.3 Eletrólises

As eletrólises foram realizadas em uma cela eletroquímica de compartimento único de 100 mL; ânodos de $\text{Ti/RuO}_2\text{TiO}_2$ e $\text{Ti/RuO}_2\text{IrO}_2\text{TiO}_2$ (Figura 5), ambos de $18,5 \text{ cm}^2$ de área geométrica, fornecidos pela De Nora do Brasil[®] Ltda; cátodo de titânio, sendo duas placas de $18,5 \text{ cm}^2$ cada (De Nora do Brasil[®] Ltda); e eletrodo de referência de $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat.})}$. Para os processos de eletrólise foi utilizada uma fonte de alimentação modelo MLP-3303, de 3A/5V, da marca MINIPA, e um agitador magnético STIRRER, modelo OP-912/3.

Figura 5. Ânodos Dimensionalmente Estáveis utilizados na pesquisa: (A) Ti/RuO₂TiO₂ e (B) Ti/RuO₂IrO₂TiO₂



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos de análise físico-química e de eletrólise foram realizados no Laboratório de Eletroquímica e Química Analítica (LEQA) e os experimentos microbiológicos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), ambos da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN).

4.3.1 Análises físico-químicas

O cloreto foi determinado por titulação volumétrica de precipitação, utilizando-se o método de Mohr, o qual se baseia na titulação de íons cloreto com solução padrão de AgNO₃, usando cromato de potássio como indicador (EATON, CLESCERI e GREENBERG, 2005).

Os valores de COT (EMBRAPA, 2005) foram determinados por titulação volumétrica utilizando o método adaptado de Yeomans e Bremner (1988), que se baseia na medida da quantidade do carbono orgânico total, de forma indireta, por meio da determinação da quantidade de oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica, utilizando-se um agente fortemente oxidante (dicromato de potássio) em meio ácido. O resultado do carbono orgânico total foi expresso em g L⁻¹, utilizando as fórmulas de Yeomans e Bremner (1988), na Equação 5.

$$\text{COT (g/L)} = (\text{A}) \times [\text{SFA}] \times 12/4 \times 10 \quad (5)$$

A: $((\text{Vbaq}-\text{Vam}) \times (\text{VBf}-\text{Vbaq}) / \text{VBf}) + (\text{Vbaq}-\text{Vam})$;

SFA: Sulfato Ferroso Amoniacal;

Vbaq: volume de SFA gasto na titulação do branco com aquecimento;

Vam: volume de SFA gasto na titulação da amostra;

VBf: volume de SFA gasto na titulação do branco sem aquecimento;

[SFA]: concentração da solução de SFA;

12/4: relação de equivalência de carbono;

10: fator de diluição da solução de trabalho.

A turbidez foi determinada através do método nefelométrico, usando um turbidímetro digital portátil.

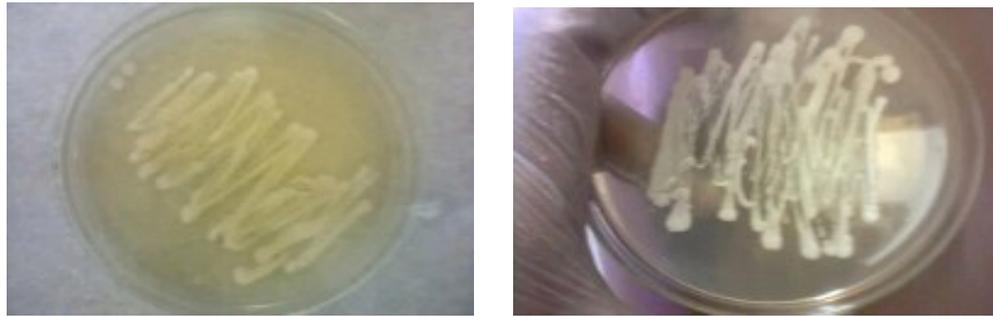
4.3.2 Determinação microbiológica

4.3.2.1 Condições do meio de cultivo sólido e líquido

O meio de cultivo sólido (Ágar nutriente) para *S. cerevisiae* foi preparado usando o procedimento de cultura Sabouraud 4%: 10 g de peptona, 40 g de glicose e 15 g de ágar para 1000 mL de água deionizada, o qual foi fundido em Banho Maria e esterilizado em autoclave por 20 min., a 120 °C e 1 atm. Para o meio de cultura líquido foi utilizado o mesmo procedimento do sólido, mas sem o agente solidificante.

Para a reativação das leveduras, foi realizada a hidratação de 10 g do fermento biológico com uma solução aquosa de 3% de glicose e 0,9% de NaCl. As leveduras reativadas foram inoculadas em 20 mL do meio de cultivo sólido, em placas de petri e incubadas em incubadora de BOD, sob temperaturas de 35 °C, por 72 horas. O cultivo em meio sólido foi realizado para selecionar as leveduras clones em uma Unidade Formadora de Colônias UFC (Figura 6).

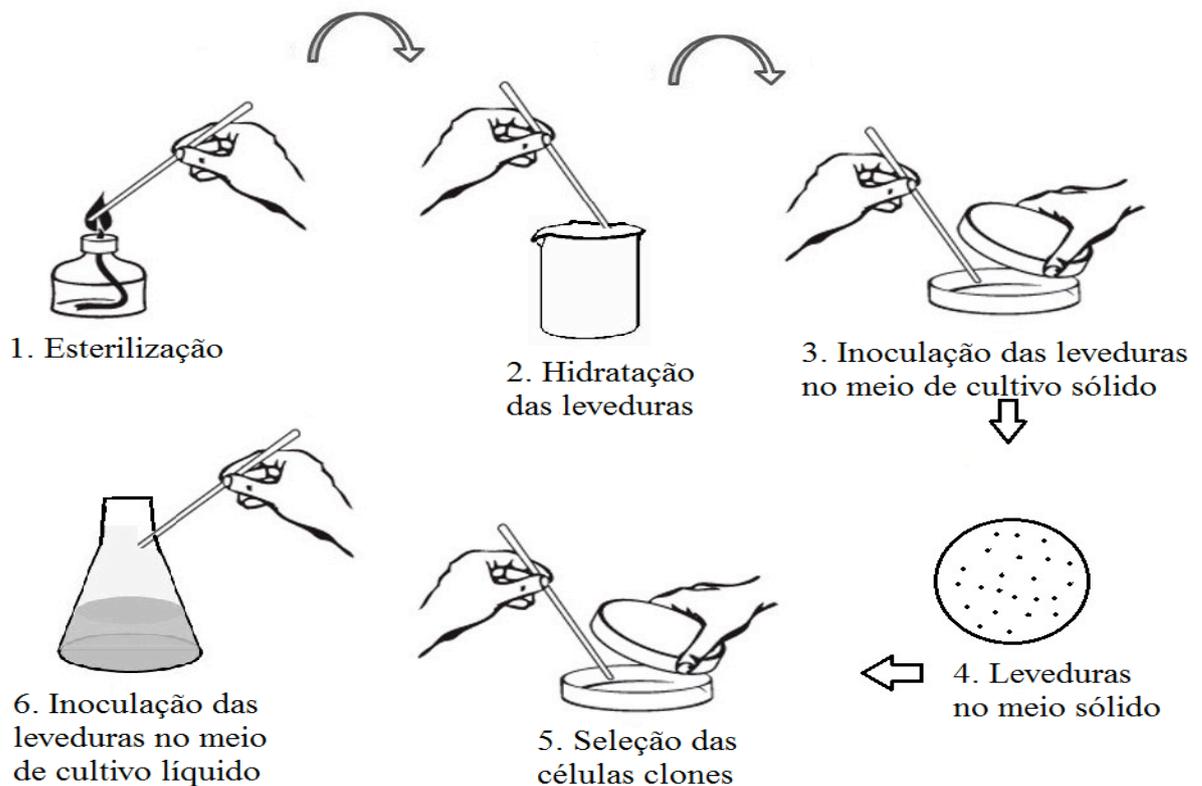
Figura 6. Meio de cultivo sólido, realizado para selecionar a levedura mais pura possível



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

As colônias do meio sólido foram inoculadas com alça de platina para erlenmeyer de 250 mL contendo o meio Sabouraud líquido, e incubado em incubadora de BOD na temperatura de 35 °C, por 72 horas, para obter uma densidade populacional de 1×10^6 UFC mL^{-1} de leveduras em 0,1 μL (Figura 7); quando esses valores ultrapassam 1×10^6 UFC mL^{-1} de leveduras é necessário fazer uma diluição do meio de cultivo.

Figura 7. Esquema do processo de inoculação das leveduras em meio sólido e líquido



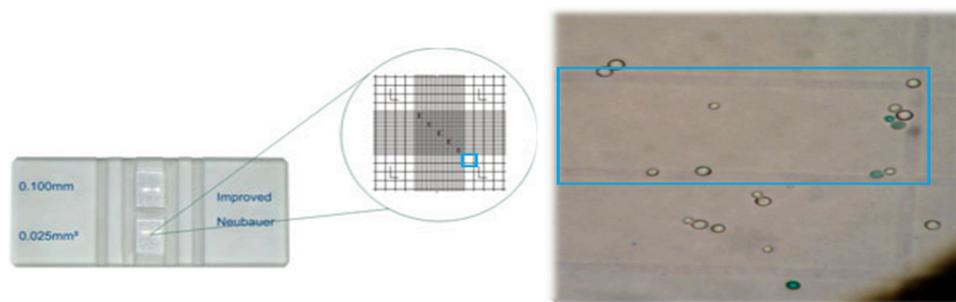
Fonte: Montagem elaborada pela autora (2015)

As vidrarias utilizadas foram previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C e 1 atm, durante 20 minutos, para evitar possíveis contaminações.

4.3.2.2 Procedimento de contagem celular pelo método de Microscopia Direta

A contagem foi realizada em uma Câmara de Neubauer espelhada, onde foram contados os quatro retículos laterais de cada um dos 16 campos, nos 4 quadrados maiores da lâmina, isto para cada erlenmeyer/experimento. Para a contagem de células ativas e inativas foi adotada a técnica preconizada por Cecatto-Antonini (2004), que se baseia no uso de uma solução corante de 0,01 g de azul de metileno e 2 g de citrato de sódio (Figura 8).

Figura 8. Câmara de Neubauer, evidenciando-se, em azul, os quadrados contados em todas as laterais



Fonte: Adaptado por Rabelo (2011)

As amostras retiradas para análise microbiológica (1 mL) foram homogêneas com 1 mL da solução corante (azul de metileno\citrato de sódio) e transferida para a Câmara de Neubauer para a realização da contagem através do microscópio óptico e, desta forma, determinar a inativação celular, sendo determinado o número total de células viáveis as que não absorveram o corante e as inviáveis (inativadas) as que absorveram (OLIVEIRA, 1996).

Considerando as células coradas de azul como inativas e as transparentes como ainda ativas (Figura 9), a viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* foi calculada de acordo com a fórmula:

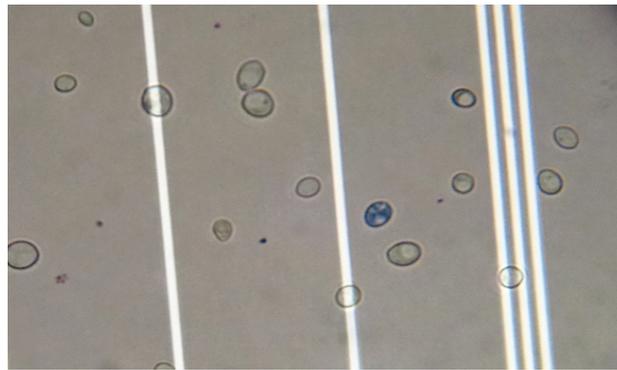
$$Vc (\%) = \frac{Nca}{Ntc} \times 100 \quad (6)$$

Vc: viabilidade celular

Nca: número de células ativas

Ntc: número total de células

Figura 9. Células em meio de solução corante de azul de metileno/citrato de sódio, mostrando as células viáveis (não coradas) e inviáveis (coradas)



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Como mencionado anteriormente, a inativação foi realizada através da contagem usando a técnica da solução corante, mostrando as células ativas e inativas presentes no meio, pois não ocorre a destruição das estruturas externas, que é quem confere o formato da mesma. Já em relação à lise celular foi realizada a contagem inicial e nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos, para obter a densidade populacional final das leveduras, uma vez que quando ocorre a lise celular, ocorre a destruição das estruturas externas das células, proporcionando uma diminuição da densidade populacional celular.

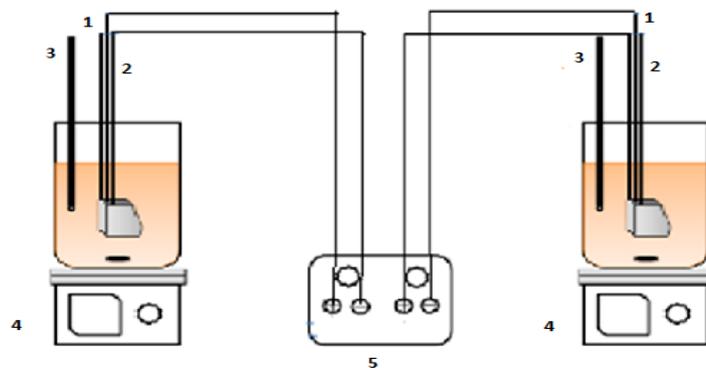
A partir do número de células totais (coradas e não coradas) obtido em cada intervalo de tempo, foi possível calcular a taxa de sobrevivência (e portanto a lise celular) e a eficiência do tratamento eletrolítico.

4.3.3 *Eletrólises*

Foram montados dois sistemas de eletrólise (um para cada ânodo), os quais foram operados simultaneamente, sob condições galvanostáticas e de agitação constante. Foram utilizadas duas celas eletroquímicas de compartimento único contendo, cada uma, 100 mL da solução do meio de cultivo com uma densidade populacional de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de

leveduras, em meio de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 , e três eletrodos (ânodo: $\text{Ti/RuO}_2\text{-TiO}_2$ ou $\text{Ti/RuO}_2\text{-IrO}_2\text{-TiO}_2$; cátodo: placa de titânio; e eletrodo de referência: $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat.})}$). Durante as eletrólises, os eletrodos (ânodo e cátodo) foram mantidos em paralelo (distância em torno de 1 cm) e de forma alternada (Figura 10).

Figura 10. Sistema eletrolítico: 1) ADEs; 2) Cátodos; 3) Eletrodos de referência; 4) Agitador magnético; 5) Fonte de alimentação



Fonte: Adaptado de Oliveira e Castro (2014)

Foram avaliadas três densidades de corrente (20 , 40 e 60 mA cm^{-2}), à temperatura ambiente ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). Posteriormente, aplicando a densidade de corrente que apresentou a melhor resposta em termos de inativação, foi verificado o efeito da adição de cloreto no meio eletrolítico ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl).

Durante as eletrólises foram retiradas alíquotas da solução eletrolítica após os tempos de 30 , 60 , 120 , 180 , 240 , 300 e 360 minutos para a realização das análises microbiológicas. Em cada intervalo de tempo foram monitorados, *in situ*, os parâmetros temperatura, pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, turbidez e potenciais da célula e do ânodo. Os parâmetros concentração de íons cloreto e COT foram determinados antes e após a realização das eletrólises.

Simultaneamente aos processos de eletrólise (Figura 10), foi montado um sistema controle, constituído de uma célula contendo 100 mL do mesmo meio de cultivo utilizado nas células eletroquímicas, e deixado em repouso no mesmo ambiente de realização das eletrólises. Desta solução controle, também foram retiradas alíquotas em cada intervalo de tempo para as análises microbiológicas, assim como foram monitorados os mesmos parâmetros e determinado a concentração de íons cloreto e COT.

Entre cada eletrólise, os eletrodos de trabalho foram limpos por meio da aplicação de uma densidade de corrente de 10 mA cm^{-2} durante 5 minutos, em uma solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 , para retirar das superfícies as impurezas adsorvidas.

4.3.4 Determinação do consumo energético

O processo eletroquímico foi avaliado em termos de eficiência de inativação e redução da densidade populacional de leveduras, e de consumo energético. O consumo de energia (CE) foi obtido através da Equação (7) (MARTÍNEZ-HUITLE *et al.*, 2012):

$$\text{CE} = \frac{\Delta E_c \cdot I \cdot t}{1000 \cdot V} \quad (7)$$

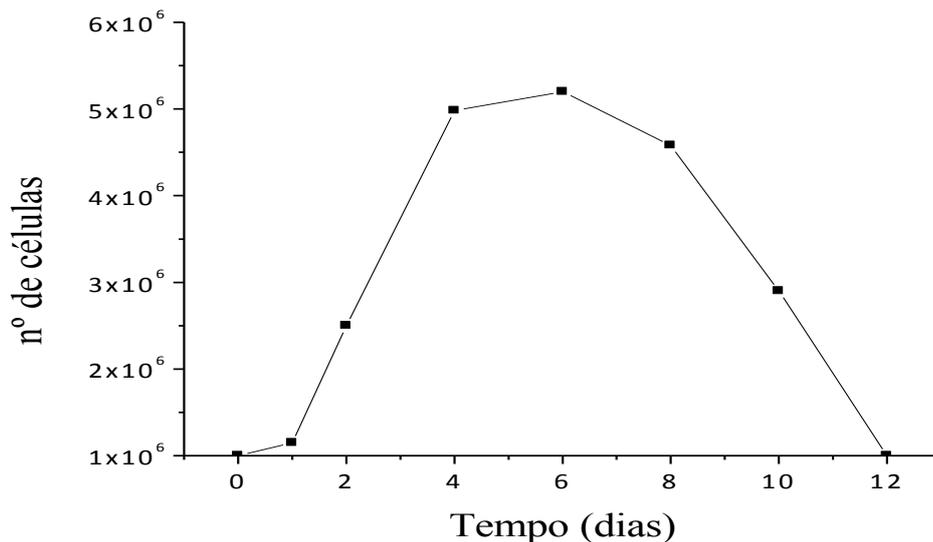
onde ΔE_c é a média do potencial aplicado (Volts), I é a corrente (Amperes), t é o tempo de eletrólise (h) e V é o volume (m^3).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo microbiológico

A curva de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* foi realizada no intuito de estabelecer uma densidade populacional ideal de células no meio, para iniciar o processo eletrolítico. O perfil da curva de crescimento, nas condições do meio de cultivo utilizado (Figura 11), indica que os dias mais favoráveis para a realização do tratamento eletrolítico é do segundo ao quarto dia de incubação das leveduras, quando ocorre a fase exponencial na curva de crescimento, ou seja, quando o número de células aumenta exponencialmente com o tempo. Assim, foi estabelecida uma densidade de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de células de *S. cerevisiae*. Quando esses valores aumentavam, era necessário fazer a diluição do meio para a obtenção de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de células de *S. cerevisiae*.

Figura 11. Identificação dos dias favoráveis para o tratamento eletrolítico, através da curva de crescimento das leveduras *S. cerevisiae*



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Não é interessante realizar esses processos nas fases Lag, estacionária ou declínio porque na fase Lag as células se encontram em processo de adaptação ao meio, na estacionária a quantidade de células vivas são iguais às mortas, e no declínio ocorre à morte excessiva das células devido à falta de nutrientes necessários para que ocorra o processo de duplicação.

5.2 Tratamento eletrolítico

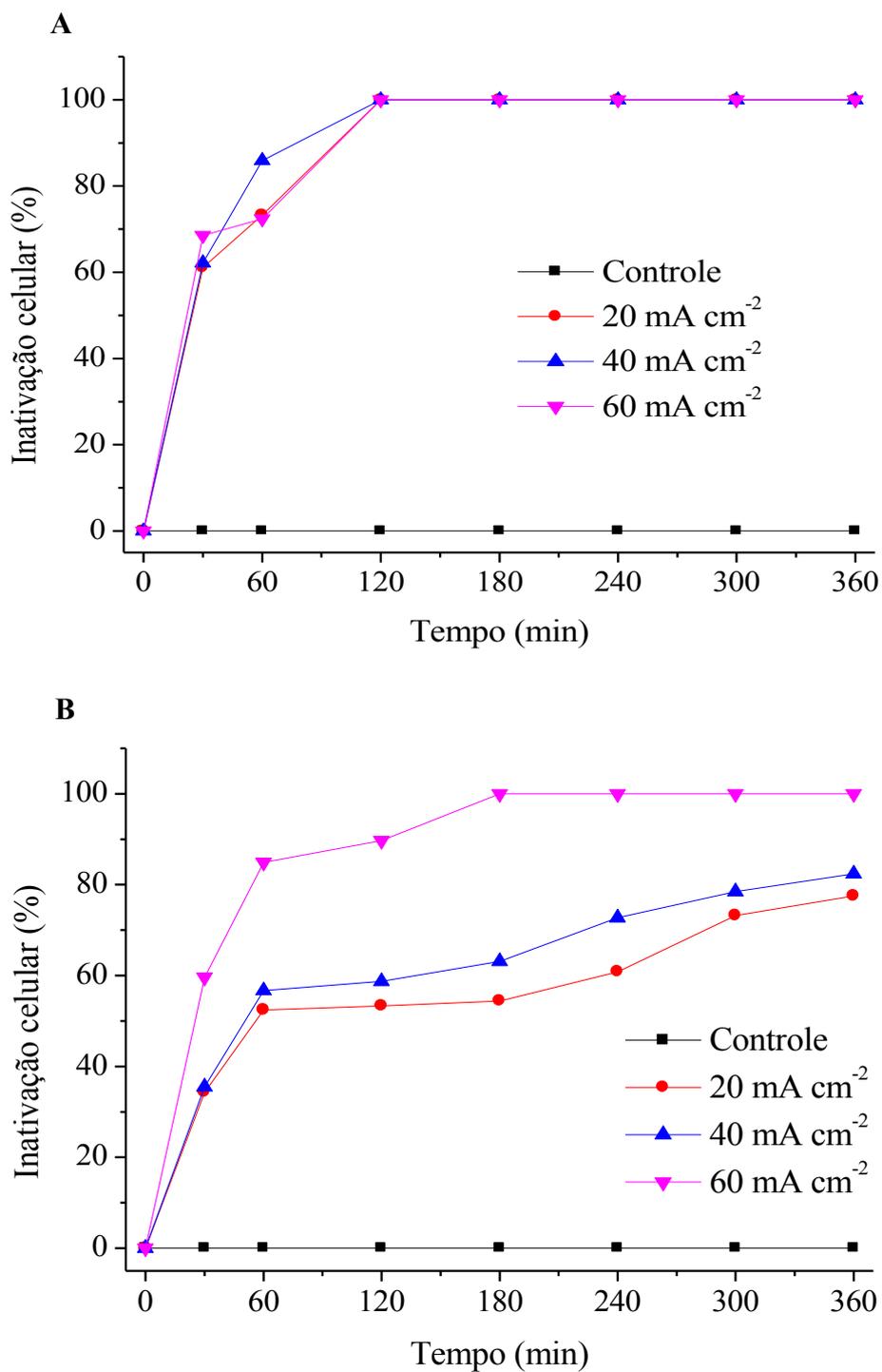
5.2.1 Influência da densidade de corrente aplicada na inativação e lise celular

Os resultados obtidos durante os processos de eletrólise feitos nas densidades de corrente de 20, 40 e 60 mA cm⁻², em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, para ambos os ADEs, foram avaliados em termos de inativação e lise celular da *S. cerevisiae*, sempre em comparação aos resultados obtidos com um meio de cultura controle, que foi mantido nas mesmas condições operacionais, mas sem passagem de corrente, durante 360 minutos.

O impacto causado pela aplicação de corrente (densidades de corrente de 20, 40 e 60 mA cm⁻²) na inativação das leveduras (1 x 10⁶ UFC mL⁻¹) foi expressiva quando comparado ao controle, que se manteve estável (Figura 12). Os resultados mostram que quando o ânodo de Ti/RuO₂TiO₂ foi utilizado, independente da densidade de corrente aplicada, em 120 minutos de eletrólise ocorreu a inativação de 100% das células. No entanto, quando o eletrodo de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ foi utilizado a inativação completa somente foi obtida após 180 minutos de eletrólise, e somente com aplicação de uma densidade de corrente de 60 mA cm⁻².

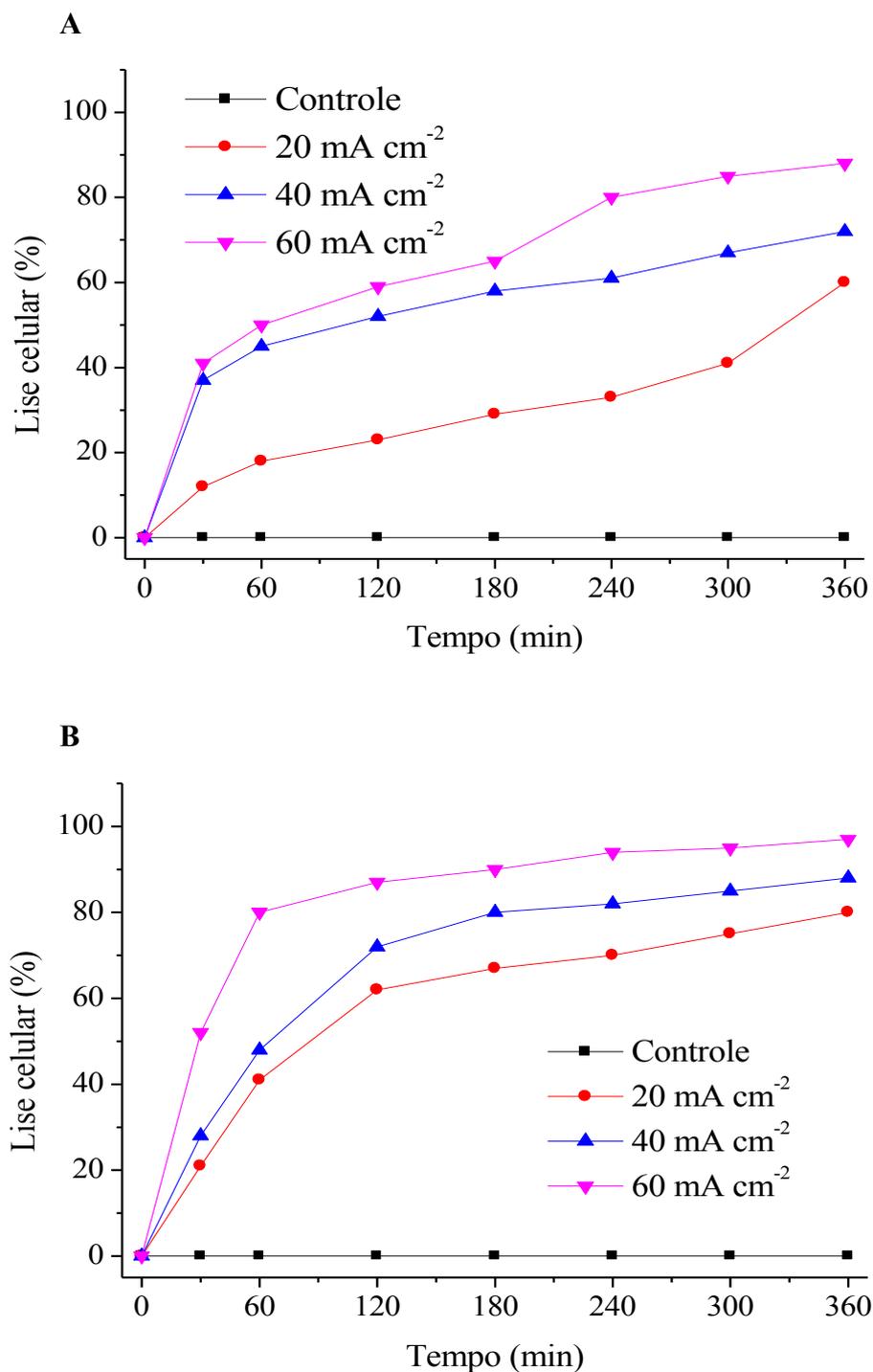
Em termos de lise celular, conforme representado na Figura 13 podemos verificar que ocorreu uma diminuição populacional de leveduras com a aplicação das densidades de corrente. As leveduras foram reduzidas de 1 x 10⁶ UFC mL⁻¹ para 4 x 10⁵ UFC mL⁻¹, 2,8 x 10⁵ UFC mL⁻¹ e 1,2 x 10⁵ UFC mL⁻¹, o que corresponde à uma remoção de células de 60%, 72% e 88%, para as densidades de corrente aplicadas de 20, 40 e 60 mA cm⁻², respectivamente, para o ânodo de Ti/RuO₂TiO₂ (Figura 13A); e de 1 x 10⁶ UFC mL⁻¹ para 2 x 10⁵ UFC mL⁻¹, 1,2 x 10⁵ UFC mL⁻¹ e 2,8 x 10⁴ UFC mL⁻¹, correspondendo à uma remoção de 80%, 88% e 97%, respectivamente, para o ânodo Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ (Figura 13B), mostrando que a redução máxima da densidade populacional (lise celular) foi de 88% para o ânodo de Ti/RuO₂TiO₂ e de 97% para o ânodo de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ após 360 minutos de eletrólise.

Figura 12. Influência da densidade de corrente aplicada (20, 40 e 60 mA cm⁻²) na porcentagem de inativação das leveduras *S. cerevisiae* (1×10^6 UFC mL⁻¹) em função do tempo de eletrólise, em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, usando os ânodos de (A) Ti/RuO₂TiO₂ e (B) Ti/RuO₂IrO₂TiO₂



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Figura 13. Influência da densidade de corrente aplicada (20, 40 e 60 mA cm⁻²) na porcentagem de redução da densidade populacional (lise celular) de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de leveduras *S. cerevisiae*, em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, em função do tempo de eletrólise, usando ânodos (A) Ti/RuO₂TiO₂ e (B) Ti/RuO₂IrO₂TiO₂



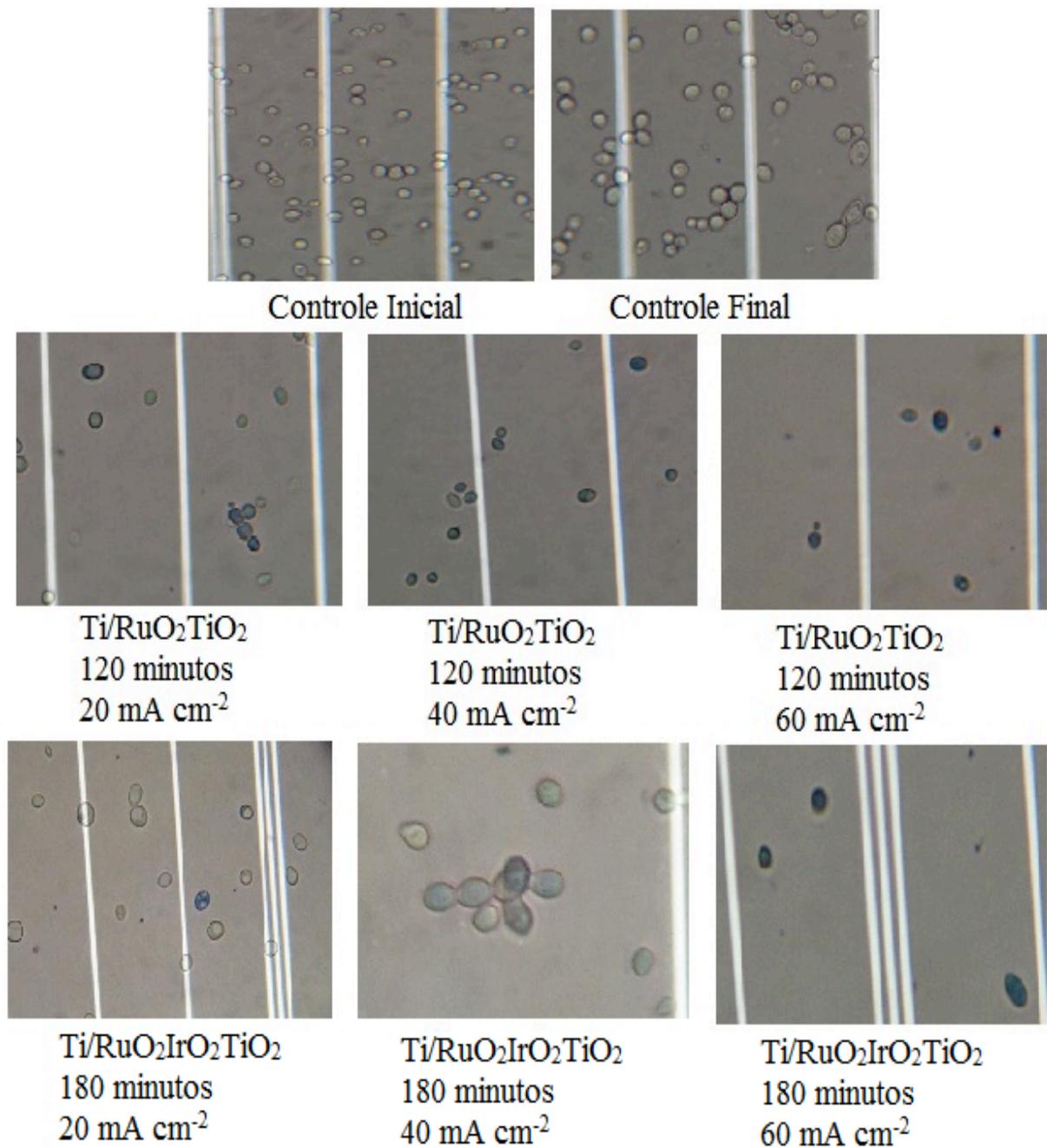
Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Segundo Trasatti (1991), alguns óxidos são eletrocatalisadores ativos para a reação de desprendimento de oxigênio, sendo que o RuO_2 tem uma alta atividade, maior do que o IrO_2 ; entretanto, o IrO_2 é anodicamente mais estável do que o RuO_2 . Quando ocorre a mistura destes dois óxidos, o IrO_2 impede a dissolução anódica do RuO_2 , pois desloca a formação dos óxidos de alta valência (RuO_3 e RuO_4) para potenciais mais positivos; contudo, o IrO_2 pode ter diminuído a atividade catalítica do RuO_2 .

Por outro lado, o processo de eletroporação ocorrido nos 120 minutos de eletrólise, associado aos subprodutos da degradação dos compostos orgânicos do meio de cultivo, podem ter levado a um processo de adsorção maior na superfície do eletrodo de $\text{Ti/RuO}_2\text{TiO}_2$ causando a sua passivação mais rapidamente e reduzindo o processo de lise celular.

Os resultados de inativação das leveduras foram obtidos pela contagem direta das células na câmara de Neubauer, por meio de um microscópio óptico e da coloração com a solução de azul de metileno/citrato de sódio (CECATTO-ANTONINI, 2004). A viabilidade celular foi medida através da percentagem de células coradas e células não coradas, sendo viáveis ou ativas as que ficaram transparentes e inviáveis ou inativadas as que foram coradas de azul devido à eletroporação causada pela oxidação da membrana e parede celular, permitindo assim, a entrada do corante (Figura 14).

Figura 14: Células coradas com azul de metileno/citrato de sódio após eletrólise em diferentes densidades de corrente aplicadas, em comparação ao controle inicial e final



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Avaliando os resultados obtidos, observa-se que a eficiência na inativação e lise celular aumenta conforme aumenta a densidade de corrente aplicada. Como essas leveduras são células eucarióticas, que possuem membrana e parede celular mais espessas e complexas, compostas de carboidratos, proteínas, lipídeos e quitina, o que confere proteção e resistência à célula, é difícil romper essas barreiras (PELCZAR *et al.*, 1997). Assim, inicialmente a

corrente aplicada promove um ataque oxidativo aos constituintes mais externos da célula, como a parede celular e a membrana plasmática, ocasionando a formação de poros (eletroporação) e, em seguida, permitindo a entrada dos agentes oxidantes, promovendo a oxidação de enzimas importantes para o metabolismo e a respiração celular, levando a inativação, e quando destroem as estruturas externas e internas promove a lise celular.

Segundo Knorr *et al.* (1994), quando a aplicação da densidade de corrente for baixa e em tempo curto, há a formação de poros que é reversível. Porém, com corrente e tempo de tratamento suficiente, este processo se torna irreversível, ocorrendo à perda de material celular.

A eletroporação é considerada reversível quando ocorre a formação de poros na membrana e parede celular aumentando a permeabilidade da membrana (inativação), porém a morte celular não é obrigatória; ou irreversível, quando há a formação de rupturas na membrana ocorrendo à morte celular (lise celular) (LUBICKI e JAYARAM, 1996).

O mecanismo envolvido no aumento da permeabilidade celular, ou seja, o processo tradicionalmente descrito na literatura, é que o campo elétrico gerado durante a eletroporação causa o aparecimento de poros aquosos ou hidrofílicos na membrana, os quais possibilitam a entrada de moléculas específicas nas células (NEUMANN *et al.*, 1982; CHEN *et al.*, 2006; YUAN, 2007). Essa permeabilidade na membrana é devido à baixa condutividade elétrica da bicamada lipídica, e alta em sua superfície, gerando um potencial transmembrana, que ao superar o valor do potencial natural da célula (cerca de 1 V) causa o rompimento da membrana (ZIMMERMAN, 1986; ANGERSBACH *et al.*, 2000).

Desta forma, a inativação e a lise das leveduras *S. cerevisiae* pode ser explicada pela oxidação do microrganismo na superfície do eletrodo, por meio do par redox (MO_x/MO_{x+1}) formado a partir da eletrólise da água, provocando a eletroporação de sua membrana e parede celular, e ocasionando a entrada de substâncias tóxicas para dentro da célula, como também a saída de substâncias importantes para manter a sua viabilidade celular, resultando na lise celular.

Esses resultados estão em consonância com outros autores. Tolentino-Bisneto e Bidoia (2003), utilizando processos eletrolíticos, verificaram que a parede celular e a membrana plasmática são as primeiras estruturas a reagirem com os radicais hidroxila; ou seja, o ponto de partida para a lise celular, causando a redução da densidade populacional de leveduras, é o ataque a essas estruturas.

Guillou *et al.* (2003), que estudaram os efeitos da eletrólise em suspensões de leveduras *S. cerevisiae* em meio de tampão fosfato, através dos métodos de contagem de

placas e determinação de ATP, aplicando uma corrente de 0,5 A durante 3 h, observaram uma diminuição na viabilidade celular durante o processo e verificaram efeito letal para as células.

No entanto, resultados divergentes foram encontrados por Gusmão (2006), que não obteve diminuição da viabilidade das leveduras *S. cerevisiae* pelo tratamento eletrolítico em fluxo (vazão de 200 L h⁻¹), utilizando correntes de 1, 2 e 3 A durante 60 minutos. Este mesmo tratamento foi aplicado por Gusmão (2010) em bactérias *E.coli*, resultando na inativação de 98,9%.

Jeong *et al.* (2007), usando ânodo de Platina, relataram que os microrganismos podem entrar em contacto com a superfície do ânodo, sendo adsorvidos sobre ele, e provavelmente sendo mortos eletricamente, isto é, através do campo elétrico aplicado ocorre a oxidação eletroquímica de constituintes vitais da célula (membrana e parede celular) provocando uma permeabilidade irreversível.

Os diferentes resultados aqui reportados podem estar associados às diferentes condições experimentais adotadas pelos autores. No geral, as divergências reportadas são devido a fatores que influenciam no processo de inativação, como o tipo de tratamento utilizado, o ânodo, o eletrólito, o tempo, as condições do meio de cultivo, entre outros.

5.2.2 Influência dos íons de cloreto na inativação e lise celular

Considerando os resultados anteriores, 20 mA cm⁻² foi selecionada como sendo a densidade de corrente que apresentou o melhor resultado em termos de inativação (Figura 12) e CE, uma vez que aumentando a densidade de corrente aumenta o CE (Equação 7), sendo portanto, a densidade de corrente usada para verificar a influência da adição de 0,05 mol L⁻¹ de íons cloreto na inativação e lise celular das leveduras *S. cerevisiae* (Figura 15).

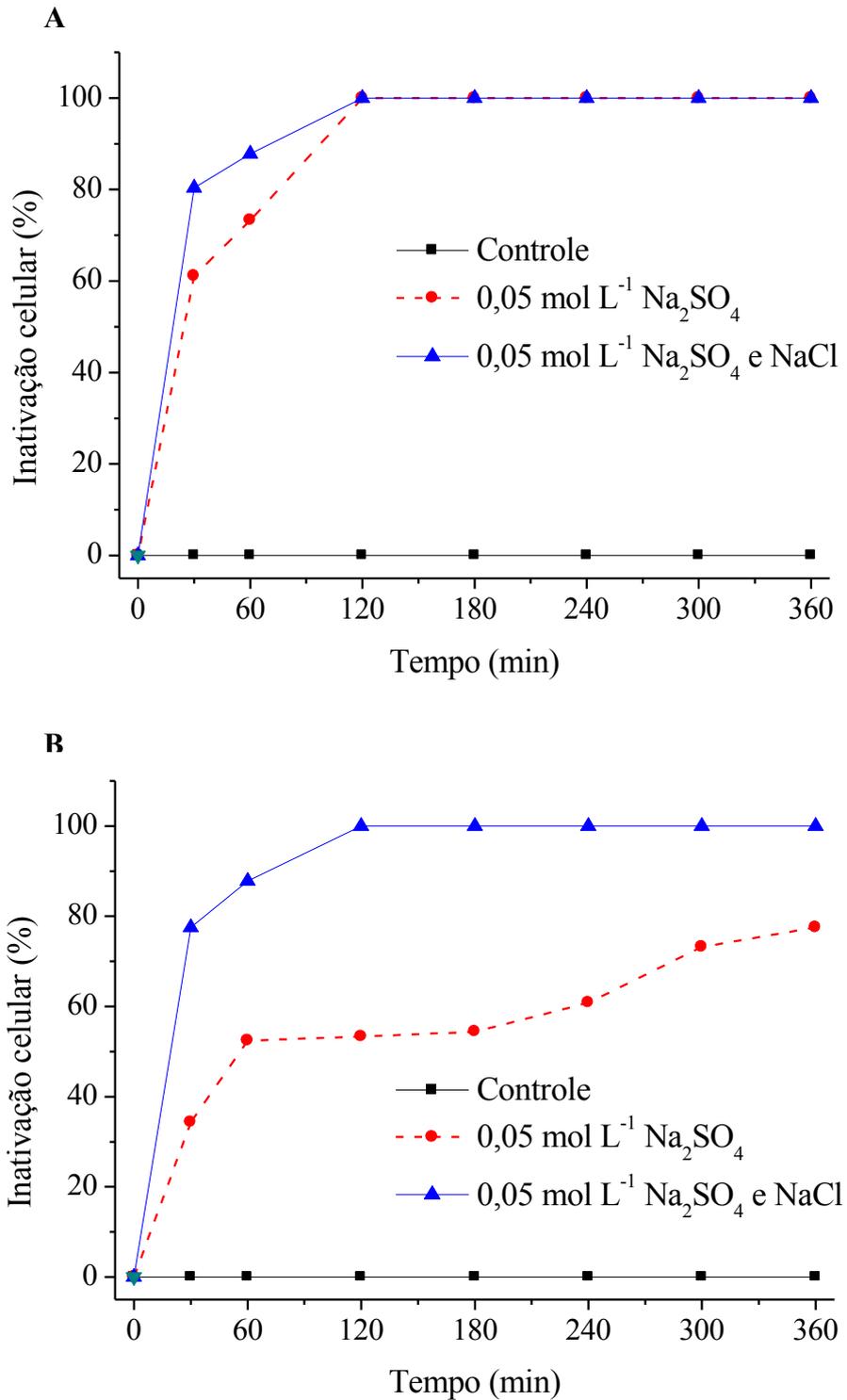
A Figura 15A mostra que quando o ânodo de Ti/RuO₂TiO₂ foi utilizado, o tempo necessário para promover 100% de inativação das leveduras permaneceu em 120 minutos de eletrólises com a adição de íons de cloreto. Por outro lado, quando foi usado o ânodo de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂, a inativação de 50% obtida anteriormente, em 120 minutos de eletrólise à 20 mA cm⁻², em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ (Figura 12B), foi aumentada para 100% quando íons cloreto foi adicionado (Figura 15B).

Em relação à lise celular, os íons cloreto também apresentaram uma influência significativa. A redução populacional das leveduras após eletrólise em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ foi de 60% e 80% quando os ânodos de Ti/RuO₂TiO₂ e de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ foram

utilizados, respectivamente, após 360 minutos. Já com a adição de íons cloreto a redução foi aumentada para 92% e 95%, respectivamente (Figura 15), para o mesmo tempo de eletrólise.

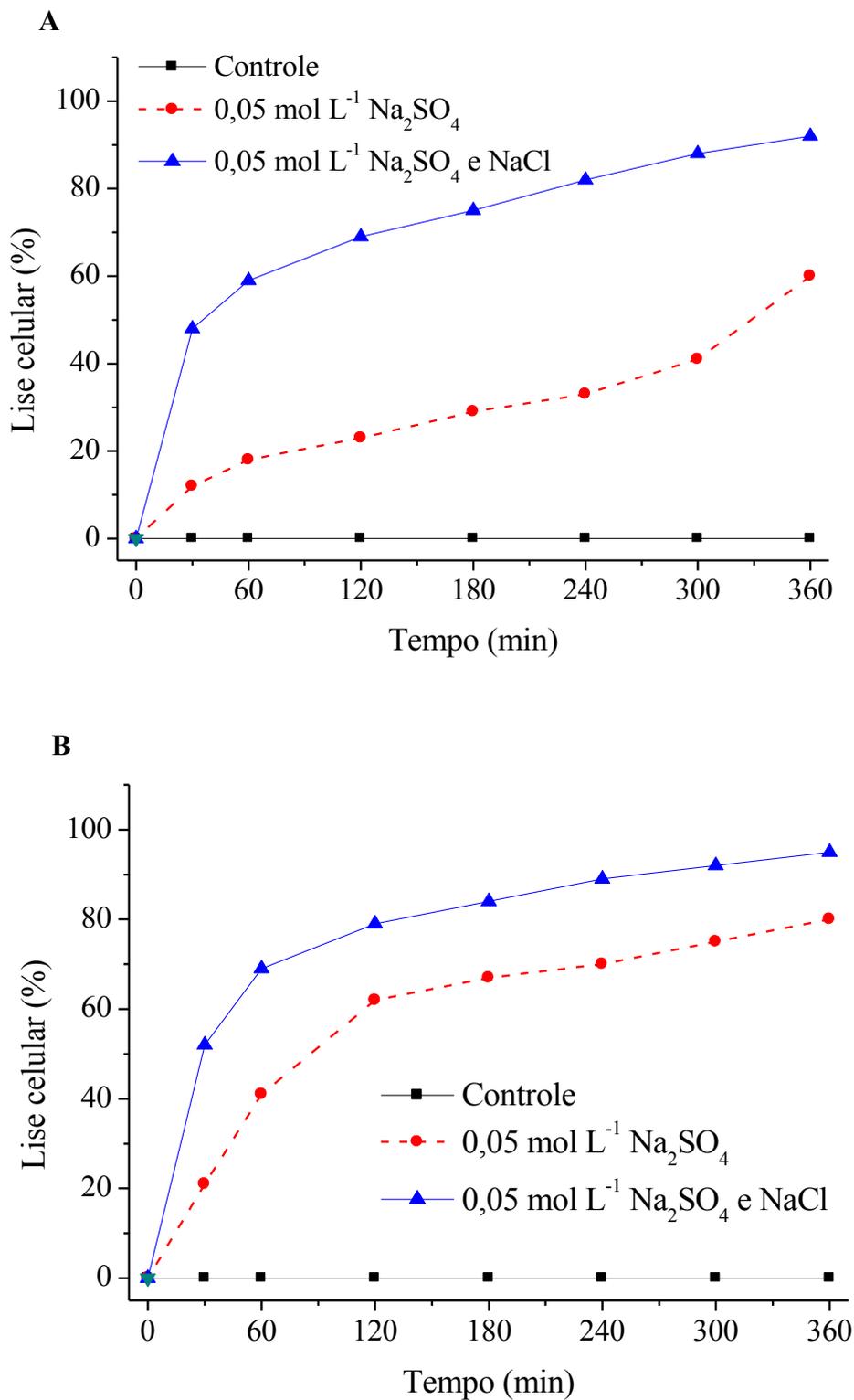
O teste de resistência do microrganismo na solução controle (mesmas condições experimentais, mas sem a aplicação da densidade de corrente) mostrou que a adição de íons cloreto não causou qualquer dano às células, ou seja, não ocorreram alterações celulares nas leveduras *S. cerevisiae* presentes na solução controle, durante os 360 minutos (Figura 15 e 16).

Figura 15. Influência da adição de íons cloreto na inativação de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de leveduras *S. cerevisiae* em função do tempo de eletrólise a 20 mA cm^{-2} , usando eletrodos de (A) Ti/RuO₂TiO₂ e (B) Ti/RuO₂IrO₂TiO₂



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Figura 16. Influência da adição de íons cloreto na redução da densidade populacional de 1×10^6 UFC mL^{-1} de leveduras *S. cerevisiae* em função do tempo de eletrólise a 20 mA cm^{-2} , usando eletrodos de (A) Ti/RuO₂TiO₂ e (B) Ti/RuO₂IrO₂TiO₂



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

A Tabela 5 mostra as porcentagens de inativação e redução da densidade populacional (lise celular) de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de leveduras *S.cerevisiae* em 120 minutos de eletrólise a 20 mA cm⁻², usando eletrodos de Ti/RuO₂TiO₂ e de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ em diferentes meios de eletrólito. Os dados mostram que o melhor resultado em termos de inativação foi obtido usando o ânodo Ti/RuO₂TiO₂, com 100% de inativação quando 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ foi usado; e na lise celular foi usando o ânodo de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂, com redução de 62% de leveduras no mesmo meio eletrolítico. Apesar dos resultados apresentados na Tabela 5 indicarem maior eficiência dos sistemas que usam íons cloreto, há um inconveniente, o de possibilitarem a formação de subprodutos tóxicos para os animais aquáticos, seguindo na cadeia trófica, prejudicando os seres consumidores, dentre estes os humanos.

Tabela 5. Porcentagens de inativação e lise celular de 1×10^6 UFC mL⁻¹ de leveduras *S. cerevisiae* em 120 minutos de eletrólise a 20 mA cm⁻², usando eletrodos de Ti/RuO₂TiO₂ e de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂, em diferentes meios de eletrólito

Ânodo	Eletrólito	Tempo (min)	Porcentagem de inativação (%)	Porcentagem de lise (%)
Ti/RuO ₂ -TiO ₂	Na ₂ SO ₄	120	100	23
	Na ₂ SO ₄ + NaCl	120	100	69
Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	Na ₂ SO ₄	120	53	62
	Na ₂ SO ₄ + NaCl	120	100	79

Fonte: Dados da pesquisa (2015)

5.2.3 Influência da densidade de corrente na remoção de COT

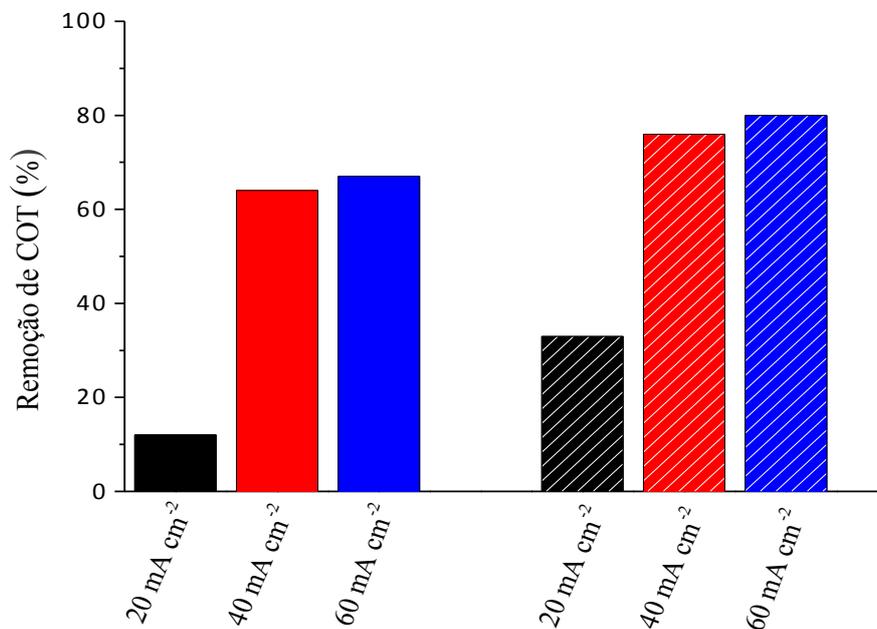
Considerando que as membranas e a parede celular das leveduras são constituídas por compostos orgânicos, como carboidratos, proteínas, lipídeos e quitina, assim como o seu meio de cultivo (ágar, peptona e glicose), fornecendo valores significativamente elevados de COT no meio eletrolítico, a remoção deste parâmetro também foi avaliada, com vistas a verificar a mineralização da matéria orgânica devido os processos de eletrólises.

Para tal, foi determinada a quantidade inicial de COT presente no meio de cultivo contendo as leveduras (242,3 mg L⁻¹) e sem as leveduras (223,8 mg L⁻¹). Estes valores

indicam que 92,4% do COT presente no meio de eletrólise deve-se aos reagentes utilizados para fazer o meio de cultivo.

A Figura 17 mostra a remoção de COT como uma função da densidade de corrente aplicada, durante 360 minutos. Como pode ser observado para ambos os eletrodos, a remoção do COT aumenta à medida que a densidade de corrente aumenta, sendo de 12%, 64% e 67% para o ânodo Ti/RuO₂TiO₂ e de 33%, 76% e 80% para o ânodo Ti/RuO₂IrO₂TiO₂, quando as densidades de 20, 40 e 60 mA cm⁻² foram aplicadas, respectivamente.

Figura 17. Influência da densidade de corrente aplicada na remoção de COT da solução de *S. cerevisiae* usando os eletrodos, Ti/RuO₂TiO₂ (colunas sólidas) e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ (colunas tracejadas). Condições experimentais: meio eletrolítico de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, densidades de corrente aplicada de 20, 40 e 60 mA cm⁻² e tempo de eletrólise de 360 minutos



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Quando a densidade de corrente foi aumentada de 20 para 40 mA cm⁻², os valores de remoção de COT aumentaram significativamente, o que pode ser justificado pelo aumento de radicais hidroxila gerados por unidade de tempo. No entanto, quando a densidade de corrente aumentou de 40 para 60 mA cm⁻², um pequeno aumento na porcentagem de remoção de COT foi observado (Figura 17). Como os ADEs são eletrodos ativos, os radicais •OH produzidos durante a oxidação da água (Eq. 1) interagem fortemente com a superfície do ânodo formando os óxidos superiores (Eq. 2), e o par redox formado (MO_x/MO_{x+1}) é responsável pela oxidação dos compostos orgânicos (Eq. 4), que por sua vez compete com a reação de

evolução de oxigênio (Eq. 3). Assim, em 60 mA cm^{-2} a reação de evolução de oxigênio pode ter sido favorecida em detrimento da oxidação da matéria orgânica.

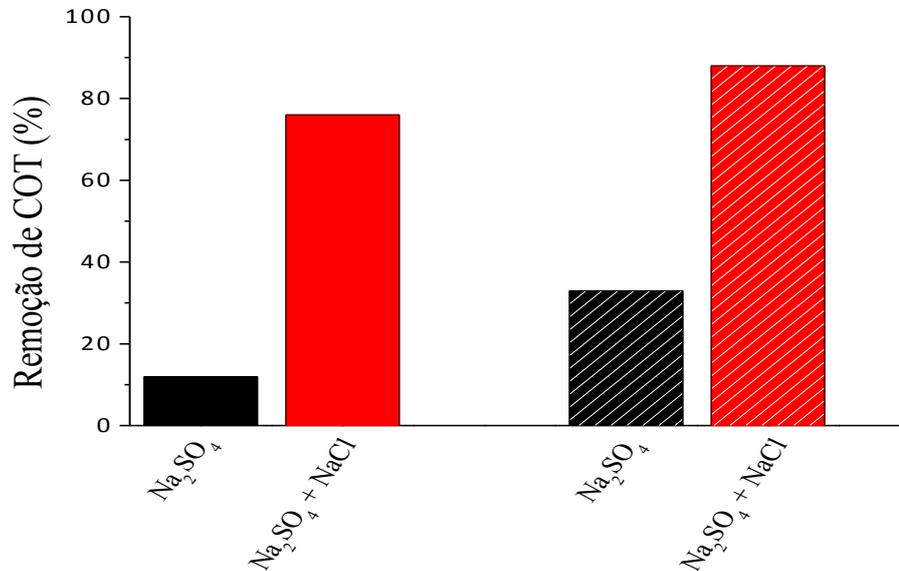
Apesar do COT não ter sido monitorado durante as eletrólises, mas somente determinada antes e após o término das mesmas, pelas curvas de inativação (Figura 12) e lise celular (Figura 13) pode-se inferir que após 60 minutos de eletrólise, independente das condições operacionais (densidade de corrente ou ânodo utilizado), pode ter ocorrido a formação de compostos estáveis, de difícil mineralização. Além disso, o aumento da evolução de oxigênio reduz a possibilidade de adsorção dos compostos orgânicos nos sítios ativos do eletrodo, diminuindo a eficiência de corrente na reação direta (PANIZZA e CERISOLA, 2009).

5.2.4 Influência de íons cloreto na remoção de COT

A Figura 18 corresponde ao efeito de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de íons cloreto sobre a remoção de COT da solução de *S. cerevisiae*, quando uma densidade de corrente de 20 mA cm^{-2} foi aplicada, durante 360 minutos. Observa-se que os íons cloreto teve um impacto significativo na oxidação eletroquímica da matéria orgânica, elevando de 12% para 76%, e de 33% para 88% de remoção de COT quando os eletrodos de $\text{Ti/RuO}_2\text{TiO}_2$ e $\text{Ti/RuO}_2\text{IrO}_2\text{TiO}_2$ foram usados, respectivamente.

Os resultados indicam que a adição de íons cloreto na solução contendo as leveduras promoveu a eletrogeração de espécies oxidantes fortes, tais como hipoclorito e ácido hipocloroso. De fato, analisando o pH da solução, inicialmente de 4,94, ele aumentou para 5,45, favorecendo a formação destas espécies de cloro ativo, que também atuam como mediadores de oxidação, aumentando a velocidade de remoção de COT.

Figura 18. Influência dos íons cloreto na remoção de COT da solução de *S. cerevisiae*, usando eletrodos de Ti/RuO₂TiO₂ (colunas sólidas) e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ (colunas tracejadas). Condições experimentais: meio eletrolítico de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ e 0,05 mol L⁻¹ de NaCl, densidade de corrente aplicada de 20 mA cm⁻² e tempo de eletrólise de 360 minutos



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Na verdade, é bem conhecido que a eletrólise em meio aquoso contendo íons cloreto gera espécies oxidantes de cloro ativo no ânodo, como o ácido hipocloroso e o hipoclorito (GHERNAOUT, NACEUR e AOUABED, 2011), sendo que na faixa de pH trabalhado, a espécie predominante é o HClO ($\text{Cl}_{2(\text{aq})} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HOCl} + \text{Cl}^- + \text{H}^+$), que tem um alto potencial padrão ($E^0 = 1,63 \text{ V vs. ENH}$) e, indiretamente, pode oxidar a matéria orgânica ($\text{MO}_x(\text{HClO})_{\text{ads}} + \text{R} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^-$). O íon de hipoclorito predomina em meios alcalinos, $\text{pH} > 7,5$ (CHEN *et al.*, 2004), enquanto o cloro é mais estável em ambiente ácido ($\text{pH} < 3$).

Observou-se também uma variação da concentração de íons cloreto nas soluções de eletrólise, obtidos antes e após a aplicação das densidades de corrente (Tabela 6). A concentração desses íons diminuiu após as eletrólises à 20 mA cm^{-2} , para ambos os eletrodos, devido ao fato de uma pequena quantidade de cloreto ser eliminada como Cl_2 ($\text{Cl}_{2(\text{aq})} \rightleftharpoons \text{Cl}_{2(\text{g})}$).

Esta variação de concentração de cloreto foi contrária aquela observada em meio contendo somente o eletrólito de Na₂SO₄, onde obteve-se um aumento da concentração de cloreto. Esse aumento pode estar relacionado com a lise das células, liberando cloreto, uma vez que no processo de ativação das leveduras foi utilizado este ânion. Observa-se ainda, que

o aumento foi maior quando o eletrodo de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ foi usado, indicando que esse aumento realmente foi favorecido pela lise celular.

Tabela 6. Concentração de íons cloreto obtida antes e após as eletrólises realizadas usando os ânodos Ti/RuO₂TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂. Condições experimentais: densidades de corrente aplicadas de 20, 40 e 60 mA cm⁻² em meio de Na₂SO₄ e de 20 mA cm⁻² em meio de Na₂SO₄ e íons cloreto como eletrólito suporte

Densidade de Corrente (mA cm ⁻²)	Eletrólito	Ânodos	Cl inicial (mg L ⁻¹)	Cl final (mg L ⁻¹)
		Controle	204,1	247,8
20	Na ₂ SO ₄	Ti/RuO ₂ TiO ₂	204,1	210,2
		Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	204,1	235,7
		Controle	204,1	247,8
40	Na ₂ SO ₄	Ti/RuO ₂ TiO ₂	204,1	230,0
		Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	204,1	232,9
		Controle	204,1	247,8
60	Na ₂ SO ₄	Ti/RuO ₂ TiO ₂	204,1	241,4
		Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	204,1	244,2
		Controle	2414,0	2343,0
20	Na ₂ SO ₄ + NaCl	Ti/RuO ₂ TiO ₂	2414,0	2094,5

Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Apesar de apresentar alguns inconvenientes, como por exemplo a possível formação de organoclorado persistente e a menor resistência dos materiais do eletrodo neste meio (KORBAHTI *et al.*, 2009), a presença de íons cloreto mostrou ser eficiente, pois acelerou a inativação e lise celular, mostrando ser um eletrólito importante a ser usado em eletrólises, visando a completa inativação e lise de microrganismos.

5.2.5 Parâmetros físico-químicas

A Tabela 7 mostra os valores de pH, T, C, OD e turbidez medidos antes e após os processos de eletrólise usando os ânodos Ti/RuO₂TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂, na ausência e presença de íons cloreto.

O pH e a temperatura são parâmetros de extrema importância em qualquer meio reacional, pois influencia de maneira significativa as várias reações físico-químicas e atividades metabólicas em microrganismos.

Como pode ser observado na Tabela 7, os valores de pH iniciais encontram-se entre 4,5 e 5,5, que são os valores de pH ótimo para a viabilidade celular dessas leveduras (LIMA, AQUARONE e BORZANI, 1975). Portanto, este parâmetro não foi um agente influenciador da inativação ou da lise da *S. cerevisiae*. O papel do pH na sobrevivência de microrganismos está relacionada com a capacidade dos organismos para controlar o pH citoplasmático.

Em relação ao pH final, observa-se que ao aplicar as densidades de corrente de 20, 40 e 60 mA cm⁻² verifica-se um decaimento do pH usando os ânodos de Ti/RuO₂TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ (Tabela 7). Quando adicionou íons cloreto na solução contendo leveduras, na densidade de corrente de 20 mA cm⁻², os valores aumentaram usando os ânodos de Ti/RuO₂TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂.

Possivelmente, a diminuição do pH foi ocasionado pela eletrólise de água, promovendo a liberação de íon H⁺ na solução eletrolítica, deixando o meio mais ácido. Segundo Connellis (1994), a oxidação da água sobre a superfície do eletrodo (MO_x) forma o radical hidroxila adsorvido (MO_x([•]OH)), de acordo com a equação $MO_x + H_2O \rightarrow MO_x(\cdot OH) + H^+ + e^-$. Pela aplicação de correntes mais elevadas, estas proporcionam uma maior formação do MO_x([•]OH) e, conseqüentemente, maior formação do íon hidrogênio, deixando o meio aquoso mais ácido. O H⁺ também pode ser formado por meio das interações de vacâncias de oxigênio presentes no anodo oxidado, com possível transição do oxigênio do [•]OH adsorvido formando os óxidos superiores ($MO_x(\cdot OH) \rightarrow MO_{x+1} + H^+ + e^-$), ou na oxidação indireta dos compostos orgânicos por meio dos radicais hidroxila gerados, a dióxido de carbono, água e íon hidrogênio, como descrito na equação $MO_x(\cdot OH) + R \rightarrow MO_x + mCO_2 + nH_2O + H^+ + e^-$. Além disso, intermediários do processo de degradação, como os ácidos orgânicos simples, podem diminuir o pH do meio.

Tabela 7. Parâmetros físico-químicos iniciais e finais do tratamento eletrolítico das leveduras *S. cerevisiae*, nas densidades de corrente de 20, 40 e 60 mA cm⁻², em meio de eletrólito 0,05 mol L⁻¹ Na₂SO₄ e adicionado íons cloreto, usando os ânodos de Ti/RuO₂TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂

Densidade de Corrente (mA cm ⁻²)	ÂNODOS	T (i/f) (°C)	pH (i/f)	C (i/f) (mS cm ⁻²)	OD (i/f) (mg L ⁻¹)	Turbidez (i/f) (NTU)
20	Controle	26/26	4.94/5.55	12.68/12.81	2.25/7.10	455,2/548,0
	Ti/RuO ₂ TiO ₂	26/31	4.94/3.69	12.68/13.51	2.25/10.16	455,2/425,7
	Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	26/30	4.94/4.00	12.68/13.70	2.25/9.67	455,2/388,4
40	Controle	26/26	4.94/5.55	12.68/12.81	2.25/7.10	455,2/548,0
	Ti/RuO ₂ TiO ₂	26/34	4.94/3.61	12.68/14.13	2.25/6.14	455,2/348,1
	Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	26/34	4.94/2.74	12.68/13.88	2.25/11.85	455,2/299,9
60	Controle	26/26	5.13/5.90	12.80/12.81	2.15/7.55	459,2/502,5
	Ti/RuO ₂ TiO ₂	26/42	5.13/3.50	12.80/15.42	2.15/12.28	459,2/241,3
	Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	26/43	5.13/4.96	12.80/15.13	2.15/13.18	459,2/167,8
20	Controle	26/16	4.90/4.83	20.93/21.46	2.79/4.53	438,1/464,3
	Ti/RuO ₂ TiO ₂	26/33	4.90/5.43	20.93/20.29	2.79/6.41	438,1/264,2
	Ti/RuO ₂ IrO ₂ TiO ₂	26/33	4.90/5.47	20.93/19.70	2.79/9.62	434,8/215,2

Temperatura (T), condutividade elétrica (C), oxigênio dissolvido (OD) e inicial e final (i/f)

Fonte: Dados da pesquisa (2015)

Quanto à temperatura, esta se manteve entre 26 e 34 °C, com exceção das eletrólises realizadas à 60 mA cm⁻², que provocaram um aumento de 26 °C para 42 °C e 43 °C, quando os ânodos Ti/RuO₂TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ foram usados, respectivamente. A temperatura ótima de viabilidade da levedura é de 26 a 35 °C, podendo exceder até 39 °C (LIMA AQUARONE, BORZANI, 1975). Porém, o aumento observado nos experimentos não influenciou na inativação das leveduras, pois para ocorrer uma desinfecção térmica (dependendo da espécie de microrganismo) deve-se exceder 60 °C (TORTORA, FUNKE E CASE, 2005). Para

verificar se essa temperatura realmente não influenciou na inativação das leveduras, foi realizado um teste controle com temperatura de 45 °C durante 360 minutos e os resultados confirmaram que essa temperatura não é capaz de inativar as células das leveduras *S. cerevisiae*.

Em relação à condutividade elétrica, quando comparados aos valores iniciais, estas tiveram um pequeno aumento (que foi maior à medida que a densidade de corrente foi aumentada) quando as eletrólises foram realizadas em meio Na₂SO₄, indicando degradação da matéria orgânica e, como consequência, a formação de íons inorgânicos na solução, além da contribuição devido ao aumento da temperatura. Quando foi adicionado os íons cloreto, os valores de condutividade apresentaram uma pequena redução, provavelmente devido a geração das espécies de cloro altamente oxidantes no meio (RAMALHO, MARTÍNEZ-HUITLE e SILVA, 2010; ROCHA *et al.*, 2012).

Em relação ao OD, quando compara-se ao obtido no controle, observa-se um aumento após as eletrólises, principalmente quando a densidade de corrente de 60 mA cm⁻² foi aplicada. Considerando que o meio de cultivo foi incubado em condições anaeróbicas, apresentando pouca quantidade de oxigênio, o aumento na quantidade de OD no meio deve-se às reações de desprendimento de oxigênio durante as eletrólises, que aumenta com o aumento da densidade de corrente aplicada. Para verificar se o aumento de O₂ influenciava na inativação das células, uma vez que as mesmas foram cultivadas em condições anaeróbicas, (apesar de serem anaeróbicas facultativas), foi realizado um teste, aerando o meio de cultivo com as leveduras durante 360 minutos. Os resultados mostraram que o aumento de O₂ de fato não foi o responsável pela inativação das leveduras *S. cerevisiae*.

Em relação aos valores de turbidez, quando se compara os valores iniciais e finais do sistema controle observa-se um aumento, devido ao acréscimo do número de células. Isto pode ser justificado pelo fato das células estarem em um meio propício para a sua multiplicação.

Por outro lado, quando se compara os valores finais aos valores iniciais, independente da densidade de corrente aplicada durante o tratamento eletrolítico, observa-se uma diminuição. Além disso, à medida que aumenta a densidade de corrente, a turbidez diminui ainda mais. Os resultados apresentados na Tabela 7 mostraram que essa diminuição ocorreu para os dois ânodos avaliados, sendo que o ânodo de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ foi o que apresentou a maior eficiência, o que está em concordância com os dados representados na Figura 13, que mostra a diminuição da densidade populacional das células de levedura *S. cerevisiae* da solução do meio eletrolítico, devido à lise celular, com o aumento da densidade de corrente,

sendo esta diminuição maior para o ânodo Ti/RuO₂IrO₂TiO₂, o que justifica a maior redução de turbidez neste ânodo.

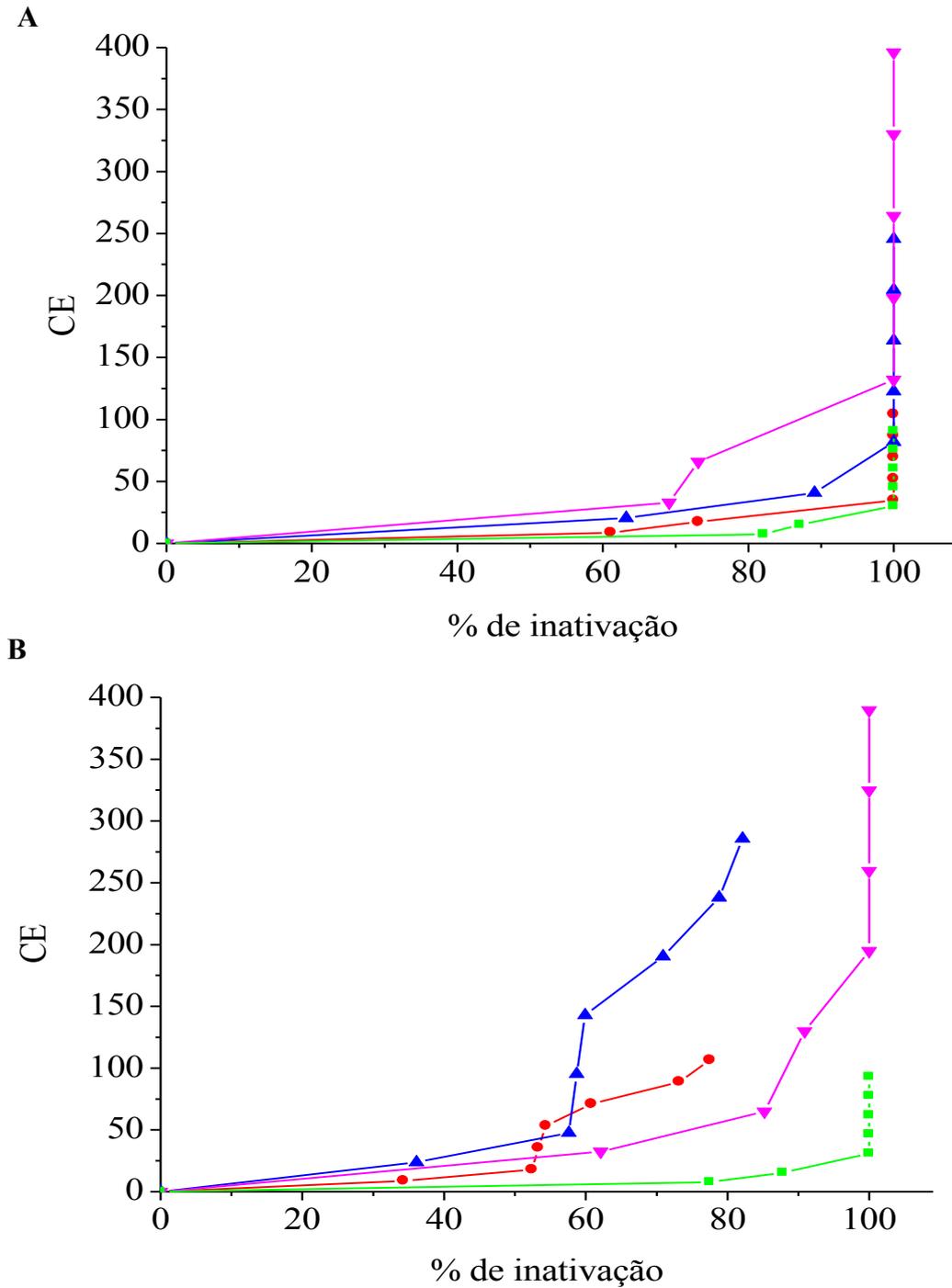
5.3 Estimativas do consumo energético

Para aplicação de qualquer metodologia de degradação eletroquímica é muito importante estimar a sua viabilidade em termos de consumo energético (PANIZZA e CERISOLA, 2009). Na Figura 19 encontra-se representado, para ambos os ânodos utilizados, o consumo de energia como uma função da porcentagem de inativação das células de leveduras *S. cerevisiae*, durante o processo de eletrólise, na ausência e presença de íons cloreto.

Como pode ser observado, para ambos os ADEs, os valores de consumo energético foram proporcionais à densidade de corrente aplicada durante o tratamento eletroquímico em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, e praticamente não houve redução na energia requerida quando íons cloreto foi adicionado ao meio eletrolítico. Na presença de cloreto, os valores de CE obtidos foram de 30,24 kWh m⁻³ e 30,99 kWh m⁻³ quando uma densidade de corrente de 20 mA cm⁻² foi aplicada aos eletrodos Ti/RuO₂TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂, respectivamente, enquanto que na ausência, o sistema experimental que apresentou o melhor desempenho na inativação das leveduras, com um consumo energético de 34,80 kWh m⁻³, foi com a aplicação de uma densidade de corrente de 20 mA cm⁻², usando o ânodo de Ti/RuO₂TiO₂, em 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄.

Estes resultados estão de acordo com dados reportados na literatura, onde foi demonstrado que o tratamento eletroquímico requer potenciais menores quando na presença de íons cloreto, comparado com aqueles necessários para a oxidação anódica direta (BONFATI *et al.*, 2000), diminuindo o CE e, conseqüentemente, os custos.

Figura 19. Consumo energético em função da porcentagem de inativação celular, durante as eletrólises da solução de *S. cerevisiae* em meio de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 , nas densidades de corrente de (—●—) 20 mA cm^{-2} , (—▲—) 40 mA cm^{-2} e (—▼—) 60 mA cm^{-2} ; e em meio de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ Na_2SO_4 e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl em (—■—) em 20 mA cm^{-2} , usando ânodos de (A) $\text{Ti/RuO}_2\text{TiO}_2$ e (B) $\text{Ti/RuO}_2\text{IrO}_2\text{TiO}_2$



Fonte: Dados da pesquisa (2015)

6. CONCLUSÕES

Na avaliação da eficiência dos eletrodos de Ti/RuO₂TiO₂ e Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ no processo eletrolítico de inativação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, as condições operacionais que possibilitaram o melhor desempenho (100% de inativação) foram:

- usando o eletrodo de Ti/RuO₂TiO₂ em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄, submetido a uma densidade de corrente de 20 mA cm⁻², durante 120 minutos de eletrolise, com um consumo energético de 34,80 kWh m⁻³; e
- usando os eletrodos de Ti/RuO₂TiO₂ e de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ e 0,05 mol L⁻¹ de NaCl, submetido a uma densidade de corrente de 20 mA cm⁻², durante 120 minutos de eletrolise, com um consumo energético de 30,24 kWh m⁻³ e 30,99 kWh m⁻³, respectivamente.

As análises físico-químicas e a comparação com o meio de cultivo controle mostraram que a inviabilização celular das leveduras ocorreu de fato pelo tratamento eletrolítico, não sendo influenciadas por condições químicas e ambientais.

Uma possível rota para o mecanismo de eletroxidação é a eletroporação da membrana e parede celular, ocasionando a entrada de substâncias tóxicas para dentro da célula, como também a saída de substâncias importantes para a manutenção de sua viabilidade celular.

Em termos de remoção da matéria orgânica, durante os 120 minutos de eletrólise necessários para a inativação de 100% das leveduras, as melhores condições experimentais foram obtidas em meio de 0,05 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ e 0,05 mol L⁻¹ de NaCl, usando o eletrodo de Ti/RuO₂IrO₂TiO₂ a uma densidade de corrente aplicada de 20 mA cm⁻², promovendo uma remoção de 88% de COT em 360 minutos de eletrólise.

Portanto, os estudos mostraram que o uso dos ADEs são eficientes na inativação das leveduras *S. cerevisiae*, sendo o método de desinfecção utilizado neste trabalho uma alternativa para a inativação de microrganismos presentes em águas e efluentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, P. A. **Tratamento eletroquímico e eletroquímico foto-assistido na degradação de efluentes da indústria têxtil**. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 2010.

ALEBOYEH, A.; OLYA, M. E.; ALEBOYEH, H.; Electrical energy determination for an azo dye decolorization and mineralization by UV/H₂O₂ advanced oxidation process, **Chemical Engineering Journal**, v. 137, p. 518 - 524, 2008.

ANGERSBACH A, HEINZ V, KNORR, D. Effect of Pulsed Electric Fields on Cell Membranes in Real Food Systems. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 1, p. 135 - 149, 2000.

ARAÚJO, C. K. C.; OLIVEIRA, G. R.; FERNANDES, N. S. ZANTA, C. L. P. S.; CASTRO, S. S. L. SILVA, D. R.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. Electrochemical removal of synthetic textile dyes from aqueous solutions using Ti/Pt anode: role of dye structure. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 9777 - 9784, 2014.

ARNOLD, W.N. Physical aspects of the yeast cell envelope. *Yeast Cell Envelopes*. **Biochemistry Biophysics and Ultrastructure**. v. 2, p. 2 - 46, 1981.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts, Characteristics and Identification**, 2. ed. Cambridge University Press, Cambridge, 467 - 469, 1990.

BIDDICK, R. YOUNG, E. T. The disorderly study of ordered recruitment. **Yeast** (Chichester, England), v. 26, p. 205 - 220, 2009.

BONFATTI, F. FERRO, S.; LAVEZZO, F.; MALACARNE, M.; LODI, G.; De BATTISTI, A.; Electrochemical incineration of glucose as a model organic substrate II. Role of active chlorine mediation. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 147, p 592 - 596, 2000.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.

BRASIL. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/port_2914_qualidade_h2o.pdf> acessado em: junho de 2013.

BRATFICH, O.J.; ANGELIS, D.F.; DOMINGOS, R.N.; BIDOIA, E.D. Electrolysis of cell suspensions of *Bacillus subtilis* (ATCC - 9372) and of *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann Royal) using cast - iron electrodes. **Brazilian Journal of Ecology**, Rio Claro, v. 3, p. 1 - 4, 1999.

BRITO, N. N.; SILVA, V. B. M. Processos Oxidativos Avançados e sua aplicação ambiental. **Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, v. 1, p. 36 - 47, 2012.

BRILLAS, E. MARTINEZ-HUITLE, C.A. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods. An updated review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 166 - 167, p. 603 - 643, 2015.

BRUGNERA, M. F., MIYATA, M., ZOCCOLO, G. J., LEITE, C. Q. F., ZANONI, M. V. B.; Inactivation and disposal of by-products from *Mycobacterium smegmatis* by photoelectrocatalytic oxidation using Ti/TiO₂-Ag nanotube electrodes, **Electrochimica Acta**, v. 85 p. 33 - 41, 2012.

CECATTO-ANTONINI, S.R. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio Econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias, São Carlos, SP. 2004.

COMNINELLIS, C. Electrocatalysis in the electrochemical conversion/combustion of organic pollutants for waste-water treatment. **Electrochimica Acta**, v. 39, n. 11-12, p. 1857-1862, 1994.

COMNINELLIS, C.; De BATTISTI A. Eletrocatalysis in anodic oxidation of organics with simultaneous oxygen evolution. **Journal of Chemical Physics**, v. 93, p. 673 - 679, 1996.

COTEIRO, R.D., ANDRADE, A.R., Electrochemical oxidation of 4-chlorophenol and its by-products using Ti/Ru_{0.3}M_{0.7}O₂ (M = Ti or Sn) anodes: preparation route versus degradation efficiency, **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 37, p. 691 - 698, 2007.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 369 - 379, 2006.

CHEN, G., Electrochemical technologies in wastewater treatment, **Separation and Purification Technology**, v. 38, p. 11 - 41, 2004.

CHEN, C.; SMYE, S. W.; ROBINSON, M. P.; EVANS, J. A. Membrane electroporation theories: a review. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 44, p. 5 - 14, 2006.

EATON, A. D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 21. ed. Washington, D.C: American Public Health Association, 2005.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005.
Disponível: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPS-010/14901/1/bpd85-avaliacao-metodologias.pdf>> Acessado em 2014.

FERNANDEZ- ALBA, A.R.; HERMANDO, D.; AGUERA, A.; CÁCERES, J.; MALATO, S.; Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. **Water Research**, v. 36, p. 4255, 2002.

- FIGLIANO, M.; SANTOS, E. P.; SCHMACHTENBERG N. Processos oxidativos avançados: fundamentos e aplicação ambiental. **Reget**, v. 18, p. 79 - 91, 2014.
- FLEET, G.H. **Cell walls. Yeast organelles**, 2^o ed. London: Academic press, v.4, p. 199 - 264, 1991.
- GARCIA-SEGURA, S.; EL-GHENYMY, A.; CENTELLAS, F.; RODRÍGUEZ, R. M.; ARIAS, C.; GARRIDO, J. A.; CABOT, P. L.; BRILLAS, E. Comparative degradation of the di azo dye DirectYellow 4 by electro-Fenton, photoelectron - Fenton and photo-assisted electro-Fenton. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 681, p. 36 - 43, 2012.
- GOFFEAU, A.; BARREL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.; DUJON, B.; FELDMAN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVIER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, 274 (5287): 546, p. 563 - 567, 1996.
- GOMES, M.O.S. **Efeito da adição de parede celular de levedura sobre a digestibilidade, microbiota, ácidos graxos de cadeia curta e aminas fecais e parâmetros hematológicos e imunológicos de cães**. Dissertação de mestrado Jaboticabal, 2009.
- GERSHON, H.; GERSON, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. **Mech. Ageing Dev.**, v. 120, p. 1 - 22, 2000.
- GHERNAOUT, D.; NACEUR, M. W.; AOUABED, A. On the dependence of chlorine by-products generated species formation of the electrode material and applied charge during electrochemical water treatment. **Desalination**, v. 270, p. 9 - 22, 2011.
- GUILLOU, S.; BESNARD, V.; EL MURR, N.; FEDERIGHI, M. Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. **International Journal of Microbiology**, v. 88, p. 85 - 89, 2003.
- GUSMÃO, I. C. C. P.; **Uso de reator tipo camada delgada para desinfecção de águas de abastecimento contendo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação: Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Campus de Rio Claro - São Paulo, 2006.
- GUSMÃO, I. C. C. P.; MORAES, P. B.; BIDOIA, E. D.; Studies on the Electrochemical Disinfection of Water Containing *Escherichia coli* using a Dimensionally Stable Anode. **Brazilian Archives Biology and Technology**. v. 53, p. 1235 - 1244, 2010.
- HUGHES, T.; ROBINSON, M. D.; MITSAKAKIS, N.; JOHNSTON, M. The promise of functional genomics: completing the encyclopedia of a cell. **Current Opinion Microbiology** v. 7, P. 546 - 554, 2004.
- HUNSBERGER, J.F., Standard reduction potentials. **Handbook of Chemistry and Physics**, 58 ed., p. 141-144, CRC Press, Ohio, 1977.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional de saneamento básico. Rio de Janeiro: **IBGE**, 2010.

Disponível:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb2008/PNSB_2008.pdf> acessado em: maio de 2014.

JEONG, J.; KIM, J. Y.; CHO, M.; CHOI, W.; YOON, J. Inactivation of *Escherichia coli* in the electrochemical disinfection process using a Pt anode. **Chemosphere** v. 67, p. 652 - 659, 2007.

JONES, G. M.; STALKER, J.; HUMPHRAY, S.; WEST, A.; COX, T.; ROGERS, J.; DUNHAM, I.; PRELICH, G. A systematic library for comprehensive over expression screens in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature Methods**, v. 5, p. 239 – 241, 2008.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A. E; ALVES, R. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. **Journal Plos**, v. 6, p. 160, 2011.

KLIS, F.M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P.W. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 23, p. 185 - 202, 2006.

KREGER-CAN RIJ, N. J. W. The Yeasts. A taxonomic study. 3 ed. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers B. V.** 1984.

KORBAHTI, B. K; TANYOLAC, A. Continuous electrochemical treatment of simulated industrial textile wastewater from industrial components in a tubular reactor. **Journal Hazard Mater**. v. 170, p. 771 - 778, 2009.

KURTZMAN, C. P. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. The yeasts, a taxonomic study. 4 ed, Amsterdam, **The Netherlands: Elsevier Science**, B. V. p. 111–121, 1997.

KNORR, D.; GEULEN, M.; GRAHL, T.; SITZMANN, W. Food Application of High Electric Field Pulses. **Trends in Food Science and Technology**. v. 5, p. 71 - 75, 1994.

LI, W.R.; XIE, X.B.; SHI, Q.S.; ZENG, H.Y.; OU-YANG, Y.S.; CHEN, Y.B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 85, p. 1115 - 1122 , 2010.

LIANG, W.; QU, J.; CHEN, L.; LIU, H.; LEI, P. Inactivation of *Microcystis aeruginosa* by continuous electrochemical cycling process in tube using Ti/RuO₂ electrodes. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 4633 - 4639, 2005.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Tecnologia das Fermentações. **Biotecnologia**, São Paulo, Edgard Blucher, 1975.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, v. 3, p.1 - 43, 2001.

LUBICK, P.; JAYARAM, K. S. High voltage pulse application for the destruction of Gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. **Bioelectrochemistry & Bioenergetics**, v. 43, p. 135 - 141, 1997.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock, 10.ed. São Paulo: **Pearson Education do Brasil**, p. 608, 2004.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 336, p. 202 - 212, 2005.

MALPASS, G. R. P.; MIWA, D. W.; MORTARI, D. A.; MACHADO, S. A. S.; MOTHEO, A. J. Decolorisation of real textile waste using electrochemical techniques: effect of the chloride concentration. **Water Research**, v. 41, p. 2969 - 2977, 2007.

MARTÍNEZ-HUITLE, C.A., FERRO, S. Electrochemical oxidation of organic pollutants for the wastewater treatment: Direct and indirect processes. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 1324 - 1340, 2006.

MARTÍNEZ-HUITLE, C. A, BRILLAS, E. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 87, p. 105 - 145, 2009.

MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; SANTOS, E.V.; ARAUJO, D.M.; PANIZZA, M. Applicability of diamond electrode/anode to the electrochemical treatment of a real textile effluent. **Electroanalytical Chemistry**, v. 674, p. 103 - 107, 2012.

MATOS, B. A. **Avaliação da Ocorrência e do Transporte de Microrganismos no Aquífero Freático do Cemitério de Vila Nova Cachoeirinha, Município de São Paulo**. Tese (Doutorado). Universidade do Estado de São Paulo, Instituto de Geociências, Programa de Pós Graduação em Recursos Minerais e Hidrogeologia, 2001.

MATSUNAGA, T.; NAKASONO, S.; TAKAMUKU, T.; BURGESS, J. G. NAKAMURA, N.; SODE, K. Disinfection of drinking water by using a novel electrochemical reactor employing carbon-cloth electrodes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 686 - 689, 1992.

MIWA, D. W.; MALPASS, G. R. P.; MACHADO, S. A. S.; MOTHEO, A. J. Degradação eletroquímica de carbaril em eletrodos de óxidos. **Water Research**, v. 40, p. 3281 - 3289, 2006.

MORAIS, J.L. **Estudo da potencialidade de processos oxidativos avançados isolados e integrados com processos biológicos tradicionais, para tratamento de chorume de aterro sanitário**. Tese (Doutorado em Química). Curso de Pós-Graduação em Química, UFPR, Curitiba, 2005.

MORAIS, C. C. O.; SILVA, A. J. C.; FERREIRA, M. B.; ARAÚJO, D. M.; ZANTA, C. L. P. S.; CASTRO, S. S. L. Electrochemical Degradation of Methyl Red Using Ti/Ru_{0.3}Ti_{0.7}O₂: Fragmentation of Azo Group. **Electrocatalysis**, v. 4, p. 312 - 319, 2013.

MOREIRA, A.N.; DEL PINO, F.A.B.; VENDRUSCOLO, C.T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através de inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia Alimentar**. v. 23, p. 300 - 305, 2003.

NASCIMENTO, J.S. Biologia de microrganismos. In. GUERRA, R.A.T. (Org.). **Cadernos CB Virtual 4**. João Pessoa: UFPB, v. 4, p. 233 - 306, 2010.

NASHEUER, H.P.; SMITH, R.; BAUERSCHMIDT, C.; GROSSE, F.; WEISSHART, K. Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, v. 72, p. 41 - 94, 2002.

NAKAJIMA, N.; NAKANO, T.; HARADA, F.; TANIGUCHI, H.; YOKOYAMA, I.; HIROSE, J.; DAIKOKU, E.; SANO, K. Evaluation of disinfective potential of reactivated free chlorine in pooled tap water by electrolysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, p. 163 - 173, 2004.

NEUMANN, E.; SCHAEFER-RIDDER, M.; WANG, Y.; HOFSCHEIDER, P. H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO Journal**, v. 1, p. 841 - 845, 1982

NOGUEIRA, R. F. P.; TROVÓ, A. G.; SILVA, M. R. A. Da; VILLA, R. D. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**, v. 30, p. 400 - 408, 2007.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC, FEALQ, ESALQ- USP, p. 89, 1996.

OLIVEIRA, E. M. S.; CASTRO, S. S. L. **Tratamento eletroquímico de efluentes das indústrias de beneficiamento da castanha de caju**. Dissertação: Mestrado em Ciências Naturais – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 2014.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 34 - 50, 2000.

OSUMI, M. The ultra structure of yeast: Cell wall formation and structure. **Micron**, v. 29, n. 2 - 3, p. 207 - 233, 1998.

PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Electrocatalytic materials for the electrochemical oxidation of synthetic dyes. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 75, p. 95 - 101, 2007.

PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants. **Chemical Review**, v. 109, p. 6541 - 6569, 2009.

PASTERIS, S.E.; STRASSER DE SAAD, A.M. Characterization of glycerol kinase and NAD - independent glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase from *Pediococcus pentosaceus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 93 - 97, 1998.

PELCZAR, M., REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**, Mc Graw - Hill, São Paulo, v. 1, 1980.

PELCZAR, J. R., MICHAEL, J., CHAN, E. C. S. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: **Pearson Makron Books**, v. 2, p. 319 - 353, 1997.

PERA TITUS, M.; GARCIA-MOLINA, V.; BAÑOS, M.A; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S.; Degradation of Chlorophenols by means of advanced Oxidation Processes: a General Review. **Applied catalysis B: Environmental**, v. 47, p. 219 - 256, 2004.

RAJKUMAR, D.; PALANIVELU, K. Electrochemical treatment of industrial wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 113, p. 123 - 129, 2004.

RABELO, T.C.B. **Enriquecimento proteico de Algaroba (Prosopisjuliflora utilizando S. Cerevisiae)**. Dissertação mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Alagoas Maceió, 2011.

RAMALHO, A. M. Z.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; SILVA, D. R. Application of electrochemical technology for removing petroleum hydrocarbons from produced water using a DSA-type anode at different flow rates. **Fuel Processing Technology**, v. 89, p. 531 - 534, 2010.

RATLEDGE, C. H. Yeast physiology - a microsynops. **Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 195-203, 1991.

REZENDE, L. G. P.; PRADO, V. M.; ROCHA, R. S.; BEATI, A. A. G. F.; SOTOMAYOR, M. D. P.; LANZA, M. R. V. Degradação eletroquímica do cloranfenicol em reator de refluxo. **Química Nova**, v. 33, p. 1088 - 1092, 2010.

ROCHA, J. H. B.; GOMES, M. M. S.; FERNANDES, N. S.; SILVA, D. R.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A. Application of electrochemical oxidation as alternative treatment of produced water generated by Brazilian petrochemical industry. **Fuel Processing Technology**, v. 96, p. 80 - 87, 2012.

RODRIGUEZ, M.; SARRIA, V.; ESPLUGAS, S.; PULGARIN, C.; Photo-Fenton treatment of a biorecalcitrant Wastewater generated in textile activities: biodegradability of the photo-treated solution. **Journal Photochemistry and Photobiology**, v. 151, p. 129, 2002.

ROSEMBERG, B.; CAMP, L. V.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698 - 699, 1965.

SANTOS, A. C. **Desenvolvimento de reatores eletroquímicos para tratamento de água de produção de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2006.

SANTOS, I. D.; AFONSO, J. C.; DUTRA, A. J. B. Influência da temperatura de calcinação na resistência à corrosão do eletrodo de Ti/SnO₂-Sb para eletrooxidação de fenóis em meio de cloreto. **Revista Matéria**, v. 14, 2009.

SANTOS, S. M.; GOUVEIA, N. Presença de trihalometanos na água e efeitos adversos na gravidez. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 14, São Paulo, 2011.

SANTOS, I. D.; AFONSO, J. C.; DUTRA, A. J. B. Eletrooxidação de fenol em um Ti/RuO₂ ânodo: Efeito de alguns parâmetros de eletrólises. **Journal Brazilian Chemical**. v. 22, p. 875, 2011.

SILVA, A. J. C.; SANTOS, E. V.; MORAIS, C. C.O.; MARTINEZ-HUITLE, C. A.; CASTRO, S. S. L. Electrochemical treatment of fresh, brine and saline produced water generated by petrochemical industry using Ti/IrO₂-Ta₂O₅ and BDD in flow reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 233, p. 47 - 55, 2013.

SIRÉS, I.; BRILLAS, E. Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: a review. **Environment International**, v. 40, p. 212 - 229, 2012.

SCHAEFER, C.E.; ANDAYA, C.; URTIAGA, A. Assessment of disinfection and by-product formation during electrochemical treatment of surface water using a Ti/IrO₂ anode. **Chemical Engineering Journal**, v. 264, p. 411 - 416, 2015.

SHERMAN, F. Getting started with yeast. **Methods in enzymology**, v. 350, p. 3 - 41, 2002.

SHIMODA, C. Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. **Journal of cell science**, v. 117, p. 389 - 396, 2004.

SMITH, G. J.; KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. Cell wall dynamics in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 348 - 352, 1999.

TEIXEIRA, C.P.A.B.; JARDIM, W. F. Processos Oxidativos Avançados- Conceitos teóricos. **Caderno temático**, v. 3. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Instituto de Química - IQ, Laboratório de Química Ambiental - LQA. Campinas, 2004.

TOLENTINO-BISNETO, R.; BIDOIA, E. D. Effects of the electrolytic treatment on *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 34, p. 48 - 50, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8^o Ed. Artmed Porto Alegre-RS, p. 743, 2005.

TRASATTI, S. Physical Electrochemistry of Ceramic Oxides. **Electrochimica Acta**, v. 36, p. 225 - 241, 1991.

TRASATTI, S. Electrocatalysis: understanding the success of DSA[®]. **Electrochimica Acta**, v.45, p. 2377 - 2385, 2000.

VAN DER BERG, J. A.; VAN DER LAKEN, K. J, VAN OUYEN RENNIERS TCHM, RIETVELD K, SCHAAP A, BRAKE AJ, BISHOP RJ, SCHULTZ K, MEYER D, RICHMAN M AND SCHUSTER J. L. *Kluyveromyces* as host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. **Nature Biotechnology** v. 8, p. 135 - 139, 1990.

WOESE, C.R.; KANDLERT, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms Proposal for the domains Archaea Bacteria and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 4576 - 4579, 1990.

YEOMANS, J.C.; BREMNER, J.M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.13, p.1467 - 1476, 1988.

YUAN, T.-F. Electroporation: an arsenal of application. **Cytotechnology**, v. 54, p.71 - 76, 2007.

ZANTA, C. P. S., ANDRADE, A. R., BOODTS, J. F., “Characterization of DSA®-type coatings with nominal composition $Ti/Ru_{0,3}Ti(0,7-x)SnxO_2$ prepared via a polymeric precursor”, **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 30, p. 467, 2000.

ZIMMERMANN, U. Electrical Breakdown, Electro permeabilization and Electrofusion. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**. v. 105, p.175 - 256, 1986.

<<https://www.sciencenews.org/article/first-chromosome-made-synthetically-yeast>>, acessado em março de 2015.