



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E
TERRITÓRIO (ILATIT)**

ENGENHARIA QUÍMICA

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA (NCB) COM CINZA
LEVE DE CARVÃO MINERAL (CL)**

LOISE RISSINI KRAMER

Foz do Iguaçu
2019



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
TECNOLOGIA, INFRAESTRUTURA E
TERRITÓRIO (ILATIT)**

ENGENHARIA QUÍMICA

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA (NCB) COM CINZA
LEVE DE CARVÃO MINERAL (CL)**

LOISE RISSINI KRAMER

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Sousa Góes
Coorientadora: Profa. Dra. Samara Silva de Souza

Foz do Iguaçu
2019

LOISE RISSINI KRAMER

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA (NCB) COM CINZA
LEVE DE CARVÃO MINERAL (CL)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Tecnologia, Infraestrutura e Território da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Sousa Góes
UNILA

Coorientadora: Profa. Dra. Samara Silva de Souza
UTFPR - DV

Profa. Dra. Karina Cardoso Valverde
UNILA

Foz do Iguaçu, 12 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha mãe, Janete, que sempre me incentivou e se orgulhou de mim. Não tenho palavras para agradecer pelos cinco anos acordando às cinco e meia da manhã todos os dias da semana, e por todos os lanches que encontrei em minha mochila. Agradeço também a Deus e a toda a minha família.

Ao meu namorado Fernando, que escutou todas as minhas histórias (algumas mais de uma vez) e me fez rir nos momentos de frustração. As minhas amigas Ana, Carol, Jacqueline, Pâmela, Gabriela e Letícia, por todos os momentos que compartilhamos. A todos os meus colegas de curso, por serem tão singulares e tornarem a Engenharia Química um curso unido e de destaque na Universidade.

A todos que me auxiliaram no Trabalho de Conclusão de Curso, em especial ao Complexo Termelétrico Jorge Lacerda, por disponibilizarem a cinza para o trabalho; a técnica de laboratório Paula Regina dos Santos; ao professor Ilton José Baraldi (UTFPR – Campus Medianeira) pela liofilização dos materiais; ao professor Rodrigo Basso e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (UNILA); ao professor Jefferson Luis Ferrari e ao Laboratório Multiusuário de Química (UFU); aos laboratórios de pesquisa e ensino da Unila, especialmente ao Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica, Laboratório Interdisciplinar de Ciências Físicas e Setor Sul.

Aos grupos que me acolheram, Projeto Green Park e GPEnSE, nos quais tive a oportunidade de produzir conteúdo científico. Ao Centro Acadêmico de Engenharia Química e a Atlética Gran Carpincho, por renovarem o espírito de integração latino-americana em todos eventos e jogos que participei.

A todos os professores que me orientaram durante ensino, pesquisa e extensão. Em especial aos professores Oswaldo H. A. Júnior, Jiam P. Frigo, Márcio de S. Góes e Samara S. de Souza, pelos ensinamentos e amizade.

A todo o corpo docente do curso de Engenharia Química, professora Marlei, Andréia, Kátya e Leonardo, pelos aprendizados e dedicação depositada no crescimento do curso de Engenharia Química e também as professoras Karina e Ivana, pelos ensinamentos nos últimos períodos do curso.

A Unila, por me proporcionar conhecer tantas pessoas e culturas da América Latina e Caribe sem sair de casa. Por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

KRAMER, Loise Rissini. **Funcionalização de Nanocelulose Bacteriana (NCB) com Cinza Leve de Carvão Mineral (CL)**. 2019. 67 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

RESUMO

A nanocelulose produzida a partir de bactérias, conhecida como nanocelulose bacteriana (NCB), ganhou um papel promissor como fonte alternativa em comparação às demais classes de celulose. Devido as propriedades excelentes como alta capacidade de retenção de água, alto grau de polimerização, nanoestrutura única, alta cristalinidade e alta resistência mecânica, esse material vem sendo amplamente estudado. As descobertas mostram que a NCB e seus derivados surgiram como um biomaterial avançado e proporcionam um futuro promissor em vários campos, como biomédico e farmacêutico, cosméticos, alimentos, têxteis e eletrônico. Em outra linha, a cinza leve de carvão mineral (CL), resíduo produzido em grandes volumes por termelétricas, é fonte de óxidos de silício e alumínio, aplicada por exemplo na construção civil e na síntese de zeólitas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi funcionalizar a NCB com CL (NCB-CL), mais especificamente, avaliar as técnicas de funcionalização *in situ* e *ex situ*, e caracterizar os materiais, a fim de investigar as possíveis aplicações do compósito. A NCB foi produzida em cultura estática pela bactéria *Komagataeibacter xylinus* a 30 °C, em meio Hestrin & Schramm (HS). A metodologia avaliou a incorporação através de duas abordagens, *in situ* e *ex situ*, e os seguintes parâmetros: meios de incorporação (água, acetato de polivinila, ácidos nítrico e sulfúrico); temperatura; tempo de processo e concentração de CL. Foram caracterizados por difração de raio X e microscopia eletrônica de varredura a NCB, a CL e a NCB-CL produzida na melhor condição (*ex situ*, imersa em solução de 500 g CL/L, sob agitação em ultrassom à 60 °C, durante 1 hora). Além disso, a composição e a granulometria da CL foi avaliada por espectroscopia por dispersão de energia de raio X e granulometria a laser, respectivamente. Os resultados mostraram que através da funcionalização *in situ* houve uma limitação para o desenvolvimento do compósito. Por outro lado, a abordagem *ex situ* permitiu a incorporação da CL em biofilmes de NCB e foi mais efetiva em temperaturas mais elevadas, com alta concentração de CL. A CL possui majoritariamente mulita e quartzo, sendo as partículas em sua maioria esféricas e 90% com diâmetros menores que $120,059 \pm 3,166 \mu\text{m}$. A NCB foi produzida com alta pureza e o método *ex situ* resultou na incorporação de 6,0 g CL/g NCB_{seca} no caso dos biofilmes de 24 poços e 6,9 g CL/g NCB_{seca} para os de 96 poços, estando a CL incorporada entre as nanofibras de NCB. O comportamento observado por meio dos parâmetros avaliados na produção de NCB-CL são o primeiro passo para o estudo desse compósito.

Palavras-chave: *Komagataeibacter xylinus*. Nanocelulose bacteriana. Cinza leve. Compósitos. Biomateriais.

KRAMER, Loise Rissini. **Functionalization of Bacterial Nanocellulose (NCB) with Coal Fly Ash (CL)**. 2019. 67 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

ABSTRACT

Nanocellulose produced from bacteria, known as bacterial nanocellulose (NCB), has gained a promising role as an alternative source in comparison to the other classes of cellulose. Due to excellent properties such as high water retention capacity, high degree of polymerization, unique nanostructure, high crystallinity and high mechanical strength, this material has been extensively studied. The findings show that NCB and its derivatives have emerged as an advanced biomaterial and provide a promising future in many fields, including biomedical and pharmaceutical, cosmetics, food, textiles and electronics. In another line, coal fly ash (CL), a residue produced in large volumes by thermoelectric plants, is a source of silicon and aluminum oxides applied, for example, in civil construction and zeolite synthesis. In this way, the objective of this work was to functionalize NCB with CL (NCB-CL), more specifically, to evaluate in situ and ex situ functionalization techniques, and to characterize the materials, in order to investigate the possible applications of the composite. The NCB was produced in static culture by the bacterium *Komagataeibacter xylinus* at 30 °C in Hestrin & Schramm (HS) medium. The methodology evaluated the incorporation through two approaches, in situ and ex situ, and the following parameters: incorporation media (water, polyvinyl acetate, nitric and sulfuric acids); temperature; process time and CL concentration. The NCB, CL and NCB-CL produced in the best condition (ex situ, immersed in 500 g CL/L solution, under ultrasonic stirring at 60 °C for 1 hour) were characterized by X-ray diffraction and scanning electron microscopy. In addition, the composition and particle size of CL were evaluated by X-ray energy dispersion spectroscopy and laser granulometry, respectively. The results showed that through in situ functionalization there was a limitation for the development of the composite. On the other hand, the ex situ approach allowed the incorporation of CL in NCB biofilms and it was more effective at higher temperatures, with high CL concentration. CL particles are mostly mullite and quartz, and they are predominantly constituted by spherical particles, being 90% with diameters smaller than $120,059 \pm 3,166 \mu\text{m}$. NCB was produced with high purity and the ex situ method resulted in the incorporation of 6.0 g CL/g NCB_{dried} in the case of the biofilm produced in 24 well plates and 6.9 g CL/g NCB_{dried} for the 96 wells, with CL being incorporated between the NCB nanofibers. The behavior observed through the parameters evaluated in the production of NCB-CL are the first step to the study of this composite.

Key words: *Komagataeibacter xylinus*. Bacterial nanocellulose. Fly Ash. Composite materials. Biomaterials.

KRAMER, Loise Rissini. **Funcionalización de Nanocelulosa Bacteriana (NCB) con Cenizas Volantes de Carbón Mineral (CL)**. 2019. 67 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

RESUMEN

La nanocelulosa producida a partir de bacterias, conocida como nanocelulosa bacteriana (NCB), ganó un papel prometedor como fuente alternativa en comparación con las demás clases de celulosa. Debido a las propiedades excelentes como alta capacidad de retención de agua, alto grado de polimerización, nanoestructura única, alta cristalinidad y alta resistencia mecánica, este material ha sido ampliamente estudiado. Los descubrimientos muestran que la NCB y sus derivados surgieron como un biomaterial avanzado y proporcionan un futuro prometedor en varios campos, como biomédico y farmacéutico, cosméticos, alimentos, textiles y electrónicos. En otra línea, la ceniza volante de carbón mineral (CL), residuo producido en grandes volúmenes por termoeléctricas, es fuente de óxidos de silicio y aluminio, aplicada por ejemplo en la construcción civil y síntesis de zeolitas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue funcionalizar NCB con CL (NCB-CL), más específicamente, evaluar las técnicas de funcionalización *in situ* y *ex situ*, y caracterizar los materiales, a fin de investigar las posibles aplicaciones del material compuesto. La NCB fue producida en cultivo estático por la bacteria *Komagataeibacter xylinus* a 30°C, en medio Hestrin & Schramm (HS). La metodología evaluó la incorporación a través de dos enfoques, *in situ* y *ex situ*, y los siguientes parámetros: medios de incorporación (agua, acetato de polivinilo, ácidos nítrico y sulfúrico); temperatura; tiempo de proceso y concentración de CL. Se caracterizó la NCB, la CL y la NCB-CL producida en la mejor condición (*ex situ*, inmersa en solución de 500 g CL/L, bajo agitación en ultrasonido a 60 °C, durante 1 hora) por los análisis de difracción de rayos-X y microscopía electrónica de barrido. Además, la composición y granulometría de la CL fue caracterizada por espectroscopia por dispersión de energía de rayos-X y granulometría a láser, respectivamente. Los resultados mostraron que a través de la funcionalización *in situ* hubo una limitación para el desarrollo del material compuesto. Por otro lado, el enfoque *ex situ* permitió la incorporación de la CL en biopelículas de NCB y fue más efectiva a temperaturas más elevadas, con alta concentración de CL. La CL posee mayoritariamente mulita y cuarzo, partículas predominantemente esféricas, siendo 90% con diámetros menores que $120,059 \pm 3,166 \mu\text{m}$. La NCB fue producida con alta pureza y el método *ex situ* resultó en la incorporación de 6,0 g CL/g NCB_{seca} en el caso de las biopelículas de 24 pocillos y 6,9 g CL/g NCB_{seca} para los de 96 pocillos, estando la CL incorporada entre las nanofibras de NCB. El comportamiento observado por medio de los parámetros evaluados en la producción de NCB-CL son el primer paso para el estudio de ese material compuesto.

Palabras clave: *Komagataeibacter xylinus*. Nanocelulosa bacteriana. Ceniza volante. Materiales compuestos. Biomateriales.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo simplificado da rota metabólica para biossíntese de celulose a partir de glicose, manitol ou glicerol por <i>K. hansenii</i>	17
Figura 2 – Representação da celulose e sua unidade estrutural: celobiose.....	20
Figura 3 – Aplicações e produtos comerciais de NCB pura e/ou modificada.	22
Figura 4 – Mecanismo simplificado de formação da CL a partir da combustão de carvão mineral.....	25
Figura 5 – Aplicações da cinza leve de carvão mineral de acordo com suas características.....	26
Figura 6 – Resumo das etapas da metodologia.	31
Figura 7 – Diagrama esquemático da produção dos biofilmes de NCB.	32
Figura 8 – Registros da reativação, produção do inóculo, do estoque bacteriano e biofilmes.....	34
Figura 9 – Diagrama esquemático da incorporação <i>ex situ</i>	388
Figura 10 – Biofilmes produzidos de 6, 24 e 96 poços, além de biofilmes no formato de tiras e pacotes.....	38
Figura 11 – Suspensão de 0,1 g de CL e 1 g de PVA em 40 mL de água, a 100 rpm, 90°C durante 30 minutos.....	39
Figura 12 – Resultado da incubação de 10 mL de HS (10% v/v de inóculo) com 0,5 g de CL, a 30°C após 7 dias.	40
Figura 13 – Influência da temperatura na incorporação utilizando solução de CL 30 mg/mL. À esquerda, teste a 50 °C; à direita, teste a temperatura ambiente.	42
Figura 14 – Influência do tempo e concentração na incorporação da CL em NCB, em ultrassom a 50 °C (lado poroso).....	43
Figura 15 – Superfície superior de NCB-CL (menos porosa) produzida em ultrassom, a 50 °C, com solução de 100 g/L de CL.....	43
Figura 16 – Biofilmes de NCB (controle) e NCB-CL produzidos <i>ex situ</i> em ultrassom, a 60 °C, 100 g/L, variando-se os solventes do processo.	44
Figura 17 – Biofilmes de NCB (controle) e NCB-CL produzidos <i>ex situ</i> com 500 g/L de CL em ultrassom a 60 °C durante 1 hora.	45
Figura 18 – Biofilmes liofilizados de NCB (controle) e NCB-CL produzida <i>ex situ</i> com 500 g/L de CL em ultrassom a 60 °C durante 1 hora.	45
Figura 19 – Distribuição granulométrica acumulada das partículas de CL.....	47

Figura 20 – Imagem de elétrons para EDS	48
Figura 21 – EDS dos espectros 17 (a), 18 (b) e 19 (c).	49
Figura 22 – Difratoograma de raio X da NCB, CL, NCB-CL das superfícies inferior (mais porosa) e superior (menos porosa).	51
Figura 23 – Micrografias da CL com ampliação de 100 (A), 1.000 (B), 2.000 (C) e 5.000x (D).	52
Figura 24 – Micrografias dos biofilmes de NCB. (A) Lado inferior (superfície porosa) e (B) lado superior (menos poroso) com ampliação de 10.000x.	53
Figura 25 – Micrografias da superfície superior de NCB, com ampliação de 100 (A), 2.000 (B), 20.000 (C) e 100.000 vezes (D).	54
Figura 26 – Micrografia da NCB-CL com ampliação de 100 (A), 2.000 (B), 10.000 (C) e 20.000 (D) vezes.	55

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 NANOCELULOSE BACTERIANA	14
2.1.1 Histórico	14
2.1.2 Biossíntese da NCB	15
2.1.3 Condições de Cultivo.....	17
2.1.4 Características e Propriedades da NCB.....	19
2.1.5 Aplicações e Funcionalização da NCB	21
2.2 CINZA LEVE DE CARVÃO MINERAL.....	24
2.3 FUNCIONALIZAÇÃO DE NCB COM CL	29
3 METODOLOGIA	31
3.1 MEIO DE CULTURA.....	31
3.2 PRODUÇÃO DOS BIOFILMES DE NCB.....	32
3.2.1 Reativação da Cepa Bacteriana.....	32
3.2.2 Preparação do Inóculo e Manutenção do Estoque Bacteriano.....	33
3.2.3 Produção e Purificação dos Biofilmes de NCB.....	33
3.3 MÉTODOS DE INCORPORAÇÃO.....	34
3.3.1 Avaliação Inicial.....	34
3.3.2 Incorporação <i>In Situ</i>	35
3.3.3 Incorporação <i>Ex Situ</i>	35
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	36
3.4.1 Difração de Raio X (DRX).....	37
3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raio X (EDS).....	37
3.4.3 Granulometria por Difração a Laser	37
4 RESULTADOS	38
4.1 PRODUÇÃO DE BIOFILMES DE NCB	38
4.2 MÉTODOS DE INCORPORAÇÃO	39

4.2.2 Incorporação <i>In Situ</i>	40
4.2.3 Incorporação <i>Ex Situ</i>	42
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	46
4.3.1 Massa dos Biofilmes.....	46
4.3.2 Granulometria por Difração a Laser	47
4.3.3 Espectrometria por Dispersão de Energia de Raio X (EDS)	48
4.3.4 Difração de Raio X (DRX)	50
4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
4.4 APLICAÇÕES E TRABALHOS FUTUROS	56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A celulose ($[C_6H_{10}O_5]_n$) é o biopolímero mais abundante no planeta, constituinte das paredes celulares de plantas e algas (Donini *et al.*, 2010). Apesar de ser extraída de fontes renováveis, o uso da madeira como matéria-prima é causa de desmatamentos ilegais e os processos para purificação da celulose são altamente poluentes (Esa, Tasirin e Rahman, 2014). Isso ocorre pois a celulose vegetal encontra-se ramificada entre hemicelulose e lignina, impurezas que podem ser removidas pela aplicação de um processo químico, que resulta em efluentes com alta fração de compostos orgânicos não biodegradáveis (Esa, Tasirin e Rahman, 2014; Hermosilla *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a nanocelulose bacteriana (NCB) desponta como uma alternativa tecnológica promissora para substituição do processo tradicional de obtenção desse biopolímero. Produzida por diferentes espécies de bactérias gram-negativas, tais como representantes dos gêneros *Komagataeibacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium* e *Pseudomonas* (Shoda e Sugano, 2005), a NCB possui a mesma estrutura química da celulose vegetal e seu processo de purificação envolve apenas a remoção das bactérias, não contendo qualquer outro composto indesejado. Além disso, é constituída por fibras nanométricas que conferem à NCB propriedades específicas, como alta resistência mecânica à tração, possibilidade de formação de compósitos, biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta cristalinidade e pureza, grande capacidade de retenção de água e flexibilidade de produção (Donini *et al.*, 2010; Esa, Tasirin e Rahman, 2014; Foresti, Vazquez e Boury, 2016; Pinto, 2013; Stumpf *et al.*, 2016).

Devido a essas propriedades, a NCB possui uma ampla gama de aplicações em áreas distintas como embalagens (Martin *et al.*, 2017; Nandi e Guha, 2018), indústria de alimentos, farmacêutica e cosméticos (Bashari, Shirvan e Shakeri, 2018; Shi *et al.*, 2014; Ullah, Santos e Khan, 2016), indústria têxtil (Sarubbo, 2017), engenharia de tecidos (Oliveira *et al.*, 2012), biomedicina, tratamento de água e sensores (Bethke *et al.*, 2018; Cherian *et al.*, 2013; Khalid *et al.*, 2017; Mohammedi, 2017; Pirich *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018), catálise (Bethke *et al.*, 2018; Foresti, Vazquez e Boury, 2016), optoeletrônica (Abood, Salim e Saimon, 2018), entre outras aplicações (Donini *et al.*, 2010; Iris *et al.*, 2013). Em outras palavras, a NCB é um biomaterial promissor para funcionalização por meio de sua modificação *in situ*

(materiais são adicionados durante a síntese, ou seja, durante a produção de NCB pelas bactérias) ou *ex situ* (NCB é impregnada com materiais em uma fase de pós tratamento).

A relevância da produção de compósitos a partir da NCB se encontra no fato de que o biopolímero puro possui algumas limitações que restringem suas aplicações, como por exemplo a falta de propriedades antibacterianas e condutividade elétrica. Nesse sentido, estudos vem sendo realizados para introduzir materiais de reforço na rede de fibras da NCB que atuam fornecendo propriedades adicionais, fortificando ou diminuindo as propriedades intrínsecas do material (Esa, Tasirin e Rahman, 2014).

Pesquisas de incorporação de nanopartículas de óxidos metálicos na NCB já atingiram diversos resultados, como adição de propriedades antimicrobianas, optoeletrônicas e atividade catalítica, propriedades que permitem a utilização desses compósitos em fotocatalise, papel eletrônico, biomedicina e tratamento de efluentes (Foresti, Vazquez e Boury, 2016; Khalid *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018).

Em outra linha, há as cinzas leves de carvão mineral (CL) – um dos principais resíduos da combustão do carvão mineral em usinas termelétricas – que são uma grande fonte de óxidos metálicos, principalmente óxidos de silício e alumínio, contendo traços de óxidos de ferro, cálcio, manganês e potássio (Yao *et al.*, 2015). A CL tem sido considerada como um resíduo com potencial de liberação de elementos nocivos ao meio ambiente, pois seu descarte inadequado pode resultar em poluição da água e do solo, e os processos de remediação dos ecossistemas são complexos (Yao *et al.*, 2015).

Em 2010, estimava-se que a produção mundial anual de CL chegava a 480 milhões de toneladas (Ahmaruzzaman, 2010), ressaltando a importância de investigar possibilidades de aproveitamento desse resíduo, cuja a produção tem aumentado nos últimos anos. Somente na China, em 2015, a produção anual estava estimada em alcançar 580 milhões de toneladas (Yao *et al.*, 2015). Já no Brasil, a produção é menor – projeção de 10 milhões de toneladas para 2020 – e concentrada principalmente na região Sul do país (Pedrolo, 2017). Algumas aplicações potenciais da CL incluem usos nas indústrias da construção civil e cerâmica, síntese de zeólitas, catalise e suporte para catalise (Yao *et al.*, 2015). Destaca-se assim a oportunidade de investigação desse resíduo e sua incorporação em uma matriz biopolimérica para futuras aplicações.

Devido a formação multidisciplinar do engenheiro químico, a produção de novos materiais unindo a nanotecnologia e biotecnologia está diretamente ligada à sua atuação. Dentro desse contexto, o objetivo geral deste trabalho é funcionalizar a nanocelulose bacteriana (NCB) com cinza leve de carvão mineral (CL). Em paralelo, os objetivos específicos incluem: sintetizar e caracterizar os biofilmes de NCB; caracterizar a CL; avaliar as técnicas de funcionalização em biofilmes de NCB; incorporar CL na matriz de NCB por modificações *in situ* e *ex situ* e caracterizar a NCB funcionalizada com CL (NCB-CL). A partir das características e propriedades obtidas serão investigadas as possíveis aplicações desse novo material.

Neste trabalho será apresentado inicialmente um referencial teórico fundamentando aspectos importantes sobre a NCB e a CL, seguida da metodologia de preparo e caracterização, resultados e discussão, finalizando com as considerações finais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O referencial teórico está dividido em três partes. A primeira apresenta as principais características da nanocelulose bacteriana (NCB), seu histórico, biossíntese e condições de cultivo, finalizando com as propriedades e aplicações. Na sequência são abordados aspectos importantes sobre a cinza leve (CL) e, por fim, uma revisão sobre os estudos da literatura relacionados ao objetivo desse trabalho.

2.1 NANOCELULOSE BACTERIANA

2.1.1 Histórico

A NCB foi descrita pela primeira vez em 1886 por Brown, que observou a formação de uma película durante a fermentação do vinagre e se referiu a ela como “planta de vinagre”. Por meio de estudos descobriu-se que a película era constituída por celulose e formada devido à fermentação acética realizada pela bactéria que ele denominou *Bacterium xylinum* (Brown, 1886).

Em 1906, Browne confirmou os estudos de Brown, por meio do estudo do material celulósico produzido durante a fermentação do suco da cana-de-açúcar (Browne, 1906). Entretanto, somente em 1931 foi publicado o primeiro estudo detalhado da formação da NCB em uma série de experimentos realizados com a bactéria (Tarr e Hibbert, 1931). Alguns anos depois, em 1954, Hestrin e Schramm desenvolveram um meio de cultura complexo, que até os dias atuais é amplamente utilizado (Hestrin e Schramm, 1954).

Desde seu descobrimento, a bactéria tem recebido diversos nomes, sendo eles: *Bacterium xylinum* (1886), *Acetobacterium xylinum* (1889), *Bacterium xylinodes* (1906), *Acetobacter xylinum* (1925), *Gluconacetobacter xylinus* (2009) e atualmente o gênero *Gluconacetobacter* foi dividido em dois e a bactéria passou a ser parte do gênero recém criado *Komagataeibacter*, com o nome *K. xylinus* (Cacicedo et al., 2016; Iris et al., 2013; Yamada et al., 2012).

A bactéria gram-negativa *K. xylinus* é estritamente aeróbia e vive principalmente em frutas e vegetais em processo de decomposição (Cacicedo et al., 2016). É amplamente reconhecida por sua habilidade de produzir NCB a níveis de interesse comercial a partir de inúmeras fontes de carbono e nitrogênio (Iris et al.,

2013). Entretanto, existem outros microrganismos que produzem a NCB, tais como as espécies: *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas putida*, *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia chrysanthemi*, *Salmonella enterica*, *Komagataeibacter hansenii* e *Escherichia coli* (GULLO et al., 2018). Cabe destacar que o tipo de bactéria produz a celulose em diferentes formas, como a exemplo dos gêneros: *Aerobacter*, *Achromobacter* e *Alcaligenes* (forma de fibrilas), *Komagataeibacter* (forma de fitas), *Agrobacterium* e *Rhizobium* (forma de fibrilas curtas) e *Sarcina* (celulose amorfa) (Mohammedi, 2017).

2.1.2 Biossíntese da NCB

A bactéria aeróbia gram-negativa *K. xylinus*, com comprimento na faixa de 2 a 10 micrômetros e largura entre 0,5 a 1 micrômetro, produz quantidades significativas de NCB durante seu desenvolvimento, a partir de uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio (Mohammedi, 2017).

A NCB é um produto final do metabolismo do carbono e, dependendo do estado fisiológico da célula pode envolver o ciclo das pentoses, o ciclo de Krebs e a gliconeogênese (o processo pelo qual precursores como o piruvato e glicerol são convertidos em glicose) (Mohammedi, 2017). Além disso, a reação de biossíntese da NCB é um processo “trabalhoso” para as bactérias, já que consome 10% de adenosina trifosfato (ATP) gerados no catabolismo (Donini et al., 2010).

A necessidade da bactéria de trocar o estado planctônico (livre em suspensão) pelo biofilme (sésseis) é uma resposta ao ambiente em que está inserida, uma vez que o biofilme pode fornecer proteção à bactéria contra condições severas atuando como um suporte, para evitar eliminação de células através de fluxo de líquido, e como uma barreira física, protegendo de efeitos negativos de raios ultravioleta devido à sua opacidade, de microrganismos competidores e, de compostos antimicrobianos – pela limitação da difusão e pelo aumento da densidade celular (Gullo et al., 2018; Iris et al., 2013). Há evidências que a NCB é utilizada como mecanismo de flotação para a bactéria, para que assim fique mais próxima da interface entre o líquido e o ar, o que facilita a obtenção de oxigênio. Essa barreira ainda atua retendo a umidade e prevenindo a desidratação do substrato em que a bactéria vive (Donini et al., 2010; Iris et al., 2013; Mohammedi, 2017).

Sua biossíntese possui várias etapas que envolvem uma série de enzimas individuais e complexos de proteínas catalíticas e reguladoras, porém as estruturas supramoleculares ainda não são precisas (Pinto, 2013). O processo pode ocorrer a partir de fontes exógenas e endógenas que pode ser realizado diretamente pela fosforilação de hexoses exógenas (sem depender de clivagens intermediárias do esqueleto carbônico) e indiretamente pela gliconeogênese e via das pentoses (Donini *et al.*, 2010; Mohammedi, 2017).

O processo indireto a partir de fontes endógenas inicia pela gliconeogênese a partir do oxalacetato via piruvato, sendo o piruvato convertido em fosfoenolpiruvato por duas enzimas (oxalacetato descarboxilase e piruvato fosfato diquinase (Donini *et al.*, 2010).

Em paralelo, o processo direto inicia com a glicose sendo transportada para o meio intracelular e, na sequência, há quatro enzimas principais que atuam na conversão da glicose em NCB (Colvin e Leppard, 1977):

- glicoquinase: responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose;
- fosfoglicomutase: catalisa a isomerização da glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato;
- pirofosforilase, também denominada glicose-1-fosfatouridiltransferase: sintetiza uridina difosfoglicose (UDPG (termo em inglês para *Uridine diphosphate glucose*);
- celulose *sintase*: UDPG é transformada em uridina difosfato (UDP) enquanto cadeias de β -1,4-glicano são formadas e utilizadas para sintetizar a NCB.

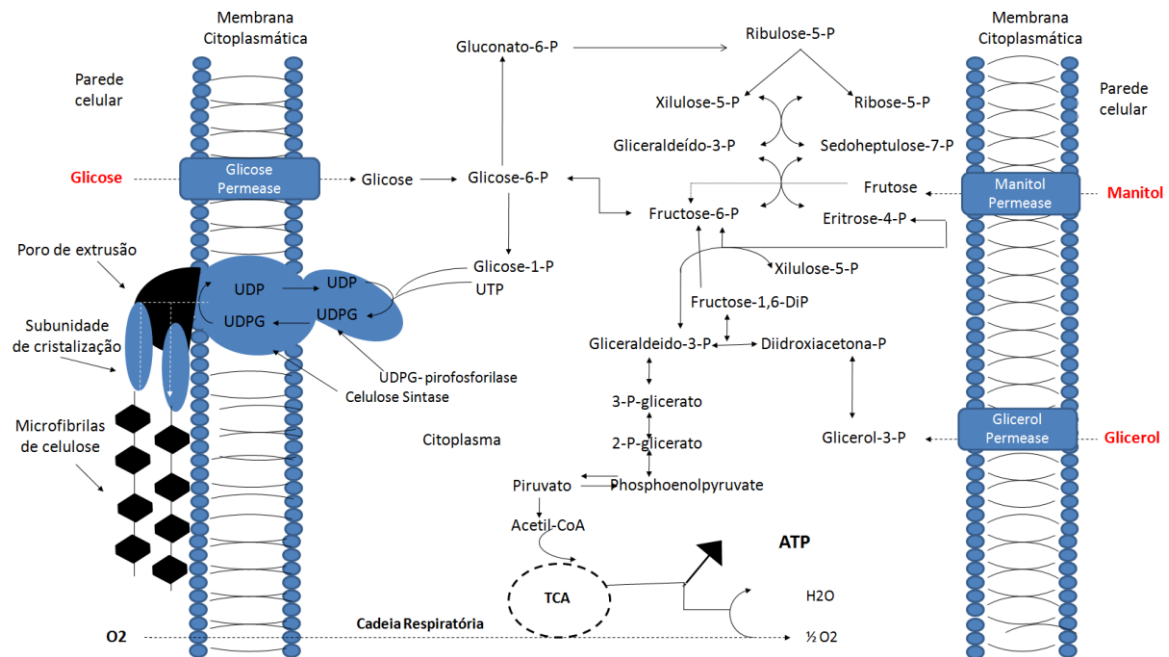
Na celulose *sintase* ocorrem três etapas principais (Donini *et al.*, 2010). Inicialmente ocorre a polimerização da glicose em cadeias de β -1,4-glucano; secreção extracelular das cadeias lineares e a organização e cristalização das cadeias de glucanos em tiras, por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Na Figura 1, pode ser visualizado um modelo simplificado das rotas de produção da NCB, de acordo com Souza (2014).

Quando dissacarídeos como sacarose e maltose são utilizados como fonte de carbono para a produção de NCB, a biossíntese inicia com a hidrólise dos dissacarídeos em monossacarídeos como glicose e frutose. Apesar do caminho de produção de UDPG ser relativamente bem conhecido, os mecanismos moleculares

da polimerização da glicose em cadeias longas e não ramificadas de celulose ainda necessitam ser elucidados (Lee *et al.*, 2013).

A formação da NCB ocorre na interface ar-líquido, de cima para baixo, devido à disponibilidade de solutos e difusão de oxigênio pela matriz. Cada microfibrila produzida é extrusada em uma região específica no exterior do biofilme, sendo formado por protofibrilas em torno de 2 a 4 nm de diâmetro, que se combinam espontaneamente na forma de fitas de aproximadamente 80 nm de diâmetro e por fim, se agrupam em uma rede tridimensional, resultante da divisão celular das bactérias (Gama, Dourado e Bielecki, 2016; Gullo *et al.*, 2018).

Figura 1 – Modelo simplificado da rota metabólica para biossíntese de celulose a partir de glicose, manitol ou glicerol por *K. hansenii*.



Fonte: SOUZA, 2014.

2.1.3 Condições de Cultivo

Dependendo das condições de cultivo a NCB pode ser produzida em diferentes tamanhos e formatos, como películas (membranas), esferas, agregados fibrosos, tubos, massas irregulares e bioimpressões tridimensionais. Podem ser utilizados moldes de diferentes tamanhos e formatos para delinear a geometria desejada para o biomaterial (Gama, Gatenholm e Klemm, 2013).

A NCB pode ser obtida em condições de cultura dinâmica ou estática. No cultivo dinâmico há maior produtividade de NCB e pode ser realizado em recipiente tipo *shakers*, biorreatores de tanque agitado, colunas de bolhas, biorreatores *airlift* e variações. Entretanto, o cultivo dinâmico resulta em material na forma de esferas ou um emaranhado de fibras, resultando em menor resistência mecânica (Donini *et al.*, 2010; Gama, Gatenholm e Klemm, 2013). Além disso, estudos mostram que o tempo de cultivo pode induzir mutações na bactéria ocasionando uma menor produção de NCB (Shi *et al.*, 2014).

Por outro lado, a cultura estática é mais comum e resulta em um biomaterial na forma de películas, que é mais estável e com estruturas e propriedades reprodutíveis para aplicações comerciais (Gama, Gatenholm e Klemm, 2013). Apesar disso, ainda apresenta custos de produção elevados em larga escala (Shi *et al.*, 2014) limitando seu uso direto para fabricação da NCB. Alguns reatores utilizados são: disco rotativo, bandejas, *horizontal lift reactor* (Iris *et al.*, 2013).

Os principais parâmetros que influenciam nas condições de cultivo são oxigênio dissolvido, pH e temperatura (Lee *et al.*, 2013), sendo que o tempo de cultivo e meio de cultura utilizado também influenciam nas características do biofilme.

O teor de oxigênio dissolvido afeta a morfologia da NCB e a taxa de crescimento de *K. xylinus*. Watanabe e Yamanaka (1995), identificaram que a densidade da rede de nanocelulose pode ser controlada por alterações na tensão de oxigênio. Para teores maiores a rede é mais densa, devido às ramificações que ocorrem no processo de divisão celular que se torna mais frequente. Entretanto, se a tensão de oxigênio, definida como o volume (%) na fase gasosa a 1 atm for maior que a tensão de oxigênio na atmosfera, a produção de NCB é inibida (Watanabe e Yamanaka, 1995).

O pH é outro fator de influência, devendo ser controlado e regulado durante o cultivo, pois afeta a estrutura e a permeabilidade da membrana celular, alterando a produtividade e a formação da rede de fibras de nanocelulose. O pH considerado ótimo para a produção de NCB varia de acordo com a fonte de carbono utilizada, entretanto o pH ideal para produção a partir de *K. xylinus* está entre 4 e 6, e a faixa de desenvolvimento entre pH 3,5 e 7,5 (Gama, Gatenholm e Klemm, 2013; Mohammedi, 2017). Para a produção a partir de glicose, o pH ótimo é 5,5 e, alterando para manitol, o valor chega a 6,5 (Iris *et al.*, 2013).

Destaca-se que no decorrer do metabolismo respiratório da *K. xylinus*,

ocorre a oxidação do etanol a ácido acético, e conversão de glicose e ácido glucônico, ocasionando uma diminuição no pH em processos batelada que pode alcançar pH 3,5, enquanto que para processos batelada alimentada o pH permanece praticamente constante (Shezad *et al.*, 2010).

Temperaturas ideais de produção foram observadas entre 28 °C e 31 °C, com temperatura ótima de 30 °C (Mohammedi, 2017). Em relação ao tempo de cultivo, este influencia na espessura do biofilme, já que continua sendo produzido enquanto há condições favoráveis ao desenvolvimento das bactérias.

O meio de cultura utilizado também é importante para a produção de NCB, pois a bactéria *K. xylinus* tem a capacidade de se desenvolver em uma variedade de substratos carbônicos (sacarose, glicose, frutose, lactose, manitol, entre outros) com a inclusão de uma fonte de nitrogênio (extrato de levedura, sais de amônio) (Iris *et al.*, 2013). Os substratos utilizados podem alterar as propriedades do biofilme de NCB, a exemplo de Souza *et al.* (2019), que desenvolveu um meio de cultura mínimo para cultivo de *K. hansenii* (espécie produtora de NCB do mesmo gênero da *K. xylinus*), resultando em transparência, maior capacidade de retenção de água, superfície altamente porosa e maior elasticidade do que os biofilmes usuais produzidas em meio manitol, características interessantes para aplicações nos campos médico e industrial (Souza *et al.*, 2019).

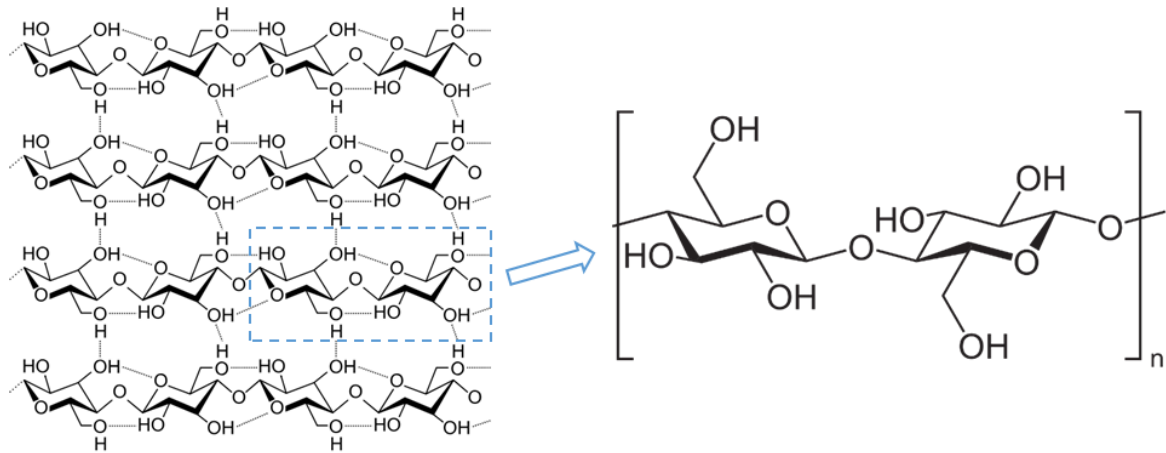
Além disso, *K. xylinus* possui resistência a mudanças abruptas de umidade, pH, presença de substâncias tóxicas e organismos patogênicos (Mohammedi, 2017). Sendo assim, podem ser testados diversos aditivos no meio de cultura com o objetivo de construir uma rede de fibras funcionalizada com novas propriedades ou alterar propriedades já existentes. O papel dos aditivos está relacionado com a habilidade de competirem por ligações de hidrogênio com as cadeias de β -1,4-glucano, afetando o processo de montagem da rede tridimensional, que também pode ser alterado por mudanças na viscosidade do meio (Gullo *et al.*, 2018). Na seção 2.1.5 serão apresentadas algumas aplicações da NCB e NCB funcionalizada, comentando brevemente sobre as formas de modificação, que serão melhor abordadas na seção 2.3.

2.1.4 Características e Propriedades da NCB

A celulose é um homopolissacarídeo linear cuja unidade estrutural,

celulose, é formada por duas moléculas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 2). Na Figura 2 também podem ser observadas as ligações de hidrogênio intramoleculares (domínios amorfos responsáveis pela rigidez da cadeia) e intermoleculares (domínios cristalinos, insolubilidade em água) entre os grupos hidroxila e oxigênios do anel (Donini *et al.*, 2010; Gullo *et al.*, 2018; Mohite e Patil, 2014; Sarubbo, 2017; Souza, 2014).

Figura 2 – Representação da celulose e sua unidade estrutural: celobiose. As linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio.



Fonte: Da autora, 2018.

Além disso, o mecanismo de biossíntese das cadeias pode levar a produção de dois tipos de celulose: (i) celulose I (cristalina), cujas microfibrilas são orientadas paralelamente e (ii) celulose II, na qual as microfibrilas são orientadas de forma antiparalela (Donini *et al.*, 2010). Em relação a celulose I, podem ocorrer duas estruturas cristalinas diferentes, monoclinica (I_{β}) ou triclinica (I_{α}) (Iris *et al.*, 2013; Sarubbo, 2017), cuja quantidade de cada tipo produzido pela bactéria pode ser alterada pelas condições de cultivo (agitação, temperatura e aditivos) (Foresti, Vazquez e Boury, 2016).

A NCB sintetizada pela bactéria em condições de cultura estática forma uma membrana na interface entre o ar e o meio de cultivo, que é flutuante devido à bolhas de gás carbônico produzidas durante o metabolismo da bactéria, e que foram aprisionadas na matriz de nanocelulose (Iris *et al.*, 2013; Klemm *et al.*, 2001). Sua alta capacidade de retenção de água é devida a sua superfície interna coberta por grupos hidroxila que são altamente hidrofílicos, entretanto apenas 1/10 da

água armazenada se comporta como água livre sobre a pressão atmosférica (Gelin *et al.*, 2007).

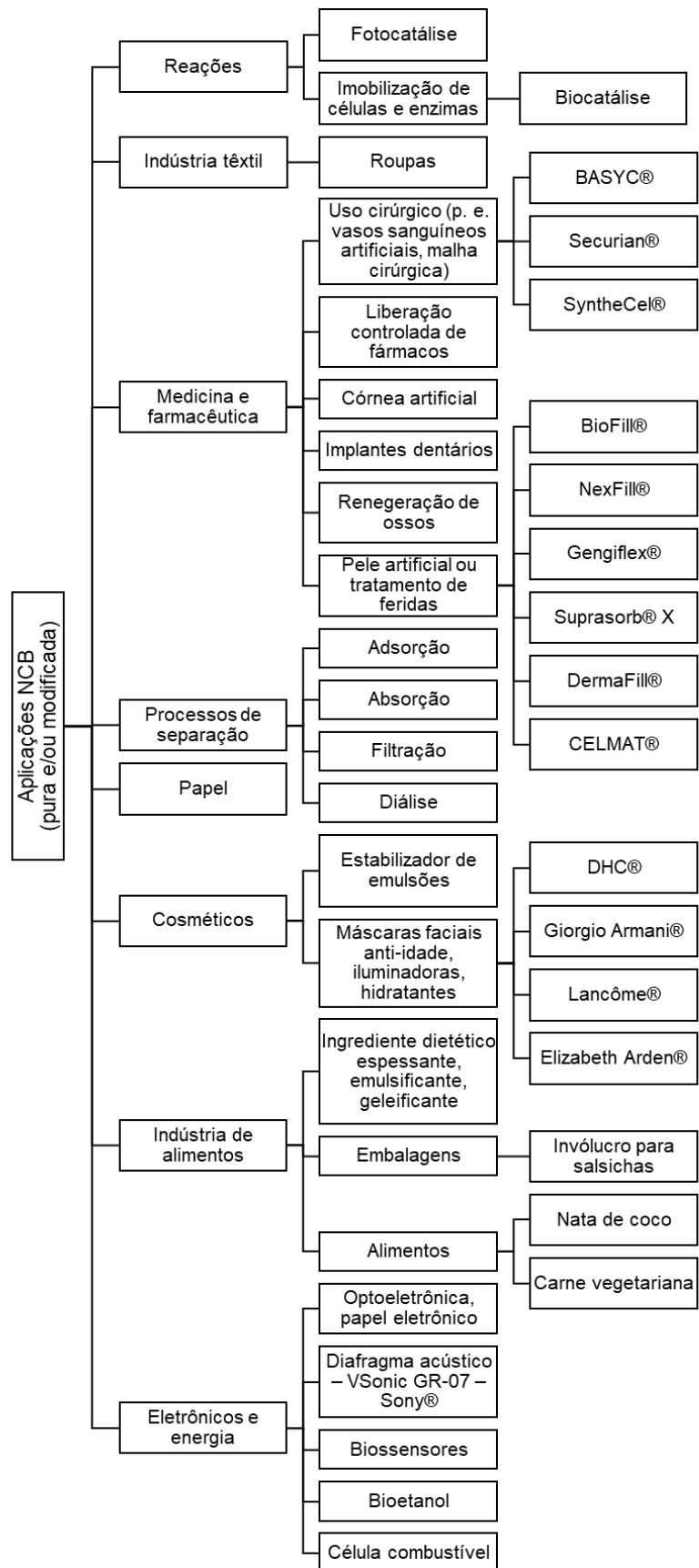
De maneira geral, a NCB apresenta como propriedades: a possibilidade de incorporação de materiais para produção de compósitos, elasticidade, alta cristalinidade (60-90%) (Gullo *et al.*, 2017), alta pureza e propriedades mecânicas superiores a da celulose vegetal (Sarubbo, 2017). Além disso, as microfibrilas de NCB são aproximadamente 100 vezes menores que as da celulose vegetal (Klemm *et al.*, 2001).

2.1.5 Aplicações e Funcionalização da NCB

A NCB tem sido extensivamente pesquisada para utilização em diversas áreas (Figura 3), sendo que em alguns setores já alcançou patamar comercial, seja como a NCB pura ou modificada (compósitos). Os compósitos consistem em dois materiais individuais, uma matriz e um material de reforço: a matriz atua como suporte ao material de reforço que, por sua vez, confere propriedades físicas, químicas e/ou biológicas à matriz. São produzidos a fim de superar as limitações e ampliar as possibilidades de aplicação da NCB, que não possui, por exemplo, propriedades antibacterianas, antioxidantes, condutoras e magnéticas (Shah *et al.*, 2013). O tipo de aplicação do biofilme ou compósito de NCB depende das propriedades da superfície, portanto o preparo seguido de caracterização é essencial no estudo de biomateriais e suas aplicações (Gama, Dourado e Bielecki, 2016).

Existem vários métodos para fornecer a NCB funcionalizada com várias propriedades físicas, reológicas, mecânicas, térmicas, elétricas, ópticas e biológicas. A NCB pura ou em combinação com diferentes componentes (por exemplo, biopolímeros e nanopartículas), pode ser usada para uma ampla gama de aplicações. Por exemplo, na medicina, a partir impregnação de compostos com atividade bactericidas, como óxidos de zinco e prata (Khalid *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2013); melhoramento das propriedades mecânicas, capacidade de retenção de água e adição de propriedades curativas para feridas e queimaduras (Diana e Zanoti, 2017); ou alteração da forma para uso como implantes médicos e na engenharia de tecidos (Cherian *et al.*, 2013; Klemm *et al.*, 2001; Mohammedi, 2017; Ullah, Santos e Khan, 2016).

Figura 3 – Aplicações e produtos comerciais a base de NCB pura e/ou modificada.



Fonte: Adaptado de BAPTISTA, 2013; IRIS et al., 2013; ESA et al., 2014; SHI et al., 2014; CACICEDO et al., 2016; STUMPF et al., 2016; ULLAH et al., 2016; FORESTI et al., 2016; GAMA et al., 2016; HOKKANEN et al., 2016; MARTIN et al., 2017; SARUBBO, 2017.

Seu uso na medicina, indústria farmacêutica e cosmética é principalmente devido à alta pureza, biocompatibilidade, insolubilidade, resistência à degradação microbiana, propriedades mecânicas, estabilidade térmica (autoclavável) e boa capacidade de retenção de água. Além disso, por ter uma escala relativamente variada de poros, a NCB pode ser utilizada como *scaffolds* (arcabouços na engenharia de tecidos para cultivo de células) (Gama, Dourado e Bielecki, 2016). Também possui ampla aplicação na indústria de alimentos por ser dietética, auxiliando a produzir alimentos com poucas calorias e colesterol, além de poder melhorar as propriedades reológicas dos alimentos (Shi *et al.*, 2014).

Os métodos de modificação da NCB podem ser obtidos com base no tipo de técnica. Estudos comprovaram que vários compostos foram adicionados com sucesso na NCB por modificações *in situ* (durante a síntese de NCB, que então se torna parte da estrutura do polímero) (Stumpf *et al.*, 2016). Por outro lado, o método *ex situ* consiste na adição de outros compostos (tais como, moléculas pequenas, nanopartículas inorgânicas ou polímeros nas superfícies) uma vez que a NCB já tenha sido sintetizada e purificada.

As modificações *ex situ* podem ocorrer por métodos químicos ou físicos. O grande número de grupos funcionais hidroxila presentes na cadeia polimérica da NCB permite uma extensa variedade de modificações químicas por meio de reações de derivação, a exemplo de esterificação e eterificação (Foresti, Vazquez e Boury, 2016). Por outro lado, as modificações físicas incluem processos como recobrimentos (*coating*) e adsorção (Li *et al.*, 2018; ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2012; Shah *et al.*, 2013; Stumpf *et al.*, 2016). Foresti *et al.* (2016) analisaram diferentes tipos de modificações que podem ser realizadas na NCB, incluindo a integração de diferentes óxidos metálicos. Nesse trabalho, os autores observaram que o modo mais simples de integrar óxidos metálicos na NCB é a mistura sob vigorosa agitação, assim como a síntese dos óxidos na presença do biofilme (por exemplo, síntese hidrotérmica ou solvotérmica). Apesar da utilização da NCB na medicina ter recebido muita atenção na última década, Foresti *et al.* (2016) destacam em seus estudos que o uso da NCB “integrada” a diferentes óxidos metálicos (ou particulados) e sulfetos metálicos pode contribuir de maneira direta para inovação e/ou aplicações em diferentes áreas do conhecimento. Como exemplo, podem ser citadas aplicações em materiais condutores, dispositivos eletrônicos e processos de separação (Shah *et al.*, 2013).

2.2 CINZA LEVE DE CARVÃO MINERAL

A matriz energética brasileira é composta 43,2% por fontes renováveis e, dos 56,8% das fontes não renováveis, 3,2 % correspondem ao carvão mineral. Em paralelo, 2,6% da oferta interna de energia elétrica brasileira corresponde a queima do carvão mineral. Por outro lado, a matriz energética mundial é composta por 26,5% de carvão mineral (MME, 2018), e estima-se que em 2031 a quantidade de cinza produzida alcance 2100 milhões de toneladas (Hemalatha e Ramaswamy, 2017).

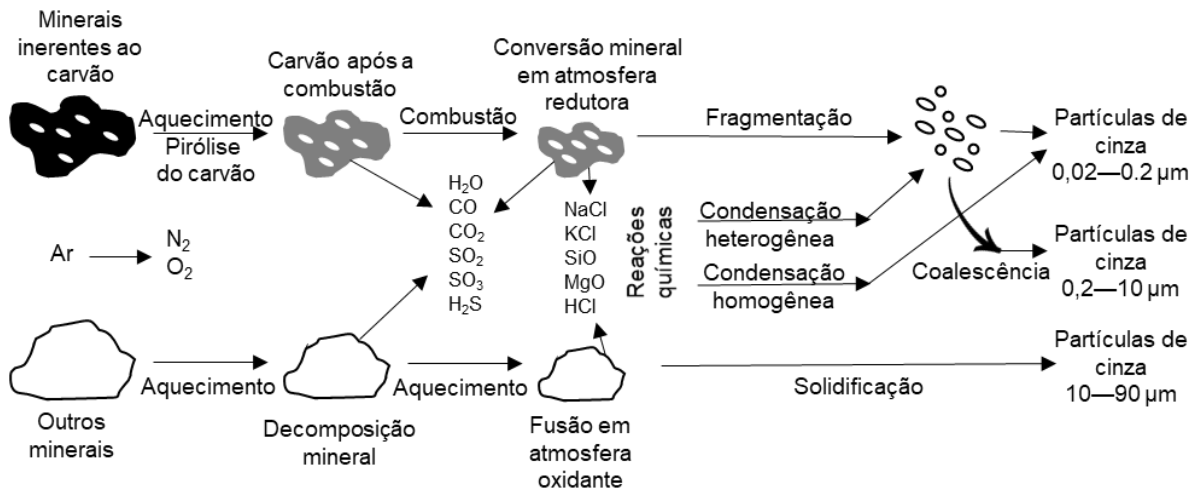
A cinza produzida na queima do carvão mineral pode ser dividida em: (i) cinza leve, coletada em ciclones, precipitadores eletrostáticos ou lançada na atmosfera e (ii) cinza pesada, depositada no fundo de fornalhas e gaseificadores. Outro resíduo desse processo é a escória, que possui a granulometria mais grosseira apresentando até mesmo blocos sinterizados (Carvalho, 2010).

As jazidas de carvão mineral mais significativas do Brasil se encontram na região Sul do país, assim como a maioria das termelétricas. Das 13 termelétricas do Brasil, 8 são na região Sul, sendo que 3 se encontram na cidade de Capivari de Baixo, em Santa Catarina, compondo o Complexo Termelétrico Jorge Lacerda (Matias, 2017), que a cada 100 toneladas de carvão mineral consumidas, produz 42 toneladas de cinza (70% CL e 30% cinza pesada) (Pozzobon, 1999). A alta quantidade de cinzas se deve ao baixo poder calorífico do carvão queimado no complexo Jorge Lacerda, sendo classificado como CE 4500 (4500 cal/g) (Pozzobon, 1999).

A CL proveniente de Jorge Lacerda é recolhida em precipitadores eletrostáticos e transportada pneumaticamente para silos de armazenagem, onde permanece até ser retirada por caminhões que transportam a CL até o comprador. A CL não comercializada é transportada até uma bacia de sedimentação, após adição de 10 a 20% de peso em umidade para facilitar manuseio e evitar o pó, onde permanece até sua retirada para recuperação ambiental de áreas degradadas pela mineração do carvão (POZZOBON, ROCHA e CHERIAF, 2000).

A combustão do carvão ocorre em temperaturas entre 1200 °C e 1600 °C, sendo que a Figura 4 representa o mecanismo de formação da CL. Dois tipos de partículas são alimentadas nas usinas: (i) carvão com alta quantidade de matéria orgânica e cerca de 10% de minerais inerentes e (ii) partículas contendo mais de 90% de matéria mineral.

Figura 4 – Mecanismo simplificado de formação da CL a partir da combustão de carvão mineral.



Fonte: Adaptado de TOMECZEK; PALUGNIOK, 2002.

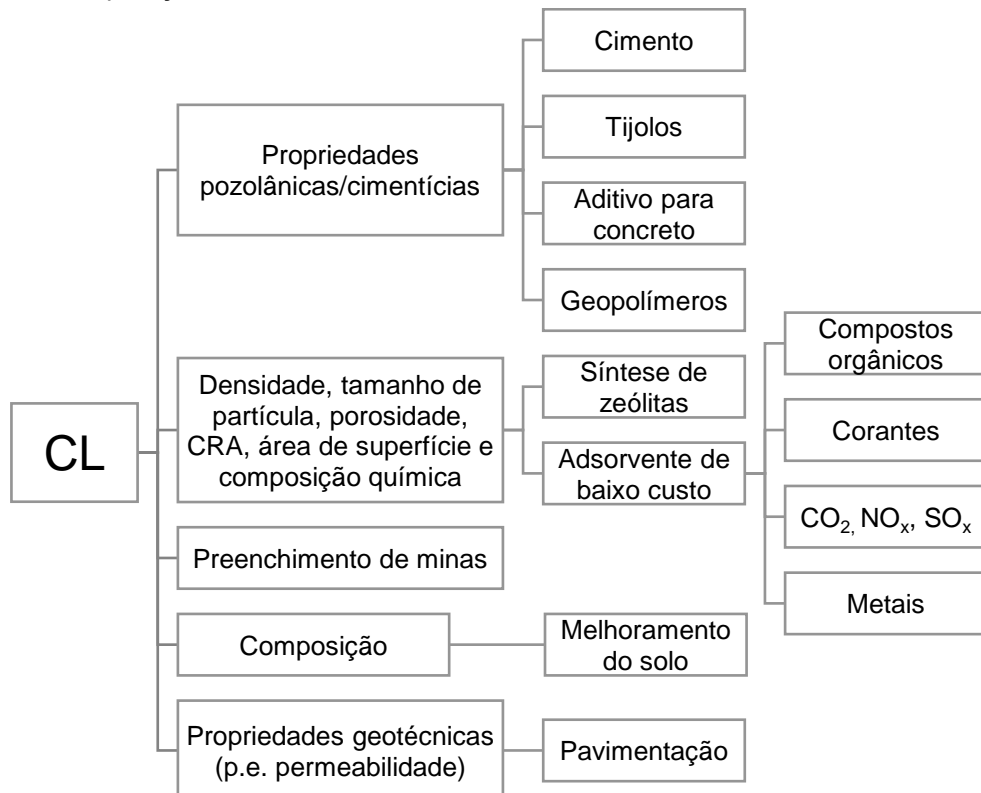
O processo inicia com a carbonização do carvão, seguido da combustão (materiais com maior teor de matéria orgânica queimam a temperaturas mais altas). Na sequência, as partículas minerais finas do carvão reduzem gradualmente devido à temperatura elevada, sendo liberadas do interior do carvão. Nesse ponto ocorre a fragmentação dos minerais, que se decompõem, e são convertidos em gases e eventualmente condensam formando partículas sólidas de cinzas, que variam no tamanho dependendo do tipo de condensação. E a outra matéria mineral, que possuía pouca matéria orgânica, passa por inúmeras transformações complexas resultando em partículas predominantemente esféricas e de maior granulometria (Tomeczek e Palugniok, 2002). Além disso, granulometrias maiores do que as mencionadas na Figura 4 podem ser encontradas devido ao agrupamento de partículas, germinação mútua de esferas, esferoides e partículas irregulares de carvão não queimado, que provavelmente não alcançaram temperaturas superiores a 550 °C (Blissett e Rowson, 2012).

A NBR 5736/1991 (ABNT, 1991) define a CL como resíduos finamente divididos provenientes da combustão de carvão pulverizado ou granulado. Também pode ser classificada de acordo com o tipo de carvão, separando-se em Classe C ou Classe F. A CL Classe C é produzida pela queima de lignita ou carvão sub-betuminoso, contendo entre 50 e 70 % (m/m) e altas quantidades de CaO (em torno de 30 a 40 %). Por outro lado, a Classe F é produzida pela queima de antracito ou carvão betuminoso e possui mais de 70 % (m/m) de SiO_2 , Al_2O_3 e Fe_2O_3 e baixas quantidades de CaO (em torno de 1 a 12 %) (Ahmaruzzaman, 2010; ASTM, 2005), sendo que as cinzas

produzidas no Complexo Termelétrico Jorge Lacerda pertencem a Classe F (Pozzobon, 1999).

Além da composição do carvão de origem, as características físicas, químicas e composição das cinzas dependem das condições de combustão, do tipo e eficiência do controle de emissão e os métodos de disposição utilizados, tendo sido verificado em estudos de caracterização química de diferentes amostras de CL, grande variabilidade na distribuição dos elementos traço (Sabedot *et al.*, 2011). Contudo, a composição química da CL em geral contém uma gama de óxidos metálicos e carbono não queimado, usualmente encontrados na seguinte ordem decrescente: $\text{SiO}_2 > \text{Al}_2\text{O}_3 > \text{Fe}_2\text{O}_3 > \text{CaO} > \text{MgO} > \text{K}_2\text{O}$, além de traços de vários elementos como Cr, Pb, Ni, Ba, Sr, V e Zn (Yao *et al.*, 2015) que podem alcançar concentração total maior que 50 mg/kg (Izquierdo e Querol, 2012). Apesar de sua composição complexa, a CL já possui diversas aplicações (Figura 5).

Figura 5 – Aplicações da cinza leve de carvão mineral de acordo com suas características.



Fonte: Adaptado de AHMARUZZAMAN, 2010; YAO *et al.*, 2015.

De acordo com Yao *et al.* (2015), a CL é um dos mais complexos e abundantes materiais antropogênicos (foram identificados aproximadamente 316 minerais individuais e 188 grupos minerais em diferentes amostras de CL), e se não

for devidamente disposta pode causar poluição do solo, da água e romper ciclos ecológicos. Apesar de estar sendo utilizada em diferentes setores (produção de concreto, construção de rodovias, melhoramento do solo, síntese de zeólitas), essas aplicações ainda não são suficientes para utilizar toda a CL gerada. Grande parte ainda acaba sendo depositada em bacias de sedimentação, lagoas ou aterros sanitários – espaços limitados que com o tempo custarão cada vez mais – sendo necessário desenvolver novas técnicas de reciclagem da CL. Para amplificar sua utilização, se faz necessário conhecer as propriedades físicas, químicas e composição da CL, conforme sumarizado na Tabela 1.

Tabela 1 – Características da CL.

Características	Descrição	Referências
Tamanho	partículas finas, <20 µm	(Fisher <i>et al.</i> , 1978)
	1-100 µm	(Kutchko e Kim, 2006)
	0,02-90 µm	(Sarkar <i>et al.</i> , 2005)
	< 0,075 mm	(Ahmaruzzaman, 2010)
Densidade	2,1-3 g/cm ³	(Ahmaruzzaman, 2010)
Área superficial	0,3-0,5 m ² /g	(Fisher <i>et al.</i> , 1978)
	0,7-0,8 m ² /g	(Pedersen <i>et al.</i> , 2008)
	até 1 m ² /g (BET)	(Golewski, 2017)
	0,17-1 m ² /g	(Ahmaruzzaman, 2010)
pH	Alcalina	(Ahmaruzzaman, 2010)
Cor	Cinza ao preto (depende % carvão não queimado)	(Ahmaruzzaman, 2010)
Morfologia e composição	Esferas sólidas, cenosferas, fragmentos irregulares de carbono não queimado	(Yao <i>et al.</i> , 2015)
	Aluminossilicatos e quartzo (amorfo e cristais), esferas ricas em óxido de ferro e aluminossilicatos	(Kutchko e Kim, 2006)
	Partículas esféricas, fases amorfas (aluminossilicatos) e fases inertes cristalinas (mulita, quartzo, magnetita)	(Benezet, Adamiec e Benhassaine, 2008)
	Principalmente aluminossilicatos amorfos (CL com CaO < 10%)	(Blissett e Rowson, 2012)
	Esferas sólidas, cenosferas (até 1 µm) preenchidas com gases, multiesferas, pleroesferas, esfera vesicular, ferroesferas, partículas irregulares e amorfas	(Golewski, 2017)

A morfologia da CL é controlada primariamente pela temperatura de combustão e pela taxa de resfriamento (Kutchko e Kim, 2006). Apesar de serem predominantemente esféricas, as partículas consistem majoritariamente por esferas sólidas, cenosferas (esferas ocas) e fragmentos irregulares (carbono poroso não queimado) (Blissett e Rowson, 2012; Kutchko e Kim, 2006; Yao *et al.*, 2015), assim como minerais e agregados minerais a exemplo do quartzo (Kutchko e Kim, 2006). A expansão de voláteis presos no interior da matéria pode resultar na expansão de partículas formando cenosferas. Além disso, minerais com ponto de fusão superiores aos empregados podem permanecer relativamente não modificados (Kutchko e Kim, 2006).

Alguns estudos têm sido realizados empregando técnicas de separação sequenciais para obter frações compostas por diferentes partículas isoladas da CL, como as esferas magnéticas e as cenosferas (densidade menor que 1 g/cm^3) (Blissett e Rowson, 2012). A relevância desses estudos se encontra no fato de que o uso de CL em diversos campos – assim como em escala industrial – possui inúmeros desafios devido à relativa variabilidade de suas características e composição, que dificultam a reprodutibilidade dos processos (Ahmaruzzaman, 2010). Portanto, a obtenção dos componentes em separado pode ser útil em aplicações particulares, ampliando a utilização da CL e, em consequência, reduzindo os custos e área de disposição, assim como os impactos ambientais.

O pH da mistura entre CL e água, depende principalmente da razão molar entre cálcio e enxofre, embora outros cátions alcalinos também possam contribuir. Baseando-se nesse razão, a CL pode ser classificada em fortemente alcalina (pH 11-13, $\text{Ca/S} \gg 1$), levemente alcalina (8-9) e ácida ($\text{Ca/S} \ll 1$) (Izquierdo e Querol, 2012; Yao *et al.*, 2015).

Em relação a aplicação como adsorvente, ressalta-se que o carvão não queimado (2-12% m/m) exerce importante papel na capacidade de adsorção, que pode ser melhorada por ativação química e física (Ahmaruzzaman, 2010). Na pesquisa realizada por Ahmaruzzaman (2010) estão reunidas informações sobre capacidade de adsorção de CL e de CL modificada provenientes de cerca de trinta estudos, considerando compostos orgânicos, corantes e metais.

Por fim, para a utilização de CL em meios aquosos deve-se levar em conta a possibilidade de lixiviação de alguns elementos e também a transformação de compostos em outros, como a formação da etringita, que ocorre em solução aquosa

na presença de íons de cálcio, alumínio, sulfato e $\text{pH} > 11$ (Izquierdo e Querol, 2012). Izquierdo e Querol (2012) compilaram tendências de liberação (mg/kg) de alguns metais presentes na CL de acordo com o pH da solução aquosa, sendo eles: Al, As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Si, V, W e Zn. Além disso, relataram a lixiviação de 9 elementos majoritários (Al, Ca, Fe, Mg, K, Na, Si, S, Ti) e de 26 elementos que podem estar presentes em concentrações traço (Sb, As, Ba, Be, B, Cd, Cr, Ce, Co, Cu, F, Pb, Mn, Hg, Mo, Ni, terras raras, Rb, Se, Tl, Th, W, Sn, U, V e Zn). Destaca-se que a composição do extrato aquoso dependerá de inúmeros fatores, como tempo de contato, tamanho das partículas, concentração dos elementos, temperatura, pressão e principalmente do pH (Ahmaruzzaman, 2010).

2.3 FUNCIONALIZAÇÃO DE NCB COM CL

Como já descrito, as modificações da NCB podem ser químicas ou físicas, realizadas *in situ* (durante a formação do biofilme) ou *ex situ* (com o biofilme *in natura*). Na literatura pesquisada não foram encontradas modificações de NCB utilizando CL, entretanto podem ser realizadas analogias com estudos realizados com os constituintes da CL, por exemplo, o componente SiO_2 (sílica), e também com estudos relacionando a CL com outros polímeros.

Yu-Fen et al. (2006) estudaram a CL para aplicação em preenchimento de polímeros. Após realizar métodos para purificação da CL (separação em diversas frações), foi aplicado o método do aquecimento isotérmico para aumentar a área específica da CL purificada, sendo que a purificação e o aquecimento isotérmico apresentaram boa reprodutibilidade. Após a incorporação da CL purificada em polipropileno e caracterização do material, observou-se que a performance mecânica foi inferior à do propileno puro. Contudo, o compósito com a CL purificada apresentou performance mecânica superior ao compósito com a CL não tratada pelo método do aquecimento isotérmico (Yu-fen *et al.*, 2006).

Maeda et al. (2006) produziu, por método *ex situ*, hidrogéis híbridos de NCB e sílica, a partir da conversão do precursor tetraetoxisilano, na presença do biofilme. O compósito obtido apresentou módulo de Young, resistência a tração e alongação superiores a NCB pura (Maeda *et al.*, 2006). Barud et al. (2008) avaliaram as propriedades térmicas e de luminescência de híbridos de sílica e NCB, produzidos de forma similar a anterior. Constatou-se que são estáveis até 300°C e, pelo estudo

preliminar de luminescência, que é um material cuja cor de emissão pode ser ajustada, sendo promissor para aplicação em dispositivos ópticos (Barud *et al.*, 2008).

Jiang *et al.* (2016) mostraram que a sílica foi covalentemente ligada na superfície de NCB, para formar uma camada de revestimento ultrafina e uso do material como separador nanofibroso encapsulado com sílica para baterias de íon-lítio. Pela caracterização do material observou-se que é um candidato promissor para alta potência e performance de baterias de íon-lítio (Jiang *et al.*, 2016).

Pesquisadores também produziram aerogéis flexíveis de sílica e NCB, por metodologia *ex situ*, a partir de precursor da sílica, Na_2SiO_3 . O material apresentou melhores propriedades mecânicas que o aerogel de NCB pura, menor densidade, maior área de superfície e baixa condutividade térmica. Após a “hidrofobização” o material pôde ser utilizado para absorção de óleos e ser reutilizado após lavagem (Sai *et al.*, 2014). A NCB também foi estudada na produção de compósitos de fibra e cimento. Os autores constataram que a NCB criou uma forte interface com o cimento e impediu a mineralização das fibras (Mohammadkazemi *et al.*, 2015).

Membranas de celulose vegetal funcionalizadas por oxidação foram montadas *layer by layer* juntamente com nanopartículas de sílica funcionalizadas com epóxi, resultando em uma superfície superhidrofóbica e autolimpante (Yu *et al.*, 2017).

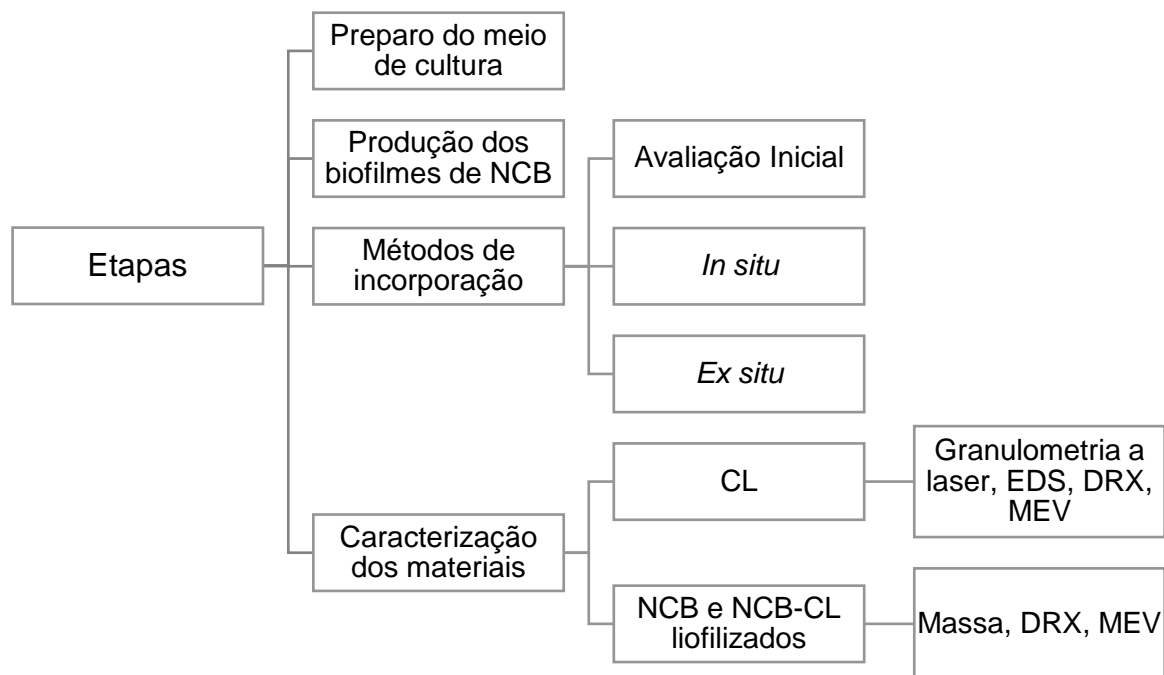
Com relação as frações da CL, foi preparado um filme compósito contendo polivinil butiral, polianilina e cenosferas de CL funcionalizadas com cobalto e níquel que foi considerado promissor para utilização em blindagem contra interferência eletromagnética (Bora *et al.*, 2016). Outra fração da CL é composta por partículas magnéticas, representada principalmente pela magnetita, que possui aplicações potenciais em campos como: membrana magneticamente ativa em biorreator de membrana e tratamento de resíduos (Blaney, 2007).

Dessa forma, observa-se um leque variado de possibilidades para a funcionalização de NCB com CL, abrindo um novo campo de possíveis aplicações científicas e/ou tecnológicas. Porém, a formação do compósito não é uma etapa trivial, sendo que esse trabalho almeja – como ponto de partida – contribuir para “novas” propostas desse compósito (NCB-CL).

3 METODOLOGIA

Nesta seção estão descritos os reagentes, equipamentos e procedimentos necessários em cada etapa. A pesquisa foi dividida em 4 etapas, conforme apresentado no fluxograma abaixo (Figura 6).

Figura 6 – Resumo das etapas da metodologia.



Fonte: Da autora, 2019.

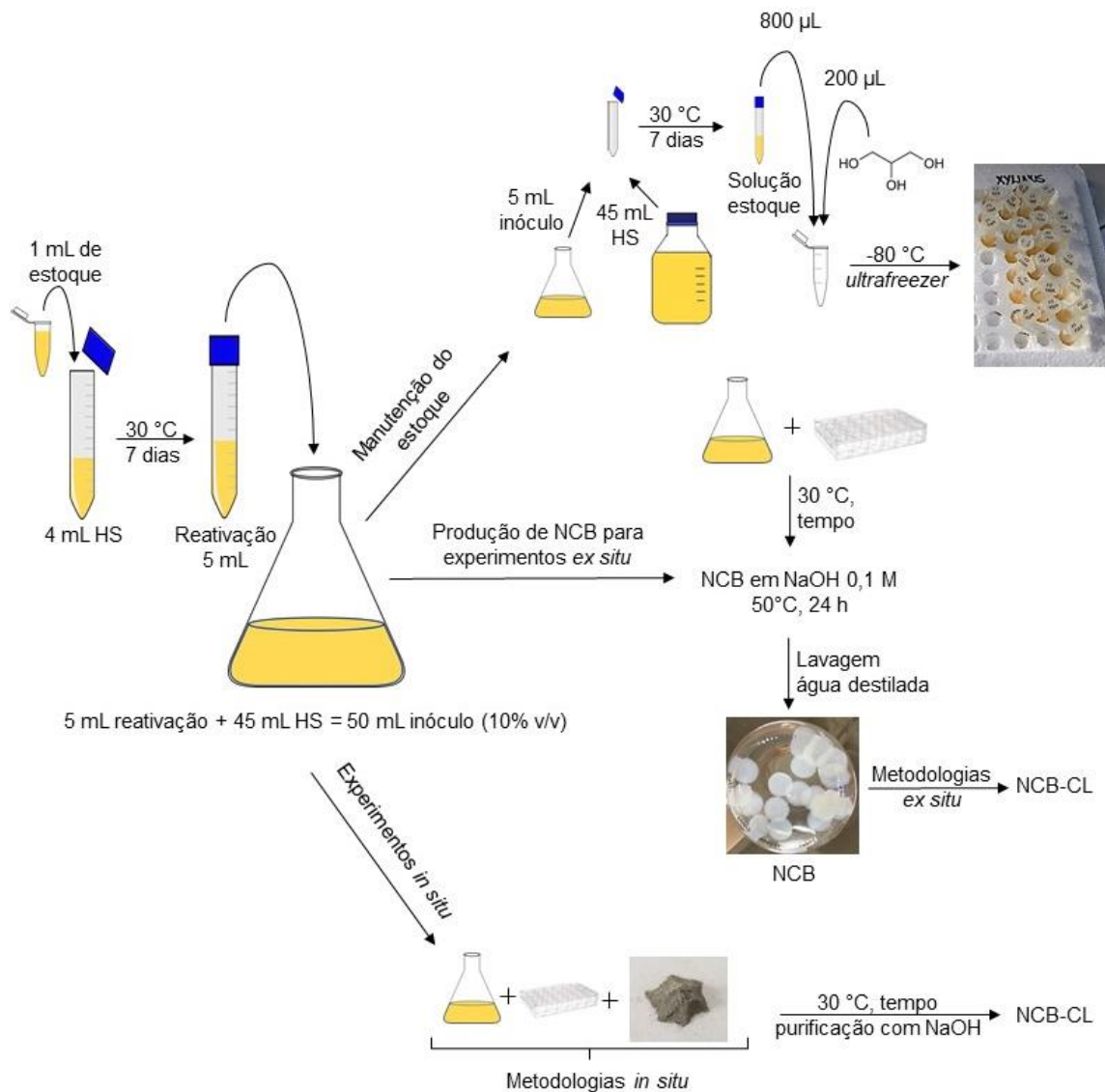
3.1 MEIO DE CULTURA

A bactéria *Komagataeibacter xylinus* (ATCC® 53524™) foi utilizada para a produção de biofilmes de NCB. Para seu cultivo foi utilizado o meio Hestrin & Schramm (HS), constituído por 20 g de glicose, 5,0 g de extrato de levedura, 5,0 g de peptona, 2,7 g de fosfato dissódico (Na₂HPO₄) e 1,15 g de ácido cítrico por litro. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6 após o seu preparo e, em seguida, esterilizou-se o meio em autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Posteriormente, toda a manipulação do meio de cultivo foi realizada dentro da câmara de fluxo laminar para a manutenção da esterilidade.

3.2 PRODUÇÃO DOS BIOFILMES DE NCB

Na Figura 7 pode ser visualizado um diagrama esquemático da reativação da cepa bacteriana, produção do inóculo, manutenção do estoque e produção e purificação dos biofilmes de NCB.

Figura 7 – Diagrama esquemático da produção dos biofilmes de NCB.



Fonte: Da autora, 2018.

3.2.1 Reativação da Cepa Bacteriana

Cepas da bactéria *K. xylinus* foram armazenadas em um estoque no ultrafreezer a -80 °C para a manutenção do estoque bacteriano. Para a reativação,

descongelou-se uma alíquota de 1 mL do estoque no interior da cabine de fluxo laminar, e transferiu-se para um tubo de cultura contendo 4 mL do meio de HS. Após homogeneização, o tubo de reativação foi colocado em incubadora a 30 °C e cultivado em cultura estática durante 7 dias, devendo apresentar a formação de biofilme ao final desse período.

3.2.2 Preparação do Inóculo e Manutenção do Estoque Bacteriano

O volume da reativação foi ampliado em um erlenmeyer denominado inóculo, sendo que após a reativação todos os inóculos preparados devem seguir a proporção de 10 % (v/v) do cultivo anterior. Ou seja, para produzir 30 mL de inóculo, prepara-se uma solução contendo 3 mL da reativação e 27 mL de HS e incuba-se a 30 °C durante 7 dias, em cultura estática. O inóculo foi utilizado para a realização dos experimentos *in situ*, produção de biofilmes e manutenção do estoque bacteriano.

Para a produção dos estoques da cepa bacteriana retirou-se o volume desejado do inóculo em um fálcon de 50 mL, completando-se com meio HS até a proporção de 10 % (v/v). Após 7 dias de incubação a 30 °C, transferiu-se 800 µL do estoque para *ependorfs* contendo 200 µL de glicerol 20 % (v/v) estéril. Depois da homogeneização, as alíquotas produzidas são congeladas a -80 °C em ultrafreezer.

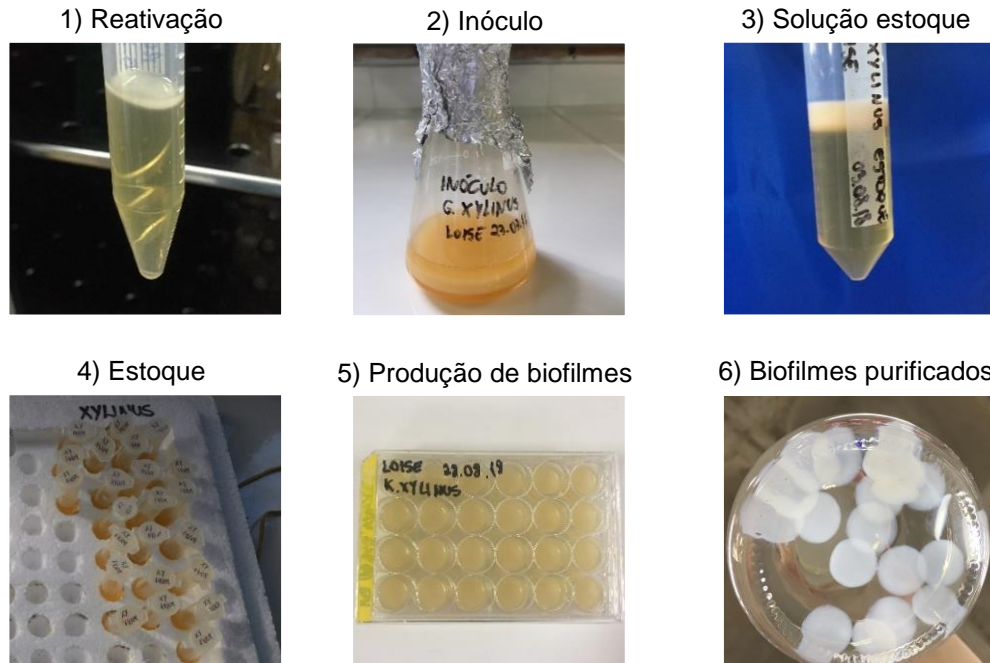
3.2.3 Produção e Purificação dos Biofilmes de NCB

Os biofilmes de NCB podem ser produzidos em diferentes tamanhos e formatos. Para a produção da NCB preparou-se o meio de cultura contendo 10 % (v/v) do inóculo, conforme descrito anteriormente. Utilizou-se placas de cultura de 6, 24 e 96 poços, assim como recipientes esterilizáveis para produção de tiras, que foram incubados a 30°C em cultura estática durante 5 dias.

Após o período de incubação os biofilmes foram removidos e purificados em um béquer contendo uma solução 0,1 M de hidróxido de sódio. Para remover as bactérias e resíduos retidos na rede de fibras da nanocelulose os biofilmes foram mantidos na solução alcalina por 24 horas a 50°C. Após esse período foram lavados com água destilada até o pH atingir a neutralidade e autoclavados por 20 min a 121 °C. Na Figura 8, observa-se os resultados adequados de reativação da cepa

bacteriana, produção do inóculo, manutenção do estoque e produção e purificação dos biofilmes de NCB.

Figura 8 – Registros da reativação, produção do inóculo, do estoque bacteriano e biofilmes.



Fonte: Da autora, 2018.

3.3 MÉTODOS DE INCORPORAÇÃO

A cinza leve de carvão mineral (CL) utilizada foi doada pelo Complexo Termelétrico Jorge Lacerda, em Capivari de Baixo/SC. Os tópicos a seguir apresentam as metodologias de avaliação inicial, incorporação *in situ* e incorporação *ex situ*, sendo que o desenvolvimento das metodologias foi derivado de artigos da literatura.

3.3.1 Avaliação Inicial

Para realização de testes *in situ* e *ex situ*, investigou-se a capacidade de algumas substâncias suspenderem ou solubilizarem a CL.

- i. adição de 0,1 g de CL e 1 g de acetato de polivinila (PVA) em 40 mL de água, a 100 rpm, 90°C, durante 30 minutos (Revanasiddappa *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2010);
- ii. adição de 0,5 g de CL em substâncias com diversos grupos

funcionais, que após 5 minutos foram aquecidas a 50°C em banho-maria: ácido sulfúrico P.A, ácido sulfúrico 1 M, peróxido de hidrogênio P.A., ácido etilenodiamino tetra-acético 1 M, ácido acético 1 M, cloreto férrico 1 M, álcool etílico 70% (v/v), ácido nítrico P.A., bicarbonato de sódio 5% (m/v);

- iii. adição de 0,5 g de CL em soluções 2% (m/v) de ácido sulfúrico e ácido nítrico, aquecidas a 200°C durante 20 minutos (Bai *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2018).

3.3.2 Incorporação *In Situ*

Para a incorporação *in situ* foram realizados os testes abaixo, utilizando CL esterilizada em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos.

- i. Incubação de 10 mL de solução de meio HS (10% v/v de inóculo) com 0,5 g de CL, a 30°C durante 7 dias;
- ii. 0,1 g de CL e 1 g de PVA foram suspensos em 40 mL de meio HS utilizando um agitador magnético, a 100 rpm, 90 °C, durante 30 minutos. Uma placa de 24 poços foi separada em três seções, contendo cada uma 10 % v/v de inóculo e HS, HS+PVA, HS+PVA+CL, respectivamente. A placa foi incubada a 30°C durante 7 dias (Wang *et al.*, 2010);
- iii. Produção de membranas em forma de silicone a 30 °C, durante 7 dias, utilizando 30 mL de solução de HS (10% v/v de inóculo + 0,5 g de CL) (Onodera *et al.*, 2002).

3.3.3 Incorporação *Ex Situ*

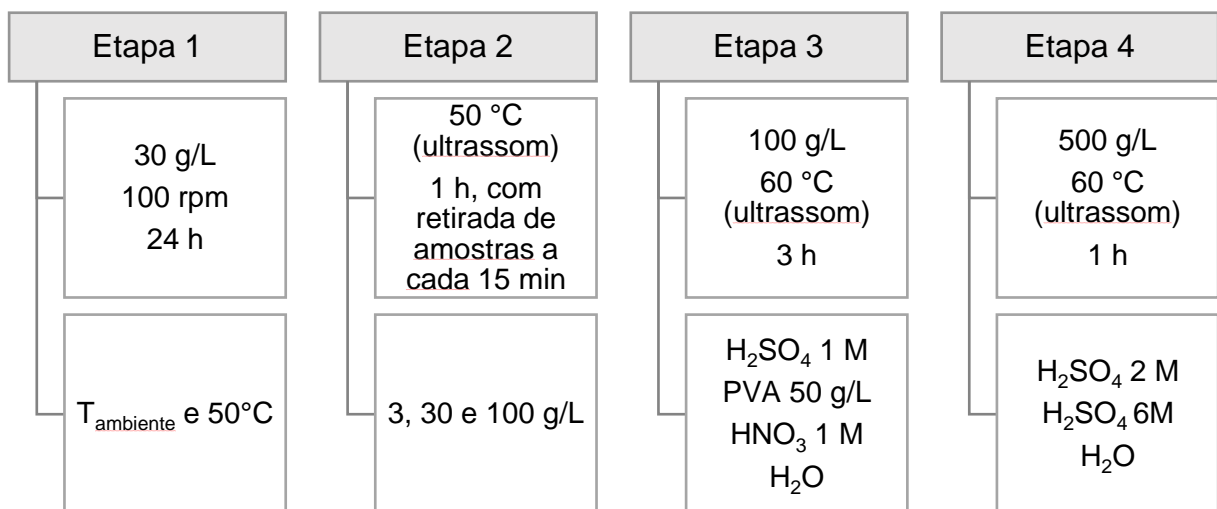
Para a incorporação *ex situ* foram realizados os testes a seguir, utilizando a CL sem ter passado por nenhum procedimento prévio. Para os testes, utilizou-se Lavadora Ultrassônica da Schuster, modelo L220, com frequência de 35 kHz.

- i. Adição de 4 biofilmes de NCB (24 poços) em meio aquoso contendo 30 g/L, sob agitação em agitador magnético a 100 rpm, durante 24 horas, utilizando temperatura ambiente e 50°C (Foresti, Vazquez e

- Boury, 2016; Khalid *et al.*, 2017);
- ii. Adição de 4 biofilmes de NCB (24 poços, espessura de $0,886 \pm 0,072$ mm) em meio aquoso contendo 3 g/L, 30 g/L e 100 g/L em ultrassom, a 50°C , durante 1 hora, sendo retirado 1 biofilme a cada 15 minutos;
 - iii. Adição de biofilmes de NCB (20 de 24 poços e 47 de 96 poços, possuindo espessura de $2,605 \pm 0,031$ mm) em solução de 100 g/L de cinza, utilizando os seguintes meios: ácido sulfúrico 1 M, PVA 50 g/L, ácido nítrico 1 M e água destilada. O teste foi realizado no interior de uma estufa, em ultrassom a 60°C , durante 3 horas (Ahmaruzzaman, 2010; Sai *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2010);
 - iv. Adição de biofilmes de NCB (13 de 24 poços e 36 de 96 poços, com espessura de $1,439 \pm 0,017$ mm) em solução de 500 g/L de cinza, utilizando os seguintes meios: ácido sulfúrico 2 M (teste A), ácido sulfúrico 6 M (teste B) e água (teste C). O experimento foi realizado no interior de uma estufa, em ultrassom a 60°C durante 1 hora.

A concepção das metodologias *ex situ* foi baseada na literatura e na avaliação inicial. As etapas foram realizadas em sequência, adaptando as metodologias posteriores aos resultados obtidos nas anteriores, conforme pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 – Diagrama esquemático da incorporação *ex situ*.



Fonte: Da autora, 2019.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

Foram realizadas análises químicas, morfológicas e estruturais a fim de identificar a composição da CL e o tamanho das partículas. As seguintes análises foram realizadas: difração de raio X, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia por dispersão de energia de raio X e granulometria por difração a laser. Em paralelo, os biofilmes NCB e NCB-CL foram secos pelo processo de liofilização (Liofilizador Labconco), realizado na UTFPR (Campus Medianeira), durante 24 horas e caracterizados por difração de raio X e microscopia eletrônica de varredura. Além disso, mediu-se a massa dos biofilmes úmidos e secos em balança analítica e determinou-se a espessura da NCB utilizando um paquímetro digital.

3.4.1 Difração de Raio X (DRX)

Os dados foram coletados no difratômetro PANalytical (Empyrean), de 5° a 80° (2θ), varredura contínua, radiação de cobre, fendas de divergência com 0,50 mm e de recepção com 0,30 mm, potência no tubo dada por 40 kV x 30 mA.

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raio X (EDS)

As micrografias da NCB e NCB-CL foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss EVO-MA10, operado a 20 kV no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Unila. Por outro lado, as micrografias da CL foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura Tescan VEGA3, operado a 5 kV, acoplado a um equipamento EDS Oxford Instruments, no Laboratório Multiusuário de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Previamente às análises, todas as amostras foram recobertas com uma camada de ouro.

3.4.3 Granulometria por Difração a Laser

A análise granulométrica foi realizada na amostra de CL pela técnica de difração a laser no analisador de tamanho de partículas 1190 Cilas, com um range de $0,04 \mu\text{m}$ a $2500 \mu\text{m}$.

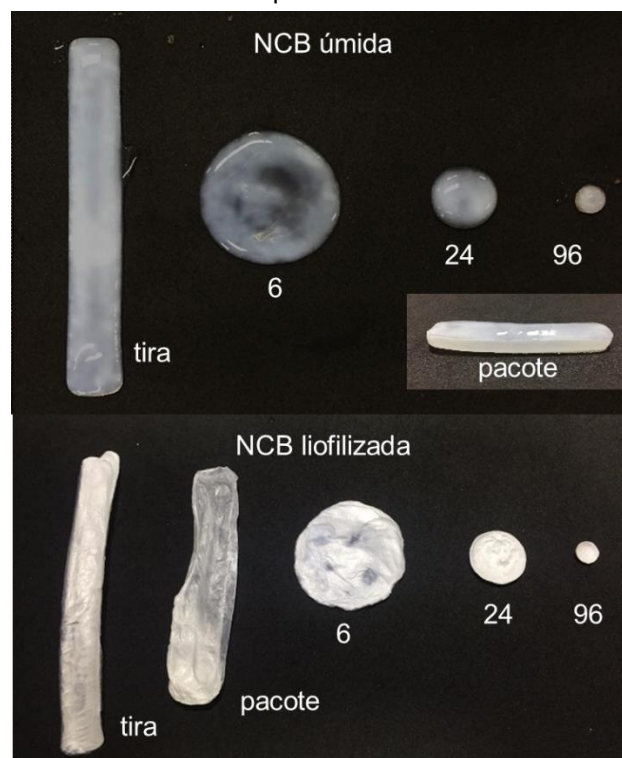
4 RESULTADOS

Nesta seção estão apresentados os resultados obtidos na produção de biofilmes, nos métodos de incorporação e pela caracterização dos materiais.

4.1 PRODUÇÃO DE BIOFILMES DE NCB

Após o protocolo de reativação da bactéria e produção dos inóculos estarem de acordo, os biofilmes de nanocelulose foram sintetizados com sucesso no meio HS em cultura estática. Os biofilmes foram produzidos em tamanho uniforme para serem utilizados posteriormente em modificações *ex situ* com a CL. Foram utilizadas placas de cultura com 6, 24 e 96 poços (contendo 3 mL, 1 mL e 0,2 mL de inóculo por poço, respectivamente) e recipientes esterilizáveis no formato de tiras (6 mL por poço) que foram incubados a 30°C por 5 dias. Além disso, foi possível obter estruturas no formato de “pacotes”, ou seja, como um invólucro. Após a produção dos biofilmes, uma parte foi separada como controle e liofilizada, enquanto a outra foi armazenada para utilização nos testes *ex situ*, de acordo com a Figura 10.

Figura 10 – Biofilmes produzidos de 6, 24 e 96 poços, além de biofilmes no formato de tiras e pacotes.



Fonte: Da autora, 2019.

4.2 MÉTODOS DE INCORPORAÇÃO

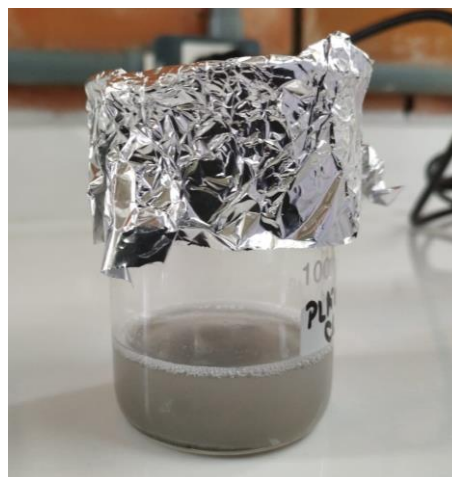
As principais variáveis que devem ser controladas nos processos de modificação da NCB são pH, agitação, temperatura, tempo e concentração do material a ser incorporado. Além disso, faz-se necessário investigar a melhor técnica (*in situ* e *ex situ*) e solvente para incorporar as cinzas na matriz de nanocelulose.

Para o método *in situ* que se refere a alterações que podem ocorrer nas propriedades da NCB durante o seu cultivo, foi investigada uma solução de cinzas a ser adicionada ao meio de cultura. Já para as modificações realizadas na NCB após sua produção e purificação (*ex situ*) foram avaliados os métodos/processos que permitiriam uma melhor incorporação.

4.2.1 Avaliação Inicial

Para os testes *in situ* e *ex situ* analisou-se qual seria o meio mais adequado para que a CL pudesse ser solubilizada ou suspensa, integrando-se posteriormente a NCB. Por essa razão, o primeiro teste realizado foi o conjunto CL e PVA – composto previamente utilizado na literatura para produzir compósitos condutores à base de polianilina/PVA/CL (Revanasiddappa *et al.*, 2018) e compósitos de NCB/PVA (Wang *et al.*, 2010). Pela Figura 11 observa-se a formação de uma suspensão de CL em PVA (aspecto cinza da mistura), que foi utilizada tanto para experimentos *in situ* como *ex situ*.

Figura 11 – Suspensão de 0,1 g de CL e 1 g de PVA em 40 mL de água, a 100 rpm, 90°C durante 30 minutos.



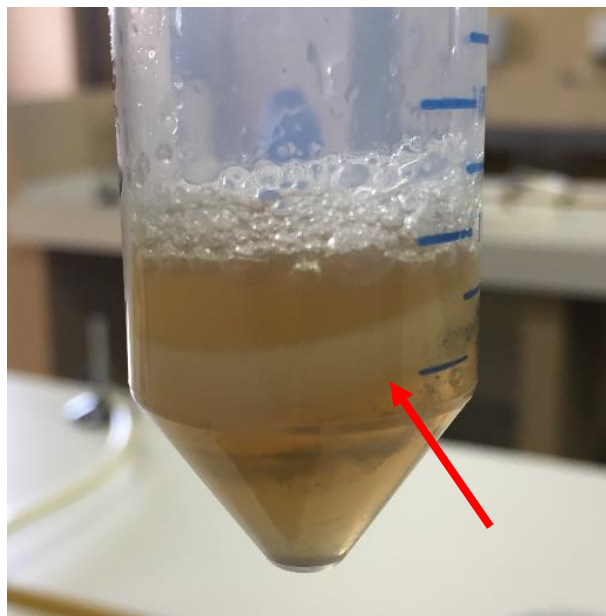
Fonte: Da autora, 2018.

Já o segundo teste, realizado a 50 °C, indicou por uma observação visual que o ácido sulfúrico e o nítrico são os mais prováveis de suspender e/ou solubilizar a CL. Nesse caso, com aquecimento a 200 °C por 20 minutos de soluções de CL com ácido nítrico e sulfúrico (2% (m/v)) observou-se, em uma análise qualitativa, que houve baixa solubilização da CL no meio. Entretanto, obteve-se uma suspensão de partículas de CL promissora para uso nos testes de incorporação *ex situ*. Há de ressaltar que a CL pode ser decomposta por ácido sulfúrico concentrado em uma faixa de 150 a 300 °C, sendo a mulita e alumina presentes no material convertidas a sulfato de alumínio (Bai *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2018).

4.2.2 Incorporação *In Situ*

Para verificar a viabilidade dos testes *in situ*, ou seja, para determinar se a bactéria *K. xylinus* tem seu desenvolvimento completamente inibido pela CL, iniciou-se o experimento de incorporação *in situ* com um teste qualitativo de cinza em meio HS. Apesar da CL decantar no meio de cultura, a *K. xylinus* é tolerante à presença de CL, uma vez que foi possível perceber a formação de um biofilme de NCB (Figura 12). Portanto, tem-se o indicativo da possibilidade de realizar a produção *in situ* em condições similares.

Figura 12 – Resultado da incubação de 10 mL de HS (10% v/v de inóculo) com 0,5 g de CL, a 30°C após 7 dias.



Fonte: Da autora, 2018.

Assim, tal condição foi usada em placa de cultura de 24 poços para a produção da NCB-CL, conforme indicado na metodologia. Esta etapa baseou-se no trabalho de Castro et al. (2014), o qual mesclou NCB e PVA por metodologia *in situ* com a bactéria *Gluconacetobacter medellinensis*, obtendo um material compósito biocompatível com melhor performance térmica e mecânica. Além disso, os autores mostraram que o PVA e a NCB estavam distribuídos de forma homogênea no compósito (CASTRO et al., 2014; CASTRO et al., 2015). No presente experimento houve produção de biofilme nos poços contendo apenas o meio de cultura, ou seja, os poços contendo PVA não produziram biofilme. Nesse caso, o PVA provavelmente inibiu o desenvolvimento da bactéria devido a concentração (0,025 g/mL) utilizada, devendo a mesma ser ajustada para a bactéria *K. xylinus*.

Antes de realizar o ajuste, realizou-se a produção em uma placa de silicone, na qual a bactéria foi capaz de produzir o biofilme em toda a superfície do material, pois silicone é uma membrana permeável ao oxigênio que pode ser utilizada como substituto da interface ar-líquido (Onodera et al., 2002). Em outras palavras, a quantidade de oxigênio necessária para o metabolismo da bactéria passa através da placa de silicone, promovendo o aumento na produção da NCB (Figura 10, denominado de “pacote”). Portanto, como a bactéria produz o biofilme apenas na interface ar-líquido, não era possível realizar a funcionalização *in situ* devido a decantação da CL no meio HS. Dessa forma, o teste de produção com a placa de silicone foi realizado para observar se havia incorporação de CL no biofilme produzido na base inferior da placa de silicone. Após 7 dias de incubação, houve produção de biofilme em todos os poços da placa de silicone, mas com baixa incorporação, uma vez que a CL foi inserida somente no interior do pacote. Com isso, concluiu-se que apesar da CL não comprometer o metabolismo da *K. xylinus* nas quantidades analisadas, existe uma incompatibilidade entre os materiais durante a produção do biofilme, sendo a CL “rejeitada” pelas bactérias.

Por essa razão, decidiu-se não seguir com os testes de incorporação *in situ* utilizando o PVA como dispersante da CL no meio. Apesar disso, é um resultado interessante do ponto de vista das metodologias de encapsulamento, visto que os procedimentos envolvendo o tema e a NCB são em sua maioria voltados ao cultivo agitado. Nessa etapa, foi possível realizar o encapsulamento de um material na matriz de NCB em um cultivo estático. É importante destacar que há uma grande necessidade de mais estudos sobre modificações *in situ* da NCB, uma vez que nesse

método muitos fatores estão envolvidos devido a interferência no metabolismo da bactéria e consequentemente na formação das nanofibras.

4.2.3 Incorporação *Ex Situ*

Primeiramente avaliou-se qualitativamente a influência da temperatura na incorporação de CL em NCB, adicionando-se biofilmes em uma solução de CL (30 g/L) sob agitação durante 24 horas, sendo um teste com aquecimento a 50 °C e o outro sem aquecimento. Na Figura 13, observa-se que o uso da maior temperatura resultou em maior incorporação da CL. Entretanto, a incorporação ocorreu apenas no lado mais poroso do biofilme. Dessa forma, os experimentos seguintes foram realizados com biofilmes de espessura menor, para garantir uma melhor incorporação da CL.

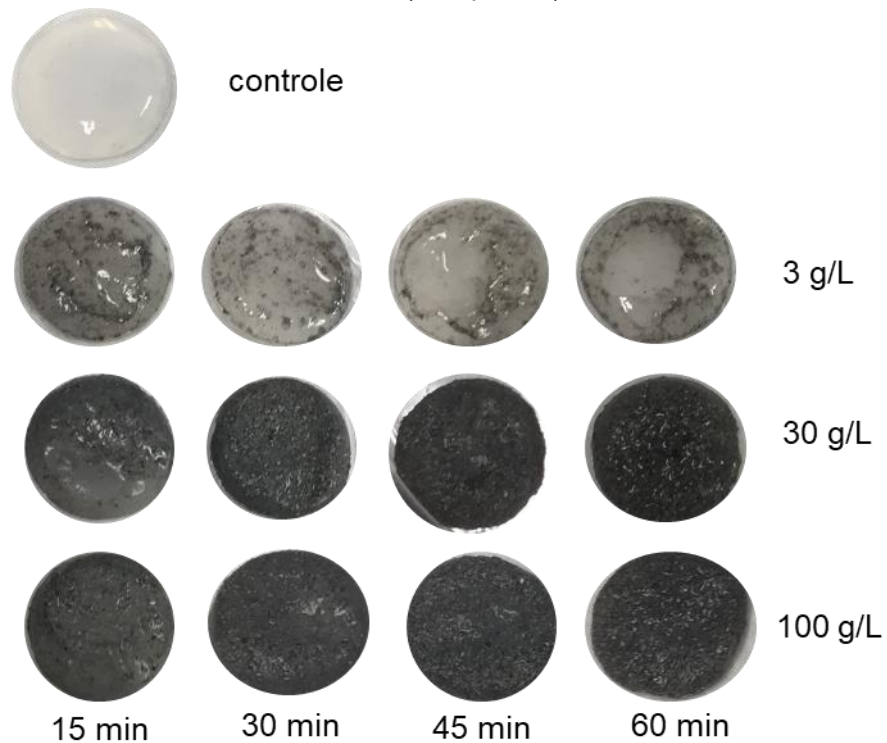
Figura 13 – Influência da temperatura na incorporação utilizando solução de CL 30 mg/mL. À esquerda, teste a 50 °C; à direita, teste a temperatura ambiente.



Fonte: Da autora, 2018.

Para a etapa seguinte utilizou-se um ultrassom a 50 °C durante 60 minutos. O pH da mistura foi sempre próximo aos 9, medido com fita de pH e os resultados estão apresentados na Figura 14 (lado inferior dos biofilmes, ou seja, lado mais poroso). Nessa etapa, buscou-se observar qualitativamente a influência da concentração e do tempo no processo de incorporação, a fim de determinar os parâmetros que poderiam proporcionar melhores resultados para a incorporação da CL.

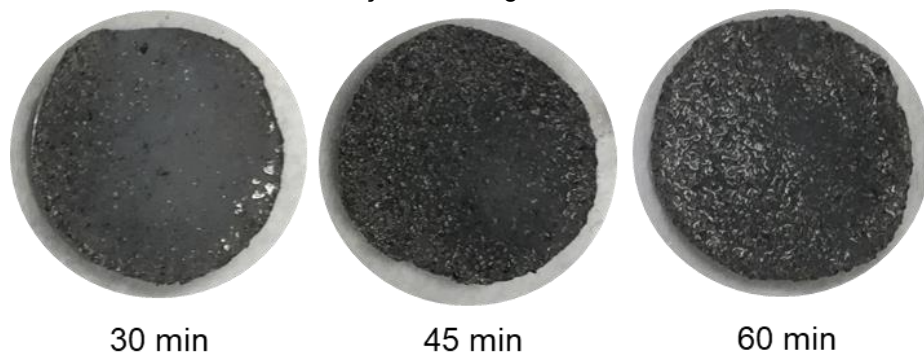
Figura 14 – Influência do tempo e concentração na incorporação da CL em NCB, em ultrassom a 50 °C (lado poroso).



Fonte: Da autora, 2018.

Pela Figura 14, observa-se que as amostras de 100 g/L são visualmente semelhantes do lado poroso, isto é, independem do tempo de incorporação. Porém, analisando o lado menos poroso (superfície superior), observa-se que apenas aos 60 min alcançou-se resultado visual igual ao lado poroso (Figura 15), o que indica que um maior tempo de contato resulta em maior incorporação.

Figura 15 – Superfície superior de NCB-CL (menos porosa) produzida em ultrassom, a 50 °C, com solução de 100 g/L de CL.

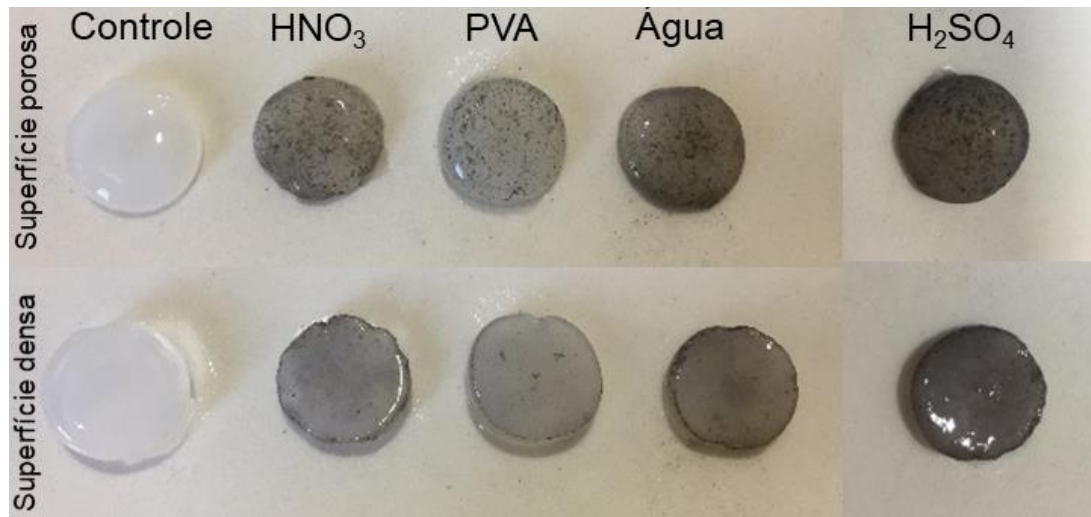


Fonte: Da autora, 2018.

Após analisar os efeitos de concentração da solução, tempo e temperatura alterou-se também o solvente. Os solventes usados foram: ácido sulfúrico (1 mol/L), PVA (50 g/L) e ácido nítrico (1 mol/L). O ácido sulfúrico foi utilizado por Sai et al. (2014) para produzir um compósito de sílica e NCB, imergindo os biofilmes durante 8 horas à temperatura ambiente. Além disso, é relatado que o tratamento da CL com ácido sulfúrico ou nítrico resultam em um aumento na área superficial específica da CL e em sua capacidade de adsorção (Ahmaruzzaman, 2010), o que seria um resultado interessante visto que tanto NCB quando a CL são utilizadas em processos de separação, a exemplo de adsorção de corantes (Ahmaruzzaman, 2010; Svorcik *et al.*, 2019). E o PVA foi utilizado pela sua capacidade de atuar suspendendo a CL em solução, ou seja, aumentando seu contato com a NCB, e de poder ser incorporado de forma *ex situ* nessa matriz (Wang *et al.*, 2010).

A Figura 16 mostra que o melhor solvente testado é com ácido sulfúrico, seguido pela água, para a incorporação da CL na NCB considerando a mesma espessura do biofilme. Por outro lado, a espessura do biofilme limita consideravelmente a incorporação da CL (vide Figura 15, para o caso da água).

Figura 16 – Biofilmes de NCB (controle) e NCB-CL produzidos *ex situ* em ultrassom, a 60 °C, 100 g/L, variando-se os solventes do processo.

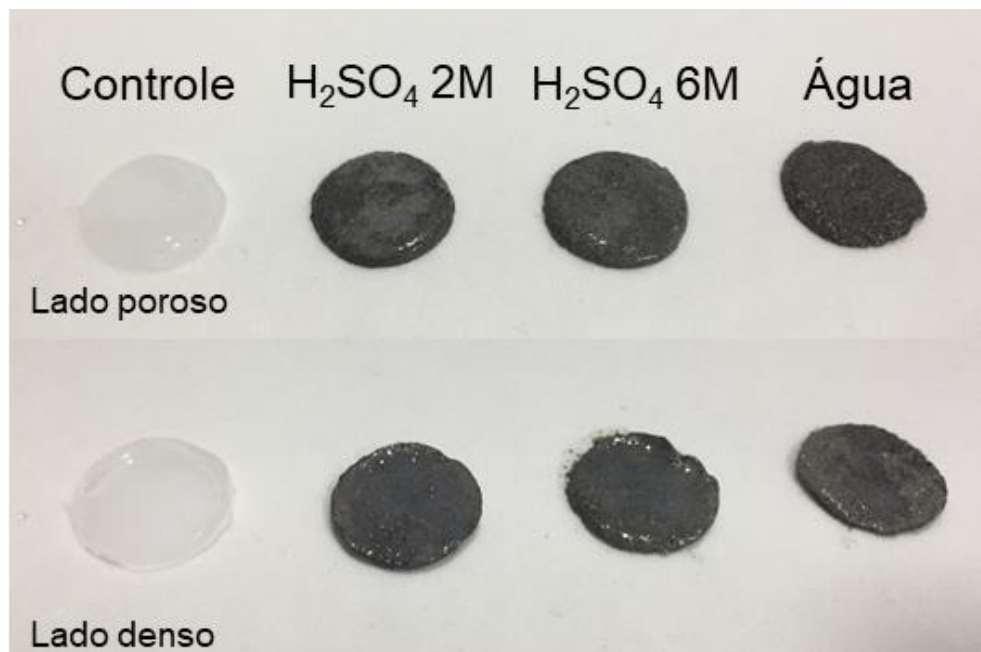


Fonte: Da autora, 2019.

Para o último experimento *ex situ* utilizou-se biofilmes de espessura mais fina (de 2,60 para 1,44 mm). Porém, como a espessura foi maior que a do teste da Figura 14 (0,89 mm), aumentou-se a concentração de CL para 500 g/L. Utilizou-se como solventes água destilada e ácido sulfúrico em duas concentrações: 2 e 6 mol/L.

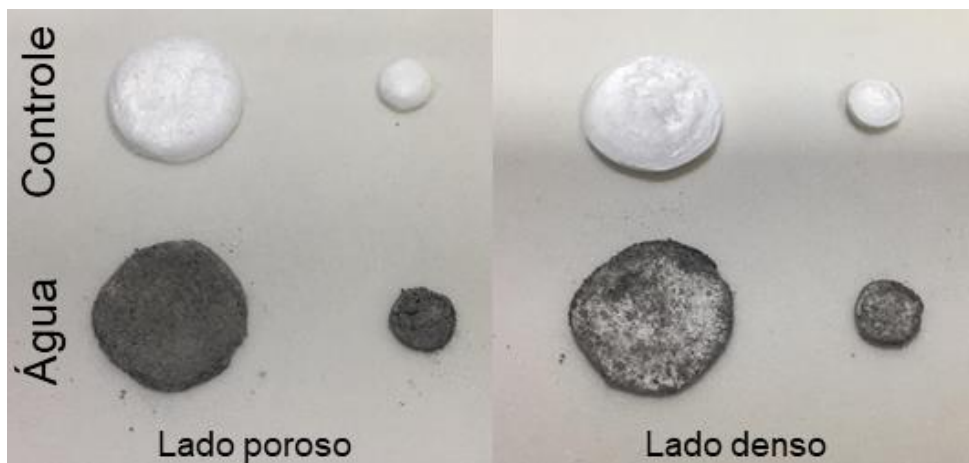
Além disso, para definir a concentração de ácido sulfúrico, testou-se a resistência do biofilme por meio de sucessivas diluições do ácido, sendo que 9 mol/L é, aproximadamente a concentração máxima suportada pela NCB a temperatura ambiente. Na Figura 17 podem ser visualizados os resultados obtidos. Após, os biofilmes úmidos foram secos pelo processo de liofilização durante 24 horas para serem caracterizados (Figura 18).

Figura 17 – Biofilmes de NCB (controle) e NCB-CL produzidos *ex situ* com 500 g/L de CL em ultrassom a 60 °C durante 1 hora.



Fonte: Da autora, 2019.

Figura 18 – Biofilmes liofilizados de NCB (controle) e NCB-CL produzida *ex situ* com 500 g/L de CL em ultrassom a 60 °C durante 1 hora.



Fonte: Da autora, 2019.

Durante o processo de liofilização, a matriz de NCB das duas amostras produzidas em meio ácido (Figura 17) foram totalmente consumidas por ácido residual, portanto somente pôde ser caracterizada a NCB-CL produzida em meio aquoso. Provavelmente, o processo de liofilização aumenta a concentração do ácido – em função da sublimação da água – fazendo com que a NCB se dissolva durante o processo. Além disso, analisando-se os biofilmes liofilizados (Figura 18), pode-se notar que a incorporação não foi homogênea na matriz de NCB, conforme era esperado ao observar os biofilmes úmidos da Figura 16.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

4.3.1 Massa dos Biofilmes

A Tabela 2 apresenta os resultados do processo de incorporação da CL na matriz de NCB.

Tabela 2 – Massa dos biofilmes (g) de NCB e NCB-CL úmidos e secos, produzidos nas placas de 24 e 96 poços.

N° amostra	NCB				NCB-CL			
	ÚMIDA		SECA		ÚMIDA		SECA	
	24	96	24	96	24	96	24	96
1	0,2881	0,0388	0,0040	0,0008	0,3398	0,0431	0,0247	0,0060
2	0,2528	0,0426	0,0037	0,0009	0,4301	0,0302	0,0298	0,0097
3	0,3350	0,0436	0,0040	0,0008	0,2958	0,0290	0,0281	0,0062
4	0,3097	0,0522	0,0043	0,0009	0,2431	0,0420	0,0271	0,0065
5	0,2455	0,0375	0,0039	0,0009	0,2328	0,0383	0,0297	0,0070
Média	0,2862	0,0429	0,0040	0,0009	0,3083	0,0365	0,0279	0,0071
Desvio Padrão	0,0378	0,0058	0,0002	0,0001	0,0805	0,0066	0,0021	0,0015

Fonte: Da autora, 2019.

Observa-se grande variabilidade dos valores de massa para o caso da via úmida, representado pelo alto desvio padrão e discrepâncias entre os valores com e sem CL. Isso ocorre devido a “flutuação” da quantidade de água entre as amostras no processo de pesagem. Portanto, apenas os resultados de massa seca foram considerados relevantes e sintetizados na Tabela 3.

Tabela 3 – Massa dos biofilmes NCB e NCB-CL secos e incorporação de CL na matriz (g CL/g NCB).

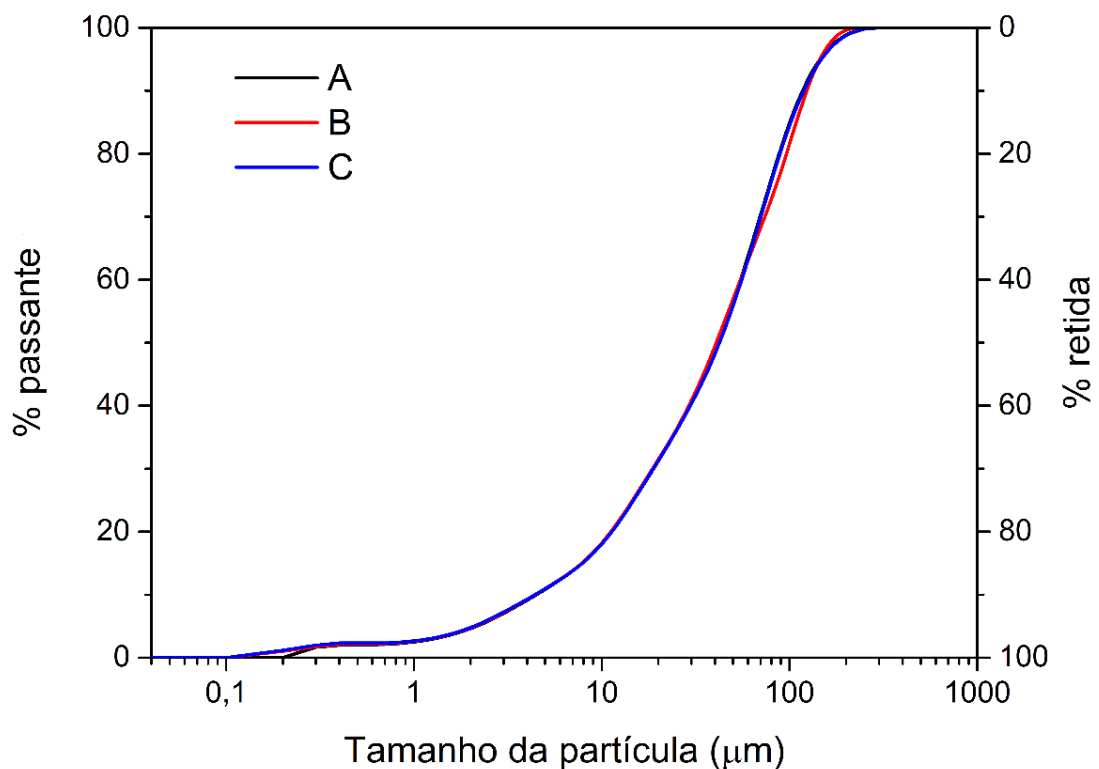
Resultados	24 poços	96 poços
NCB (mg)	4,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1
NCB-CL (mg)	27,9 ± 2,1	7,1 ± 1,5
Incorporação (g CL/g NCB _{seca})	6,0	6,9

Fonte: Da autora, 2019.

Esses resultados demonstram que a incorporação de CL é bastante elevada para os tamanhos de biofilme analisados, o que pode contribuir para o reaproveitamento de CL e aplicações futuras do compósito final.

4.3.2 Granulometria por Difração a Laser

A análise granulométrica da CL, realizada em triplicata (denominadas amostras A, B e C), permite a obtenção de informações a respeito do tamanho das partículas e sua distribuição granulométrica, conforme apresentada na Figura 19.

Figura 19 – Distribuição granulométrica acumulada das partículas de CL, representadas pelas amostras A, B e C (triplicata).

Fonte: Da autora, 2019.

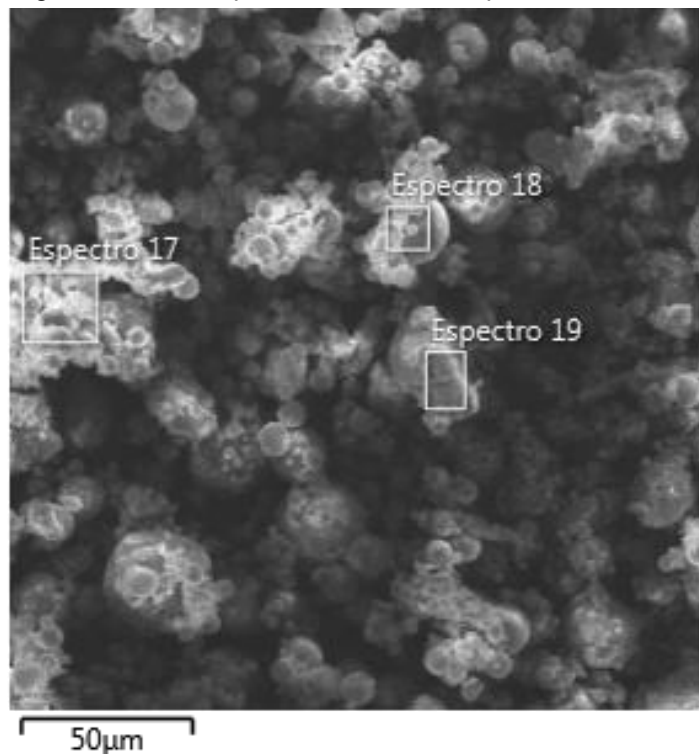
Na CL utilizada, proveniente da Termelétrica Jorge Lacerda, 90% das partículas têm diâmetro menor que $120,059 \pm 3,166 \mu\text{m}$, 50% das partículas têm diâmetro menor que $41,564 \pm 0,804 \mu\text{m}$ e 10% das partículas possuem diâmetro menor que $4,449 \pm 0,043 \mu\text{m}$.

De acordo com a literatura, o diâmetro das partículas de cinza pode variar de 0,02 a 90 μm , sendo as partículas de maior granulometria predominantemente esféricas e, partículas que excedem o tamanho são provavelmente devido à agrupamento de partículas, germinação mútua de esferas, esferoides e partículas irregulares de carvão não queimado (Blissett e Rowson, 2012; Tomeczek e Palugniok, 2002).

4.3.3 Espectrometria por Dispersão de Energia de Raio X (EDS)

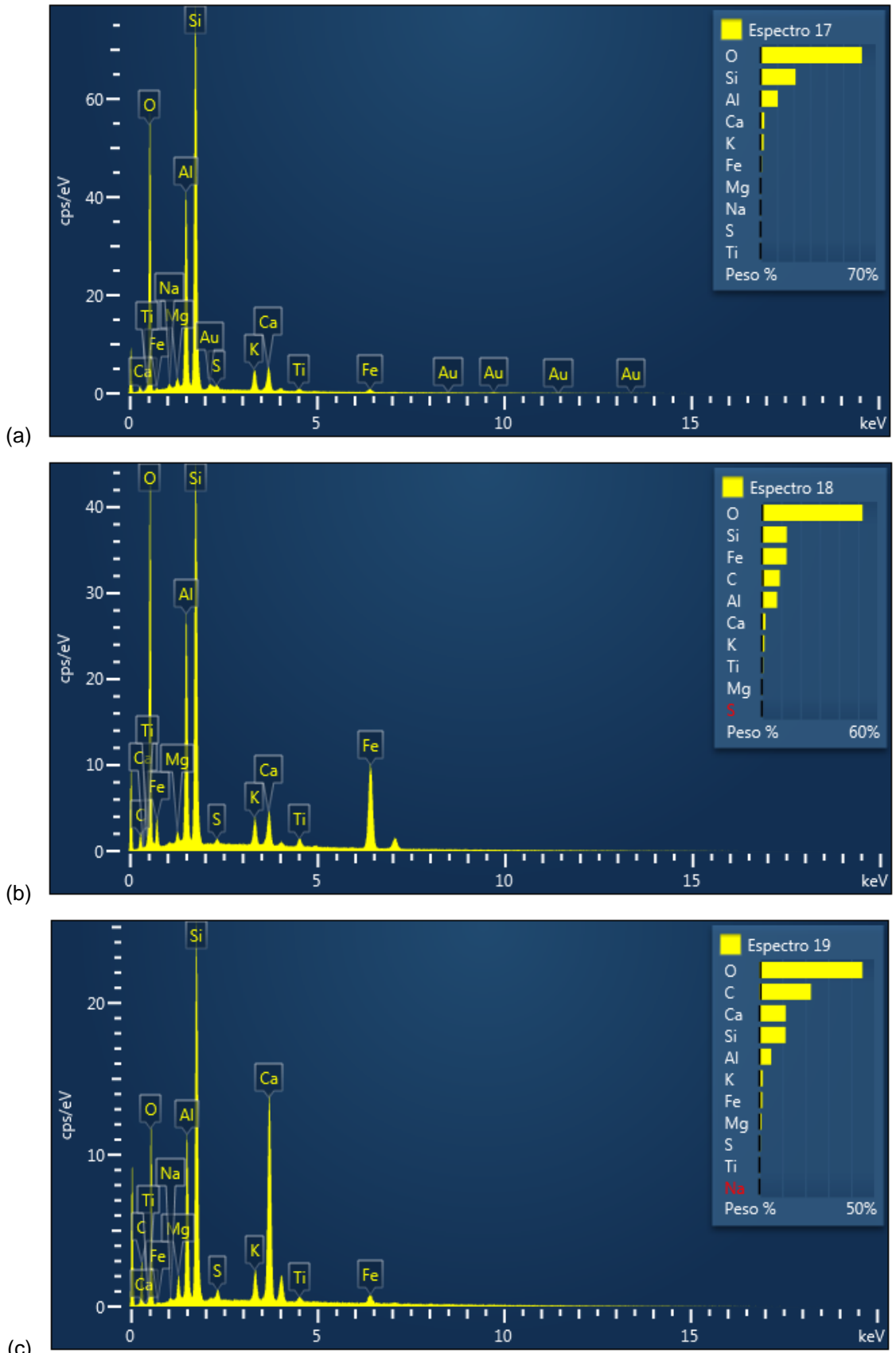
A composição química da CL utilizada foi determinada por EDS, analisando três regiões diferentes, conforme demonstrado na Figura 20. Os resultados podem ser visualizados na Figura 21 e foram sumarizados na Tabela 4.

Figura 20 – Imagem de elétrons para EDS, com os espectros 17, 18 e 19 em destaque.



Fonte: Da autora, 2019.

Figura 21 – EDS dos espectros 17 (a), 18 (b) e 19 (c).



Fonte: Da autora, 2019.

Tabela 4 – Composição química da CL (% m/m).

Elemento	Rótulo Padrão	Espectro 17	Espectro 18	Espectro 19
C	C Vit	0,00	9,31	22,45
O	SiO ₂	61,61	52,35	44,92
Na	Albita	0,43	0,00	0,17
Mg	MgO	0,54	0,46	0,90
Al	Al ₂ O ₃	10,50	7,93	5,14
Si	SiO ₂	21,26	12,97	11,40
S	FeS ₂	0,36	0,21	0,44
K	KBr	1,88	1,35	1,46
Ca	Wollastonita	2,30	1,87	11,46
Ti	Ti	0,35	0,65	0,40
Fe	Fe	0,77	12,90	1,28
Total		100,00	100,00	100,00

Fonte: Da autora, 2019.

Os resultados confirmam que a CL utilizada é de Classe F, conforme apresentado na Seção 2.2, pois possui mais de 70% (m/m) de SiO₂ e Al₂O₃ e baixas quantidades de CaO (entre 1 a 12%) (ASTM, 2005).

4.3.4 Difração de Raio X (DRX)

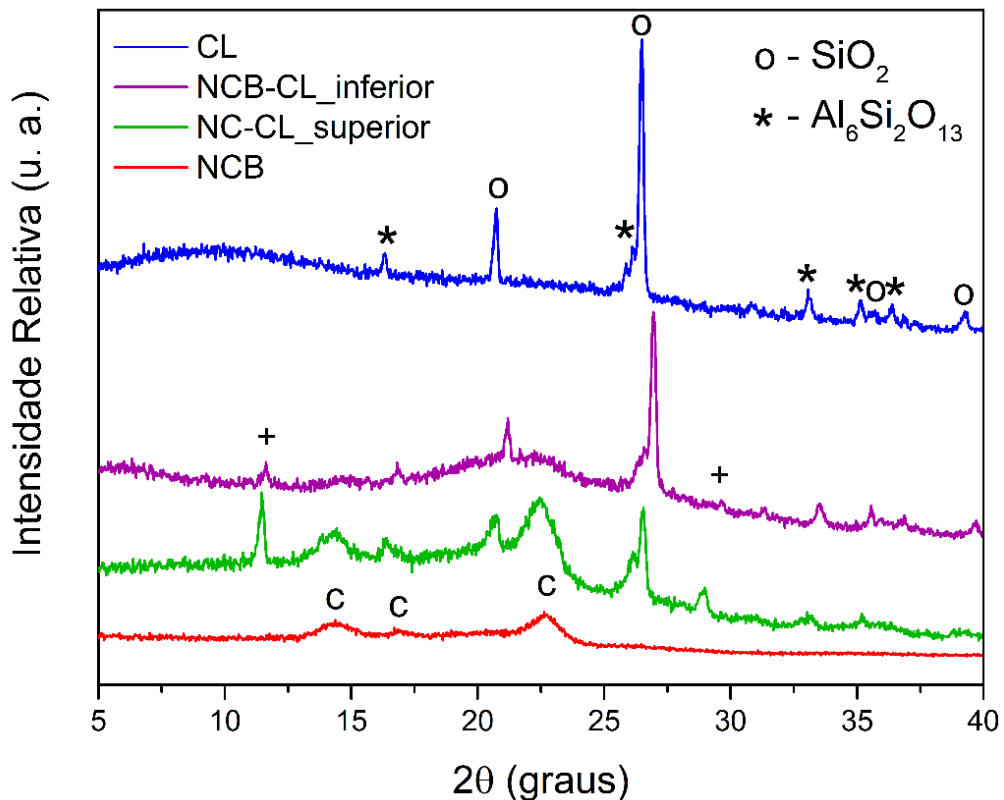
A análise do difratograma da CL (Figura 22) revelou que a cinza possui como fases majoritárias as seguintes estruturas cristalinas: mulita (Al₆Si₂O₁₃, ICSD: n° 23726) e quartzo (SiO₂, ICSD: n° 16331).

Sabedot *et al.* (2011), analisaram a composição de cinzas leves de carvão mineral por DRX, identificando as fases mulita e quartzo em cinzas leves do tipo F. Da mesma forma, Kutchko e Kim (2006) identificaram e quantificaram as porções cristalinas de diferentes amostras de cinza leve, obtendo majoritariamente quartzo, mulita, hematita (Fe₂O₃), magnetita (Fe₃O₄) e silimanita (Al₂SiO₅). Benezet *et al.* (2008) identificaram as fases mulita, quartzo e magnetita em CL. Além disso, segundo Ahmaruzzaman (2010), as fases minerais predominantes de CL com baixo teor de cálcio são quartzo e mulita. Portanto, o resultado do DRX está de acordo com os trabalhos reportados na literatura para CL do tipo F.

Em relação a NCB, há a presença de três picos principais centralizados em 14,4°, 16,9° e 22,7°, que são o perfil típico da celulose I, que possui

duas fases distintas de organização, conhecidas como I_α (triclínica) e I_β (monoclínica) (Iris *et al.*, 2013; Sarubbo, 2017; Souza, 2017).

Figura 22 – Difratoograma de raio X da NCB, CL e das superfícies inferior (mais porosa) e superior (menos porosa) da NCB-CL, com identificação para os picos de quartzo (°), mulita (*), celulose (°) e não identificado (+).



Fonte: Da autora, 2019.

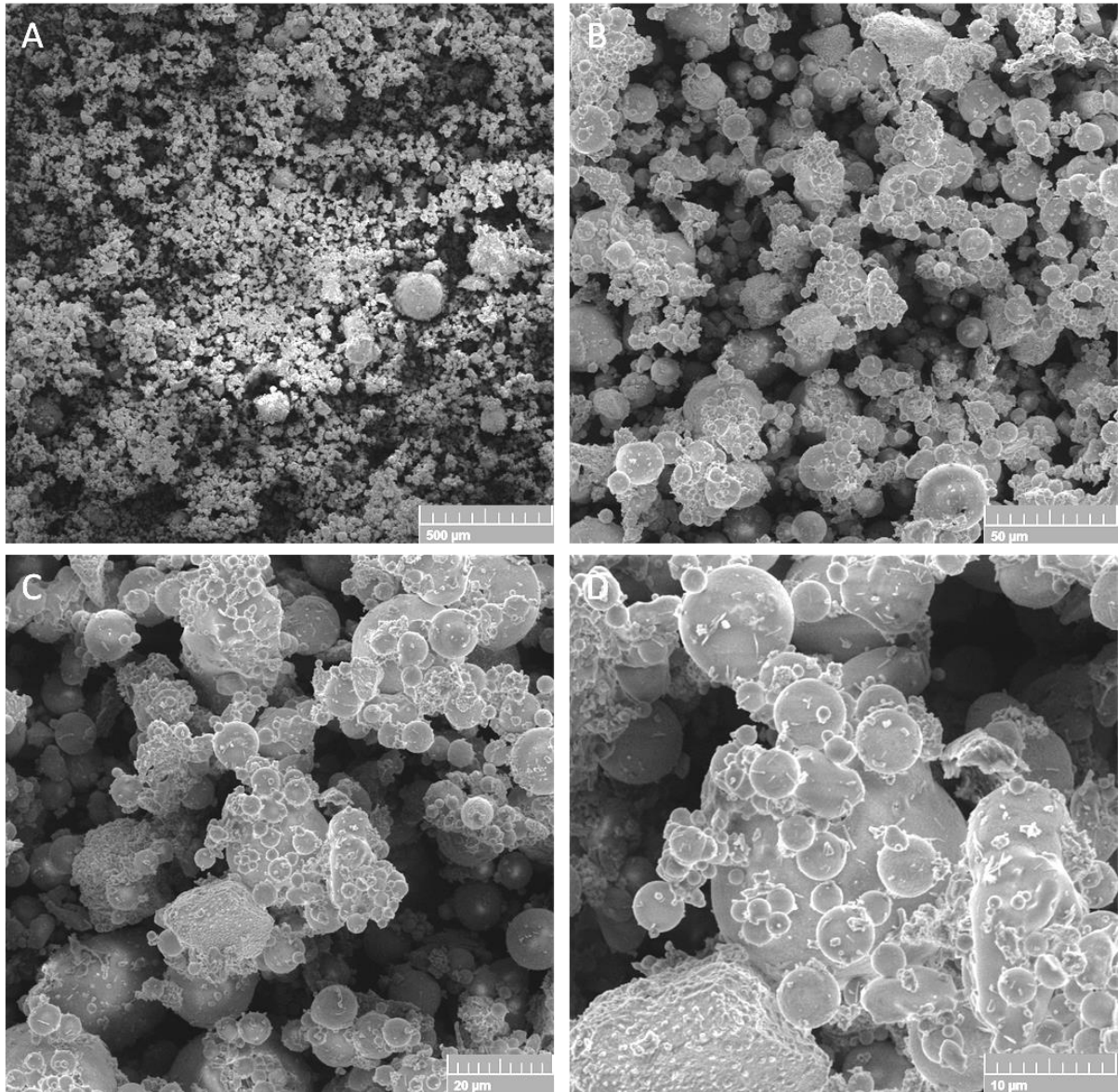
Além disso, ao comparar o difratograma dos lados superior e inferior do biofilme NCB-CL, observa-se que o lado inferior (mais poroso) possui características mais semelhantes ao difratograma da CL, enquanto que o lado superior (menos poroso) já apresenta mais picos referentes a NCB. Isso indica que houve maior incorporação de CL na superfície inferior do biofilme do que na superfície superior, evidenciando que o processo de incorporação possui margem para otimização.

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As partículas de CL são predominantemente esféricas e apresentam diversos tamanhos (Figuras 23A e 23B), cujos valores corroboram os resultados da

granulometria a laser. A amostra também contém partículas aglomeradas e agulhas nanométricas (Figuras 23C e 23D).

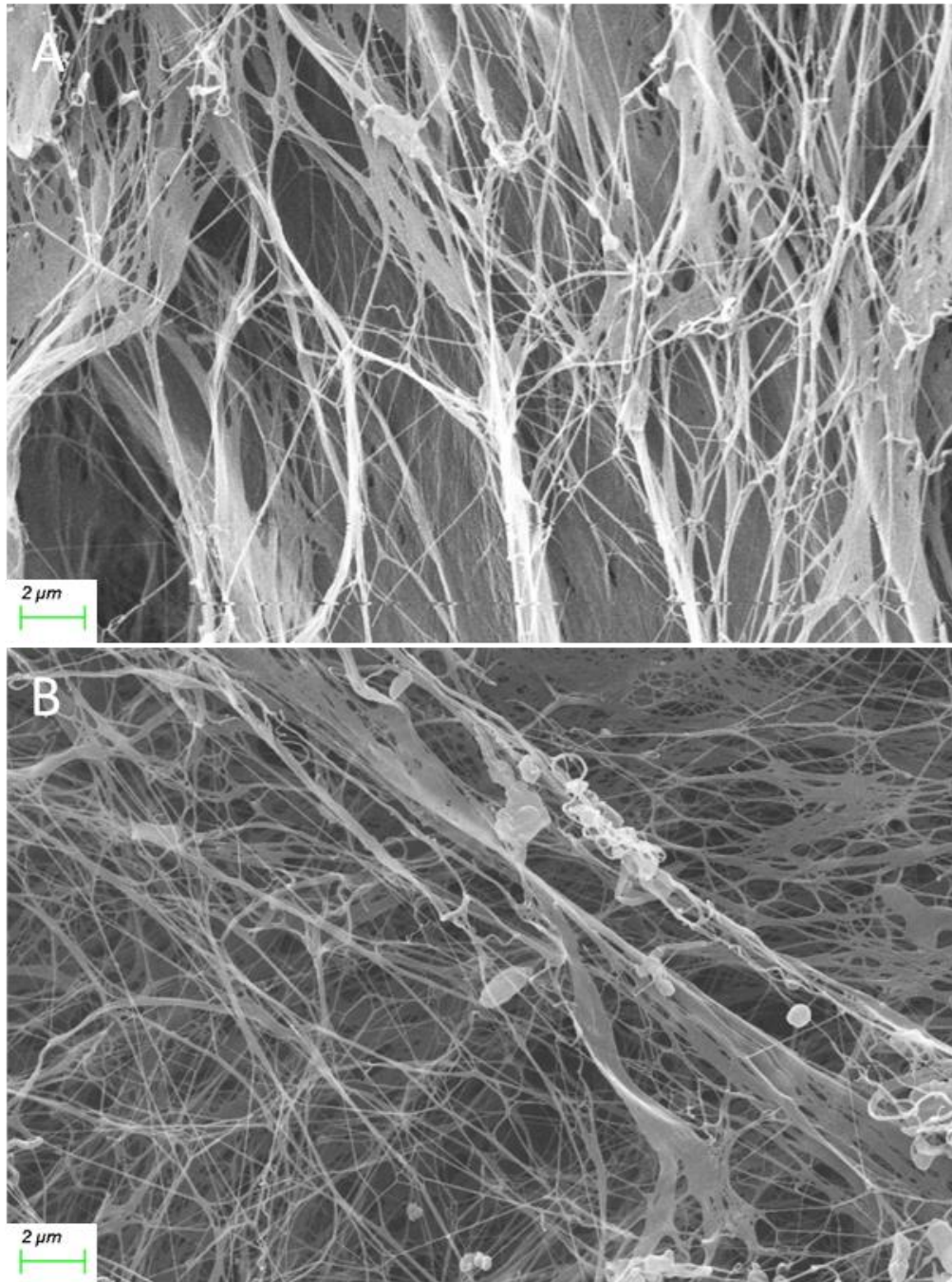
Figura 23 – Micrografias da CL com ampliação de 100 (A), 1.000 (B), 2.000 (C) e 5.000x (D).



Fonte: Da autora, 2019.

Em relação ao biofilme de NCB, a superfície inferior (Figura 24A) apresentou uma maior porosidade e uma densidade menor de fibras, enquanto que a superfície superior – produzida na interface entre o ar e o meio de cultura – exibiu uma superfície rugosa e pouco porosa, ambas caracterizadas por um arranjo entrelaçado de nanofibras (Figura 24B), o que está de acordo com resultados reportados na literatura (Berti *et al.*, 2013; Souza, 2017).

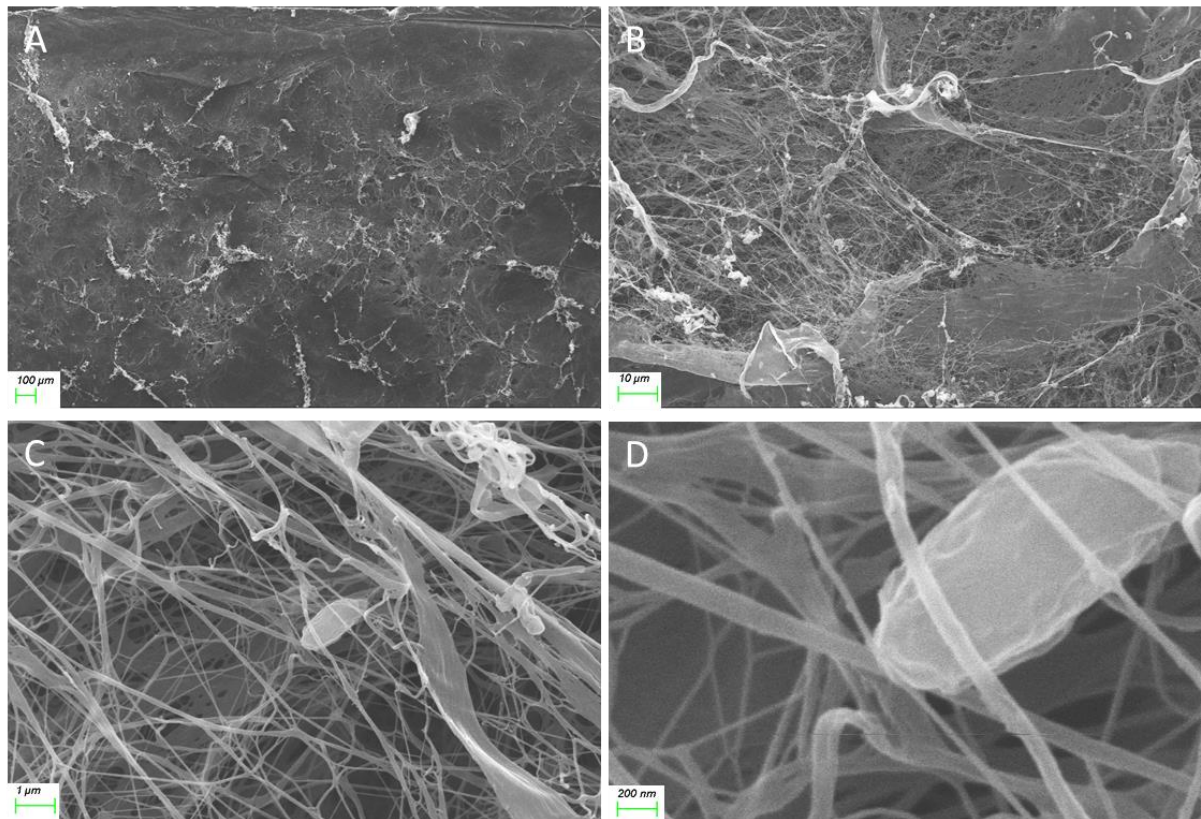
Figura 24 – Micrografias dos biofilmes de NCB. (A) Lado inferior (superfície porosa) e (B) lado superior (menos poroso) com ampliação de 10.000 \times .



Fonte: Da autora, 2019.

A superfície mais densa da NCB pode ser observada em detalhes na Figura 25. A Figura 25D mostra que as fibras possuem dimensões nanométricas. Verificou-se ainda nas Figuras 25C e D a presença da bactéria *K. xylinus* inativa, provavelmente devido a uma falha no processo de lavagem do biofilme.

Figura 25 – Micrografias da superfície superior de NCB, com ampliação de 100 (A), 2.000 (B), 20.000 (C) e 100.000 vezes (D).

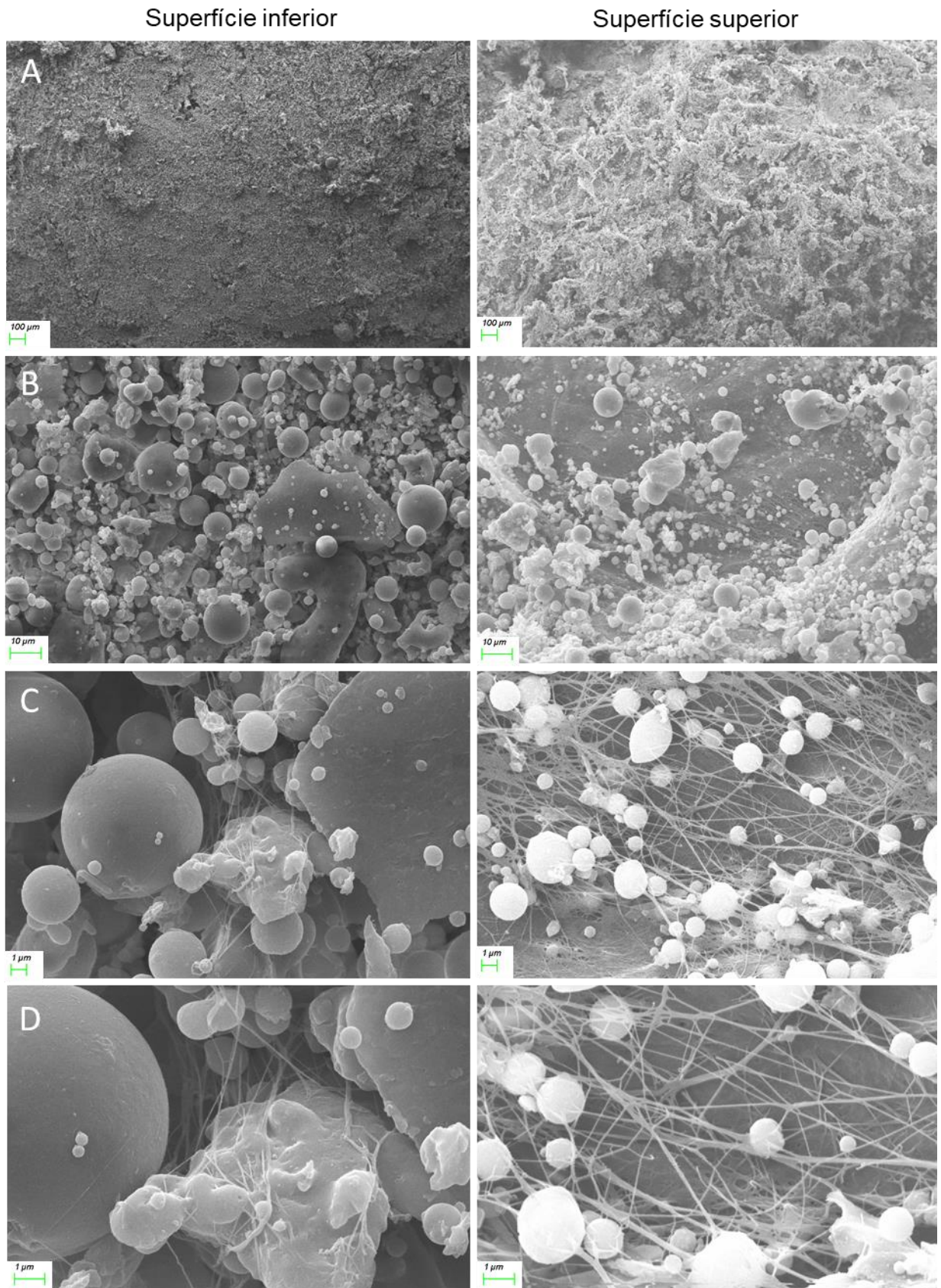


Fonte: Da autora, 2019.

A Figura 26 apresenta as imagens de micrografia referentes a incorporação de CL em NCB nas superfícies inferior (mais porosa) e superior. Comparando os dois lados nota-se que a porosidade é sempre maior no lado inferior do que no lado superior tanto para a NCB controle como para as membranas modificadas. Como esperado, a superfície porosa apresentou densidade maior de partículas de CL incorporadas (Figura 26A).

Partículas maiores de CL foram incorporadas na superfície inferior devido à sua maior porosidade (Figura 26B), porém nem todas aparentam estar entrelaçadas na rede de fibras da NCB, indicando uma interação física mais fraca com o biofilme (Figura 26C). Por outro lado, as partículas de CL incorporadas no lado superior são de menor granulometria, estando inseridas dentro da matriz de NCB (Figura 26D). Além disso, não foi observada incorporação das partículas em formato de agulhas, apenas de partículas esféricas e aglomeradas.

Figura 26 – Micrografia da NCB-CL com ampliação de 100 (A), 2.000 (B), 10.000 (C) e 20.000 (D) vezes.



Fonte: Da autora, 2019.

4.4 APLICAÇÕES E TRABALHOS FUTUROS

A pesquisa para o desenvolvimento do material compósito e sua caracterização prévia são essenciais para investigar sua aplicação e prosseguir com melhoramentos no processo de síntese do compósito e variantes. Foresti et al. (2016) concluíram que o modo mais simples de integrar óxidos metálicos na NCB é a mistura sob vigorosa agitação, que foi o método mais eficaz dentre os estudados para incorporação de CL na matriz de NCB. Isso foi comprovado pelas imagens de micrografia do compósito nas quais observou-se a incorporação da CL entre as fibras de NCB.

Cabe ressaltar que a pesquisa de incorporação de CL em matrizes de nanocelulose bacteriana é inédita e não foram encontrados métodos específicos que auxiliassem na obtenção do compósito. Alguns dos maiores obstáculos na produção da NCB-CL são o tamanho e a natureza da CL, pois as partículas grandes não penetram nos poros e, além disso, a NCB já possui um arranjo estrutural não uniforme, o que acaba por não permitir uma distribuição homogênea da CL da matriz.

Tem-se como hipótese que o compósito NCB-CL pode apresentar alta resistência à degradação microbiana e estabilidade térmica, principalmente devido às propriedades individuais dos materiais utilizados (Gama, Dourado e Bielecki, 2016). Contudo, para trabalhos futuros, as análises de área superficial, volume dos poros e termogravimetria são indicadas para confirmar as hipóteses. A área superficial e volume dos poros é muito relevante, pois apesar da incorporação de partículas reduzir o volume total dos poros, aumenta a área superficial da NCB (Sai *et al.*, 2014). Dessa forma, o compósito produzido deve ser estudado a fim de confirmar sua aplicação em processos de separação, como adsorção e filtração. Tanto a CL quanto a NCB têm sido exaustivamente estudadas para uso direto como adsorvente (Ahmaruzzaman, 2010; Svorcik *et al.*, 2019), sendo portanto uma das principais hipóteses de aplicação do material, tanto é que Blissett e Rowson (2012) destacaram que o uso direto da CL normalmente ocorre apenas na agricultura, como adsorvente e, em alguns casos, como catalisador. Portanto, além de realizar a análise de área superficial e volume dos poros, sugere-se o teste de adsorção de azul de metileno – extensivamente revisado na literatura (Ahmaruzzaman, 2010; Batmaz *et al.*, 2014; Mahfoudhi e Boufi, 2017) – e teste de filtração de ar e líquidos. Além disso, é crescente o estudo da CL como suporte em catálise, a fim de reduzir o consumo de materiais que possuem

reservas limitadas e alto custo de produção. Como o compósito produzido possui os mesmos componentes da CL e propriedades desejáveis para um suporte, como ser inerte e possuir estabilidade térmica (Blissett e Rowson, 2012), seria de interesse o seu estudo como suporte para reações heterogêneas.

É importante destacar, que como a CL é um resíduo produzido em grandes volumes, buscou-se utilizar o material em sua totalidade sem a necessidade de pré-tratamentos. Contudo, após o estudo de utilização da CL e NCB e os resultados obtidos neste trabalho, constata-se que a complexidade da CL é fator limitante para as possibilidades de aplicação na forma como o compósito foi concebido. Sua variabilidade em composição e morfologia dificultam o uso direto do material. Portanto, fica clara a relevância de padronizar as partículas inseridas na matriz de NCB, o que possibilitaria a obtenção de resultados mais relevantes e objetivos para a aplicação do compósito produzido. Por essa razão, para trabalhos futuros indica-se replicar as metodologias assertivas deste trabalho com as frações separadas da CL, buscando da mesma maneira ser capaz de encontrar novas utilidades e reaproveitar o material em sua totalidade, de preferência sem pré-tratamentos.

Além disso, de acordo com Blissett e Rowson (2012), as aplicações indiretas da CL geralmente combinam uma série de métodos químicos, térmicos ou mecânicos. Portanto, é importante saber identificar quais processos podem resultar em múltiplos produtos, maximizar o uso da CL e minimizar impactos. Por exemplo, a CL pode ser separada por processos mecânicos (que envolvem menos gasto de energia e impactos) em cenosferas (*sink-float*), carbono enriquecido (*froth flotation*, separação eletrostática), esferas magnéticas (separador magnético), resíduos finos e resíduos grosseiros melhorados (classificador de tamanhos), sendo as cenosferas e esferas magnéticas as frações de maior valor agregado, possuindo maior espaço no mercado (Blissett e Rowson, 2012). Das frações restantes, a incorporação de carbono enriquecido na NCB seria a melhor opção como estudo de um novo material compósito para uso em processos de adsorção (Ahmaruzzaman, 2010; Wang *et al.*, 2005). Os resíduos finos, poderiam ser utilizados para uniformizar e aumentar a incorporação de CL desse trabalho. Nesse sentido, poderia ser utilizado um biofilme de menor espessura, assim como sua produção em meio de cultura otimizado – como o desenvolvido por Souza (2017), que resultou em superfície porosa em ambos os lados, o que tornaria a incorporação mais homogênea no material – obtendo um compósito com hipótese de aplicação em processos de separação como filtração e

adsorção em meios gasosos e aquosos. Além disso, em caso de otimização da metodologia de incorporação, este trabalho pode atuar como fator de escolha dos intervalos de tempo, temperatura e concentração, analisando como respostas a quantidade de CL incorporada e os resultados de área superficial e volume dos poros.

As esferas magnéticas, por outro lado, possuem utilização como material de preenchimento de polímeros utilizados em aplicações médicas (Blissett e Rowson, 2012), sendo possível incorporar esse material na NCB, com foco neste tipo de aplicação. Outras aplicações seriam processos de adsorção, separações magnéticas e em membranas magneticamente ativas de biorreatores (Blaney, 2007; Jodeh *et al.*, 2018).

Além disso, como a CL analisada é de Classe F, tem-se a possibilidade de realizar a recuperação da sílica e da alumina (Bai *et al.*, 2011), e aplicar a sílica na produção de compósito com NCB visando a aplicação em dispositivos ópticos (Barud *et al.*, 2008), em separadores nanofibrosos para baterias íon-lítio (Jiang *et al.*, 2016), em absorção de óleos (Sai *et al.*, 2014), superfícies hidrofóbicas (Yu *et al.*, 2017), entre outros.

De forma geral, a partir da incorporação de partículas do tipo esferas, cenosferas e carbono não queimado da CL, tem-se como principal hipótese a aplicação do compósito em processos de adsorção, a exemplo de: purificação de gases de combustão, remoção de metais tóxicos e corantes em efluentes, remoção de compostos fenólicos e pesticidas (Ahmaruzzaman, 2010).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram avaliados diferentes métodos para permitir a incorporação de cinza leve de carvão mineral (CL) em nanocelulose bacteriana (NCB), em termos do meio de incorporação, temperatura, tempo e concentração de CL. A funcionalização apresentou melhores resultados sob temperaturas mais elevadas, utilizando maiores concentrações de CL, com espessura de biofilme menores que o maior valor testado ($2,605 \pm 0,031$ mm).

A CL utilizada no processo é de classe F, possuindo composição majoritária de SiO_2 e Al_2O_3 (EDS) e fases majoritárias de mulita e quartzo (DRX). A maioria das partículas da CL apresentaram diâmetro inferior a $120,059 \pm 3,166$ μm , sendo que 50% delas possuem diâmetro menor que $41,564 \pm 0,804$ μm .

Por meio da funcionalização *in situ* ou *ex situ* foram avaliadas as possibilidades de obtenção do compósito. Concluiu-se que a incorporação *in situ* da CL não era provável, devido a observação da “rejeição” da CL pelas bactérias. Além disso, como resultado dos testes *in situ*, produziu-se NCB em formato de pacotes (invólucro), utilizando-se placas de silicone. No caso da incorporação *ex situ* produziu-se um novo material compósito a partir da funcionalização de NCB com CL, pela imersão de biofilmes em solução aquosa de CL (500 g/L) sob agitação em ultrassom à 60°C, durante 1 hora. O método desenvolvido resultou na incorporação de 6,0 g CL/g NCB_{seca} no caso dos biofilmes de 24 poços e 6,9 g CL/g NCB_{seca} para os de 96 poços. As micrografias e difratograma de raio X confirmaram a incorporação da CL em NCB, assim como a diferença de incorporação entre as superfícies superior e inferior dos biofilmes de nanocelulose.

O comportamento observado através das técnicas e parâmetros avaliados na incorporação de cinza leve em biofilmes de nanocelulose bacteriana foi o primeiro passo no estudo de obtenção de compósitos a partir desses dois materiais. Ficou evidente o potencial do compósito NCB-CL, devido as propriedades intrínsecas de cada um, e a importância de futuros estudos para otimizar o método de preparação do compósito objeto de estudo nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABNT. NBR-5736 - Cimento Portland Pozolânico. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 6, 1991.
- ABOOD, M. K.; SALIM, E. T.; SAIMON, J. A. Niobium Pentoxide Thin Film Prepared using Simple Colloidal Suspension for Optoelectronic Application. **International Journal of Nanoelectronics and Materials**, v. 11, n. 2, p. 127–134, 2018.
- AHMARUZZAMAN, M. A review on the utilization of fly ash. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 36, n. 3, p. 327–363, 2010.
- ASTM. **Standard Specification for Coal Fly Ash and Raw or Calcined Natural Pozzolan for Use in Concrete** Annual book of ASTM standards concrete and aggregates American Society for Testing Materials, , 2005.
- BAI, G.; QIAO, Y.; SHEN, B.; CHEN, S. Thermal decomposition of coal fly ash by concentrated sulfuric acid and alumina extraction process based on it. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n. 6, p. 1213–1219, 2011.
- BAPTISTA, A.; FERREIRA, I.; BORGES, J. Cellulose-Based Bioelectronic Devices. *In*: FERREIRA, I. (Ed.). **Cellulose – Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications structures**. Rijeka: IntechOpen, 2013. p. 67–82.
- BARUD, H. S.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MARTINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose – silica organic – inorganic hybrids. **Sol-Gel Sci Technol**, v. 46, p. 363–367, 2008.
- BASHARI, A.; SHIRVAN, A. R.; SHAKERI, M. Cellulose - based hydrogels for personal care products. **Polymers Advanced Technologies**, p. 1–15, 2018.
- BATMAZ, R.; MOHAMMED, N.; ZAMAN, M.; MINHAS, G.; BERRY, R. M.; TAM, K. C. Cellulose nanocrystals as promising adsorbents for the removal of cationic dyes. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 1655–1665, 2014.
- BENEZET, J.-C.; ADAMIEC, P.; BENHASSAINE, A. Relation between silico-aluminous fly ash and its coal of origin. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 85–92, 2008.
- BERTI, F. V.; RAMBO, C. R.; DIAS, P. F.; PORTO, L. M. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4684–4691, 2013.
- BETHKE, K.; PALANTÖKEN, S.; ANDREI, V.; ROSS, M.; RAGHUWANSHI, V. S.; KETTEMANN, F.; GREIS, K.; INGBER, T. T. K.; STÜCKRATH, J. B.; VALIYAVEETIL, S.; RADEMANN, K. Functionalized Cellulose for Water Purification, Antimicrobial Applications, and Sensors. **Advanced Functional Materials**, v. 28, p. 1–14, 2018.
- BLANEY, L. Magnetite (Fe₃O₄): Properties, Synthesis, and Applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 15, n. 5, p. 2316–2319, 2007.

BLISSETT, R. S.; ROWSON, N. A. A review of the multi-component utilisation of coal fly ash. **Fuel**, v. 97, p. 1–23, 2012.

BORA, P. J.; MALLIK, N.; RAMAMURTHY, P. C.; KISHORE; MADRAS, G. Poly(vinyl butyral) -polyaniline-magnetically functionalized fly ash cenosphere composite film for electromagnetic interference shielding. **Composites Part B: Engineering**, v. 106, p. 224–233, 2016.

BROWN, A. J. XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 49, n. 0, p. 432–439, 1886.

BROWNE, C. A. THE FERMENTATION OF SUGAR-CANE PRODUCTS.1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 28, n. 4, p. 453–469, 1 abr. 1906.

CACICEDO, M. L.; CASTRO, M. C.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.; TSAFRAKIDOU, P.; DIMA, A.; TERPOU, A.; KOUTINAS, A.; CASTRO, G. R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, 2016.

CARVALHO, T. E. M. DE. **Adsorção de corantes aniônicos de solução aquosa em cinza leve de carvão e zeólita de cinza leve de carvão**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

CASTRO, C.; VESTERINEN, A.; ZULUAGA, R.; CARO, G.; FILPPONEN, I.; ROJAS, O. J.; KORTABERRIA, G.; GAÑÁN, P. In situ production of nanocomposites of poly(vinyl alcohol) and cellulose nanofibrils from *Gluconacetobacter* bacteria: Effect of chemical crosslinking. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 1745–1756, 2014.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; ROJAS, O. J.; FILPPONEN, I.; ORELMA, H.; BETANCOURT, S.; GAÑÁN, P. Highly percolated poly(vinyl alcohol) and bacterial nanocellulose synthesized in-situ by physical-crosslinking: Exploiting polymer synergies for biomedical nanocomposites C. **RSC Advances**, 2015.

CHERIAN, B. M.; LEO, A.; SOUZA, S. F. DE; MARIA, L.; COSTA, M. Bacterial Nanocellulose for Medical Implants. *In: Advances in Natural Polymers*. [s.l.: s.n.]. p. 337–359.

COLVIN, J. R.; LEPPARD, G. G. The biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* and *Acetobacter acetigenus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 701–709, 1 jun. 1977.

DIANA, M.; ZANOTI, U. **Membranas de Celulose Bacteriana com anti-inflamatório Ibuprofeno para o tratamento de feridas crônicas**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2017.

DONINI, Í. A. N.; SALVI, D. T. B. DE; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, p. 165–178, 2010.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 2014.

FISHER, G. L.; PRENTICE, B. A.; SILBERMAN, D.; ONDOV, J. M.; BIERMANN, A. H.; RAGAINI, R. C.; MCFARLAND, A. R. Physical and morphological studies of size-classified coal fly ash. **Environmental Science & Technology**, v. 12, n. 4, p. 447–451, 1 abr. 1978.

FORESTI, M. L.; VAZQUEZ, A.; BOURY, B. Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide , metal sulfide and metal nanoparticles : A review of recent advances . **Carbohydrate Polymers**, 2016.

GAMA, M.; DOURADO, F.; BIELECKI, S. **Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-Economy**. [s.l.] Elsevier B.V., 2016.

GAMA, M.; GATENHOLM, P.; KLEMM, D. **Bacterial NanoCellulose: A Sophisticated Multifunctional Material**. [s.l.] CRC Press, 2013.

GELIN, K.; BODIN, A.; GATENHOLM, P.; MIHRANYAN, A.; EDWARDS, K.; STRØMME, M. Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy. **Polymer**, v. 48, n. 26, p. 7623–7631, 2007.

GOLEWSKI, G. L. Improvement of fracture toughness of green concrete as a result of addition of coal fly ash. Characterization of fly ash microstructure. **Materials Characterization**, v. 134, p. 335–346, 2017.

GULLO, M.; CHINA, S. LA; FALCONE, P. M.; GIUDICI, P. Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria : current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018.

GULLO, M.; SOLA, A.; ZANICHELLI, G.; MONTORSI, M.; MESSORI, M.; GIUDICI, P. Increased production of bacterial cellulose as starting point for scaled-up applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 22, p. 8115–8127, 2017.

HEMALATHA, T.; RAMASWAMY, A. A review on fly ash characteristics – Towards promoting high volume utilization in developing sustainable concrete. **Journal of Cleaner Production**, v. 147, p. 546–559, 2017.

HERMOSILLA, D.; MERAYO, N.; GASCÓ, A.; BLANCO, Á. The application of advanced oxidation technologies to the treatment of effluents from the pulp and paper industry: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 168–191, 2014.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, out. 1954.

HOKKANEN, S.; BHATNAGAR, A.; SILLANPÄÄ, M. A review on modification methods to cellulose-based adsorbents to improve adsorption capacity. **Water Research**, v. 91, p. 156–173, 2016.

IRIS, S. L.; CALVAR, L.; LIU, J. M. C. J.; CHENG, A. D. K. Biosynthesis , production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, 2013.

IZQUIERDO, M.; QUEROL, X. Leaching behaviour of elements from coal combustion fly ash: An overview. **International Journal of Coal Geology**, v. 94, p. 54–66, 2012.

JIANG, F.; NIE, Y.; YIN, L.; FENG, Y.; YU, Q.; ZHONG, C. Core–shell-structured nanofibrous membrane as advanced separator for lithium-ion batteries. **Journal of Membrane Science**, v. 510, p. 1–9, 2016.

JODEH, S.; HAMED, O.; MELHEM, A.; SALGHI, R.; JODEH, D.; AZZAOU, K.; BENMASSAOUD, Y.; MURTADA, K. Magnetic nanocellulose from olive industry solid waste for the effective removal of methylene blue from wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 22, p. 22060–22074, 2018.

KHALID, A.; KHAN, R.; UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; WAHID, F. Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 214–221, 2017.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561–1603, 2001.

KUTCHKO, B. G.; KIM, A. G. Fly ash characterization by SEM–EDS. **Fuel**, v. 85, n. 17, p. 2537–2544, 2006.

LEE, K.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose : Biosynthesis , Bioprocessing , and Applications in Advanced Fiber Composites a. **Macromolecular Bioscience**, p. 1–23, 2013.

LI, J.; CHA, R.; MOU, K.; ZHAO, X.; LONG, K.; LUO, H. Nanocellulose-Based Antibacterial Materials. **Advanced Healthcare Materials**, p. 1–16, 2018.

MAEDA, H.; NAKAJIMA, M.; HAGIWARA, T.; SAWAGUCHI, T.; YANO, S. Bacterial cellulose / silica hybrid fabricated by mimicking biocomposites. **Materials Science**, p. 5646–5656, 2006.

MAHFOUDHI, N.; BOUFI, S. Nanocellulose as a novel nanostructured adsorbent for environmental remediation : a review. **Cellulose**, 2017.

MARTIN, A.; GAONA, R.; HUBBE, M. A.; FERRER, A.; TYAGI, P.; YIN, Y.; SALAS, C. Nanocellulose in Thin Films , Coatings , and Plies for Packaging Applications : A Review. **BioResources**, v. 12, n. 1, p. 2143–2233, 2017.

MATIAS, H. T. **Estudo da sustentabilidade na geração de energia elétrica por usina termelétrica a carvão mineral**. [s.l.] Universidade Nove de Julho - UNINOVE, 2017.

MME. **Resenha Energética Brasileira**. Ministério de Minas e Energia, Brasília, 2018.

MOHAMMADKAZEMI, F.; DOOSTHOSEINI, K.; GANJIAN, E.; AZIN, M. Manufacturing of bacterial nano-cellulose reinforced fiber–cement composites. **Construction and Building Materials**, v. 101, p. 958–964, 2015.

MOHAMMEDI, Z. Structure, Properties and Medical Advances for Biocellulose Applications : A Review. **American Journal of Polymer Science and Technology**, v. 3, n. 5, p. 89–96, 2017.

MOHITE, B. V; PATIL, S. V. A novel Biomaterial: Bacterial Cellulose & Its New Era Applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014.

NANDI, S.; GUHA, P. A Review on Preparation and Properties of Cellulose Nanocrystal - Incorporated Natural Biopolymer. **Journal of Packaging Technology and Research**, 2018.

OLIVEIRA, C. R. DE; CARVALHO, J. L.; NOVIKOFF, S.; BERTI, F. V; PORTO, L. M.; GOMES, D. A.; MIRANDE DE GOES, A. Bacterial Cellulose Membranes Constitute Biocompatible Biomaterials for Mesenchymal and Induced Pluripotent Stem Cell Culture and Tissue Engineering. **Journal of Tissue Science & Engineering**, 2012.

ONODERA, M.; HARASHIMA, I.; TODA, K.; ASAKURA, T. Silicone rubber membrane bioreactors for bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 5, p. 289–294, 2002.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos & Aplicações**. 1. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2012.

PEDERSEN, K. H.; JENSEN, A. D.; SKJØTH-RASMUSSEN, M. S.; DAM-JOHANSEN, K. A review of the interference of carbon containing fly ash with air entrainment in concrete. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 2, p. 135–154, 2008.

PEDROLO, D. R. S. **Obtenção de zeólitas a partir de cinzas de carvão mineral visando a aplicação em adsorção de SO₂**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

PINTO, A. M. C. **Modificação in situ e ex situ da celulose bacteriana: efeito da composição do meio de cultura no seu rendimento e propriedade**. [s.l.] Universidade do Minho, Escola de Engenharia, 2013.

PIRICH, C. L.; ALVES DE FREITAS, R.; TORRESI, R. M.; PICHETH, F.; RITA, M. Biosensors and Bioelectronics Piezoelectric immunochip coated with thin films of bacterial cellulose nanocrystals for dengue detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 47–53, 2017.

POZZOBON, C. E. **Aplicações Tecnológicas para a Cinza do Carvão Mineral Produzida no Complexo Termelétrico Jorge Lacerda**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 1999.

POZZOBON, C. E.; ROCHA, J. C.; CHERIAF, M. **Cinza do carvão mineral produzida no complexo termelétrico Jorge Lacerda: Contexto Comercial**8 ENTAC. **Anais...**Salvador, Bahia: 2000

- REVANASIDDAPPA, M.; SWAMY, D. S.; VINAY, K.; RAVIKIRAN, Y. T.; RAGHAVENDRA, S. C. **Synthesis, characterization and DC conductivity studies of conducting polyaniline/PVA/Fly ash polymer composites** AIP Conference Proceedings. **Anais...**2018
- SABEDOT, S.; SUNDSTRON, M. G.; SAMPAIO, C. H.; GRINGS, R.; DIAS, D. O.; RAMOS, C. G. **Caracterização e aproveitamento de cinzas da combustão de carvão mineral geradas em usinas termelétricas** III Congresso de Carvão Mineral. **Anais...**2011
- SAI, H.; XING, L.; XIANG, J.; CUI, L.; JIAO, J.; ZHAO, C.; LI, Z.; LI, F.; ZHANG, T. Flexible aerogels with interpenetrating network structure of bacterial cellulose-silica composite from sodium silicate precursor via freeze drying process. **RSC Advances**, v. 4, p. 30453–30461, 2014.
- SARKAR, A.; RANO, R.; MISHRA, K. K.; SINHA, I. N. Particle size distribution profile of some Indian fly ash—a comparative study to assess their possible uses. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 11, p. 1221–1238, 2005.
- SARUBBO, L. Bacterial Cellulose: an ecofriendly biotextile. **International Journal of Textile and Fashion Technology**, v. 7, n. 1, p. 11–26, 2017.
- SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; PARK, J. K. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 2013.
- SHEZAD, O.; KHAN, S.; KHAN, T.; PARK, J. K. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, n. August, 2010.
- SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, 2014.
- SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1, 2005.
- SOUZA, S. S.; BERTI, F. V.; OLIVEIRA, K. P. V. DE; PITTELLA, C. Q. P.; CASTRO, J. V. DE; PELISSARI, C.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. **Cellulose**, v. 26, n. 3, p. 1641–1655, 2019.
- SOUZA, S. S. DE. **Biologia sistêmica da produção de celulose bacteriana através da reconstrução metabólica da *Gluconacetobacter hansenii***. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- _____. **Bionanocellulose: new methods for biofilm production and high-quality bacterial RNA extraction**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
- STUMPF, T. R.; YANG, X.; ZHANG, J.; CAO, X. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. **Materials Science & Engineering**, 2016.

- SVORCIK, V.; KOLAROVA, K.; SKOGBERG, A.; KALLIO, P.; BACAKOVA, L.; BACAKOVA, M.; PAJOROVA, J. Versatile Application of Nanocellulose: From Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, p. 164, 2019.
- TARR, H. L. A.; HIBBERT, H. Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. Xxxv. Polysaccharide synthesis by the action of acetobacter xylinus on carbohydrates and related compounds. **Canadian Journal of Research**, v. 4, n. 4, p. 372–388, 1 abr. 1931.
- TOMECEK, J.; PALUGNIOK, H. Kinetics of mineral matter transformation during coal combustion. **Fuel**, v. 81, n. 10, p. 1251–1258, 2002.
- ULLAH, H.; SANTOS, A. H.; KHAN, T. Applications of bacterial cellulose in food , cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, p. 2291–2314, 2016.
- WANG, J.; GAO, C.; ZHANG, Y.; WAN, Y. Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 1, p. 214–218, 2010.
- WANG, S.; BOYJOO, Y.; CHOUAIB, A.; NG, E.; WU, H.; ZHU, Z. Role of unburnt carbon in adsorption of dyes on fly ash. **Journal os Chemical Technology and Biotechnology**, v. 1209, p. 1204–1209, 2005.
- WATANABE, K.; YAMANAKA, S. Effects of Oxygen Tension in the Gaseous Phase on Production and Physical Properties of Bacterial Cellulose Formed under Static Culture Conditions. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 65–68, 1995.
- WEI, C.; CHENG, S.; ZHU, F.; TAN, X.; LI, W.; ZHANG, P. Hydrometallurgy Digesting high-aluminum coal fly ash with concentrated sulfuric acid at high temperatures. **Hydrometallurgy**, v. 180, n. November 2017, p. 41–48, 2018.
- WU, J.; ZHENG, Y.; SONG, W.; LUAN, J.; WEN, X.; WU, Z.; CHEN, X.; WANG, Q.; GUO, S. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, 2013.
- YAMADA, Y.; YUKPHAN, P.; VU, H. T. L.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D.; NAKAGAWA, Y. Subdivision of the genus Gluconacetobacter Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of Komagatabacter gen. nov., for strains accommodated to the Gluconacetobacter xylinus group in the α -Proteobacteria. **Annals of microbiology**, v. v. 62, n. 2, p. 849-859–2012 v.62 n°2, 2012.
- YANG, Z.; REN, L.; JIN, L.; HUANG, L.; HE, Y.; TANG, J. In-situ functionalization of poly (m-phenylenediamine) nanoparticles on bacterial cellulose for chromium removal. **Chemical Engineering Journal**, 2018.
- YAO, Z. T.; JI, X. S.; SARKER, P. K.; TANG, J. H.; GE, L. Q.; XIA, M. S.; XI, Y. Q. A comprehensive review on the applications of coal fly ash. **Earth-Science Reviews**, v. 141, p. 105–121, 2015.

YU-FEN, Y.; GUO-SHENG, G.; ZHEN-FANG, C.; QING-RU, C. Surface modification of purified fly ash and application in polymer. **Journal of Hazardous Materials**, v. 133, p. 276–282, 2006.

YU, C.; WANG, F.; LUCIA, L. A.; FU, S. Induction of Superhydrophobicity in a Cellulose Substrate by LbL Assembly of Covalently Linked Dual-Sized Silica Nanoparticles Layers. **Advances in Materials Physics and Chemistry**, v. 7, p. 395–410, 2017.