



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS BLUMENAU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA, PROCESSOS E
MATERIAIS AVANÇADOS

Beatriz Fernanda da Silva

**BIO-OXIDAÇÃO DE ETILHIDROXIETILCELULOSE (EHEC) E RETICULAÇÃO
ONE POT COM QUITOSANA: UMA ABORDAGEM PROMISSORA PARA A
PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS SEGUROS**

Blumenau

2026

Beatriz Fernanda da Silva

**BIO-OXIDAÇÃO DE ETILHIDROXIETILCELULOSE (EHEC) E RETICULAÇÃO
ONE POT COM QUITOSANA: UMA ABORDAGEM PROMISSORA PARA A
PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS SEGUROS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Patrícia Bulegon Brondani, Dra.
Coorientadora: Prof^a. Lidiane Meier, Dra.

Blumenau

2026

da Silva, Beatriz Fernanda

BIO-OXIDAÇÃO DE ETILHIDROXIETILCELULOSE (EHEC) E
RETICULAÇÃO ONE POT COM QUITOSANA : UMA ABORDAGEM
PROMISSORA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS SEGUROS /
Beatriz Fernanda da Silva ; orientadora, Patrícia Bulegon
Brondani, coorientador, Lidianne Meier, 2026.

107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Campus Blumenau, Programa de Pós-Graduação em
Nanociência, Processos e Materiais Avançados, Blumenau,
2026.

Inclui referências.

1. Nanociência, Processos e Materiais Avançados. 2.
Biomateriais. 3. Oxidação enzimática. 4.
Etilhidroxietilcelulose (EHEC). 5. Quitosana. I. Bulegon
Brondani, Patrícia. II. Meier, Lidianne. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Nanociência, Processos e Materiais Avançados. IV. Título.

Beatriz Fernanda da Silva

**BIO-OXIDAÇÃO DE ETILHIDROXIETILCELULOSE (EHEC) E RETICULAÇÃO *ONE POT*
COM QUITOSANA Título: UMA ABORDAGEM PROMISSORA PARA A PRODUÇÃO DE
BIOMATERIAIS SEGUROS**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 02 de fevereiro de 2026, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Larissa Nardini Carli, Dr.a
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Thalita Fernanda Borges de Aquino, Dr.a
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dionei Neves, Dr.
Instituição: Missner Hospitalar

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.



Documento assinado digitalmente

Daniela Brondani

Data: 09/03/2026 08:31:33-0300

CPF: ***.803.190-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Documento assinado digitalmente

Patrícia Bulegon Brondani

Data: 09/03/2026 08:11:01-0300

CPF: ***.102.500-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof.(a) Patrícia Bulegon Brondani, Dr.a
Orientadora

Blumenau, 2026

RESUMO

A crescente demanda por materiais ambientalmente responsáveis tem impulsionado o desenvolvimento de biomateriais biodegradáveis, seguros e biocompatíveis. Nesse contexto, a etilhidroxietilcelulose (EHEC) surge como uma alternativa promissora, devido às suas propriedades físico-químicas favoráveis e à capacidade de formar filmes. Contudo, sua elevada hidrofiliabilidade limita aplicações que exigem resistência à umidade. Para contornar essa limitação, foi proposta a bio-oxidação enzimática da EHEC utilizando lacase Novoprime Base 286, a temperatura ambiente, com tempos reacionais de 1 a 4 h. Para otimizar essa etapa, foram avaliadas três metodologias de reticulação: (A) aquecimento, (B) emprego de EDC/DMAP e (C) radiação UV. As amostras foram comparadas quanto à solubilidade em água, à estabilidade estrutural e às propriedades térmicas. As análises de FTIR confirmaram a interação entre os grupos -COOH da EHECox e -NH_2 da quitosana. As análises térmicas (TGA/DTGA e DSC) evidenciaram modificações nos perfis de degradação, com a principal etapa ocorrendo entre 250–380 °C, além de variações nas entalpias de fusão ($\Delta H_f \approx 262 \text{ J/g}$ para os filmes irradiados com luz ultravioleta (UV)), indicando maior organização intermolecular após reticulação. A metodologia por radiação UV (24 h) apresentou o melhor desempenho, resultando em filmes insolúveis em água e estruturalmente estáveis por até três meses em meio aquoso. Em pH acima de 10, os filmes permaneceram íntegros por mais de cinco meses, demonstrando elevada resistência à hidrólise. A formulação contendo 50% m/m de quitosana apresentou desempenho mecânico superior, com módulo de elasticidade de $775,6 \pm 272,8 \text{ MPa}$, resistência à tração de $21,6 \pm 4,4 \text{ MPa}$ e alongamento de $7,2 \pm 1,49\%$, o que representa um aumento aproximado de 47% no módulo elástico em relação à EHEC purificada ($537,8 \pm 214,6 \text{ MPa}$). O ângulo de contato de $75,2^\circ$ no filme otimizado confirmou o aumento da hidrofobicidade após a reticulação. Os resultados demonstram que a bio-oxidação por 4 h, seguida de reticulação UV por 24 h, gerou filmes com maior resistência mecânica, estabilidade térmica e resistência à solvatação, confirmando sua adequação para aplicações em meio aquoso.

Palavras-chave: biomateriais; etilhidroxietilcelulose (EHEC); quitosana; reticulação; oxidação enzimática;

ABSTRACT

The growing demand for environmentally responsible materials has driven the development of biodegradable, safe, and biocompatible biomaterials. In this context, ethyl hydroxyethyl cellulose (EHEC) emerges as a promising alternative due to its favorable physicochemical properties and film-forming ability. However, its high hydrophilicity limits its applications in moisture-resistant environments. To overcome this limitation, enzymatic bio-oxidation of EHEC using laccase Novoprime Base 286 was proposed, conducted at room temperature with reaction times ranging from 1 to 4 h. To optimize this stage, three crosslinking methodologies were evaluated: (A) heating, (B) EDC/DMAP coupling, and (C) ultraviolet (UV) radiation. The samples were compared with respect to water solubility, structural stability, and thermal properties. FTIR analyses confirmed the interaction between -COOH groups of oxidized EHEC (EHECox) and -NH_2 groups of chitosan. Thermal analyses (TGA/DTGA and DSC) revealed modifications in degradation profiles, with the main degradation stage occurring between 250–380 °C, as well as variations in melting enthalpy ($\Delta H_f \approx 262$ J/g for UV-irradiated films), indicating increased intermolecular organization after crosslinking. The UV radiation methodology (24 h) showed the best performance, yielding water-insoluble films that remained structurally stable for up to 3 months in aqueous media. At pH values above 10, the films remained intact for more than five months, demonstrating high hydrolytic resistance. The formulation containing 50 wt% chitosan exhibited superior mechanical performance, with an elastic modulus of 775.6 ± 272.8 MPa, tensile strength of 21.6 ± 4.4 MPa, and elongation at break of $7.2 \pm 1.49\%$, representing an approximately 47% increase in elastic modulus compared to purified EHEC (537.8 ± 214.6 MPa). The contact angle of 75.2° for the optimized film confirmed increased hydrophobicity after crosslinking. Overall, bio-oxidation for 4 h, followed by 24 h of UV crosslinking, produced films with enhanced mechanical strength, thermal stability, and resistance to solvation, confirming their suitability for aqueous applications.

Keywords: biomaterials; ethylhydroxyethyl cellulose (EHEC); chitosan; crosslinking; enzymatic oxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da EHEC (A) HEC (B) e celulose (C).....	23
Figura 2 - Estrutura química dos mediadores redox: ABTS (A) e TEMPO (B)	25
Figura 3 - Oxidação da celulose via lacase e TEMPO	27
Figura 4 - Representação da formação da quitosana a partir da desacetilação parcial da quitina	29
Figura 5 - Proposta mecanística para bio-oxidação da EHEC	46
Figura 6 - Possível interação entre o EHEC e a quitosana	47
Figura 7 - Espectros de FTIR dos filmes obtidos por três metodologias de reticulação, após submersão em água por 48 h: (A) Aquecimento, (B) DMAP/EDC, (C) Radiação de luz UV, (D) EHEC purificada e (E) Quitosana em filme	49
Figura 8 - Curvas de análise termogravimétrica (TGA) dos filmes obtidos por diferentes metodologias: (A) aquecimento, (B) DMAP/EDC, (C) irradiação UV, bem como dos polímeros de referência: (D) EHEC purificada e (E) quitosana.	50
Figura 9 - DTGA das 3 metodologias de reticulação e dos polímeros puros: (A) aquecimento, (B) DMAP/EDC, (C) irradiação UV, (D) EHEC purificada e (E) Quitosana	51
Figura 10 - DSC das três metodologias (A) aquecimento, (B) EDC/DMAP e (C) Radiação UV	54
Figura 11 - DSC de (A) quitosana e (B) EHEC	54
Figura 12 – EHEC não oxidada reticulada com quitosana após submersão em água por 15 min	57
Figura 13 - EHEC purificada não reticulada com quitosana exposta a irradiação UV após submersão em água por 15 min	58
Figura 14 - Amostra de EHECox (4 h) reticulada com quitosana, exposta à radiação UV (254 nm) e submersa em água por três meses	59
Figura 15 - EHEC bio-oxidada por (A) 1 h, (B) 2 h, (C) 3 h e (D) 4 h, sem quitosana e sem UV	60
Figura 16 - Análise dos tempos de oxidação de (A) EHEC purificada, (B) 1 h, (C) 2 h, (D) 3 h e (E) 4 h.....	61
Figura 17 - Ângulos de contato dos filmes de EHEC e quitosana: (A) sem oxidação; (B) após 1 h de oxidação; (C) 2 h; (D) 3 h; (E) 4 h.....	62

Figura 18 - Gráficos da titulação condutométrica: (A) EHECox 1 h + quitosana (UV); (B) 2 h; (C) 3 h; (D) 4 h.	62
Figura 19 - EHEC parcialmente oxidada.....	64
Figura 20 - FTIR da amostra (A) EHECox (4h) e (B) EHECox4Q2	65
Figura 21 - FTIR do filme com (A) 15% de quitosana , (B) 25% e (C) 50%. .	67
Figura 22 - Filme de EHECox com 25% de quitosana (A) e (B) filme de EHECox com 50% de quitosana.....	67
Figura 23 - (A) Amostra reticulada por 15 min; (B) 30 min; (C) 60 min; (D) 90 min; (E) 120 min.	68
Figura 24 - FTIR dos filmes à base de EHEC e quitosana: (A) filme EHEC sem oxidação reticulado com quitosana por 24 h, (B) filme EHECox1Q24 e (C) filme EHECox4Q24.....	69
Figura 25 - Intumescimento do filme polímero EHECox1Q2	71
Figura 26 - Intumescimento do filme polímero de EHECox4Q24.....	72
Figura 27 - EHECox4Q24 em solução alcalina submersa por cinco meses.	75
Figura 28 - Avaliação da citotoxicidade por MTS do extrato da membrana em fibroblastos L929 após 24 h de tratamento. O controle negativo (–) representa 100% de viabilidade celular.....	76
Figura 29 - Avaliação da citotoxicidade por ensaio de redução de MTS de fibroblastos L929 cultivados sobre o material por 1 e 3 dias. O controle corresponde à placa de cultura após 24 h de adesão.	77
Figura 30 - Difratoograma da EHEC purificada.	79
Figura 31 - Difratoograma do filme EHECox4Q24.....	80
Figura 32 - FTIR da EHECox (4 h) com lacase reutilizada: (A) 1ª, (B) 4ª utilização.....	81
Figura 33 - FTIR do filme EHECox4Q24 obtido com a mesma lacase reutilizada em três ciclos: (A) 1ª, (B) 4ª utilização.	82
Figura 34 - Filme EHECox4Q24 após 2 h de imersão em água.	83
Figura 35 - Amostra do filme EHECox4Q24 antes (à esquerda) e após dois meses de teste de biodegradabilidade em solo (à direita).	83
Figura 36 - Amostra do filme EHECox4Q24 após quatro meses de teste de biodegradabilidade em solo.	85
Figura 37 - Filme EHECox4Q24 (A) antes da submersão em solo (B) após 2 meses de biodegradação em solo e (C) após 4 meses de biodegradação em solo..	85

Figura 38 - Filmes EHECox4Q24 após ruptura	87
Figura 39 - Filmes EHEC purificada à esquerda e de quitosana pura a direita.	88
Figura 40 - Tensão vs Deformação para (A) Quitosana, (B) EHECox4Q24 e (C) EHEC purificada.....	88
Figura 41 - MEV da superfície do filme EHECox4Q24 (A) aumento de 1000x; (B) aumento de 2500x.....	91
Figura 42 - Perda de massa (%) do filme EHECox4Q24 em função do tempo de submersão em água deionizada.....	92
Figura 43 - Curvas de análise termogravimétrica (TGA) das amostras: (A) EHEC, (B) EHECox4Q2, (C) EHEC4oxQ24 e (D) quitosana.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tipos de reticulação	32
Quadro 2 - Reações entre EHEC e quitosana em diferentes meios reacionais.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Temperaturas de degradação obtidas por TGA e DTGA para os filmes preparados pelos diferentes métodos de reticulação: (A) aquecimento, (B) EDC/DMAP, (C) radiação UV (D) EHEC purificada e (E) Quitosana. 53

Tabela 2 - Temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão experimental (ΔH_f) das amostras obtidas pelos diferentes métodos de reticulação: (A) aquecimento, (B) EDC/DMAP e (C) radiação UV. 56

Tabela 3 - Filmes de EHEC sob diferentes condições de preparo: (A) EHEC purificada; (B) EHEC purificada exposta à radiação UV (254 nm); (C) EHEC bio-oxidada (1 – 4 h); (D) EHEC bio-oxidada (1 – 4 h) exposta à radiação UV e (E) EHEC purificada reticulada com quitosa. 57

Tabela 4 - Propriedades mecânicas extraídas do ensaio de tração. 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus celsius
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AGU	Unidade anidra de glicose (anhydroglucose unit)
ATR	Reflectância Total Atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DO	Grau de oxidação
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
EDC	1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
EHEC	Etilhidroxietilcelulose
EHECox	EHEC bio-oxidada
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HEC	Hidroxietilcelulose
LABQA	Laboratório de Química Analítica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Politereftalato de etileno
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PLA	Ácido Polilático
PP	Polipropileno
PU	Poliuretano
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto

SFD	Soro fetal bovino
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil
TGA	Análise termogravimétrica
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1 POLÍMEROS	19
3.2 POLÍMEROS BIODegradáveis	21
3.3 CELULOSE E SEUS DERIVADOS	22
3.3.1 BIO-OXIDAÇÃO DE CELULOSE E DERIVADOS.....	24
3.4 QUITOSANA.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAIS.....	35
4.2 BIO-OXIDAÇÃO DA EHEC	36
4.3 RETICULAÇÃO <i>ONE-POT</i> EHEC _{ox} COM QUITOSANA.....	36
4.4 AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	38
4.4.1 Análise comparativa das metodologias de reticulação: avaliação visual e de integridade estrutural	38
4.4.2 Análise de estabilidade térmica via análise termogravimétrica (TGA)	38
4.4.3 Análise via calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	39
4.4.4 Teste de solubilidade em água.....	39
4.4.5 Testes em diferentes solventes orgânicos do filme ótimo...39	39
4.4.6 Análise de molhabilidade - ângulo de contato	40
4.4.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)	40
4.4.8 Avaliação do grau de oxidação - titulação condutométrica....	40

4.4.9	Teste de biodegradabilidade do filme EHECox4Q24.....	41
4.4.10	Teste em diferentes pH do filme EHECox4Q24.....	41
4.4.11	Teste de intumescimento dos filmes.....	42
4.4.12	Teste de citotoxicidade do filme.....	42
4.4.13	Análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) e ^{13}C (RMN ^{13}C).....	43
4.4.14	Análise morfológica (MEV) do filme EHECox4Q24	43
4.4.15	Análise de cristalinidade (DRX)	44
4.4.16	Ciclos de reuso da lacase na bio-oxidação da EHEC e avaliação por FTIR/reticulação	44
4.4.17	Gravimetria do filme EHECox4Q24	44
4.4.18	Tração.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	TESTES PRÉVIOS DE BIO-OXIDAÇÃO e RETICULAÇÃO ENTRE EHECox E QUITOSANA	46
5.2	OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE OXIDAÇÃO DA EHEC (EHECox)	59
5.2.1	Análise estrutural da EHEC purificada e EHECox por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C	63
5.3	RETICULAÇÃO DA EHECox COM QUITOSANA	64
5.3.1	Otimização da quantidade de quitosana para reticulação com EHECox	66
5.3.2	Otimização do tempo de reticulação em UV (254 nm) de filmes de EHECox e EHEC não oxidada com quitosana.....	68
5.3.3	Avaliação do intumescimento e da absorção de água	70
5.3.4	Testes do filme EHECox4Q24 em diferentes pH.....	74
5.3.5	Testes em diferentes solventes orgânicos do filme EHECox4Q24	75
5.3.6	Citotoxicidade do filme EHECox4Q24	76
5.3.7	DRX do filme de EHEC purificada e EHECox4Q24.....	79

5.3.8 Ciclos de reuso da lacase na bio-oxidação da EHEC e avaliação por FTIR/reticulação para EHECox4Q24	80
5.3.9 Biodegradabilidade em solo para EHECox4Q24	83
5.3.10 Teste de tração do filme EHECox4Q24.....	86
5.3.11 MEV do filme EHECox4Q24	90
5.3.12 Gravimetria do filme EHECox4Q24	91
5.3.13 TGA do filme EHECox4Q24.....	92
6. CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS.....	96
APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA EHEC PURIFICADA E DA EHEC PARCIALMENTE OXIDADA	105
APÊNDICE B – ESPECTRO FTIR DA QUITOSANA COMERCIAL	107

1. INTRODUÇÃO

A busca por soluções sustentáveis tem impulsionado o desenvolvimento de novos materiais poliméricos que conciliem funcionalidade e biodegradabilidade (Chaichi et al., 2019). O objetivo é atender às exigências de um mercado cada vez mais comprometido com a sustentabilidade e com a redução dos impactos ambientais, sem comprometer o desempenho técnico dos materiais (Mostafavi, *et al.*, 2020). Nesse contexto, a etilhidroxietilcelulose (EHEC) surge como material promissor devido à sua baixa toxicidade, biocompatibilidade e capacidade de formar filmes, o que é particularmente relevante para diversas aplicações industriais e de pesquisa (Karlström *et al.*, 1990; Rinaudo, 2006). Estruturalmente, a EHEC corresponde a uma versão modificada da celulose, cujos grupos hidroxila são substituídos por grupos 2-hidroxietila e etila, conferindo ao material maior hidrofiliabilidade, tornando-o anfifílico e hidrossolúvel, além de apresentar maior viscosidade do que a celulose pura (Wang; Somasundaran, 2006).

Portanto, filmes de EHEC são altamente solúveis em água, o que limita seu uso em aplicações como curativos e embalagens, por exemplo, que exigem resistência à umidade e estabilidade em condições úmidas (Karlström *et al.*, 1990). Para superar essa limitação e ampliar as aplicações da EHEC, estratégias de reticulação química são necessárias. A reticulação permite modificar as propriedades do material, tornando-o menos solúvel em água e, como consequência, mais estável em ambientes úmidos ou aquosos (Welsh; Price, 2003). Entretanto, a reticulação via ligações covalentes, embora mais robusta, geralmente ocorre na presença de agentes reticulantes tóxicos e/ou em processos que envolvem temperaturas elevadas (Azeredo; Waldron, 2016).

Sendo assim, este projeto propõe o desenvolvimento de um processo de reticulação economicamente viável e ambientalmente amigável para a preparação de filmes de EHEC insolúveis em água. A proposta envolveu a bio-oxidação da EHEC, empregando a enzima lacase e o mediador TEMPO, gerando grupos eletrofílicos COOH. Após essa etapa, foi realizada a reticulação covalente com quitosana, que contém grupos nucleofílicos (NH₂). A quitosana é um biopolímero possuidor de propriedades antimicrobianas e capaz de formar redes poliméricas estáveis.

O diferencial deste trabalho está na combinação inédita dessas etapas reacionais, que resulta em um material com características únicas, ainda não descritas

na literatura. Além de agregar valor funcional ao produto final, essa estratégia representa um avanço científico significativo por empregar um método de reticulação ambientalmente seguro, eliminando o uso de agentes químicos tóxicos, como glioxal e glutaraldeído. Essa abordagem não apenas reduz impactos ambientais e riscos à saúde, como também amplia o potencial de aplicação dos filmes em áreas como a biomedicina e as embalagens sustentáveis.

Este estudo abre novas perspectivas para o desenvolvimento de materiais funcionais com amplo potencial de aplicação em diversas áreas, como na criação de *scaffolds* estruturais (Rinaudo, 2006), sistemas de liberação controlada de compostos ativos (Park; Jeon, 2009), embalagens avançadas que oferecem barreiras otimizadas à umidade e a gases (Andrady; Neal, 2009), entre outros dispositivos. Desta forma, este estudo visa não apenas otimizar as propriedades da EHEC, mas também ampliar seu potencial em aplicações industriais que demandam biocompatibilidade, resistência à água e sustentabilidade, contribuindo para alternativas ecologicamente responsáveis aos polímeros convencionais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar, desenvolver e avaliar a bio-oxidação da etilhidroxietilcelulose (EHEC), seguida de sua reticulação covalente com quitosana, visando à obtenção de filmes com maior resistência à água, estabilidade em meio aquoso e propriedades físico-químicas, estruturais, térmicas e mecânicas aprimoradas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar a EHEC por bio-oxidação utilizando a lacase *Novoprime Base 286*, e otimizar o processo para garantir eficiência e reprodutibilidade.
- Promover a reticulação da EHEC previamente bio-oxidada com quitosana para formar uma rede polimérica estável, visando aumentar a hidrofobicidade em meio aquoso, com otimização do processo para assegurar a eficiência e a reprodutibilidade.

- Compreender as interações químicas, estruturais e morfológicas dos filmes formados, bem como suas propriedades térmicas e mecânicas, por meio de análises de FTIR, MEV, ^1H -RMN, TGA, DSC, ensaio de tração e DRX.
- Avaliar as propriedades físico-químicas e funcionais dos filmes obtidos, considerando parâmetros como molhabilidade, solubilidade, intumescimento, estabilidade em pH variado, biodegradabilidade e citotoxicidade, visando identificar seu potencial de aplicação como biomaterial funcional.
- Analisar a influência das condições reacionais, tais como tempo de reação, pH, temperatura e concentração enzimática, no processo de bio-oxidação da EHEC, visando compreender seu impacto no grau de oxidação e na formação de grupos funcionais reativos.
- Correlacionar as modificações químicas e estruturais promovidas pelos processos de bio-oxidação e reticulação com as propriedades térmicas e mecânicas dos filmes obtidos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 POLÍMEROS

Os polímeros são macromoléculas formadas por unidades repetitivas chamadas meros, que se ligam por meio de reações químicas para formar cadeias longas. Existem em sua forma natural desde o início da vida, como o DNA (ácido desoxirribonucleico), o RNA (ácido ribonucleico), as proteínas e os polissacarídeos, que desempenham papéis essenciais na vida vegetal e animal. Desde os tempos mais remotos, a humanidade tem explorado polímeros naturais como materiais para vestuário, decoração, abrigo, ferramentas, armas, materiais de escrita e diversas outras necessidades (Young; Lovell, 2011). A utilização de polímeros remonta a aproximadamente 1600 a.C., quando civilizações mesoamericanas já processavam polímeros naturais, muito antes da vulcanização (Hosler; Burkett; Tarkanian, 1999). Eles podem ser encontrados na natureza, como a celulose, a borracha natural e as proteínas, ou sintetizados quimicamente, dando origem a uma vasta gama de materiais com diferentes propriedades. A versatilidade dos polímeros permite sua aplicação em diversos setores, como embalagens, indústria automotiva, construção

civil, eletrônica e até na medicina, onde são usados na fabricação de próteses e biomateriais (Pious; Thomas, 2016).

Os polímeros são geralmente classificados de acordo com sua origem e seu comportamento térmico. Quanto à origem, podem ser naturais, derivados de fontes biológicas (como a seda e o amido), sintéticos, produzidos por meio de reações químicas controladas (como o polietileno), ou artificiais, quando derivados naturais passam por modificações químicas (como o acetato de celulose). No que se refere ao comportamento térmico, dividem-se em termoplásticos, que podem ser moldados várias vezes por aquecimento — como o poli(tereftalato de etileno) (PET) e o poli(propileno) (PP); termorrígidos, que, após a moldagem, não podem ser remodelados devido à formação de ligações químicas irreversíveis (como as resinas epóxi); e elastômeros, que possuem alta elasticidade e retornam à sua forma original após a deformação (como a borracha sintética). Essa diversidade de classificações permite que os polímeros sejam amplamente explorados em diversas aplicações industriais e tecnológicas (Rial, 2022).

A crescente preocupação ambiental no Brasil tem fomentado a elaboração de políticas regulatórias voltadas à mitigação do uso de plásticos descartáveis, bem como a promoção de incentivos à produção e comercialização de bioplásticos (Lima; Gutierrez; Cruz, 2021). No entanto, a efetivação dessas iniciativas ainda enfrenta desafios significativos, tais como lacunas normativas e a ausência de diretrizes padronizadas que regulamentem a substituição de polímeros convencionais por alternativas biodegradáveis. Embora algumas legislações estaduais e municipais já restrinjam o uso de plásticos de uso único, persistem dificuldades na definição de critérios técnicos e regulatórios para viabilizar sua implementação em larga escala. Dessa forma, a consolidação da economia circular no Brasil exige maior articulação entre políticas ambientais, desenvolvimento tecnológico e ampliação da infraestrutura de reciclagem, garantindo uma transição mais eficiente e sustentável para novos materiais poliméricos (Lima; Gutierrez; Cruz, 2021).

A introdução de polímeros biodegradáveis surge como uma abordagem promissora para mitigar os impactos ambientais decorrentes do descarte inadequado de plásticos. Visto que, podem ser degradados por processos naturais, como fotodegradação, oxidação, hidrólise e a ação de microrganismos em condições específicas, como a compostagem. Esses materiais apresentam potencial para

reduzir a acumulação de resíduos plásticos no meio ambiente e minimizar os efeitos negativos decorrentes de sua persistência nos ecossistemas (Massy, 2017).

3.2 POLÍMEROS BIODegradáveis

Os polímeros biodegradáveis são materiais cuja degradação ocorre por meio de processos biológicos, como a ação enzimática, resultando em subprodutos ambientalmente amigáveis, como água, dióxido de carbono e biomassa (Tokiwa *et al.*, 2009). A velocidade e o mecanismo de degradação dependem de fatores como a estrutura química, as condições ambientais e a presença de microrganismos degradadores (Emadian *et al.*, 2017). Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados em duas categorias principais: naturais e sintéticos. Os polímeros naturais, como celulose, quitosana, amido e proteínas (colágeno, caseína e soja), são derivados de fontes renováveis e amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, biomédica e agrícola, devido à sua biocompatibilidade, renovabilidade e facilidade de degradação por microrganismos. Por outro lado, os polímeros sintéticos biodegradáveis, como o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(butileno succinato) (PBS) e os poli(hidroxialcanoatos) (PHA), são produzidos por meio de rotas químicas ou biotecnológicas a partir de fontes renováveis. Esses materiais têm sido amplamente estudados por sua versatilidade, processabilidade e desempenho mecânico, com grande potencial para substituir os plásticos convencionais em aplicações como embalagens, dispositivos médicos e materiais sustentáveis de engenharia (Nair *et al.*, 2019). Filmes biodegradáveis à base de amido têm sido amplamente explorados na indústria de embalagens, enquanto o PLA tem se destacado na impressão 3D e na fabricação de próteses médicas (Avérous, 2004).

Os polímeros biodegradáveis representam uma solução promissora para mitigar a poluição plástica. Seu potencial sustentável pode ser ainda mais explorado por meio de pesquisas voltadas à melhoria de suas propriedades e à ampliação de suas aplicações industriais. Assim, a combinação entre a inovação tecnológica e as políticas ambientais favorece a transição para um modelo de produção e consumo mais sustentável.

3.3 CELULOSE E SEUS DERIVADOS

A celulose é o biopolímero de maior reutilização no setor agroindustrial, sendo amplamente derivada de fontes vegetais, como a madeira e o algodão. Além disso, pode ser sintetizada por alguns organismos, como algas, tunicados e certas bactérias (Klemm *et al.*, 2006). A estrutura química da celulose caracteriza-se por uma conformação linear em fita, com ligações glicosídicas do tipo β -1,4. O grau de polimerização varia conforme a origem, sendo de aproximadamente 10.000 unidades na madeira e podendo atingir 15.000 unidades no algodão. Essa organização estrutural confere elevada rigidez à celulose, resultando em propriedades mecânicas superiores e estabilidade térmica (Habibi *et al.*, 2010; Rosseto, *et al.*, 2019).

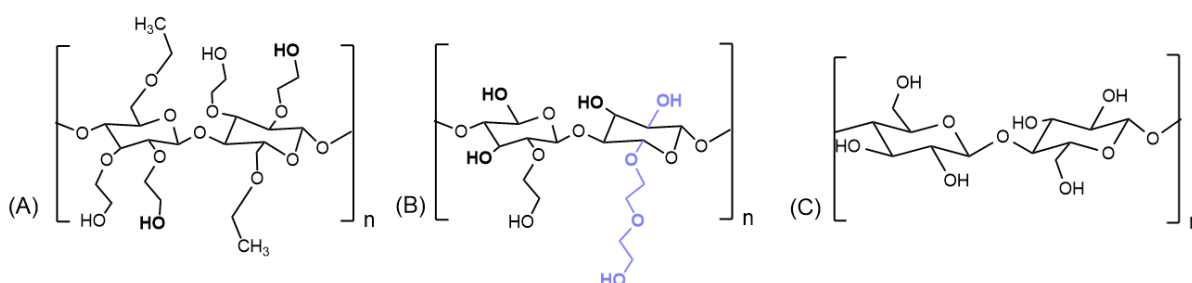
A celulose é formada por unidades repetidas de glicose anidra (AGU) ligadas entre si por ligações glicosídicas, com grupos hidroxila disponíveis. Esses grupos OH ao longo da macromolécula são altamente reativos e podem ser facilmente alterados por meio da introdução de grupos funcionais, o que gera uma grande variedade de derivados de celulose. Reações, como a esterificação, permitem obter diversos derivados da celulose, e a reatividade é influenciada por fatores estéreos e pela estrutura supramolecular. Contudo, sua modificação química geralmente envolve solventes e reagentes tóxicos, exigindo condições severas que dificultam a dispersão e demandam purificação adicional (Aziz *et al.*, 2022). Durante seu processamento, a celulose pode ser submetida a modificações químicas e físicas que possibilitam a obtenção de membranas porosas e materiais biocompatíveis, ampliando suas possibilidades de aplicação (Siró; Plackett, 2010). Devido à sua abundância, renovabilidade e biodegradabilidade, a celulose é amplamente explorada na produção de materiais sustentáveis (Aziz *et al.*, 2022). Ademais, a solubilidade da celulose em água representa um desafio significativo, o que torna necessário o desenvolvimento de estratégias para facilitar seu processamento e viabilizar sua aplicação em materiais poliméricos avançados (Moon *et al.*, 2011).

Nesse contexto de expansão das aplicações da celulose e de seus derivados, destaca-se a etilhidroxietilcelulose (EHEC), um polímero não iônico, hidrossolúvel e modificado, que apresenta biocompatibilidade e baixa toxicidade, tornando-se uma alternativa promissora para uso em dispositivos biomédicos (Calejo *et al.*, 2012). Contudo, observa-se escassez de estudos na literatura científica dedicados à investigação das propriedades e potenciais aplicações da EHEC, o que evidencia a

necessidade de mais pesquisas na área. Nesse sentido, compreender suas particularidades estruturais torna-se fundamental para avançar no desenvolvimento de novas aplicações.

A principal diferença estrutural entre a celulose (**Figura 1.c**) e a EHEC (**Figura 1.a**) está na presença de grupos funcionais etóxi e hidroxietila, que conferem à EHEC propriedades distintas e ampliam suas possibilidades de aplicação. A introdução desses grupos funcionais na cadeia polimérica da EHEC altera sua solubilidade e sua capacidade de interação com outros materiais.

Figura 1 - Estrutura química da EHEC (A) HEC (B) e celulose (C).



Fonte: Autora (2025).

Além da EHEC, outro derivado da celulose amplamente utilizado é a hidroxietilcelulose (HEC) (**Figura 1.B**), conhecida por sua capacidade de formar soluções viscosas e por ser amplamente empregada em cosméticos, produtos farmacêuticos e materiais absorventes. A introdução de grupos $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ na cadeia da celulose reduz sua cristalinidade e melhora a solubilidade e retenção de água, especialmente quando o grau de substituição aumenta (Li *et al.*, 2014). A principal diferença entre a HEC e a EHEC está na presença adicional de grupos etila na EHEC, o que altera suas propriedades de solubilidade e de interação com outros compostos. Essa modificação confere à EHEC um comportamento mais complexo em solução aquosa, afetando sua estabilidade e sua capacidade de formar redes poliméricas, especialmente na presença de surfactantes ou de outros aditivos (Thuresson *et al.*, 1995).

Ademais, estudos recentes demonstraram que a EHEC apresenta elevada biocompatibilidade, não induzindo ativação ou agregação plaquetária quando em contato com sangue humano, mesmo em diferentes concentrações. Ela também reproduz o comportamento pseudoplástico do sangue, ao contrário dos expansores

plasmáticos comerciais de fluxo newtoniano, o que a torna uma alternativa promissora para aplicações intravasculares e terapêuticas, com estabilidade hemostática comprovada (Eckelt *et al.*, 2022).

Apesar de suas vantagens, a elevada hidrofiliabilidade da EHEC, conferida pelos grupos funcionais adicionados, limita seu uso em ambientes úmidos, pois o material tende a absorver excesso de água. Essa absorção pode comprometer a integridade estrutural e reduzir a eficiência em aplicações que exigem contato prolongado com fluidos corporais, como em sistemas biomédicos. Desta forma, a utilização da EHEC em materiais que requeiram resistência à água demanda modificações estruturais ou a adição de agentes que controlem a absorção de umidade, preservando suas propriedades desejáveis (Dashtimoghadam, *et al.*, 2020).

3.3.1 BIO-OXIDAÇÃO DE CELULOSE E DERIVADOS

O processo de oxidação química da celulose apresenta limitações, como a cinética lenta e a necessidade de meios diluídos, o que implica elevado consumo de água e energia. A baixa reatividade da celulose exige quantidades elevadas de periodato e tempos de reação prolongados, condições que se afastam dos princípios da química sustentável. Além disso, temperaturas elevadas e meios ácidos podem levar à degradação da celulose ou da dialdeído-celulose, de modo que a escolha dos parâmetros de reação exige um equilíbrio entre rendimento e eficiência. Outro obstáculo reside no fato de que os grupos aldeídos formados podem permanecer em equilíbrio com a forma hidratada, dificultando sua quantificação precisa; em certas situações, esses aldeídos reagem ainda com hidroxilas da própria cadeia polimérica, resultando em hemiacetais. Nessas condições, o processo pode estagnar na formação de aldeídos, limitando a funcionalização desejada do material (Sultana *et al.*, 2024).

Uma alternativa é a oxidação enzimática, utilizando-se de enzimas oxidoredutases. Dentre elas, as lacases são enzimas oxidativas amplamente estudadas e desempenham papel fundamental na bio-oxidação de polímeros derivados da celulose. Essas enzimas, produzidas por fungos ligninolíticos, como *Trametes pubescens*, catalisam a oxidação de uma ampla variedade de substratos, incluindo derivados de açúcares, sem a necessidade de cofatores adicionais. Essa característica, associada à sua alta especificidade e eficiência catalítica, torna as

lacases ferramentas promissoras para modificações químicas em materiais poliméricos destinados a aplicações biomédicas (Jeon *et al.*, 2012).

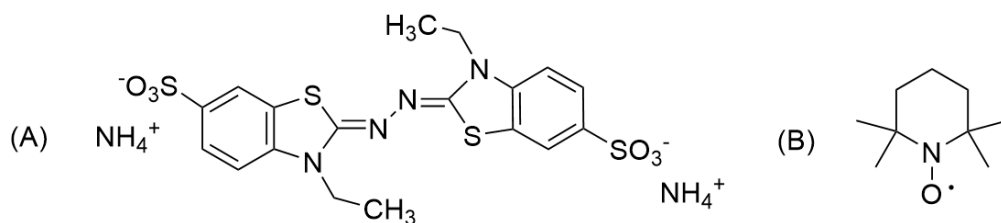
Do ponto de vista estrutural, as lacases pertencem ao grupo das oxidases multicobre (Thurston, 1994; Giardinal *et al.*, 2010). São glicoproteínas monoméricas, com massas molares entre 50 e 130 kDa, nas quais a fração de carboidratos associada contribui para a estabilidade estrutural e a resistência à desnaturação (Baldrian, 2006).

O mecanismo catalítico dessas enzimas envolve a oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos, por meio da remoção de um elétron, o que gera radicais estáveis. O estado oxidado da enzima é restaurado pela participação do oxigênio molecular, que atua como aceitor final de elétrons, resultando na formação de água como único subproduto (Rodríguez Couto; Telke; Tyagi, 2022). Em termos estequiométricos, para cada molécula de oxigênio reduzida, duas moléculas de água e quatro moléculas de substrato são oxidadas, gerando quatro radicais livres. Essa alta eficiência catalítica reforça o potencial das lacases para processos de modificação de polímeros, especialmente em contextos ambientalmente sustentáveis.

De maneira ainda mais sustentável, a oxidação enzimática mediada por lacases apresenta vantagens ambientais relevantes, pois promove reações de oxidação sem a geração de subprodutos tóxicos, aspecto essencial em aplicações biomédicas sensíveis, como implantes e dispositivos destinados à regeneração tecidual (Beauchamp *et al.*, 1992). Ademais, a bio-oxidação enzimática minimiza o risco de degradação indesejada do polímero, elimina etapas adicionais de purificação e torna o processo mais seguro, eficiente e economicamente viável, especialmente para a produção em larga escala de materiais poliméricos funcionalizados (Jeon *et al.*, 2012).

A eficiência dessa conversão pode ser amplificada pelo uso de mediadores redox, como o ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) (**Figura 2.A**) e o TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) (**Figura 2.B**). Esses mediadores facilitam a transferência de elétrons entre a lacase e o substrato-alvo, permitindo a oxidação de grupos funcionalmente menos reativos.

Figura 2 - Estrutura química dos mediadores redox: ABTS (A) e TEMPO (B)



Fonte: Autora (2025).

Estudos apontam que a associação da lacase a mediadores químicos proporciona uma modificação mais homogênea e controlada da EHEC, ampliando seu potencial de aplicação em materiais biomédicos, tais como curativos e sistemas de liberação controlada de fármacos (Jeon *et al.*, 2012).

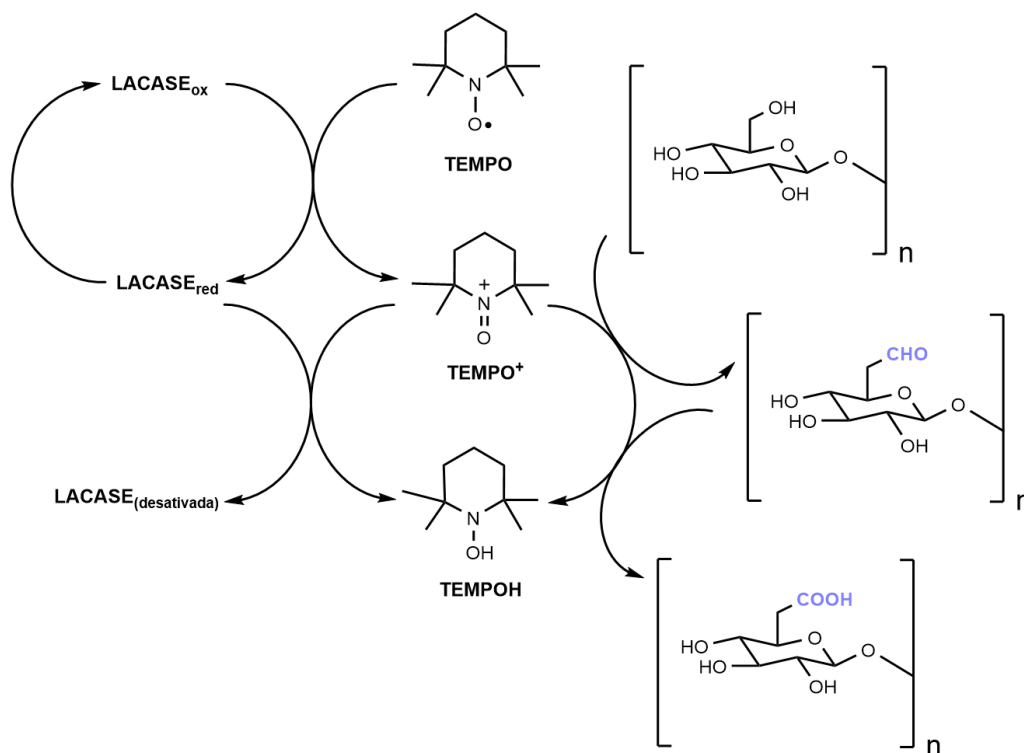
Em especial, o TEMPO é necessário quando o substrato a ser oxidado apresenta um potencial redox superior ao da lacase ou quando se trata de moléculas volumosas e de difícil acesso ao sítio ativo. Por ser um mediador químico de baixa massa molecular, o TEMPO reage primeiro com a lacase, formando um intermediário oxidativo altamente reativo, que então oxida o substrato-alvo (Bourbonnais; Paice, 1990). Além disso, uma das principais vantagens do uso de lacases é que, embora os mediadores sejam frequentemente necessários, não precisam ser empregados em quantidades estequiométricas nem regenerados por reações adicionais, como ocorre com os cofatores requeridos por outras oxirredutases. Essa característica contribui para explicar por que as lacases se destacam entre as oxirredutases mais aplicadas em processos industriais (Kudanga; Le Roux; Ngwenya, 2020; Pezzella; Guarino; Piscitelli, 2015; Rodríguez Couto, 2020).

Nesse sentido, diversos estudos têm explorado o uso de lacases na oxidação da celulose, visando modificar suas propriedades para aplicações específicas. Uma abordagem notável é o uso combinado de lacase com o radical livre TEMPO, formando o sistema TEMPO/lacase/O₂, que permite a oxidação seletiva de grupos hidroxila primários na celulose, introduzindo grupos carboxilato na estrutura polimérica (Deng *et al.*, 2025).

O TEMPO atua como mediador redox no sistema lacase/TEMPO, facilitando a oxidação seletiva de grupos primários alcoólicos (C6–OH) da celulose a grupos aldeídos e carboxílicos, por meio de um ciclo catalítico em que o radical nitroxila é convertido em cátion oxoamônio. Nesse processo, a lacase reoxida o TEMPO à sua forma ativa, regenerando o mediador e mantendo o ciclo catalítico. Esse mecanismo

permite uma oxidação controlada e suave da celulose, evitando a degradação da cadeia polimérica e preservando sua integridade estrutural (Isogai, Saito, 2014) (Figura 3).

Figura 3 - Oxidação da celulose via lacase e TEMPO



Fonte: Adaptado de Gu *et al.*, 2021.

Pesquisas demonstram que, embora a lacase possa ser degradada pelo TEMPO oxidado, a aplicação sequencial desse sistema pode aumentar o teor de carboxilato na celulose, facilitando sua conversão em nanofibrilas de celulose por meio de sonicação em água (Jiang *et al.*, 2016).

Outro exemplo utilizou o sistema lacase para oxidar superficialmente o tecido de algodão e ligar covalentemente nanopartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de eucalipto ou lavanda, conferindo ao tecido diferentes propriedades. O processo de bio-oxidação foi otimizado considerando os tipos de lacase e de mediador utilizados (ABTS ou TEMPO). As condições ótimas consistiram na utilização de lacase de *Pleurotus ostreatus*, TEMPO como mediador e um pós-tratamento com 1 mol L⁻¹ de solução de NaOH. Esse tratamento alcalino, além de neutralizar subprodutos ácidos, promove a conversão de grupos aldeídos residuais em carboxilatos e desprotona os grupos amino da quitosana, tornando-a insolúvel. Dessa forma,

favorece a estabilidade química da celulose oxidada, aumenta a interação eletrostática entre os grupos carboxilato e amino e garante a fixação das nanopartículas de quitosana ao tecido, resultando em uma camada funcionalizada mais resistente. Após essa etapa, os ensaios antibacterianos realizados contra *E. coli* e *S. aureus* indicaram redução no crescimento bacteriano em comparação com os tecidos não funcionalizados (Da Rosa *et al.*, 2025).

Ressalta-se, entretanto, que, apesar das inúmeras vantagens associadas ao uso de lacases na modificação de celuloses e de seus derivados, alguns desafios ainda limitam sua aplicação industrial em larga escala. A estabilidade dessas enzimas frente a variações de pH e temperatura pode comprometer o desempenho do processo, além dos custos relacionados à produção e purificação das lacases ainda serem considerados elevados. No entanto, os avanços em biotecnologia, especialmente nas áreas de engenharia enzimática e no desenvolvimento de sistemas microbianos para a produção de lacases, têm contribuído para a superação dessas limitações, tornando o uso dessas enzimas cada vez mais viável e promissor (Shokri *et al.*, 2021).

Embora não existam estudos específicos sobre a oxidação enzimática da EHEC (etil-hidroxietilcelulose) por lacases, é plausível inferir que ocorreram mecanismos oxidativos análogos aos observados em sistemas mediados por TEMPO. Assim, espera-se a formação de grupos eletrofílicos, como aldeídos e carboxilatos, que podem reagir com grupos amino da quitosana, promovendo a reticulação química e o desenvolvimento de redes poliméricas estáveis, com propriedades ajustáveis, para aplicações biotecnológicas e biomateriais.

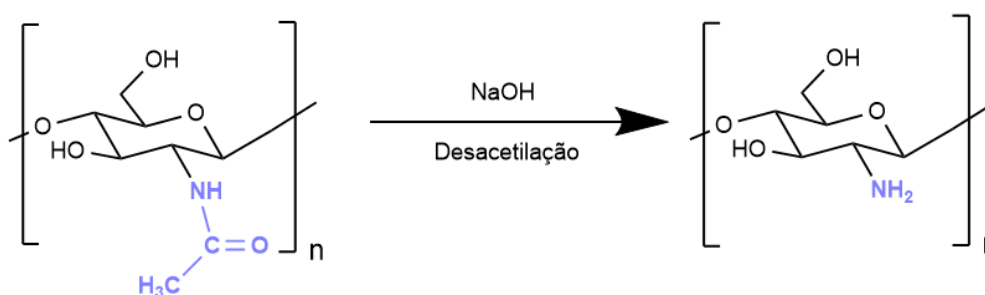
3.4 QUITOSANA

A quitina é considerada o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose. Está amplamente distribuída no reino animal (casca de crustáceos, cutícula de insetos e escama dorsal de moluscos) e em organismos vegetais, como algas, protozoários e fungos (Panariello *et al.*, 2019). A quitosana, por sua vez, é um polissacarídeo obtido majoritariamente pela desacetilação da quitina, processo no qual os grupos acetila são removidos das unidades de *N*-acetil-D-glicosamina, convertendo-as em unidades de D-glicosamina com grupos amino livres. Apesar de ocorrer naturalmente nas paredes celulares de alguns fungos, a principal fonte comercial da quitosana é a quitina extraída de

exoesqueletos de crustáceos, como camarões, lagostas, caranguejos e krill. A estrutura da quitosana é composta por unidades de glucosamina e *N*-acetil-D-glucosamina ligadas por ligações β -1,4 glicosídicas, características que conferem propriedades versáteis ao polímero, amplamente utilizado em processos biotecnológicos e biomédicos. A distinção entre quitina e quitosana é estabelecida pelo grau de acetilação: polímeros com mais de 50% de grupos acetilados são denominados quitina, enquanto aqueles com menos de 50% pertencem à categoria da quitosana (Gonil; Sajomsang, 2012; Rosseto *et al.*, 2019).

A transformação da quitina em quitosana (**Figura 4**) ocorre por meio de desacetilação parcial, na qual os grupos acetil (-COCH₃) são convertidos em grupos amino (-NH₂).

Figura 4 - Representação da formação da quitosana a partir da desacetilação parcial da quitina



Fonte: Autora (2025).

Essa modificação confere à quitosana características exclusivas, como solubilidade em meios ácidos, alta reatividade química e capacidade de interação com uma ampla gama de moléculas e superfícies. A proporção de grupos amino em relação aos grupos acetilados, conhecida como grau de desacetilação, é um parâmetro determinante das propriedades físico-químicas da quitosana. Quanto maior o grau de desacetilação, maior é a densidade de carga positiva em pH ácido, o que favorece interações eletrostáticas com moléculas carregadas negativamente, como polissacarídeos, proteínas ou ácidos nucleicos (Kumar *et al.*, 2020).

A quitosana é amplamente reconhecida por sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Sua biodegradação ocorre por meio da ação de enzimas específicas, como a lisozima, que fragmentam sua cadeia polimérica em oligômeros

e monômeros de glucosamina, que são facilmente metabolizados pelo organismo, sem causar efeitos tóxicos (Rinaudo, 2006).

Uma das propriedades mais marcantes da quitosana é sua atividade antimicrobiana, eficaz contra uma ampla gama de bactérias, fungos e leveduras. Essa atividade é atribuída à carga positiva dos grupos amino da quitosana, que interagem com as membranas celulares microbianas carregadas negativamente, causando danos à membrana, o vazamento de conteúdo intracelular e, eventualmente, a inibição do crescimento microbiano (Moeini *et al.*, 2020).

Ela desempenha um papel ativo no processo de cicatrização de feridas, devido à sua capacidade de estimular a migração e a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, células fundamentais para a regeneração tecidual. Estudos demonstram que a quitosana promove a deposição de colágeno no local da lesão, fortalecendo a matriz extracelular e acelerando a recuperação tecidual (Jayakumar *et al.*, 2010). Essa propriedade é particularmente relevante em feridas crônicas e queimaduras, nas quais a regeneração acelerada e a prevenção de infecções são essenciais. Ademais, a atividade antimicrobiana da quitosana atua como barreira protetora contra microrganismos, reduzindo o risco de infecções secundárias que poderiam comprometer o processo de cura (Moeini *et al.*, 2020).

A quitosana possui excelente capacidade de formar géis, filmes e membranas, materiais amplamente utilizados em aplicações biomédicas devido às suas propriedades físico-químicas únicas. Os géis à base de quitosana são amplamente empregados em sistemas de liberação controlada de medicamentos e na engenharia de tecidos, pois sua capacidade de reter grandes quantidades de água permite encapsular agentes bioativos e liberá-los de forma controlada em resposta a estímulos, como o pH ou a temperatura (Kumar *et al.*, 2020). Filmes de quitosana são amplamente explorados em curativos para feridas, devido à sua flexibilidade, biocompatibilidade e capacidade de incorporar agentes terapêuticos, como antibióticos e fatores de crescimento, o que promove uma recuperação acelerada e segura (Moeini *et al.*, 2020). Já as membranas de quitosana apresentam aplicações versáteis em dispositivos médicos, atuando como barreiras seletivas ou como suportes para cultivo celular na engenharia de tecidos. Essas membranas são particularmente úteis devido à sua resistência mecânica, à permeabilidade ajustável e à capacidade de prevenir contaminações microbianas (Rinaudo, 2006). Sua estrutura, rica em grupos amino ($-NH_2$), facilita a interação com outros polímeros,

possibilitando a criação de materiais híbridos e hidrogéis inteligentes, responsivos a estímulos externos.

Embora a quitosana ofereça diversas vantagens, algumas limitações podem restringir suas aplicações em determinadas condições. A solubilidade da quitosana em pH neutro ou alcalino é limitada, o que restringe seu uso em alguns ambientes fisiológicos. Para superar essa barreira, modificações químicas, como a introdução de grupos hidrofóbicos ou reticulação com polímeros compatíveis, têm sido exploradas para ampliar sua faixa de solubilidade e estabilidade (Rinaudo, 2006). Outra limitação está relacionada à resistência mecânica de filmes e membranas de quitosana pura, que pode ser insuficiente para certas aplicações biomédicas. Para contornar esse problema, combinações com outros polímeros ou o uso de agentes reticulantes podem melhorar a durabilidade e as propriedades mecânicas desses materiais (Dodero *et al.*, 2021).

A quitosana tem sido amplamente estudada na formação de sistemas reticulados por meio de reações químicas com diferentes polímeros e agentes reticulantes, visando aprimorar suas propriedades mecânicas, estabilidade e funcionalidade em diversas aplicações biomédicas e industriais. Dentre os sistemas descritos na literatura, destaca-se a reticulação covalente da quitosana com o agente diepóxido butanodiol diglicidil éter, que resultou no aumento da rigidez mecânica do material, favorecendo a proliferação de condrócitos, o que demonstra potencial de aplicação na engenharia de tecidos cartilagosos (Subramanian; Lin, 2005). De forma semelhante, hidrogéis de quitosana reticulados com genipina apresentaram estruturas mais compactas, melhor desempenho reológico e biocompatibilidade destacada, características desejáveis para aplicações biomédicas avançadas (Sánchez-cid *et al.*, 2023).

Outro exemplo relevante é a formação de membranas híbridas de quitosana e poli(álcool vinílico) (PVA), reticuladas com ácido sulfosuccínico, resultando em materiais com condutividade protônica adequada para aplicação como membranas eletrolíticas em células a combustível (Witt *et al.*, 2010). Ainda, a reticulação de quitosana com derivados dialdeídicos de nucleosídeos e nucleotídeos revelou a participação de interações iônicas adicionais na formação da rede polimérica, ampliando as propriedades funcionais dos hidrogéis obtidos (Mikhailov *et al.*, 2016).

Apesar da ampla variedade de sistemas reticulados com quitosana descritos na literatura, não foram encontrados estudos sobre a reticulação da quitosana com

EHEC. No entanto, considerando que a oxidação seletiva da EHEC pode gerar grupos aldeído reativos, é plausível propor que, uma vez oxidada, a EHEC poderia reagir com os grupos amino livres da quitosana, promovendo a formação de ligações amida e, consequentemente, de redes poliméricas reticuladas.

3.5. PROCESSOS DE RETICULAÇÃO

Devido às propriedades previamente descritas da EHEC e da quitosana, esses polissacarídeos destacam-se como candidatos promissores para a obtenção de materiais biodegradáveis. Entretanto, alguns desafios críticos ainda precisam ser superados para ampliar sua aplicabilidade, tais como a elevada sensibilidade à umidade, as limitações nas propriedades mecânicas, especialmente a baixa resistência e a reduzida estabilidade estrutural em meio aquoso, além da suscetibilidade à contaminação microbiana (Ezati et al., 2021). Embora filmes com certa solubilidade em água sejam desejáveis para embalagens comestíveis, como sacolas descartáveis e sachês, por exemplo, essa propriedade limita bastante o escopo de aplicação de filmes baseados em polissacarídeos (Choi *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2024).

A reticulação é um processo essencial na modificação de polímeros, no qual as cadeias macromoleculares são interligadas, formando uma estrutura tridimensional contínua. Esse processo pode ocorrer por diferentes mecanismos, sendo geralmente classificado em três tipos principais: físico, iônico e covalente (CALLISTER; RETHWISCH, 2018; SPERLING, 2006) (**Quadro 1**).

Tipo de Reticulação	Natureza da Ligação	Estabilidade/Força	Exemplos/Típicos
Reticulação física	Interações fracas, como ligações de hidrogênio, Van der Waals	Baixa a moderada; reversível	Gelatina, agarose, PVA reticulado por congelamento
Reticulação iônica	Ligações eletrostáticas entre íons positivos e negativos	Moderada; depende do pH e força iônica	Alginato com Ca^{2+} , quitosana com tripolifosfato de sódio
Reticulação covalente	Ligações químicas fortes entre átomos	Alta; geralmente irreversível	Redes de polímeros sintéticos (epóxi, poliuretano), quitosana reticulada com EDC/DMAP

Fonte: Autora (2025).

A reticulação física ocorre por meio de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas ou associações eletrostáticas fracas. Trata-se de um processo reversível, sensível a fatores ambientais como pH, temperatura e força iônica, sendo comumente explorado na formação de géis responsivos a estímulos externos (Dodero *et al.*, 2021). Já a reticulação iônica baseia-se na interação entre grupos carregados opostamente, como ocorre entre o alginato (aniônico) e a quitosana (catiônica), formando redes estabilizadas por ligações eletrostáticas, conferindo boa integridade estrutural em condições controladas (Seidi *et al.*, 2021).

Entre os diferentes tipos de reticulação, destaca-se a reticulação covalente, amplamente empregada quando se busca estabilidade química e mecânica superior. Esse tipo de reticulação é irreversível e permite o controle preciso da densidade de ligações cruzadas, o que influencia diretamente propriedades como rigidez, permeabilidade, taxa de degradação e resistência térmica do material (Kumar *et al.*, 2020). Ademais, a reticulação covalente permite a obtenção de filmes e hidrogéis com excelente estabilidade em meio aquoso (Gu *et al.*, 2021). A reticulação química, baseada na formação de ligações covalentes, configura-se, portanto, como uma estratégia eficiente para aprimorar a integridade estrutural e a durabilidade desses sistemas poliméricos (Sabaghi *et al.*, 2022).

Um processo típico de reticulação química envolve o uso de agentes de reticulação, gerando redes com integridade estrutural aprimorada e, portanto, ajudando a superar as deficiências inerentes em resistência à água, propriedades mecânicas e de barreira dos filmes (Azeredo *et al.*, 2016). A escolha dos agentes reticulantes a serem utilizados depende dos grupos reativos do polissacarídeo escolhido para a formação do material. O mais comum é que o polissacarídeo possua grupos nucleofílicos, como NH_2 ou OH , em sua estrutura. Nesse caso, utilizam-se agentes reticulantes contendo, ao menos, dois grupos eletrofilicos nas pontas da cadeia. Dois dos principais agentes reticulantes são o glutaraldeído e o glioxal, ambos aldeídos bifuncionais e de considerável toxicidade. No caso do glioxal, o LD_{50} é $> 2.000 \text{ mg/kg}$, enquanto o do glutaraldeído é $< 200 \text{ mg/kg}$. Além da toxicidade dos agentes reticulantes citados, o processo, geralmente, emprega solventes orgânicos e altas temperaturas (Doustdar *et al.*, 2022; Colombi *et al.*, 2024; Swamy *et al.*, 2022). O ácido cítrico é uma alternativa não tóxica e amplamente utilizada. No entanto, por ser um eletrófilo menos reativo, ainda se utilizam agentes ativadores ou reações a altas temperaturas, geralmente próximas de 100°C . Mesmo assim, é muito comum a adição de glicerol como plastificante ao final da reação (Liu *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2023).

Além da toxicidade, das altas temperaturas e dos diversos reagentes necessários aos processos de reticulação, a inserção desses agentes pode gerar filmes com uma rede mais espaçada do que se as cadeias do(s) polímero(s) fossem reticuladas diretamente entre si. Esse fato pode afetar as propriedades mecânicas do filme formado. Sendo assim, uma alternativa viável e ambientalmente correta seria reagir um derivado de polissacarídeo contendo grupos nucleofílicos com outro contendo grupos eletrofilicos, em uma reticulação direta entre polímeros. (Sen, *et al.*, 2019) O problema é que a grande maioria dos polissacarídeos possui apenas grupos nucleofílicos em sua estrutura, como a quitosana, que contém grupos NH_2 , e a EHEC, que contém grupos OH . No entanto, uma modificação por biocatálise poderia gerar grupos eletrofilicos em alguns polímeros de interesse (Jiang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2021).

A introdução de grupos funcionais na EHEC, especialmente grupos carboxila ($-\text{COOH}$) formados durante o processo de bio-oxidação, permite a reação com grupos amino ($-\text{NH}_2$) presentes na quitosana. Essa funcionalização viabiliza a formação de redes poliméricas por meio de ligações covalentes, especificamente as amídicas.

Embora existam diversos estudos na literatura sobre a reticulação de polímeros contendo grupos carboxílicos ou carbonílicos com compostos nitrogenados, como carbodiimidas, aziridinas e aminas (Tillet *et al.*, 2011), não foram encontrados relatos específicos que utilizem EHEC e quitosana com esse propósito. Nesse contexto, a proposta de utilizar a quitosana fundamenta-se em suas características intrínsecas, como biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade, tornando-a uma alternativa sustentável e promissora para a formação de materiais poliméricos reticulados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente tópico, apresenta-se a metodologia utilizada para o desenvolvimento do presente trabalho de pesquisa, composto por quatro seções: MATERIAIS, BIO-OXIDAÇÃO DA EHEC, RETICULAÇÃO *ONE-POT* EHEC BIO-OXIDADA COM QUITOSANA e AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.

4.1 MATERIAIS

- EHEC Bermocoll E 230FQ (Akzo Nobel, Suécia), com grau de substituição de 0,9–1,0 para grupos etila e de 1,9–2,2 para óxido de etileno por unidade de anidrogucose.
- Lacase *Novoprime Base 286*;
- Mediador redox 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) (Sigma Aldrich);
- Quitosana (Sigma-Aldrich, peso molecular médio, grau de desacetilação ~75–85%)
- Compressor de ar para tanques (*OceanMax*);
- Vidrarias de uso geral;
- Agitador orbital KLINE-KJ201BS;
- Centrífuga V4000-1215;
- Papel filtro Whatman nº 230;
- DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium*);
- SFB (Soro fetal bovino) 10% (Gibco, Brasil);
- Penicilina-estreptomicina 1% (pens/strep);
- PBS (phosphate-buffered saline) (Gibco, Brasil);

- Carbonato de sódio (Sigma Aldrich);
- Células L929 (linhagem fibroblástica murina) (*Thermo Scientific*);
- MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] (Promega Biotecnologia do Brasil, Brasil).
- EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida);
- DMAP (4-dimetilaminopiridina);

4.2 BIO-OXIDAÇÃO DA EHEC

A EHEC purificada por diálise (MWCO de 14.000 g·mol⁻¹) em água destilada por 7 dias foi solubilizada em água por 24 h sob agitação magnética. À solução foram adicionados 17,5 mg de TEMPO e 15 mg de lacase (*Novoprime Base 286*). A reação foi conduzida por 1 a 4 h, sob agitação orbital contínua e aeração com bomba de aquário. Ao final, as amostras foram centrifugadas (4000 rpm, 15 min) para remoção de resíduos e da enzima. As soluções foram então transferidas para placas de Petri e secas em estufa a 50 °C por cerca de 5 dias, para fornecer a EHEC bio-oxidada (EHECox) como filme opaco amarelado.

4.3 RETICULAÇÃO ONE-POT EHECox COM QUITOSANA

Para a obtenção dos filmes, preparou-se inicialmente uma solução de quitosana (250 mg em 25 mL de solução contendo 0,16 µL de ácido acético), mantida sob agitação magnética a 50 °C até a completa solubilização. Em seguida, essa solução foi adicionada a 25 mL de EHEC previamente bio-oxidada (EHECox), mantendo-se a proporção 2:1 (EHECox:quitosana), sob agitação por 1 h.

A reação foi conduzida em sistema *one-pot* (processo realizado em uma única etapa reacional, sem isolamento intermediário dos reagentes), sob diferentes meios e condições reacionais, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 - Reações entre EHEC e quitosana em diferentes meios reacionais.

Método	Meio reacional	Condições reacionais	pH final
A	25 mL de solução de quitosana + 500 mg de EHECox	Agitação magnética e aquecimento a 50°C por 2 h	5
B	25 mL de solução de quitosana + 500 mg de EHECox + 100 mg de EDC + 10 mg de DMAP	Agitação magnética e aquecimento a 50°C por 2 h	7
C	25 mL de solução de quitosana + 500 mg de EHECox	Agitação magnética em câmara UV (254 nm), temperatura ambiente por 2 h	5

Fonte: Autora (2025).

Como controle, os mesmos procedimentos apresentados no quadro 2 foram aplicados com EHEC não oxidada. Além disso, amostras de EHEC bio-oxidada sem quitosana, expostas à radiação UV com e sem repouso de 24 h após a oxidação, também foram utilizadas como controle. Outro controle foi realizado com a exposição da quitosana em solução sob UV e a análise do filme formado.

Para otimizar o tempo de exposição à luz UV no processo de reticulação, as misturas foram distribuídas em quatro béqueres e expostas à radiação UV (254 nm), sob agitação magnética constante (450 rpm), por 15, 30, 60 e 90 min, respectivamente.

Após cada tempo, as amostras foram transferidas para placas de Petri e secas em estufa a 50 °C até a completa formação dos filmes. Análises posteriores determinaram a condição ideal. Adicionalmente, foram conduzidos testes complementares de reticulação prolongada (24 h), aplicados às formulações contendo EHECox por 1 e 4 h, com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de oxidação na estabilidade estrutural e nas propriedades dos filmes obtidos.

4.4 AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Esta etapa teve como objetivo analisar as propriedades físico-químicas, estruturais dos filmes obtidos sob diferentes condições de bio-oxidação e reticulação da EHEC com quitosana. Foram realizados ensaios para avaliar a integridade estrutural, a resistência à solubilização em água, a molhabilidade, o grau de oxidação e as alterações estruturais decorrentes dos tratamentos aplicados.

4.4.1 Análise comparativa das metodologias de reticulação: avaliação visual e de integridade estrutural

Os filmes de EHEC e quitosana obtidos por reticulação com radiação UV, EDC/DMAP e aquecimento foram inicialmente avaliados quanto à aparência (homogeneidade, cor, transparência e defeitos) por meio de registros fotográficos. Em seguida, cada amostra seca foi imersa em 10 mL de água destilada a 25 °C por 48 h, sem agitação. Após este período, os filmes foram inspecionados visualmente e manuseados com pinça para verificar a integridade mecânica e, então deixados em dessecador por cinco dias para completa secagem, quando foram reavaliados. As amostras foram submetidas a ensaios de solubilidade por imersão em água destilada por 48 h, determinando-se a fração solubilizada pela diferença entre a massa seca inicial e a massa seca final após a imersão e a secagem. O intumescimento foi avaliado por meio de pesagens sucessivas após a submersão, permitindo calcular o ganho de massa ao longo do tempo. Também foram realizadas análises de ângulo de contato e de FTIR, visando comparar as metodologias quanto à estabilidade em meio aquoso, à molhabilidade e à integridade química dos filmes.

4.4.2 Análise de estabilidade térmica via análise termogravimétrica (TGA)

As análises foram realizadas em um equipamento TGA 8000 (PerkinElmer®). As amostras foram aquecidas de 30 °C a 700 °C, sob fluxo contínuo de argônio, a 10 °C/min. Registrou-se a perda de massa em função da temperatura para caracterizar a degradação térmica, identificar a perda de água (livre e ligada) e avaliar a estabilidade dos filmes conforme os tempos de bio-oxidação da EHEC e a metodologia de reticulação aplicada. As temperaturas de início ($T_{n\text{início}}$) e término ($T_{n\text{final}}$) da degradação nas curvas de TGA foram determinadas pelo método da tangente, a partir da interseção entre a reta traçada na região de maior inclinação e a

linha de base da curva. A estabilidade térmica foi avaliada com base no percentual de resíduo remanescente ao final do ensaio.

4.4.3 Análise via calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As análises térmicas foram realizadas em um equipamento DSC NETZSCH 214 Polyma (NETZSCH Instruments®). As amostras foram acondicionadas em cápsulas de alumínio seladas e submetidas à atmosfera inerte (fluxo contínuo de nitrogênio). O ensaio foi conduzido com aquecimento de 10 °C/min, de 0 °C a 200 °C, seguido de resfriamento à mesma taxa. Essa faixa permitiu identificar transições térmicas, como eventos de degradação e de transição de fase. Os dados foram utilizados para comparar o perfil térmico dos filmes, segundo a metodologia de reticulação, e para avaliar a influência da bio-oxidação da EHEC.

4.4.4 Teste de solubilidade em água

O teste de solubilidade avaliou a estabilidade dos filmes em meio aquoso e os efeitos da bio-oxidação e da reticulação. Cada filme seco foi imerso individualmente em 10 mL de água destilada a 25 °C, com monitoramento visual a cada 2, 24 e 48 h para observar intumescimento, fragmentação, perda de massa, desintegração ou solubilização. Os filmes que permaneceram íntegros foram removidos, secos em estufa a 50 °C e reavaliados. O teste permitiu comparar o desempenho das amostras bio-oxidadas/reticuladas com o dos controles, evidenciando o impacto da radiação UV e da bio-oxidação na estabilidade dos filmes poliméricos.

4.4.5 Testes em diferentes solventes orgânicos do filme ótimo

A solubilidade do filme otimizado foi avaliada em três solventes orgânicos de polaridades distintas: clorofórmio (apolar), acetonitrila (polar aprótico) e dimetilsulfóxido (DMSO, altamente polar aprótico). Amostras do filme, previamente secas, foram pesadas (29,4 mg, 31,8 mg e 35,1 mg, respectivamente) e imersas em 800 µL de cada solvente. Os sistemas foram mantidos sob agitação leve à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 24 h. Após o período de contato, observou-se o comportamento das amostras quanto à solubilização, ao intumescimento e à integridade estrutural.

4.4.6 Análise de molhabilidade - ângulo de contato

A molhabilidade dos filmes foi avaliada por meio da medição do ângulo de contato (AC), pelo método da gota séssil, a 25 °C. Para isso, amostras de filmes de EHEC e quitosana, preparadas com EHEC submetida a diferentes tempos de bio-oxidação (1 , 2 , 3 e 4 h) e uma amostra controle, todas reticuladas por irradiação de luz UV (254 nm) por 15, 30, 60, 90 e 120 min, foram cortadas (1 cm × 3 cm) e fixadas em lâminas com fita dupla face. Com auxílio de uma micropipeta, uma gota de 10 µL de água deionizada foi aplicada em cada amostra. A molhabilidade foi utilizada para avaliar o efeito do tempo de oxidação sobre a eficiência da reticulação. A hidrofobicidade foi interpretada conforme Cassie *et al.* (1944): AC < 90° indica caráter hidrofílico; > 90°, hidrofóbico; > 150°, super-hidrofóbico.

4.4.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A caracterização química dos filmes foi realizada por espectroscopia de FTIR empregando acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR), efetuando-se oito varreduras por amostra na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos em equipamento PerkinElmer® Frontier, e posteriormente normalizados por meio do *software* Origin por meio da definição dos valores máximos e mínimos.

4.4.8 Avaliação do grau de oxidação - titulação condutométrica

As análises foram conduzidas em um condutivímetro LUCA-150. O grau de oxidação (DO) foi determinado por titulação condutométrica em duplicata. Cerca de 50 mg de cada amostra de EHEC foram suspensos em 20 mL de HCl 0,00986 mol/L e agitados por 10 min. Em seguida, foram titulados com NaOH 0,00979 mol/L, preparado por diluição da solução-mãe 0,01929 mol/L. O HCl também foi obtido a partir de uma solução-mãe 0,01524 mol/L. O cálculo do DO foi realizado conforme Habibi, Chanzy e Vignon (2006) (Eq. 1).

$$DO = \frac{162 * C * (V_2 - V_1)}{w - 19 \frac{g}{mol} * C * (V_2 - V_1)} \quad (Eq. 1)$$

Onde:

- C: concentração de NaOH (mol/L);

- w: massa da amostra seca (g);
- V₁ e V₂: volumes de NaOH consumidos (L);
- 19 g/mol: diferença entre as massas molares do AGU modificado (236 g/mol) e do ácido glucurônico (217 g/mol);

A massa molar do AGU modificado considera substituições etil (29 g/mol) e hidroxiethyl (45 g/mol), assumindo grau de substituição médio de 1,0. V₁ e V₂ foram determinados a partir da derivada da curva de titulação, considerando variações $\leq 0,05$; pontos anômalos foram descartados.

4.4.9 Teste de biodegradabilidade do filme EHECox4Q24

O teste de biodegradabilidade foi realizado utilizando o filme polimérico otimizado, EHECox4Q24 (EHEC oxidada por 4 h e reticulada com quitosana por irradiação UV durante 24 h). Os ensaios de biodegradação foram realizados em solo simulado, preparado a partir da mistura em proporções iguais de solo fértil com baixo teor de argila, esterco de cavalo curtido e areia grossa (10–40 mesh). A mistura foi peneirada e submetida a maturação de aproximadamente três meses, conforme a norma ASTM G160–03. Os testes foram conduzidos em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos resultados. As amostras, com dimensões de 2,0 × 2,0 cm, foram enterradas individualmente em recipientes separados, todos preparados simultaneamente e mantidos sob condições controladas e homogêneas, assegurando comparabilidade entre os ensaios. Após períodos de 2 e 4 meses, os corpos de prova foram cuidadosamente removidos, lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente. Em seguida, foi avaliado o grau de desintegração de cada amostra, com base na variação de massa ao longo do tempo.

4.4.10 Teste em diferentes pH do filme EHECox4Q24

Com o objetivo de avaliar a estabilidade do filme otimizado sob diferentes condições de pH, foram realizados testes de solubilidade em soluções aquosas de pH variado. A variação do pH foi obtida por meio da adição controlada de hidróxido de sódio (NaOH) e de ácido acético em água destilada, permitindo a preparação de soluções com pH entre 2 e 14. Os filmes foram imersos nessas soluções por 24 h e sua solubilidade foi avaliada visualmente com base em critérios como a dissolução total, parcial ou a manutenção da integridade estrutural. Esse procedimento permitiu

identificar a faixa de pH em que os filmes se tornam solúveis em meio aquoso, fornecendo informações relevantes sobre a estabilidade das ligações químicas formadas durante a reticulação.

4.4.11 Teste de intumescimento dos filmes

Os filmes obtidos a partir das metodologias que utilizaram EHEC oxidada por 1 h e reticulada com quitosana, sob exposição à radiação UV (254 nm) por 2 h (EHECox1Q2), e EHEC oxidada por 4 h e reticulada com quitosana, sob irradiação UV por 24 h (EHECox4Q24) foram submetidos ao teste de intumescimento. Para isso, os filmes foram pesados antes e após o processo de hidratação, permitindo avaliar sua capacidade de absorção e retenção de água ao longo do tempo. O grau de intumescimento (GI) do filme foi calculado utilizando a fórmula descrita por Simoni, *et al.*, (2017) (Eq. 2):

$$GI = \frac{(m_i - m_0)}{m_0} \times 100 \quad (Eq. 2)$$

Onde:

- m_i é a massa do filme após a imersão em líquido (massa hidratada);
- m_0 é a massa inicial do filme seco.

Essa fórmula é amplamente utilizada em estudos de materiais poliméricos para quantificar a capacidade de absorção de água ou de outros líquidos pelo filme, expressa como porcentagem de ganho de massa.

4.4.12 Teste de citotoxicidade do filme

Para avaliar a biocompatibilidade do filme polimérico EHECox4Q24, realizou-se um ensaio de citotoxicidade *in vitro* com células L929, conforme a norma ISO 10993-5 (ISO, 2009). A linhagem L929 foi empregada devido à sua sensibilidade a agentes citotóxicos e à facilidade de cultivo (Mosmann, 1983; Freshney, 2016). Segundo a norma, materiais com viabilidade celular superior a 70% são considerados não citotóxicos. A citotoxicidade foi analisada por meio de extratos e de contato direto.

Para obtenção dos extratos, os filmes foram esterilizados por UV (30 min por lado) e incubados em 200 µL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) por 24 h a 37 °C. O meio obtido foi coletado e diluído em proporções de 0–100%. Também foi avaliado o efeito de uma lavagem prévia em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) por

2 h antes da incubação. As células L929 foram cultivadas em DMEM com 10% SFB e 1% penicilina-estreptomicina, plaqueadas a uma densidade de 1×10^4 células por poço e expostas aos extratos por 24 h.

A viabilidade celular foi quantificada pelo ensaio de MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), com leitura a 490 nm. O teste de contato direto foi aplicado apenas aos filmes mais espessos, pois os mais finos se solubilizaram após hidratação. Os filmes foram hidratados em DMEM por 24 h, secos por 2 h e receberam 3×10^4 células em 10 μ L de meio. Após 4 h de adesão, adicionou-se meio suficiente para cobertura e as amostras foram incubadas por 24 e 72 h. A atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio de MTS após a transferência dos filmes para nova placa. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA (*Analysis of Variance*), seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), apresentando os dados como média $\pm$ desvio padrão.

4.4.13 Análise estrutural por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) e ^{13}C (RMN ^{13}C)

A caracterização estrutural das amostras foi realizada por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C). As análises foram conduzidas em espectrômetro NMR AS 400 Varian, operando a 400 MHz para RMN ^1H e a 75 MHz para RMN ^{13}C . As amostras foram preparadas por dissolução de aproximadamente 5 a 10 mg do material em 600 μ L de D_2O (água deuterada). O processamento e a análise dos espectros obtidos para cada amostra foram realizados com o auxílio do software MestReNova.

4.4.14 Análise morfológica (MEV) do filme EHECox4Q24

A análise morfológica do filme polimérico otimizado EHECox4Q24 foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias foram obtidas em ampliações de 1000x e 2500x, permitindo a observação da topografia superficial em diferentes escalas. O equipamento utilizado foi um microscópio eletrônico de varredura modelo JCM-7000 Benchtop SEM (JEOL Ltda., Japão), operado em modo de alto vácuo, com tensão de aceleração de 5 kV, para todas as amostras analisadas.

4.4.15 Análise de cristalinidade (DRX)

A caracterização estrutural dos filmes foi realizada por difração de raios X (DRX). Os padrões de difração foram obtidos utilizando um difratômetro Bruker D6 Phaser (Bruker, Alemanha), equipado com fonte de radiação Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) operando a 40 kV de tensão e 15 mA de corrente. As medidas foram registradas no modo de varredura contínua (*scan* contínuo) em uma faixa de 2θ entre 5° e 50° , com passo equivalente a uma taxa de varredura de $1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$. As amostras foram posicionadas no porta-amostras padrão do equipamento, garantindo superfície plana e alinhamento adequado para minimizar erros de paralaxe. Antes das análises, o equipamento foi calibrado com um padrão interno fornecido pelo fabricante, assegurando a precisão das posições dos picos. Os espectros obtidos foram tratados no *software* Bruker DIFFRAC.SUITE.

4.4.16 Ciclos de reuso da lacase na bio-oxidação da EHEC e avaliação por FTIR/reticulação

A fim de avaliar a manutenção da atividade oxidativa, a lacase foi reutilizada em até quatro ciclos consecutivos de oxidação otimizada da EHEC (4 h). Ao final de cada ciclo, a enzima foi recuperada por centrifugação (4000 rpm, 15 min), filtração em papel Whatman nº 230 (90 mm) e quatro lavagens sucessivas com água deionizada, com agitação em vórtex entre cada lavagem. A lacase recuperada foi seca em estufa a 50°C e armazenada em freezer até o próximo uso. As amostras de EHECox obtidas em cada ciclo de oxidação enzimática foram analisadas por FTIR. Em seguida, o material foi reticulado com quitosana nas condições previamente otimizadas (EHECox4Q24) para a obtenção de filmes, que foram avaliados quanto à solubilidade em água, à estabilidade estrutural e às características químicas por FTIR.

4.4.17 Gravimetria do filme EHECox4Q24

A estabilidade gravimétrica do filme EHECox4Q24 foi avaliada por meio de ensaio de perda de massa em meio aquoso. As amostras foram previamente secas em estufa a 40°C até atingirem massa constante e, em seguida, imersas em água destilada à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ \text{C}$). Em intervalos de 1, 5, 7, 15 e 30 dias, as amostras foram cuidadosamente secas com papel absorvente, secas novamente em estufa até atingir massa constante e pesadas em balança analítica. A perda de massa

(%) foi calculada pela diferença entre a massa seca inicial e a massa seca final após cada período de submersão. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.4.18 Tração

Os ensaios de tração foram realizados em uma máquina universal de ensaios Instron EMIC 23-100, equipada com uma célula de carga de 500 kgf. A metodologia seguiu como base a norma ASTM D882, voltada a materiais em forma de filme fino, com adaptações conforme as características das amostras. Essa norma, amplamente utilizada para avaliar propriedades mecânicas de filmes plásticos delgados, estabelece diretrizes específicas para a preparação e o ensaio dos corpos de prova (ASTM, 2012).

Conforme o protocolo descrito por Xu *et al.* (2022), o filme foi previamente seccionado em tiras com dimensões aproximadas de 2 × 8 cm para padronização de amostras para ensaios mecânicos. A partir dessas tiras, foram preparados e ensaiados quatro corpos de prova. A velocidade de aplicação da carga foi fixada em 30 mm/min, seguindo as condições experimentais indicadas pelo mesmo método. A espessura de cada corpo de prova foi determinada com um paquímetro digital, enquanto o comprimento útil foi medido individualmente para cada amostra. Todos os ensaios foram realizados sob condições laboratoriais controladas, e os dados obtidos foram utilizados para determinar as propriedades mecânicas do material, incluindo tensão na ruptura, alongamento na ruptura e módulo de elasticidade.

A tensão de ruptura (TS, do inglês *tensile strength*) foi determinada pela razão entre a força máxima aplicada e a área da seção transversal da amostra (Eq. 3).

$$TS = \frac{F}{L * W} \quad (Eq. 3)$$

Em que F é a força máxima (N), L a espessura (mm) e W a largura (mm).

O alongamento até a ruptura (EB%) foi determinado pela variação relativa do comprimento inicial (L_0) em relação ao comprimento final após a ruptura (L_1), conforme a (Eq. 4):

$$EB = \frac{L_1 - L_0}{L_0} * 100 \quad (Eq. 4)$$

O módulo de elasticidade (E) foi obtido a partir da inclinação da região linear da curva tensão × deformação, correspondente ao regime elástico, conforme a (Eq. 5):

$$E = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} \quad (Eq. 5)$$

Onde σ é a tensão (MPa) e ε a deformação (mm/mm).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

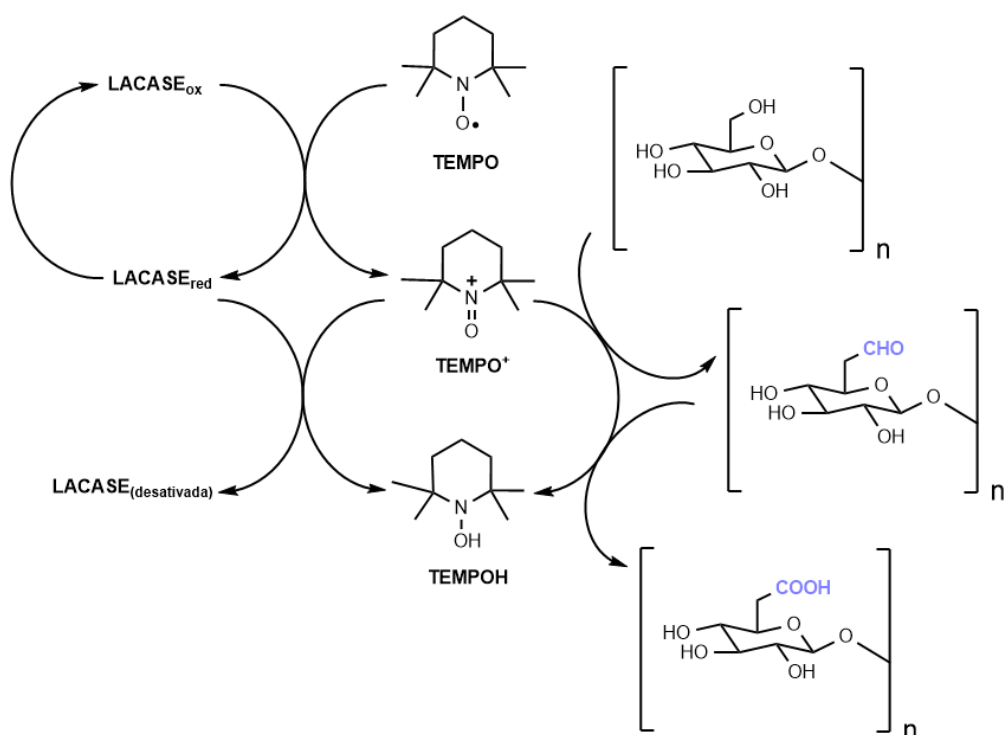
5.1 TESTES PRÉVIOS DE BIO-OXIDAÇÃO e RETICULAÇÃO ENTRE EHECOx E QUITOSANA

Previamente à definição das condições finais de obtenção dos filmes, foram realizados testes de bio-oxidação e de reticulação entre EHEC oxidado (EHECOx) e quitosana, com o objetivo de avaliar a formação de grupos funcionais reativos e sua influência na estabilidade da rede polimérica. Esses ensaios permitiram estabelecer parâmetros adequados para as etapas subsequentes de preparação e de caracterização dos filmes.

Para a preparação de EHECOx, empregou-se o processo de bio-oxidação catalisado por lacases, na presença de TEMPO, sob aeração e agitação orbital constantes, durante 4 h. As lacases promovem a oxidação das hidroxilas primárias presentes na estrutura do polímero, convertendo-as em grupos carbonila ou carboxila. Assim, o mediador TEMPO atua na transferência de elétrons, enquanto a oxidação é catalisada pela enzima lacase *Novoprime Base 286* (Gu *et al.*, 2021) (**Figura 5**).

Em comparação à oxidação clássica da celulose, que ocorre preferencialmente na hidroxila primária do C6 da unidade anidroglicose (De Nooy *et al.*, 1995), a EHEC apresenta comportamento distinto, devido à eterificação prévia. Essas modificações estruturais alteram a distribuição eletrônica e a acessibilidade dos grupos hidroxila, reduzindo a reatividade do C6. Como consequência, a hidroxila ligada ao C2 torna-se o sítio mais propício à oxidação. Assim, provavelmente, a rota oxidativa da EHEC não segue o padrão da celulose não modificada, refletindo sua nova organização estrutural e favorecendo a formação de sítios reativos importantes para etapas subsequentes, como a reticulação com quitosana.

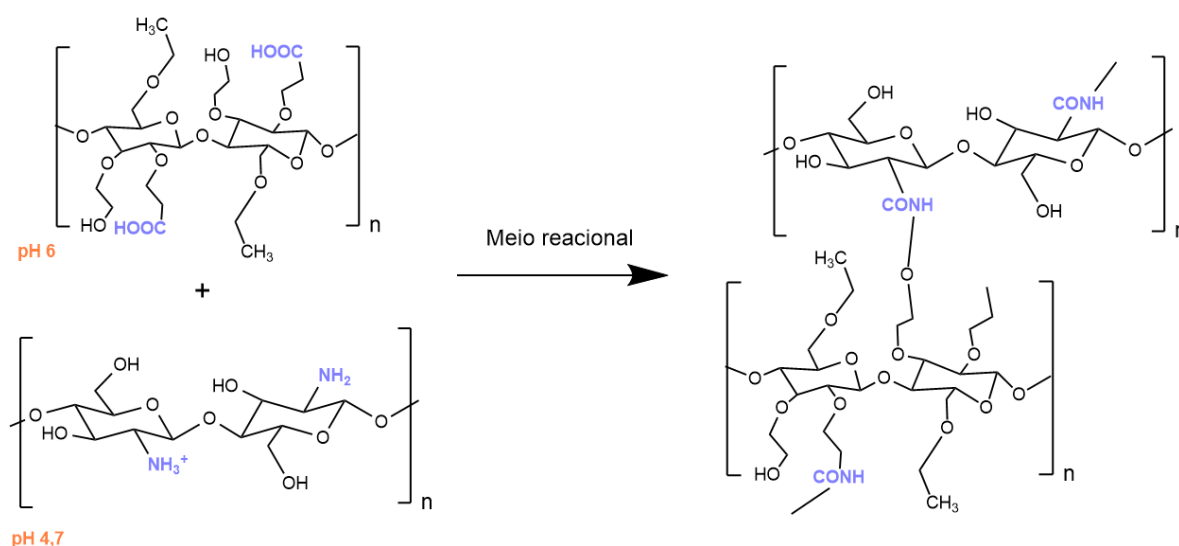
Figura 5 - Proposta mecanística para bio-oxidação da EHEC



Fonte: Adaptado de Gu *et al.*, 2021.

De posse do EHECOx, foram realizados testes prévios de reação com quitosana. A conversão de grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ em $-\text{COOH}$ durante o processo de bio-oxidação aumenta a funcionalidade do polímero, favorecendo a formação de ligações com polímeros nitrogenados, como a quitosana (**Figura 6**), resultando em redes tridimensionais estáveis (Doderó *et al.*, 2021; Seidi *et al.*, 2021). A reticulação pode ocorrer por meio da formação de ligações covalentes do tipo amida entre os grupos eletrofílicos da EHECOx e os grupos nucleofílicos da quitosana.

Figura 6 - Possível interação entre o EHEC e a quitosana



Fonte: Autora (2025).

Mantendo-se as condições de bio-oxidação fixas, três metodologias distintas foram aplicadas para promover a reticulação entre EHECox e quitosana, permitindo a comparação entre diferentes estratégias químicas e a identificação da abordagem mais eficiente para a formação de filmes poliméricos insolúveis e mecanicamente estáveis. As metodologias testadas foram: **(A)** EHECox/quitosana em aquecimento a 50 °C por 2 h; **(B)** EHECox/quitosana com DMAP/EDC, seguida de aquecimento a 50 °C por 2 h; e **(C)** EHECox/quitosana em luz UV de 254 nm por 2 h. As soluções de EHECox e de quitosana foram preparadas separadamente, posteriormente misturadas e ajustadas para um volume final de 50 mL (**Quadro 2**), e agitadas por 2 h em cada condição. Após a reação, o sistema com EDC/DMAP foi submetido à diálise para remoção de reagentes residuais, enquanto os demais foram secos diretamente em estufa a 50 °C.

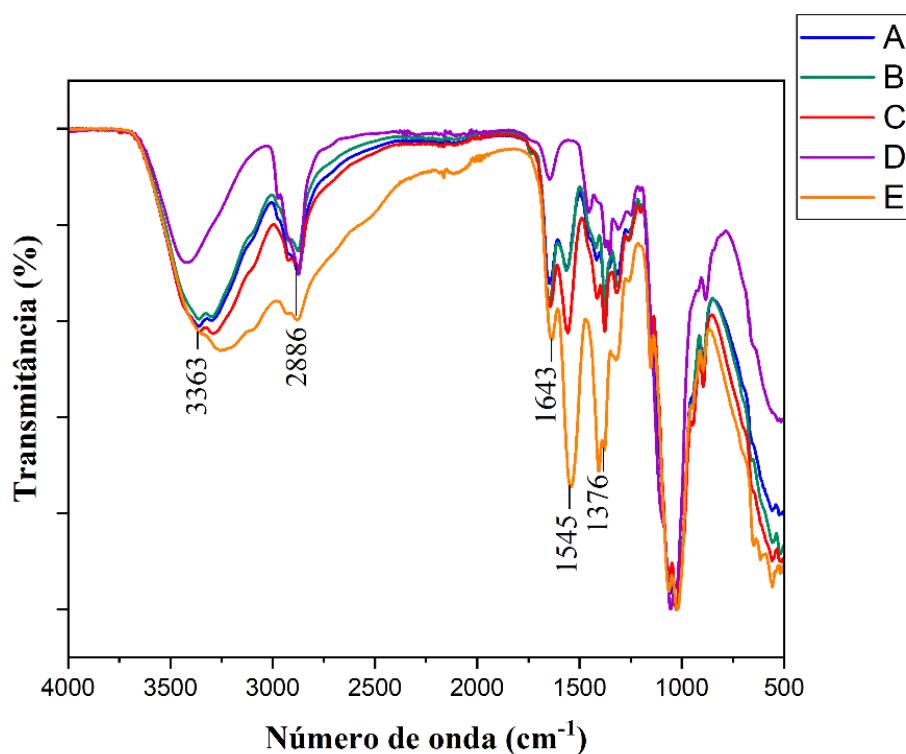
O EDC e o DMAP, comumente empregados em reações que envolvem ácidos carboxílicos e um agente nucleofílico, foram utilizados para ativar os grupos -COOH presentes na estrutura da EHECox (Ghosh, Shahabi, 2021). A irradiação UV, por sua vez, foi utilizada para promover a reticulação fotoquímica entre macromoléculas poliméricas, por meio da geração de radicais livres, o que favorece a formação de ligações covalentes entre grupos funcionais, sem reagentes adicionais. Essa técnica é eficiente e ambientalmente sustentável em sistemas que empregam polissacarídeos e biopolímeros naturais (Li *et al.*, 2020).

A análise comparativa entre as diferentes metodologias de reticulação foi realizada com o objetivo de identificar o sistema mais eficiente em termos de estabilidade estrutural, resistência à solubilidade e propriedades mecânicas dos filmes produzidos. Os parâmetros avaliados incluíram a resistência à solubilização em meio aquoso, o comportamento de molhabilidade e a preservação da estrutura química dos filmes após os testes. Com base nos resultados obtidos, foi possível indicar a metodologia de reticulação mais adequada para garantir a estabilidade e funcionalidade dos filmes híbridos de EHEC e quitosana.

Na metodologia **(A)**, o filme obtido apresentou aparência translúcida e uniforme. Porém, após submersão em água, observaram-se contração, enrolamento e enrijecimento. Para a metodologia **(B)**, o filme resultante apresentou superfície lisa e translúcida, mas, após 48 h de submersão em água, sofreu deformações e rasgos. Por outro lado, a metodologia **(C)** gerou filmes homogêneos e espessos, que, após 48 h em água, mantiveram forma e estrutura. Seu espectro de FTIR (**Figura 7**) apresentou bandas mais intensas do que as das demais metodologias, mesmo após a imersão em água por 48 h, evidenciando a preservação dos grupos funcionais e da organização estrutural, sem sinais de degradação.

As principais bandas observadas correspondem aos estiramentos O–H e N–H ($\approx 3363\text{ cm}^{-1}$), ao estiramento C–H alifático ($\approx 2886\text{ cm}^{-1}$), à carbonila C=O característica de amidas ($\approx 1643\text{ cm}^{-1}$), à banda de Amida II ($\approx 1545\text{ cm}^{-1}$) e à deformação C–H ou C–N ($\approx 1376\text{ cm}^{-1}$). Dessa forma, essa metodologia demonstrou o melhor desempenho geral, com estabilidade e forma preservadas, sendo a mais adequada para diversas aplicações.

Figura 7 - Espectros de FTIR dos filmes obtidos por três metodologias de reticulação, após imersão em água por 48 h: (A) Aquecimento, (B) DMAP/EDC, (C) Radiação de luz UV, (D) EHEC purificada e (E) Quitosana em filme

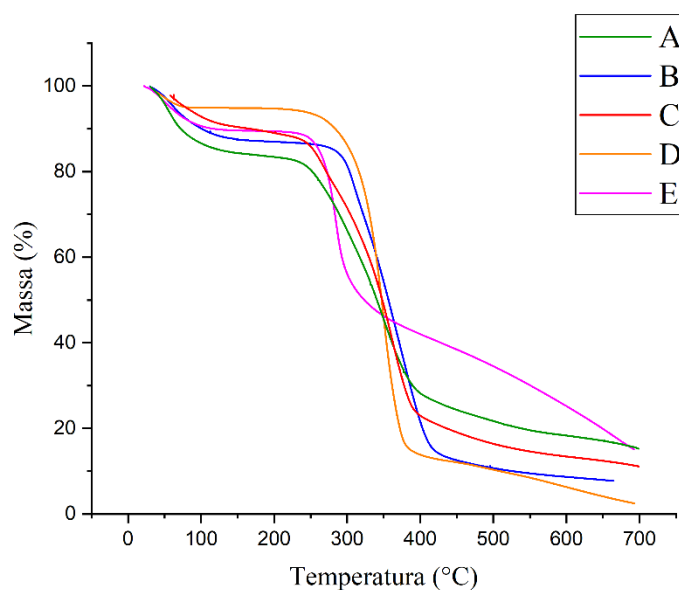


Fonte: Autora (2025).

A análise gravimétrica indicou perda de massa semelhante entre as metodologias com radiação de luz UV (24,1 mg) e apenas com aquecimento (20,6 mg), sugerindo estabilidade comparável à da água. Em contraste, a metodologia que utilizou DMAP/EDC apresentou maior perda de massa (32,8 mg), evidenciando menor resistência à imersão, possivelmente associada a menor densidade ou à distribuição inadequada das ligações covalentes.

A análise termogravimétrica (TGA) das amostras (**Figura 8**), em conjunto com suas curvas derivadas (DTGA) (**Figura 9**), evidenciou perfis de degradação térmica característicos dos sistemas polissacarídicos avaliados.

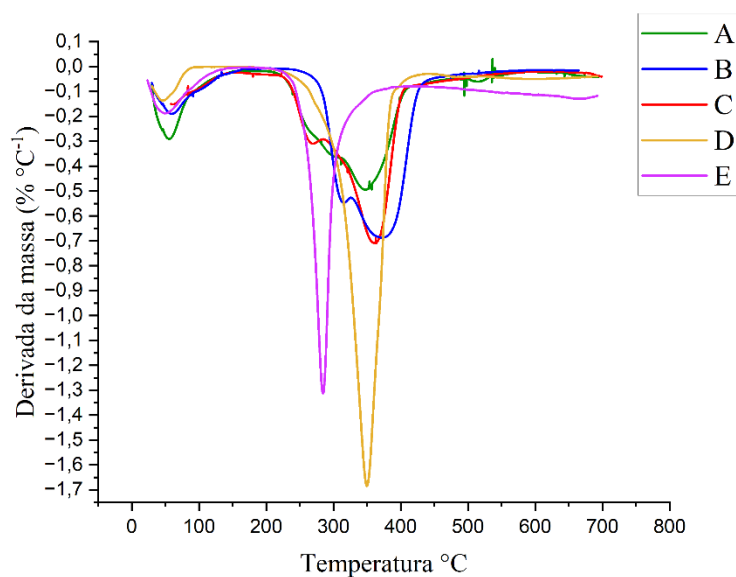
Figura 8 - Curvas de análise termogravimétrica (TGA) dos filmes obtidos por diferentes metodologias: (A) aquecimento, (B) DMAP/EDC, (C) irradiação UV, bem como dos polímeros de referência: (D) EHEC purificada e (E) quitosana.



Fonte: Autora (2025).

Observa-se, inicialmente, uma etapa de perda de massa próxima de 100 °C, atribuída à eliminação de água fisicamente adsorvida e, possivelmente, de solventes residuais. As perdas associadas a essa etapa foram de aproximadamente 14% para a amostra submetida à irradiação UV, 18% para a amostra reticulada com DMAP/EDC e 18% para o sistema obtido por aquecimento. Esse comportamento é típico de derivados celulósicos, como a EHEC, devido à sua elevada capacidade de retenção de água (Poletto; Ornaghi Jr.; Zattera, 2014). Na curva DTG (**Figura 9**), esse evento é evidenciado por um ombro ou pico discreto entre 50 e 120 °C.

Figura 9 - DTGA das 3 metodologias de reticulação e dos polímeros puros: (A) aquecimento, (B) DMAP/EDC, (C) irradiação UV, (D) EHEC purificada e (E) Quitosana



Fonte: Autora (2025).

A principal etapa de degradação ocorreu entre 300 e 400 °C, associada à ruptura das cadeias poliméricas, incluindo a clivagem de ligações glicosídicas, a depolimerização e a formação de resíduo carbonáceo. A EHEC purificada (D) apresentou degradação mais abrupta entre 300 e 380 °C, comportamento típico de éteres de celulose não reticulados e predominantemente amorfos. Em contraste, a quitosana pura (E) exibiu um perfil de degradação mais gradual e distribuído em uma faixa de temperatura mais ampla, além de maior resíduo final, atribuídos à sua natureza parcialmente cristalina e à presença de grupos amino, que favorecem a formação de estruturas carbonáceas mais estáveis durante a carbonização.

Os filmes reticulados (A – C) apresentaram comportamento térmico intermediário entre os polímeros puros, indicando que a incorporação da quitosana à matriz de EHEC oxidada contribui para o aumento da estabilidade térmica em relação à EHEC isolada, enquanto o processo de modificação química reduz parcialmente a estabilidade observada na quitosana pura. Esses resultados corroboram a formação de uma rede polimérica híbrida, na qual as interações químicas e físicas entre EHECox e quitosana modulam o perfil de degradação térmica, conforme a metodologia de reticulação adotada.

A análise das curvas de DTGA (**Figura 9**) permite comparar com maior precisão as temperaturas de máxima taxa de degradação. Entre os sistemas reticulados, a amostra obtida via DMAP/EDC apresentou leve deslocamento do pico

máximo para temperaturas mais elevadas, sugerindo ganho relativo de estabilidade térmica, possivelmente em função de maior densidade de reticulação e da formação de ligações covalentes mais estáveis. O filme preparado por irradiação UV apresentou discreto deslocamento para temperaturas ligeiramente inferiores, indicando possível redução moderada da estabilidade térmica, possivelmente associada a eventos de fotodegradação parcial. Já o sistema reticulado por aquecimento apresentou comportamento intermediário, com transição térmica mais gradual.

De modo geral, embora os perfis de degradação sejam semelhantes, as diferenças observadas nas Figuras 8 e 9 indicam que a metodologia de reticulação influencia a organização estrutural e a estabilidade térmica do sistema, sendo o tratamento com DMAP/EDC o que apresenta o maior ganho relativo de estabilidade entre as metodologias avaliadas.

Ademais, a temperatura de início e de término da degradação, a porcentagem de massa residual e o pico máximo da curva DTGA foram determinados conforme apresentado na **Tabela 1**. Ressalta-se que, quanto mais eficiente for o processo de reticulação, maior tende a ser a temperatura de degradação do polímero, em razão do aumento da estabilidade térmica proporcionado pela formação de ligações covalentes adicionais na rede polimérica (Canevarolo, 2010).

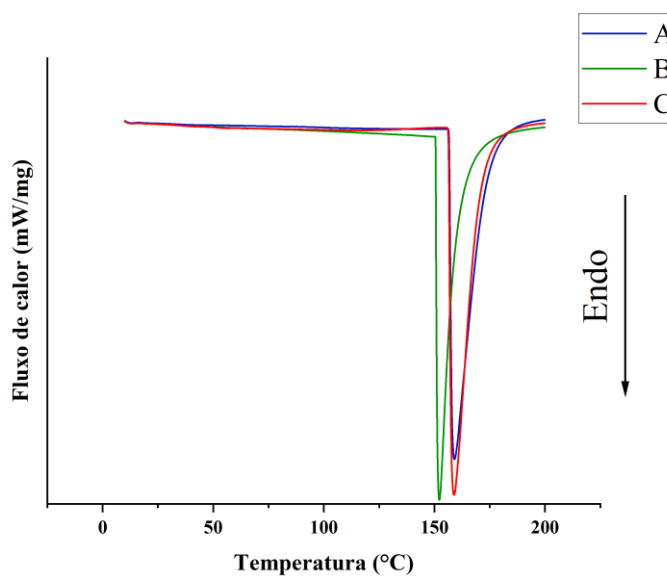
Tabela 1 - Temperaturas de degradação obtidas por TGA e DTGA para os filmes preparados pelos diferentes métodos de reticulação: (A) aquecimento, (B) EDC/DMAP, (C) radiação UV (D) EHEC purificada e (E) Quitosana.

Método	T_{início} degradação (°C)	T_{final} degradação (°C)	% Mássica restante	DTGA_{máx} (°C)
A	260,10	404,92	18,32	349,05
B	284,57	446,87	18,35	373,83
C	261,19	425,64	13,43	362,48
D	262,71	385,83	6,27	350,13
E	247,18	319,86	25,12	283,81

Fonte: Autora (2025).

Para complementar a análise térmica, foi realizada calorimetria diferencial exploratória (DSC) para investigar as transições térmicas dos filmes híbridos de EHECox e quitosana. A análise contemplou as amostras obtidas pelas três metodologias de reticulação (**Figura 10**).

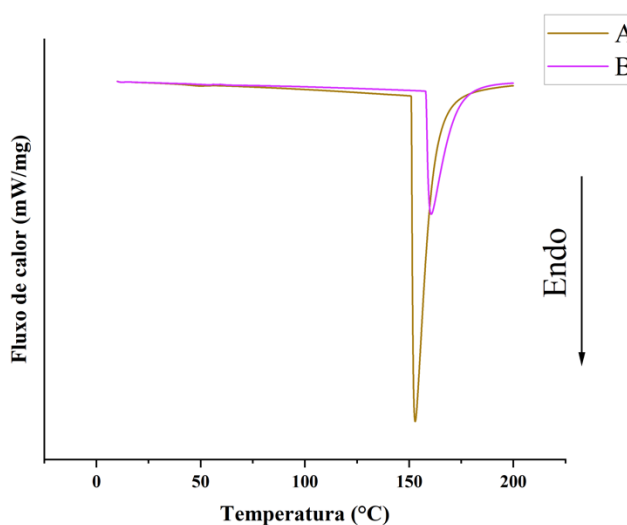
Figura 10 - DSC das três metodologias (A) aquecimento, (B) EDC/DMAP e (C) Radiação UV



Fonte: Autora (2025).

Ademais, as amostras de EHEC purificada e quitosana comercial foram utilizadas como referência (**Figura 11**).

Figura 11 - DSC de (A) quitosana e (B) EHEC



Fonte: Autora (2025).

Os resultados referem-se exclusivamente ao primeiro aquecimento, uma vez que o objetivo era avaliar apenas os efeitos da modificação e da preparação do polímero (**Tabela 2**). Os valores de temperatura de degradação térmica dos filmes reticulados foram semelhantes aos observados para os filmes puros de quitosana e EHEC. Essa temperatura está relacionada ao início da decomposição térmica do polímero e reflete a estabilidade térmica e as interações estruturais do material. A quitosana apresentou ΔH de 292,5 J/g, associado à sua natureza parcialmente cristalina. Já a EHEC, predominantemente amorfa, apresentou menor ΔH experimental (135,8 J/g), indicando ausência de regiões cristalinas relevantes. As temperaturas observadas foram de 152,9 °C para a quitosana e 160,6 °C para a EHEC purificada.

A similaridade nas temperaturas de degradação sugere que a reticulação não foi suficientemente eficiente para alterar de forma significativa a estabilidade térmica do sistema. Em polímeros reticulados, a degradação térmica geralmente ocorre antes de qualquer processo de fusão, pois a rede tridimensional restringe a mobilidade das cadeias, impedindo a transição para o estado fundido (Canevarolo, 2010). As amostras reticuladas por EDC/DMAP ($\Delta H = 206,8$ J/g) ou por aquecimento/UV ($\Delta H \approx 262$ J/g) ainda apresentam certa organização estrutural associada à quitosana, indicando que a reticulação não eliminou completamente essas regiões. Assim, os resultados sugerem que os filmes preservam características da quitosana

parcialmente cristalina, enquanto a EHEC permanece predominantemente amorfa, influenciando as propriedades térmicas observadas.

Tabela 2 - Temperatura de degradação (T_d) e entalpia de fusão experimental (ΔH_f) das amostras obtidas pelos diferentes métodos de reticulação: (A) aquecimento, (B) EDC/DMAP e (C) radiação UV.

Método	T_m (°C)	$\Delta H_{f_{\text{experimental}}}$ (J/g)
A	159,1	265,5
B	152,2	206,8
C	158,9	262,3

Fonte: Autora (2025).

Após todas as análises, a metodologia que utilizou radiação UV foi selecionada para a continuidade dos ensaios, por apresentar maior estabilidade estrutural e maior resistência em meio aquoso. Essa escolha metodológica é sustentada não apenas pelos resultados superiores nos testes de solubilidade, que demonstraram maior estabilidade dos materiais em meio aquoso, mas também pelo diferencial ambiental da abordagem empregada. Além de conferir maior resistência à água, a metodologia adotada elimina o uso de agentes reticulantes potencialmente tóxicos, evitando a presença de resíduos indesejáveis no material final. Trata-se, portanto, de uma estratégia mais segura, ambientalmente responsável e alinhada aos princípios da Química Verde, que agrega valor científico e tecnológico à proposta.

Uma vez otimizadas as condições de reticulação, foram realizados ensaios de controle para avaliar a influência da bio-oxidação e da exposição à radiação UV sobre a estabilidade dos filmes em meio aquoso (Tabela 3). Filmes de EHEC sem oxidação, de EHEC oxidada durante 1 a 4 h foram comparados quando expostos ou não à luz UV por 2 h. Além disso, uma reação controle contendo EHEC sem oxidação e quitosana, mas sem exposição à luz UV, foi realizada. Como controle adicional, avaliou-se também um filme constituído exclusivamente por quitosana submetida à irradiação UV (254 nm) por 2 h, a fim de investigar o efeito isolado da radiação sobre a estabilidade do polímero.

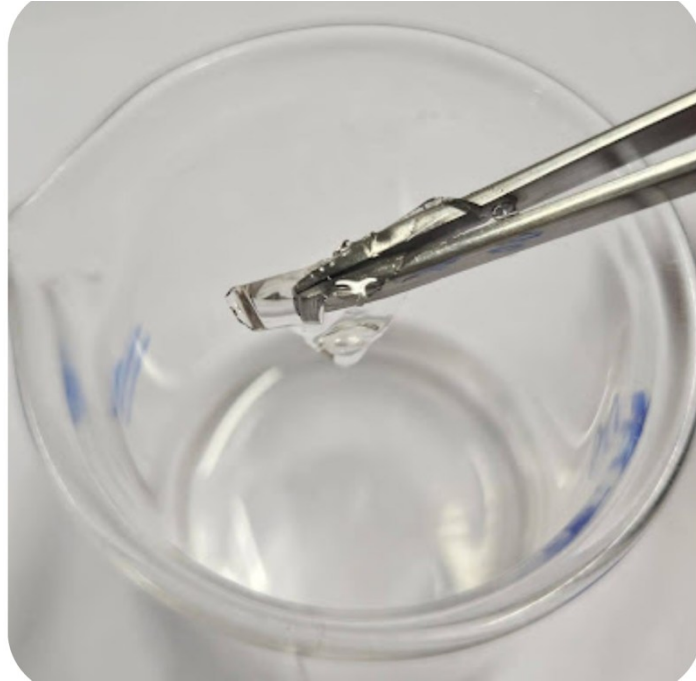
Tabela 3 - Filmes de EHEC sob diferentes condições de preparo: (A) EHEC purificada; (B) EHEC purificada exposta à radiação UV (254 nm); (C) EHEC bio-oxidada (1 – 4 h); (D) EHEC bio-oxidada (1 – 4 h) exposta à radiação UV, (E) EHEC purificada reticulada com quitosana; e (F) Quitosana exposta à radiação UV.

Amostra	Oxidação	Reticulação com quitosana	Exposição UV (254 nm)	Tempo de solubilização
A	Não	Não	Não	~ 40 min
B	Não	Não	Sim	~ 40 min
C	Sim	Não	Não	~ 2 h
D	Sim	Não	Sim	~ 2 h
E	Não	Sim	Não	~ 10 dias
F	Não	Não	Sim	~ 48 h

Fonte: Autora (2025).

A resistência a submersão em água para todos os controles realizados foi menor que a reação empregando EHECox e quitosana expostos à luz UV. Esses resultados reforçam que, na ausência de um processo eficiente de reticulação e, sobretudo, de oxidação prévia da EHEC, não há formação de uma rede polimérica suficientemente estável e durável (**Figura 12**).

Figura 12 – EHEC não oxidada reticulada com quitosana após submersão em água por 15 min



Fonte: Autora (2025).

No entanto, há de se notar que a exposição à luz UV, mesmo sem a presença dos grupos COOH, parece fornecer a possibilidade de interações, mesmo que não covalentes, entre as cadeias dos polímeros, gerando uma certa estabilidade à umidade (**Figura 13**).

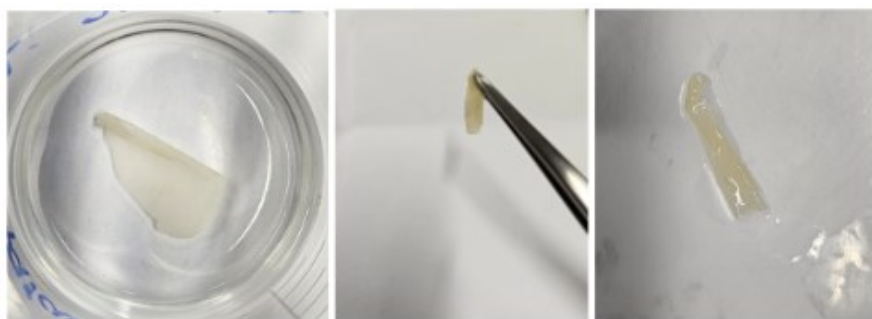
Figura 13 - EHEC purificada não reticulada com quitosana exposta a irradiação UV após submersão em água por 15 min



Fonte: Autora (2025).

Sabendo da importância da etapa de bio-oxidação para a resistência do filme, outros testes expuseram uma solução de EHECox preparada por reação em 1, 2, 3 e 4 h e quitosana sob irradiação por luz UV por 2 h. Os filmes obtidos se tornaram completamente insolúveis em água, mantendo sua integridade por até 3 meses (Figura 14).

Figura 14 - Amostra de EHECox (4 h) reticulada com quitosana, exposta à radiação UV (254 nm) e submersa em água por três meses



Fonte: Autora (2025).

Esse comportamento evidencia a formação de uma rede polimérica estável, sustentada por ligações covalentes entre os grupos carboxila ($-\text{COOH}$) da EHECox e amino ($-\text{NH}_2$) da quitosana, comprovando a eficiência da reticulação química entre os dois polímeros.

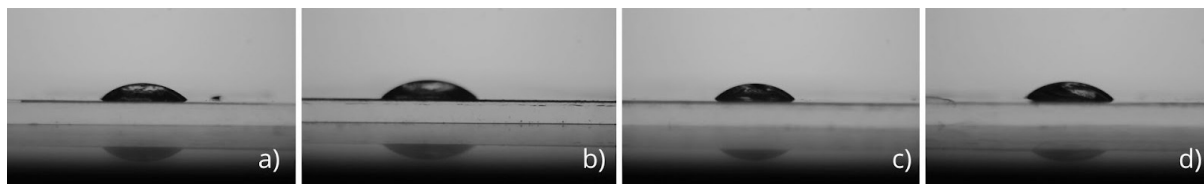
5.2 OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE OXIDAÇÃO DA EHEC (EHECox)

Para melhor avaliar os tempos de oxidação da EHEC, etapa fundamental na preparação dos filmes, foram novamente realizadas reações de oxidação da EHEC. Esses testes utilizaram a metodologia previamente descrita, com solubilização prévia da EHEC purificada por 24 h, adição de lacase e TEMPO e manutenção de agitação orbital e oxigenação por 1 a 4 h.

Em seguida, uma alíquota das reações foi seca e os filmes resultantes tiveram seus ângulos de contato medidos. Os filmes apresentaram baixa estabilidade estrutural e ângulos com médias de $40,81^\circ$ (1 h), $40,78^\circ$ (2 h), $39,23^\circ$ (3 h) e $39,92^\circ$ (4 h), resultando em uma média geral de $40,19 \pm 0,79^\circ$. A reduzida dispersão dos dados

indica variação mínima entre os tempos de bio-oxidação avaliados. No entanto, observa-se maior molhabilidade em comparação à EHEC purificada ($56,5^\circ$), o que pode ser atribuído à presença de grupos $-\text{COOH}$ expostos na superfície, indicando que a oxidação isolada não promove aumento da hidrofobicidade (**Figura 15**).

Figura 15 - EHEC bio-oxidada por (A) 1 h, (B) 2 h, (C) 3 h e (D) 4 h, sem quitosana e sem UV.



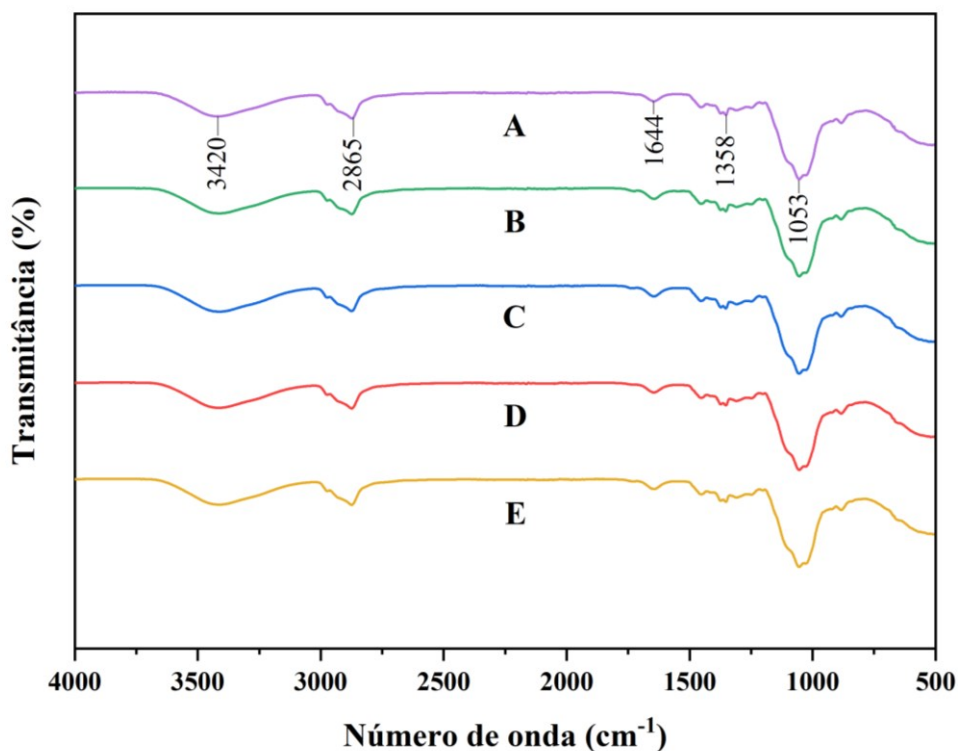
Fonte: Autora (2025).

Os ângulos de contato inferiores a 41° indicam a natureza hidrofílica da superfície, com leve aumento da molhabilidade ao longo do tempo de oxidação. Isso se deve ao acúmulo de grupos $-\text{COOH}$ na superfície, que favorecem interações com água. A baixa estabilidade estrutural das amostras reforça o papel da reticulação com essa biomolécula na coesão da matriz, por meio de interações eletrostáticas e ligações cruzadas, resultando em maior exposição de grupos $-\text{COOH}$ em relação à EHEC purificada (Rehman; Raza; Masood, 2019).

Os espectros de FTIR das amostras de EHECox nos tempos de 1 a 4 h foram comparados ao EHEC sem oxidação (**Figura 16**) e apresentam bandas típicas de materiais polissacarídicos. A larga absorção em 3420 cm^{-1} corresponde ao estiramento O–H, indicando ligações de hidrogênio e a possível presença de água. A banda em 2865 cm^{-1} refere-se ao estiramento C–H de grupos metil e metileno, enquanto a de 1644 cm^{-1} está associada à deformação da água adsorvida ou ao estiramento C=O de grupos carbonila ou amida. Em 1358 cm^{-1} observa-se deformação C–H ou C–N, e em 1053 cm^{-1} o estiramento C–O–C e C–O característico de ligações glicosídicas. Essas bandas confirmam a natureza polissacarídica do material e sugerem que as variações observadas entre as amostras A–E decorrem da oxidação das cadeias poliméricas. A análise por FTIR das amostras bio-oxidadas por 1 a 4 h não apresentou variações significativas nas bandas espectrais, mantendo perfis similares tanto entre os diferentes tempos de oxidação quanto em relação à

EHEC não oxidada. Assim, tornou-se necessária a reticulação química com quitosana para avaliar, de forma mais precisa, a influência do tempo de oxidação no processo.

Figura 16 - Análise dos tempos de oxidação de (A) EHEC purificada, (B) 1 h, (C) 2 h, (D) 3 h e (E) 4 h

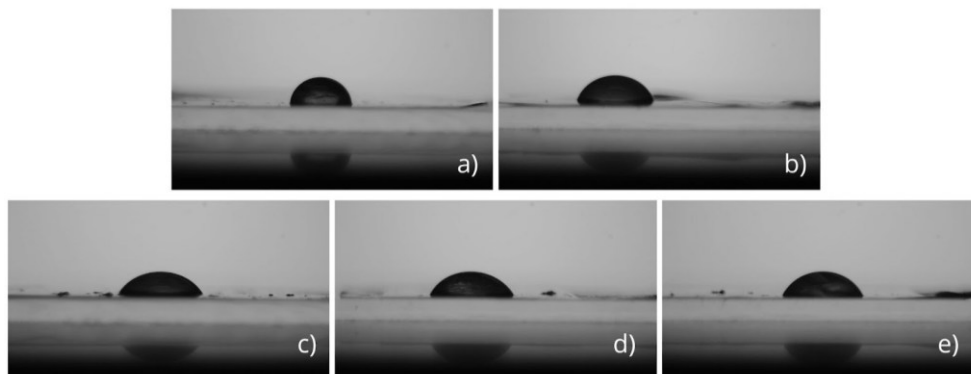


Fonte: Autora (2025).

Sendo assim, filmes produzidos por reticulação com EHECox (1 a 4 h) ou sem oxidar, reticulados com quitosana sob irradiação UV por 2 h, foram secos e novos testes de ângulo de contato foram conduzidos, esperando-se observar diferenças com a utilização de EHECox em diferentes tempos.

A reticulação aumentou a hidrofobicidade, com ângulo de contato de 82,9° para a EHEC reticulada (sem oxidação) em comparação a 56,5° para a EHEC pura. As amostras bio-oxidadas apresentaram ângulos inferiores, variando de 55,75° a 62,6°, com média de $59,18 \pm 4,84^\circ$ (**Figura 17**). O aumento da hidrofobicidade se deve à formação de ligações entre grupos NH_2 da quitosana e $-\text{COOH}$ da EHECox, reduzindo a exposição de grupos polares e alterando a rugosidade superficial (Liu, *et al*; 2024). A oxidação progressiva resultou em leve redução do ângulo de contato, sugerindo maior molhabilidade, contudo os diferentes tempos no processo de oxidação não geraram variações expressivas, indicando saturação na funcionalização

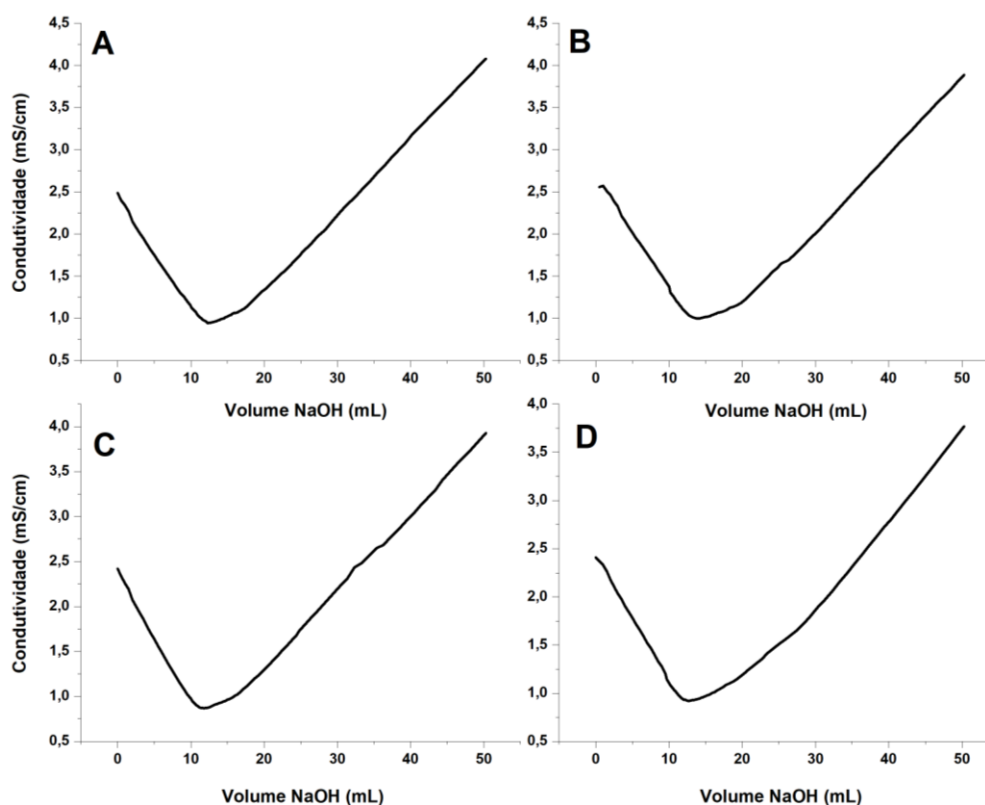
Figura 17 - Ângulos de contato dos filmes de EHEC e de quitosana: (A) sem oxidação; (B) após 1 h de oxidação; (C) após 2 h de oxidação; (D) após 3 h de oxidação; (E) após 4 h de oxidação.



Fonte: Autora (2025).

Para determinar o melhor tempo de bio-oxidação, também foi realizada a titulação condutométrica para quantificar o grau de oxidação (DO) da *EHECox*. O DO é um fator crucial na modificação química da celulose (Habibi *et al.*, 2006), pois influencia diretamente suas propriedades estruturais e funcionais, impactando características como a interação com polímeros, a molhabilidade e a capacidade de reticulação com a quitosana. A titulação condutométrica foi utilizada para monitorar a introdução de grupos -COOH na estrutura da *EHEC*, permitindo correlacionar o nível de oxidação com as propriedades dos filmes poliméricos obtidos. Esse método é amplamente empregado na caracterização de derivados celulósicos funcionalizados, fornecendo uma estimativa quantitativa da extensão da oxidação (**Figura 18**).

Figura 18 - Gráficos da titulação condutométrica: (A) *EHECox* 1 h + quitosana (UV); (B) 2 h; (C) 3 h; (D) 4 h.



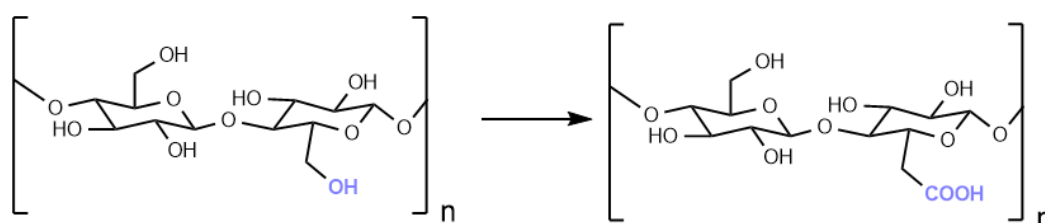
Fonte: Autora (2025)

Os resultados obtidos para os diferentes tempos de bio-oxidação (1–4 h), mantendo-se a reticulação fixa em 2 h, foram 0,153588; 0,184547; 0,150693 e 0,211090, respectivamente. A média dos valores foi de $0,17498 \pm 0,02854$, com coeficiente de variação de 16,3%, indicando variação moderada entre as amostras. Apesar do maior valor ter sido observado para 4 h de oxidação, a dispersão dos dados e a proximidade entre os resultados sugerem ausência de diferença significativa entre os tempos avaliados, indicando possível estabilização ou saturação dos grupos funcionais disponíveis na superfície da EHEC após as primeiras horas de reação. Dessa forma, os resultados foram considerados inconclusivos quanto à influência do tempo de oxidação nas propriedades avaliadas. Sendo assim, para os testes subsequentes, a oxidação de 1 h foi utilizada para otimizar os demais parâmetros de forma mais célere.

5.2.1 Análise estrutural da EHEC purificada e EHECox por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C

A caracterização estrutural da EHEC purificada e da EHECox foi realizada por espectroscopia de RMN de ^1H em D_2O , conforme apresentado no **Apêndice A**. O espectro da EHEC purificada, utilizado como referência, apresenta sinais característicos dos prótons do anel glicopiranosídico e dos grupos substituintes da cadeia lateral. A comparação entre os espectros da EHEC purificada e oxidada revela que não há diferenças significativas no perfil global do RMN de ^1H , o que é consistente com um processo de oxidação parcial (**Figura 19**).

Figura 19 - EHEC parcialmente oxidada



Fonte: Autora (2025)

De forma complementar, realizou-se a análise por RMN de ^{13}C , que indicou que a oxidação da EHEC ocorreu de forma limitada, visto que os espectros das amostras purificadas e oxidadas permanecem amplamente semelhantes. A ausência de um sinal claro de carbonila reforça a ideia de que o grau de oxidação foi baixo, característica típica de processos oxidativos suaves em derivados de celulose (Hirota *et al.*, 2009).

5.3 RETICULAÇÃO DA EHECox COM QUITOSANA

A reticulação da EHECox com quitosana visa formar ligações amídicas entre os grupos $-\text{COOH}$ da EHECox e os grupos $-\text{NH}_2$ da quitosana, resultando em uma rede polimérica estável. Embora a literatura descreva reações semelhantes com agentes como carbodiimidas e aziridinas (Tillet *et al.*, 2011), não foram encontrados relatos específicos de interação entre a quitosana e EHEC nesse contexto.

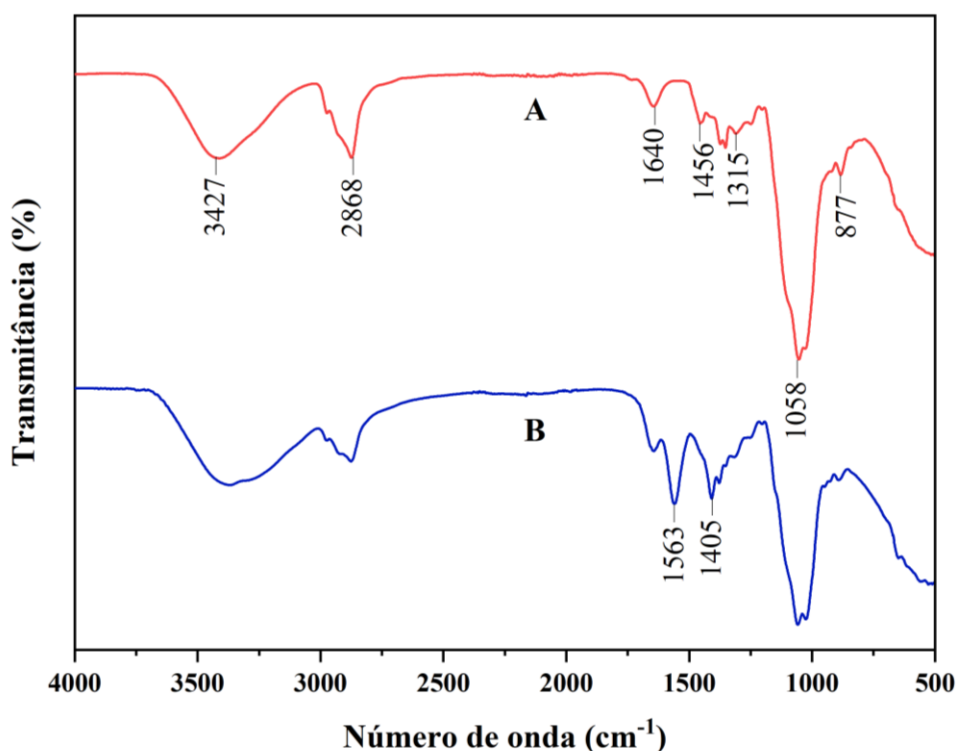
Com base nisso, foram conduzidos experimentos utilizando EHECox por diferentes tempos de reação (1 a 4 h), seguidos de reticulação com quitosana sob

irradiação UV (254 nm) por 2 h, resultando nos sistemas: EHECox1Q2, EHECox2Q2, EHECox3Q2 e EHECox4Q2.

A formação de ligações amídicas entre a EHECox e a quitosana contribui para reduzir a solubilidade dos filmes em meio aquoso, tornando-os adequados para aplicações que exigem estabilidade e resistência em ambientes úmidos. A interação química entre os grupos funcionais dos dois polímeros favorece a formação de uma rede tridimensional estável, capaz de integrar e potencializar as propriedades funcionais desejáveis de ambos os materiais.

A formação das ligações covalentes entre os polímeros pode ser inferida pela comparação dos espectros FTIR de EHECox com o filme gerado por reticulação entre EHECox e quitosana sob exposição UV (**Figura 20**).

Figura 20 - FTIR da amostra (A) EHECox (4h) e (B) EHECox4Q2



Fonte: Autora (2025)

Os espectros mostram diferenças entre a EHECox e a EHEC reticulada com quitosana, confirmando a reticulação bem-sucedida. A adição de quitosana, rica em grupos -OH e -NH_2 , apresenta modos vibracionais que aumentam as intensidades das bandas, especialmente na região de alongamento O-H (3400 cm^{-1}), devido às

interações de hidrogênio na rede reticulada. Destaca-se também a intensificação das bandas de flexão N–H acoplada ao alongamento C–N (região $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$), indicando a formação de ligações amida entre os grupos amino da quitosana e a carbonila do EHEC. Além disso, a banda de estiramento C=O em $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, presente no espectro B e ausente no espectro A, reforça a presença de ligações amida.

Visando compreender o efeito da exposição à radiação UV sobre a quitosana, uma solução do polímero foi submetida à irradiação UV (254 nm) por 2 h, o que resultou na formação de um filme. Observou-se que esse filme apresentou menor uniformidade e estabilidade visual, além de solubilização completa em água após 48 h, comportamento já descrito na Tabela 3, juntamente com os demais controles avaliados. A caracterização por FTIR do filme de quitosana irradiado, apresentada no **Apêndice B**, evidencia alterações sutis em comparação à quitosana não irradiada, sugerindo reorganizações estruturais e possíveis processos oxidativos induzidos pela radiação UV, como a intensificação de interações por ligações de hidrogênio e a modificação de grupos funcionais característicos do polímero.

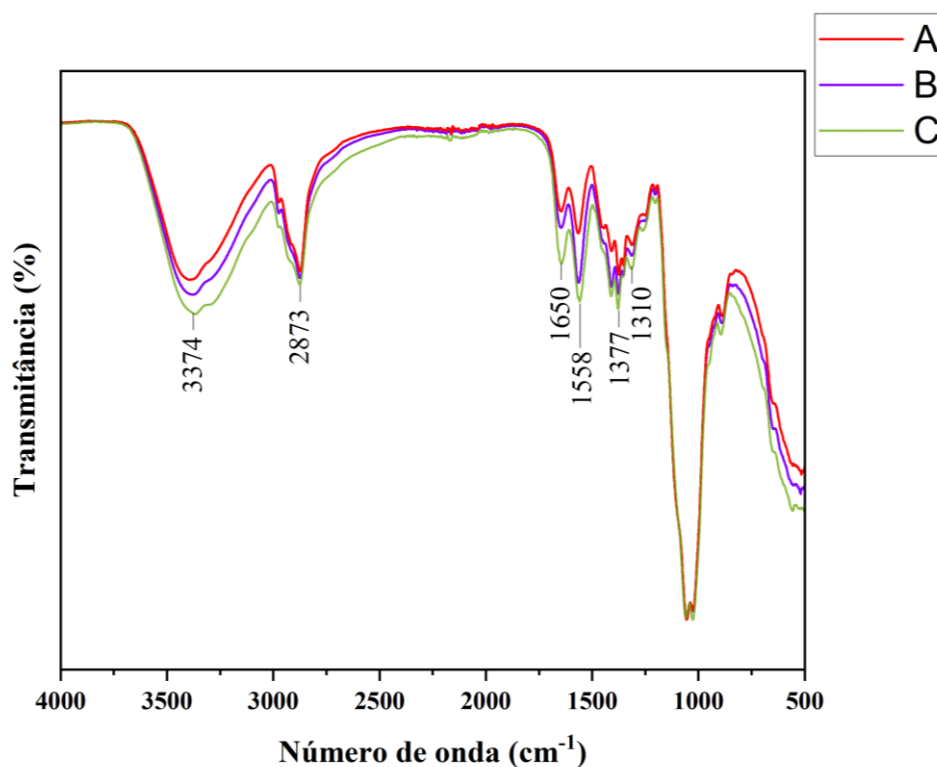
Esse comportamento contrasta com o observado para os filmes híbridos contendo EHEC, que apresentaram maior estabilidade estrutural e resistência à solubilização, ressaltando a importância das interações sinérgicas entre a quitosana e a EHEC na obtenção de materiais com propriedades físico-químicas aprimoradas, especialmente para aplicações que exigem estabilidade em meio aquoso.

5.3.1 Otimização da quantidade de quitosana para reticulação com EHECox

Foram testadas diferentes proporções de quitosana (15%, 25% e 50% em massa), mantendo-se constante a quantidade de EHECox (500 mg), oxidada por 1 h. Observou-se que o aumento da concentração de quitosana intensificou a coloração amarelada dos filmes. Após 40 min de submersão em água, os filmes com 75 mg (15%) e 125 mg (25%) de quitosana se fragmentaram, enquanto o filme com 250 mg (50%) manteve sua integridade por 3 meses. Além disso, os filmes com menor teor de quitosana apresentaram maior inchaço, enquanto os de 50% apresentaram melhor estabilidade e menor absorção de água. Após 53 dias de imersão, apenas a amostra com 15% se solubilizou completamente, enquanto as demais permaneceram estáveis, sendo a de 50% a mais resistente à degradação, possivelmente devido à formação de uma rede polimérica mais densa. As análises por FTIR confirmaram maior

intensidade nas bandas de amida I ($\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$) e II ($\approx 1558 \text{ cm}^{-1}$) na amostra com 250 mg de quitosana, sugerindo maior interação entre os grupos funcionais (**Figura 21**).

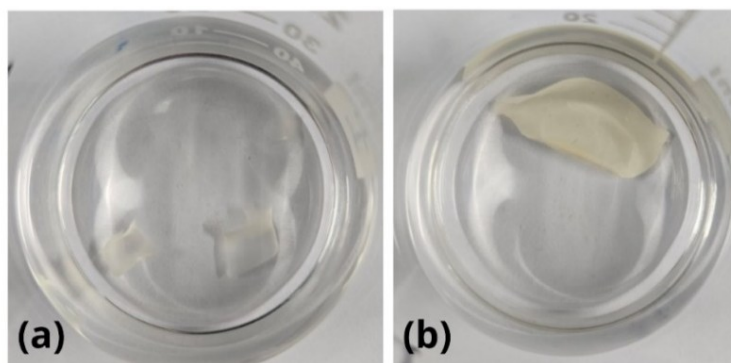
Figura 21 - FTIR do filme com (A) 15% de quitosana , (B) 25% e (C) 50%.



Fonte: Autora (2025)

Os ângulos de contato também reforçaram essa tendência: $60,1^\circ$ para 15%, $44,7^\circ$ para 25% e $62,6^\circ$ para 50%, indicando menor molhabilidade com maior teor de quitosana. Ademais, através de análises visuais, nota-se melhor integridade estrutural da amostra com 50% de quitosana (**Figura 22**).

Figura 22 - Filme de EHECox com 25% de quitosana (A) e (B) filme de EHECox com 50% de quitosana.



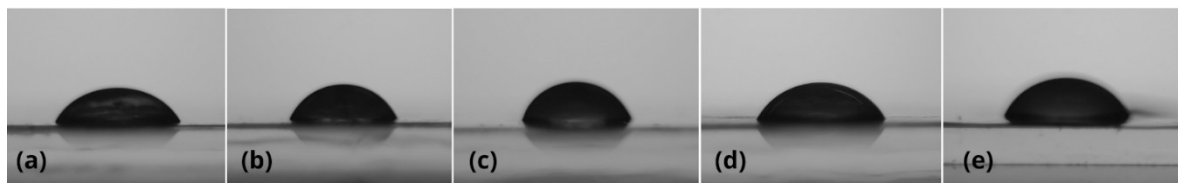
Fonte: Autora (2025).

5.3.2 Otimização do tempo de reticulação em UV (254 nm) de filmes de EHECox e EHEC não oxidada com quitosana

A otimização do tempo de reticulação dos filmes híbridos de EHEC oxidada (EHECox) e não oxidada com quitosana foi realizada para determinar o tempo de exposição à irradiação UV (254 nm) mais eficiente para promover a formação da rede polimérica, garantindo a estabilidade dos filmes em meio aquoso, sem comprometer sua integridade estrutural. Esse parâmetro é fundamental para viabilizar a aplicação de materiais em sistemas biomédicos ou de liberação controlada.

Os filmes foram submetidos à irradiação UV por 15, 30, 60, 90 e 120 min. Nos filmes produzidos com EHECox/quitosana, após 10 dias de submersão, todas as amostras permaneceram íntegras, mas, a partir do 11º dia, surgiram diferenças visíveis. Os filmes reticulados por 15 e 30 min apresentaram menor coesão estrutural. As amostras de 60 e 90 min se mantiveram espessas, coesas e com bordas bem definidas. O tempo de 90 min foi o mais eficiente, resultando em filmes translúcidos, uniformes e sem sinais de solubilização. A análise por FTIR sugere aumento da densidade de reticulação, evidenciado pelo incremento da banda C=O ($1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$), especialmente na amostra de 120 min. Os ângulos de contato indicaram leve redução na molhabilidade com o aumento do tempo de exposição, com valores de $54,3^\circ$ (15 min), $63,5^\circ$ (30 min), $66,5^\circ$ (60 min), $61,8^\circ$ (90 min) e $62,6^\circ$ (120 min), atribuída à menor disponibilidade de grupos hidrofílicos na superfície (**Figura 23**).

Figura 23 - (A) Amostra reticulada por 15 min; (B) 30 min; (C) 60 min; (D) 90 min; (E) 120 min.



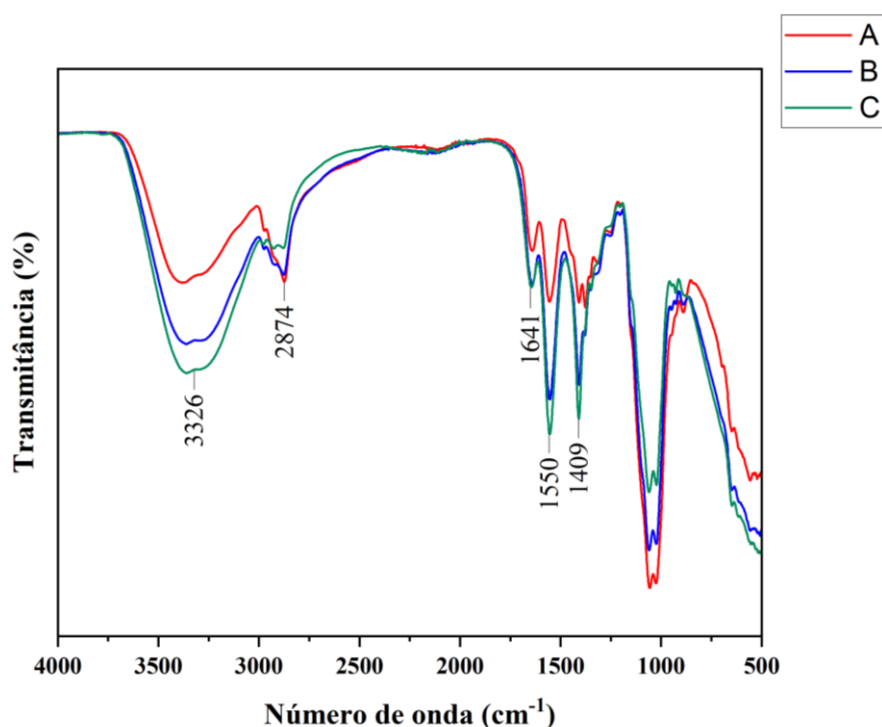
Fonte: Autora (2025).

Ensaio de controle com a EHEC não oxidada geraram filmes com comportamento inferior ao das formulações com EHECox. As amostras de 15, 30, 60, 90 e 120 min se dissolveram completamente em água. Dessa forma, conclui-se que a oxidação prévia da EHEC favorece a formação de redes poliméricas mais estáveis e eficientes quando associada à reticulação com quitosana sob radiação UV.

Apesar dos resultados positivos obtidos nos filmes produzidos pela reticulação da EHECox e da quitosana, as análises de FTIR revelaram que as intensidades das bandas de absorção variaram significativamente entre diferentes partes do mesmo filme, sugerindo homogeneidade insatisfatória. Diante disso, foi realizado um novo teste com tempo de reticulação de 24 h em câmara UV, visando promover maior uniformidade nas amostras. Para esse teste, EHEC oxidada durante 1 h ou 4 h foi utilizada para fins comparativos.

A análise dos espectros de FTIR revela que as amostras obtidas por reticulação de 24 h entre EHEC oxidada por 1 h e 4 h e quitosana (EHECox1Q24 e EHECox4Q24, respectivamente) apresentam bandas de maior intensidade na região entre 3360 e 1409 cm^{-1} , indicando um aumento expressivo na densidade de grupos funcionais e na organização estrutural da rede polimérica (**Figura 24**).

Figura 24 - FTIR dos filmes à base de EHEC e quitosana: (A) filme EHEC sem oxidação reticulado com quitosana por 24 h, (B) filme EHECox1Q24 e (C) filme EHECox4Q24.



Fonte: Autora (2025).

A amostra (C) apresentou bandas de maior intensidade, indicando que o aumento do tempo de oxidação, aliado a períodos prolongados de reticulação, influencia significativamente a organização estrutural dos filmes. Esse comportamento difere do observado nas amostras reticuladas por apenas 2 h, nas quais o tempo de oxidação não resultou em alterações expressivas.

Na amostra de EHECox4Q24, o ângulo de contato médio foi de 75,2°, superior ao das amostras reticuladas por 2 h sob as mesmas condições. Esse aumento sugere maior hidrofobicidade superficial, possivelmente decorrente de uma reticulação mais eficiente e densa promovida pelo maior tempo de exposição à radiação. Assim, a extensão da irradiação UV parece favorecer a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais dos polímeros, resultando em superfícies menos polares e menos propensas à interação com a água. Esses resultados reforçam que o tempo de exposição à radiação UV é um fator crítico na modulação das propriedades superficiais dos filmes.

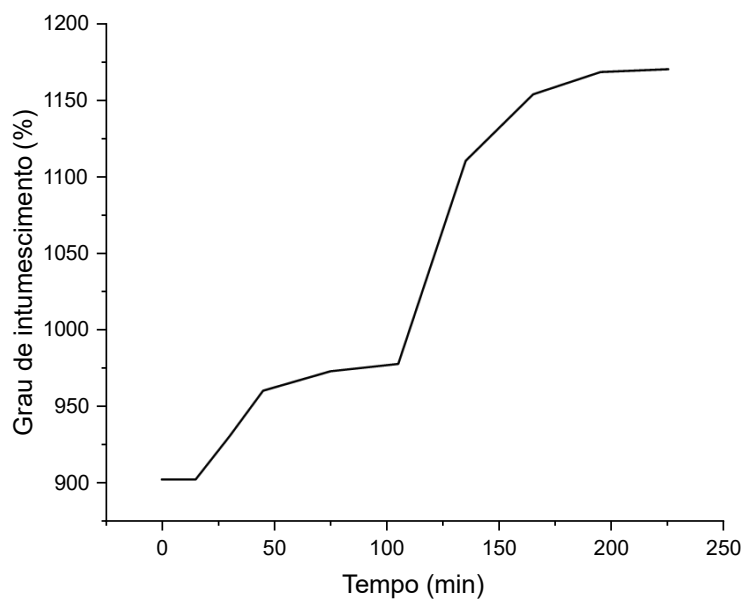
5.3.3 Avaliação do intumescimento e da absorção de água

O comportamento de intumescimento e a absorção de água dos filmes poliméricos EHECox1Q2 e EHECox4Q24 foram avaliados para investigar a influência do tempo de oxidação da EHEC e do grau de reticulação com quitosana sobre a estabilidade dos filmes em meio aquoso. Esses parâmetros são relevantes para aplicações em ambientes úmidos, pois refletem a integridade estrutural, a resistência à água e o grau de interação entre as cadeias poliméricas.

Observou-se que a amostra EHECox1Q2 apresentou tempo total de integridade de aproximadamente 3 h e 45 min em meio aquoso, enquanto a amostra EHECox4Q24 apresentou 6 h e 30 min de integridade, valor superior ao da amostra EHECox1Q2. Esse tempo de integridade está diretamente relacionado à manipulação das amostras. Quando não manipulados, os filmes permanecem insolúveis em água por até 3 meses; contudo, durante o manuseio, observa-se desintegração parcial do filme, reduzindo sua estabilidade em meio aquoso.

Apesar da diferença no tempo de integridade, os perfis de intumescimento das duas amostras não apresentaram variações muito expressivas. A primeira amostra (**Figura 25**) mostrou um leve aumento inicial no grau de intumescimento, seguido de um platô entre 50 e 100 min e, posteriormente, de um segundo crescimento mais acentuado a partir de aproximadamente 110 min, atingindo valores próximos de 1170%. Esse comportamento é compatível com hidrogéis poliméricos que apresentam absorção de água em múltiplas etapas, associada à difusão do solvente e à relaxação das cadeias poliméricas (Simoni, *et al.*, 2017). O segundo aumento pode estar relacionado a rearranjos estruturais internos ou à liberação progressiva de domínios inicialmente menos acessíveis.

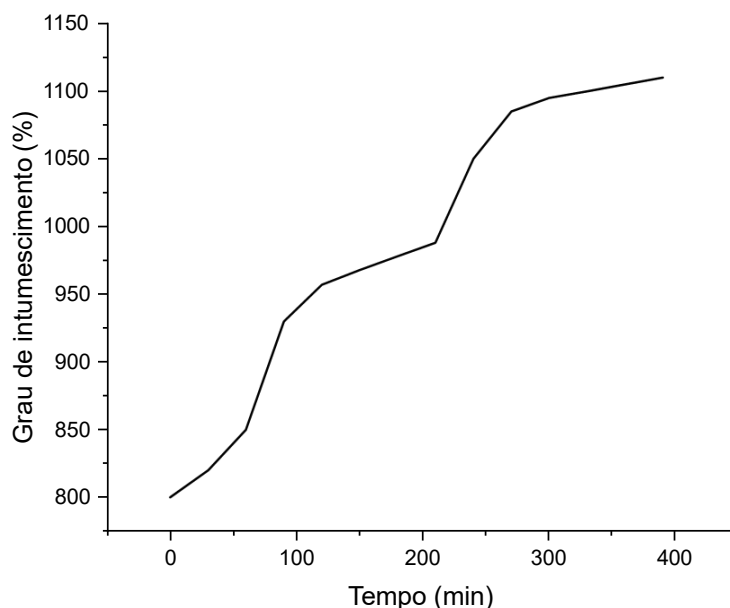
Figura 25 - Intumescimento do filme polímero EHECox1Q2



Fonte: Autora (2025).

A segunda amostra (**Figura 26**), oxidada por 4 h e reticulada por 24 h, exibiu um perfil de intumescimento semelhante, com valores ligeiramente inferiores, especialmente no pico final. Esse comportamento sugere uma rede polimérica ligeiramente mais densa e homogênea, o que pode explicar sua maior estabilidade em meio aquoso. No entanto, a diferença no grau de intumescimento entre as duas amostras foi modesta, indicando que os parâmetros de oxidação e reticulação influenciaram mais a estabilidade mecânica do que a capacidade de absorção de água.

Figura 26 - Intumescimento do filme polimérico de EHECox4Q24.



Fonte: Autora (2025).

A leve redução no grau de intumescimento observado na segunda amostra, em contraste com o aumento no tempo de integridade, sugere que a maior densidade de ligações cruzadas, gerada por tempos de oxidação e reticulação mais longos, não comprometeu significativamente a capacidade de absorção de água, mas contribuiu para o reforço estrutural da rede polimérica. Esse resultado indica que a manipulação dos parâmetros de síntese, como o tempo de oxidação da EHEC e a duração da exposição à quitosana sob irradiação UV, pode ser uma estratégia eficaz para otimizar a estabilidade mecânica do filme sem perdas substanciais de desempenho em absorção.

Esse comportamento é especialmente relevante em aplicações que exigem elevada resistência em meio aquoso, como sistemas de liberação controlada ou matrizes para engenharia de tecidos, nas quais a durabilidade da estrutura é mais crítica do que a absorção máxima. Nessas condições, formulações com maior grau de reticulação mostram-se mais adequadas, mesmo com uma leve redução no intumescimento. Ademais, a semelhança geral nos perfis de intumescimento das amostras sugere que a arquitetura fundamental da rede permanece funcional, e que os ajustes nos parâmetros de preparação afetam principalmente propriedades mecânicas e estabilidade, com impacto limitado na capacidade de absorção inicial (Eichenbaum *et al.*, 1999).

Dessa forma, o filme considerado ótimo corresponde à amostra obtida a partir da EHEC oxidada por 4 h e reticulada com quitosana por 24 h sob irradiação UV a 254 nm (**EHECox4Q24**). Essa formulação foi selecionada por apresentar o melhor equilíbrio entre estabilidade estrutural e resistência. O aumento do tempo de oxidação e da duração da reticulação favoreceu a formação de uma rede polimérica mais densa e homogênea, conforme evidenciado por bandas intensificadas nos espectros de FTIR ($3360\text{--}1409\text{ cm}^{-1}$), indicativas do fortalecimento das ligações amídicas e de hidrogênio entre os biopolímeros.

O filme apresentou um ângulo de contato médio de $75,2^\circ$, indicando um caráter moderadamente hidrofóbico e menor afinidade superficial com a água, possivelmente devido à maior eficiência de reticulação decorrente do prolongamento da exposição à radiação UV. Os testes de intumescimento evidenciaram uma discreta redução na absorção de água, acompanhada de aumento na integridade estrutural, sugerindo maior coesão da matriz polimérica, sem comprometimento significativo da capacidade de intumescimento. Em meio aquoso, o filme permaneceu insolúvel por três meses, confirmando a formação de uma rede reticulada estável e resistente à hidrólise.

5.3.4 Testes do filme EHECox4Q24 em diferentes pH

A solubilidade dos filmes poliméricos é um parâmetro fundamental para compreender sua estabilidade química e estrutural em diferentes ambientes, especialmente em aplicações que envolvem variações de pH, como sistemas biomédicos, ambientais e industriais. Nesse contexto, os filmes obtidos foram submetidos a ensaios de solubilidade em soluções aquosas com pH entre 2 e 14, a fim de avaliar o efeito do meio ácido, neutro e básico sobre a integridade e a resistência do material.

Em soluções com pH ajustado com ácido acético, observou-se a solubilização completa do filme EHECox4Q24 em pH 2 e 3, em apenas 30 minutos. No entanto, o filme manteve-se insolúvel em pH 4, observando-se apenas a perda da coloração amarelada característica. Já em pH 6 (sem ajuste) e nos pHs 5, 8, 10, 11, 12, 13 e 14, ajustados com NaOH, os filmes mantiveram-se insolúveis, estruturalmente íntegros e conservaram a coloração amarelada. Esses resultados indicam que a solubilidade dos filmes ocorre apenas em condições altamente ácidas ($\text{pH} < 3$), o que é compatível com a hidrólise de ligações amida (Zahn, 2003). Ademais, observou-se que os filmes

mantidos em pHs superiores a 12 apresentaram maior integridade estrutural ao longo do tempo, quando comparados aos ensaios previamente realizados. Nessas condições, o filme submerso em meio altamente alcalino manteve sua integridade por até cinco meses (**Figura 27**).

Figura 27 - EHECox4Q24 em solução alcalina submersa por cinco meses.



Fonte: Autora (2025).

Esse padrão sugere que a reticulação entre a EHECox e a quitosana ocorreu majoritariamente por meio da formação de ligações amídicas estáveis, conferindo ao material resistência à solubilização em ambientes neutros e básicos e sensibilidade apenas à degradação em condições de acidez extrema.

5.3.5 Testes em diferentes solventes orgânicos do filme EHECox4Q24

Realizou-se um ensaio de solubilidade empregando 800 μ L de cada solvente: clorofórmio (29,4 mg de amostra), acetonitrila (31,8 mg) e DMSO (35,1 mg). O filme permaneceu insolúvel em todas as condições testadas. A insolubilidade simultânea em um solvente apolar (clorofórmio), em um solvente polar aprótico moderado (acetonitrila) e em um solvente polar aprótico forte (DMSO) indica a presença de interações intermoleculares intensas, formação de ligações covalentes e/ou elevado grau de reticulação na matriz polimérica. Esse comportamento é característico de materiais termicamente- ou quimicamente reticulados, nos quais a formação de ligações covalentes entre unidades estruturais reduz drasticamente a solubilidade,

mesmo em solventes de alta polaridade e forte capacidade de solvatação (Song *et al.*, 2023).

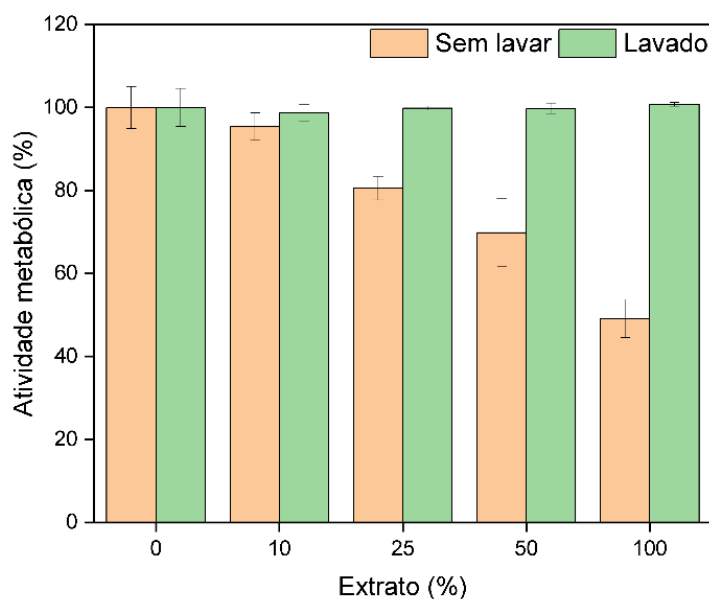
Em particular, o insucesso do DMSO, solvente com elevada constante dielétrica e forte capacidade de formar ligações de hidrogênio, em promover a desagregação do filme sugere que a rede apresenta vínculos estruturais robustos, como ligações covalentes de reticulação e/ou uma densa malha de ligações de hidrogênio, responsáveis por conferir elevada estabilidade estrutural e resistência à solvatação (Song *et al.*, 2023).

5.3.6 Citotoxicidade do filme EHECox4Q24

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos filmes obtidos, realizou-se a caracterização biológica do material por meio de ensaios de citotoxicidade por extrato e de contato direto, com fibroblastos da linhagem L929, conforme as diretrizes da norma ISO 10993-5. Os ensaios foram conduzidos considerando amostras lavadas e não lavadas, a fim de investigar a influência de eventuais resíduos do processo de obtenção do filme sobre a viabilidade celular.

Na avaliação da citotoxicidade por extrato (**Figura 28**), verificou-se que o material não lavado apresentou redução da viabilidade celular nas concentrações de 50% e 100%, com valores inferiores ao limite de 70% estabelecido pela ISO 10993-5. Esses resultados indicam a presença de compostos residuais liberados durante a hidratação inicial do filme. No entanto, após a lavagem do material com PBS por 2 h, nenhuma das concentrações testadas apresentou redução da atividade metabólica em comparação ao controle, evidenciando a remoção eficiente desses resíduos e a ausência de efeitos citotóxicos do filme lavado.

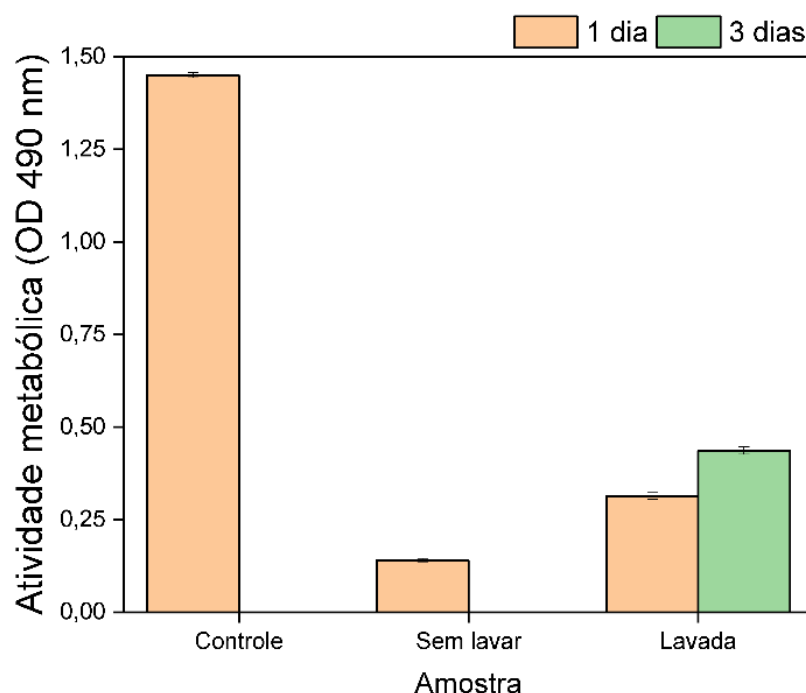
Figura 28 - Avaliação da citotoxicidade por MTS do extrato da membrana em fibroblastos L929 após 24 h de tratamento. O controle negativo (–) representa 100% de viabilidade celular.



Fonte: Autora (2025).

No ensaio de contato direto (**Figura 29**), resultados compatíveis foram observados. O material sem lavagem promoveu baixa atividade metabólica celular após 24 h de contato, sugerindo dificuldade de adesão e possível interferência de componentes tóxicos na superfície do filme. Em contraste, o material lavado permitiu a adesão celular e apresentou aumento da atividade metabólica entre 24 e 72 h, indicando manutenção da viabilidade celular ao longo do tempo. Embora esse aumento não caracterize proliferação, confirma a biocompatibilidade inicial do biomaterial e sua capacidade de sustentar interação célula-superfície.

Figura 29 - Avaliação da citotoxicidade por ensaio de redução de MTS de fibroblastos L929 cultivados sobre o material por 1 e 3 dias. O controle corresponde à placa de cultura após 24 h de adesão.



Fonte: Autora (2025).

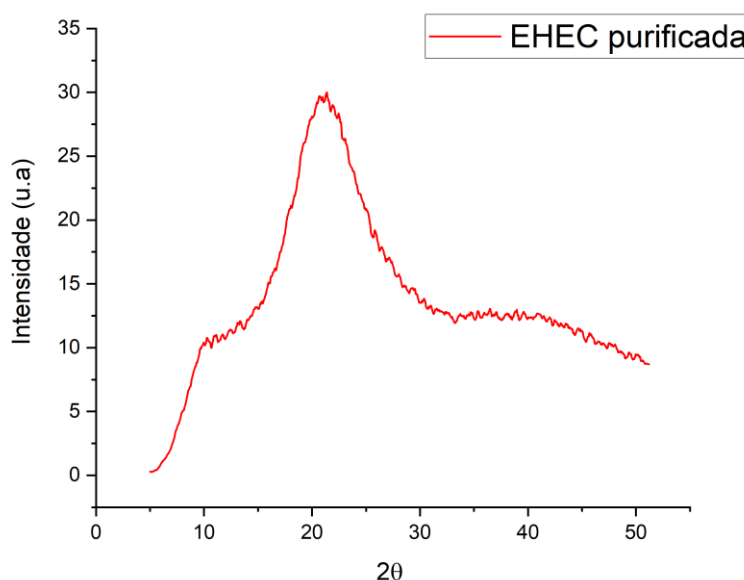
A citotoxicidade observada nos filmes de quitosana não lavados pode estar relacionada à presença de resíduos do ácido acético utilizado na etapa de solubilização da quitosana. Estudos mostram que filmes de quitosana preparados com diferentes ácidos orgânicos, incluindo o ácido acético, podem reduzir a viabilidade celular de fibroblastos em concentrações elevadas, indicando que os resíduos desses ácidos influenciam diretamente a resposta citotóxica (Eulálio *et al.*, 2020). De modo semelhante, verificou-se que soluções de ácido acético, mesmo em baixas concentrações, podem causar efeitos citotóxicos nas células, reforçando o papel desse componente na diminuição da viabilidade observada (Toledo, 2015).

Sendo assim, a toxicidade dos filmes não lavados pode ser atribuída à liberação de resíduos ácidos retidos na matriz polimérica, os quais comprometem a viabilidade celular durante o contato inicial com o meio de cultura. A lavagem prévia do filme EHECox4Q24, portanto, mostrou-se essencial para eliminar esses resíduos e garantir a biocompatibilidade necessária para aplicações biomédicas (Eulálio *et al.*, 2020; Toledo, 2015).

5.3.7 DRX do filme de EHEC purificada e EHECox4Q24

O difratograma da EHEC purificada (**Figura 30**) apresenta um halo largo e difuso, sem picos estreitos e bem definidos, característico de materiais amorfos ou com baixo grau de cristalinidade. Esse comportamento indica a ausência de ordem estrutural de longo alcance, sugerindo que as cadeias poliméricas se encontram desorganizadas e não formam domínios cristalinos evidentes. Em derivados de celulose, esse padrão é amplamente relatado na literatura e está associado à destruição parcial das regiões cristalinas durante processos de modificação química e purificação, que promovem a ruptura de ligações de hidrogênio e o aumento da desordem molecular (Segal *et al.*, 1959; French, 2014). Assim, o padrão observado confirma que a amostra apresenta estrutura majoritariamente amorfa, com baixa capacidade de difração e, portanto, baixo grau de cristalinidade.

Figura 30 - Difratograma da EHEC purificada.

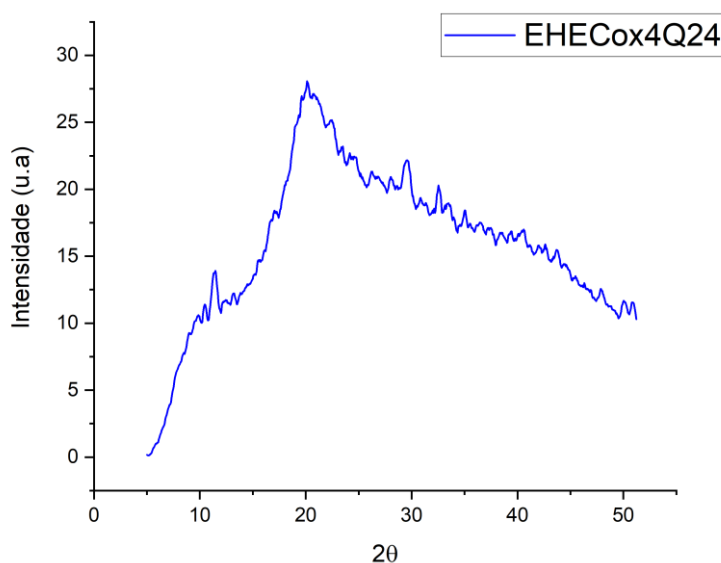


Fonte: Autora (2025).

O mesmo comportamento é observado no filme EHECox4Q24 (**Figura 31**), cujo difratograma também exibe um halo difuso, sem picos de Bragg intensos e definidos. Tal resultado demonstra que, mesmo após o processo de oxidação e

subsequente tratamento químico, não houve reorganização significativa das cadeias poliméricas capaz de restabelecer regiões cristalinas. A introdução de grupos funcionais oxigenados tende a interromper a regularidade e o empacotamento das cadeias de celulose, reduzindo ainda mais a cristalinidade e aumentando a fração amorfa (Park *et al.*, 2010; French, 2020).

Figura 31 - Difratograma do filme EHECox4Q24.



Fonte: Autora (2025).

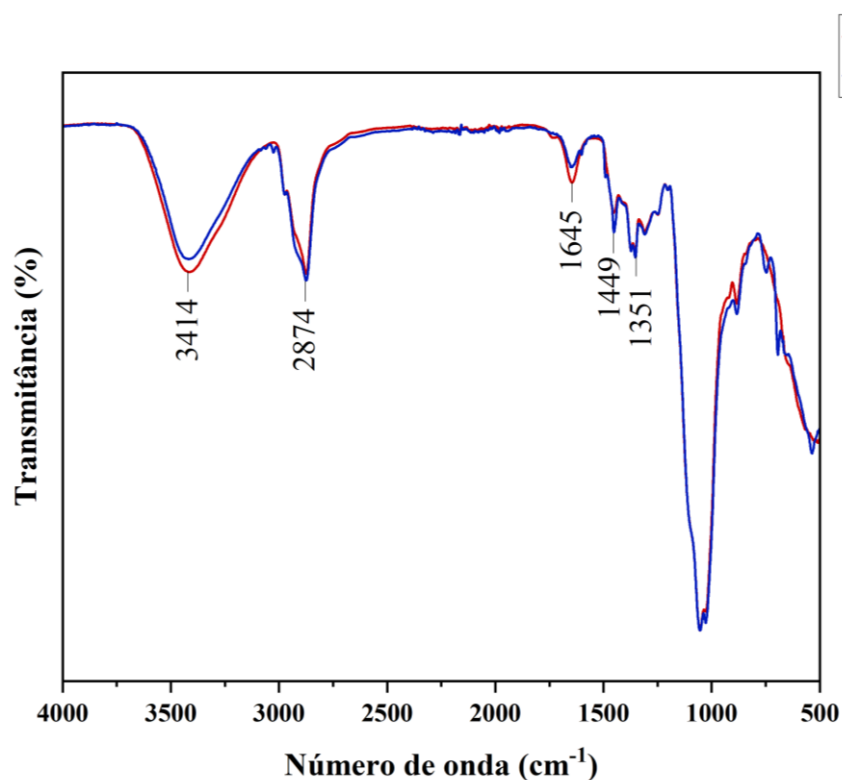
Portanto, tanto a EHEC purificada quanto o filme EHECox4Q24 apresentam características estruturais essencialmente amorfas, com ausência de picos cristalinos e presença de um halo amplo típico de materiais desordenados. Esse comportamento é coerente com o esperado para derivados de celulose modificados, em que a funcionalização química provoca a desorganização da rede supramolecular originalmente presente na celulose nativa (Klemm *et al.*, 2005).

5.3.8 Ciclos de reuso da lacase na bio-oxidação da EHEC e avaliação por FTIR/reticulação para EHECox4Q24

As amostras de EHEC obtidas ao final de cada ciclo de reutilização da lacase foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de

Fourier (FTIR). A **Figura 32** mostra o espectro da EHEC oxidada após 4 h de reação, utilizando a mesma lacase por quatro ciclos consecutivos. Observa-se preservação da estrutura química do polímero, com leve redução nas bandas de -OH (3414 cm^{-1}) e carbonila (C=O , 1645 cm^{-1}), indicando estabilidade estrutural da EHECox e redução gradual da eficiência catalítica da lacase ao longo dos ciclos.

Figura 32 - FTIR da EHECox (4 h) com lacase reutilizada: (A) 1ª, (B) 4ª utilização.



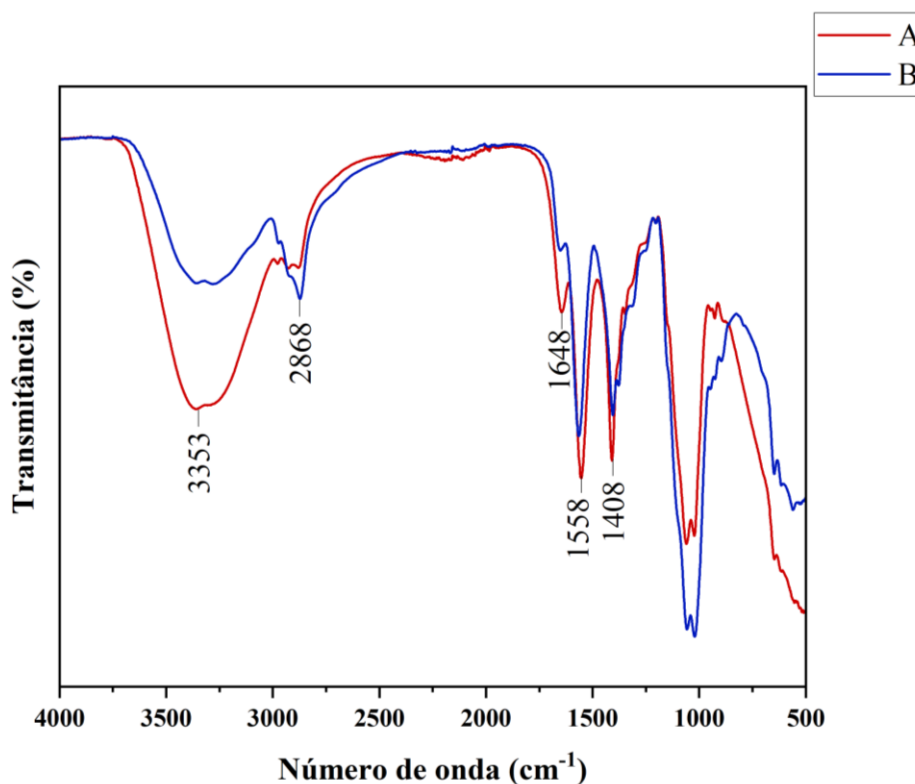
Fonte: Autora (2025).

Ao final do primeiro ciclo de reutilização, foi possível recuperar aproximadamente 8,0 mg de lacase a partir dos 15,0 mg inicialmente utilizados no processo de oxidação, o que corresponde a um rendimento de 53,0%. No segundo ciclo, a massa recuperada foi de 7,6 mg, resultando em um rendimento de 50,7%, o que indica uma discreta redução na eficiência de recuperação enzimática. Já no terceiro ciclo, a quantidade obtida diminuiu para 4,0 mg, correspondente a um rendimento de 26,7%, enquanto, no quarto ciclo, foram recuperados apenas 2,1 mg de enzima, equivalentes a 14,0% de rendimento.

A recuperação da lacase foi realizada por meio de lavagem e separação física, permitindo sua reutilização por até quatro ciclos, com rendimento ainda adequado para análises catalíticas e espectroscópicas subsequentes. Contudo, a recuperação tornou-se progressivamente mais difícil a cada ciclo, devido à perda gradual de integridade estrutural da enzima, que comprometeu a eficiência da separação física.

Em seguida, as EHECox (4 h) em quatro ciclos sucessivos com lacase, foram reticuladas com quitosana nas mesmas condições utilizadas para o filme considerado ótimo, filme EHECox4Q24 (**Figura 33**).

Figura 33 - FTIR do filme EHECox4Q24 obtido com a mesma lacase reutilizada em três ciclos: (A) 1ª, (B) 4ª utilização.

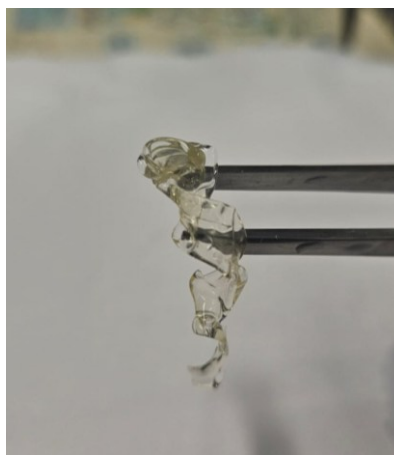


Fonte: Autora (2025)

Observa-se redução das bandas em 3353 cm^{-1} (--OH/N--H), 1648 cm^{-1} (C=O) e 1558 cm^{-1} (N--H), sugerindo menor oxidação e reticulação após sucessivos reusos da lacase. Por outro lado, a maior intensidade da banda em 2868 cm^{-1} (C--H alifático) na 4ª utilização indica menor modificação das cadeias poliméricas, reflexo da redução da atividade catalítica da enzima e da preservação de grupos alifáticos não oxidados.

Quanto à integridade em meio aquoso, o filme EHECox4Q24 oxidado com a mesma lacase, pela quarta vez, manteve-se insolúvel em água (**Figura 34**), indicando que, apesar da redução na eficiência catalítica da enzima, a estrutura reticulada do material permaneceu estável. No entanto, sua resistência à água se manteve por apenas 1 mês, diferentemente do filme EHECox4Q24 preparado com a enzima em sua primeira utilização, que apresentou insolubilidade prolongada.

Figura 34 - Filme EHECox4Q24 após 2 h de imersão em água.



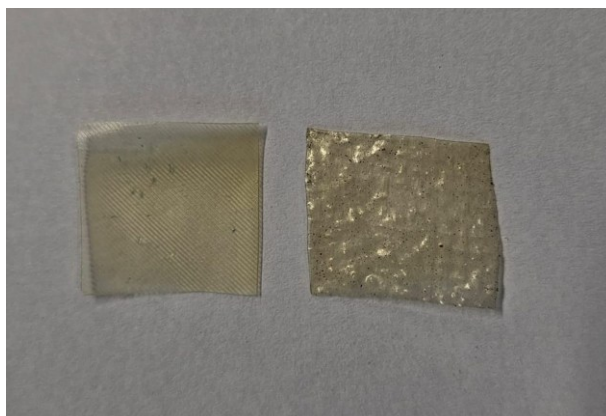
Fonte: Autora (2025).

Após a imersão, o filme manteve sua coerência física e transparência parcial, sem sinais de fragmentação ou desintegração, evidenciando que a reticulação entre EHECox e quitosana foi suficiente para conferir resistência em meio aquoso, mesmo com a lacase reutilizada.

5.3.9 Biodegradabilidade em solo para EHECox4Q24

O teste de biodegradabilidade em solo teve como objetivo avaliar a degradação do filme ótimo em condições ambientais controladas, utilizando a perda de massa como parâmetro direto da biodegradação. Após o período de incubação, observou-se que a amostra apresentou aspecto mais rugoso, resultante do contato com a superfície da malha de suporte, além de visual mais fino e irregular, o que indica a ocorrência de degradação superficial do material (**Figura 35**).

Figura 35 - Amostra do filme EHECox4Q24 antes (à esquerda) e após dois meses de teste de biodegradabilidade no solo (à direita).



Fonte: Autora (2025).

Após dois meses de incubação, o filme apresentou uma perda média de massa de 6,21%, indicando degradação parcial e evidenciando que o material é moderadamente biodegradável nas condições avaliadas. A perda de massa constitui um parâmetro amplamente empregado para quantificar a biodegradação, pois reflete a conversão do polímero em compostos de menor massa molecular, como dióxido de carbono, água e biomassa microbiana (Boyandin *et al.*, 2013). Durante esse processo, observa-se a degradação preferencial das regiões amorfas, mais suscetíveis à ação enzimática, o que resulta na redução da massa molecular e no aumento relativo da cristalinidade do material (Volova *et al.*, 2015).

Com a progressão do tempo de incubação para quatro meses (**Figura 36**), a perda média de massa aumentou para 8,47%, confirmando a continuidade do processo de biodegradação, porém, com redução da taxa de degradação em relação ao período inicial. Esse comportamento indica que a perda de massa foi relativamente baixa ao longo do tempo, possivelmente em função da irrigação realizada apenas uma vez por semana, que pode não ter sido suficiente para manter a umidade adequada do solo, especialmente em condições climáticas quentes, o que limitou a atividade microbiana e, conseqüentemente, o avanço da biodegradação.

Além disso, o pH do solo permaneceu estável em torno de 6, caracterizando um ambiente levemente ácido, condição geralmente favorável à atividade microbiana e à decomposição de matéria orgânica, o que indica que a limitação observada na degradação esteve mais relacionada à disponibilidade hídrica do que a variações no pH (Boyandin *et al.*, 2013).

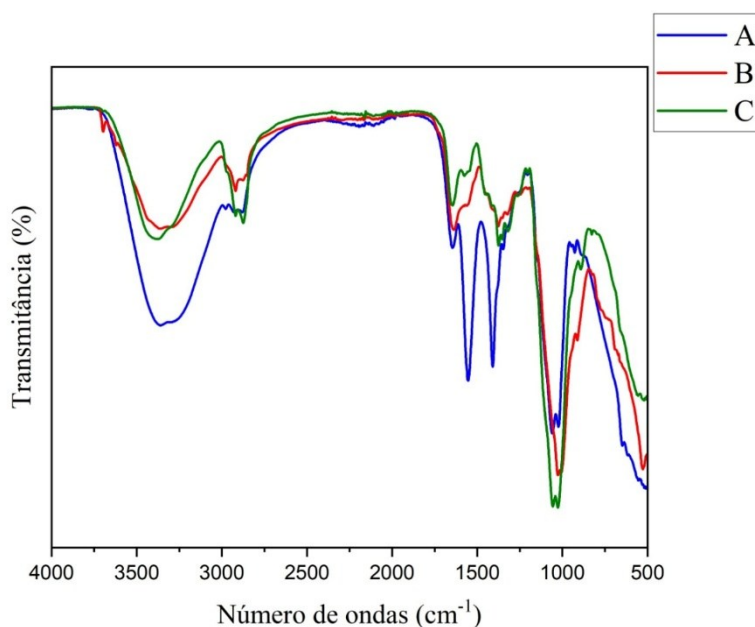
Figura 36 - Amostra do filme EHECox4Q24 após quatro meses de teste de biodegradabilidade em solo.



Fonte: Autora (2025)

Além da perda de massa, foi realizada a análise por FTIR dos filmes antes e após o ensaio de biodegradação, apresentada na **Figura 37**.

Figura 37 - Filme EHECox4Q24 (A) antes da submersão em solo (B) após 2 meses de biodegradação em solo e (C) após 4 meses de biodegradação em solo.



Fonte: Autora (2025)

A redução da banda em $3410\text{--}3420\text{ cm}^{-1}$, atribuída ao estiramento de --OH e N--H , indica diminuição de grupos hidroxila livres, possivelmente devido à oxidação microbiana e à formação de ligações intermoleculares durante a degradação

(Nuccetelli *et al.*, 2024). A diminuição da intensidade dessas bandas é típica de processos oxidativos em polímeros biodegradáveis, em que há substituição de grupos hidroxila por grupos carbonila (Kapri; ZaidiGoel, 2010). A redução da região de C–H alifático ($\approx 2870\text{ cm}^{-1}$) reforça a ocorrência de cisão de cadeias laterais e fragmentação do material polimérico (Chigwada; Ogola; Tekere, 2023).

Na região de carbonilas ($\approx 1640\text{ cm}^{-1}$), observa-se uma discreta diminuição de intensidade, associada ao consumo ou à transformação de grupos C=O durante a biodegradação, possivelmente por atividade enzimática microbiana. Já entre 1200 e 1000 cm^{-1} , pequenas alterações nas vibrações C–O–C, típicas de polissacarídeos, sugerem modificações na estrutura glicosídica decorrentes da ação do solo.

Adicionalmente, na região de $3700\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, observam-se picos próximos à banda de O–H, atribuídos à presença de hidroxilas estruturais e de moléculas de água adsorvidas, provenientes de argilominerais e de matéria orgânica do solo, aderidas ao filme. Também se notam variações em 1642 cm^{-1} , relacionadas à vibração da água (H–O–H) e à interação com grupos carbonila, além de alterações sutis entre 1200 e 900 cm^{-1} , associadas às vibrações de Si–O e Al–O–Si, típicas de minerais do solo.

Essas variações refletem não apenas modificações químicas no polímero, mas também a presença de resíduos terrosos e minerais adsorvidos durante a incubação, evidenciando a interação direta entre o material e a matriz do solo, característica de processos de biodegradação em ambientes naturais. As absorções adicionais, comuns em compostos húmicos e minerais como caulinita e montmorilonita, confirmam a adesão de partículas terrosas à superfície do material durante o processo de degradação (Dick; Santos; Ferranti, 2003).

5.3.10 Teste de tração do filme EHECox4Q24

Os ensaios de tração realizados com os quatro corpos de prova para EHECox reticulada com quitosana evidenciaram baixa variação dimensional, com espessuras entre $0,07$ e $0,10\text{ mm}$ e comprimentos úteis entre $44,95$ e $47,89\text{ mm}$. Após o ensaio, observou-se alongamento na ruptura (EB%) médio de $7,21 \pm 1,49\%$, o que confirma o caráter predominantemente rígido e pouco dúctil do material. Esse comportamento é comumente relatado em sistemas com elevada proporção de celulose e ausência

de plastificantes, nos quais a forte rede de ligações de hidrogênio limita a mobilidade das cadeias poliméricas (Azeredo, Waldron, 2016; Eckelt *et al.*, 2022). A análise da curva tensão–deformação para EHECox reticulada com quitosana (**Figura 38**) mostrou deformação limitada e fratura abrupta, sugerindo comportamento frágil.

Figura 38 - Filmes EHECox4Q24 após ruptura



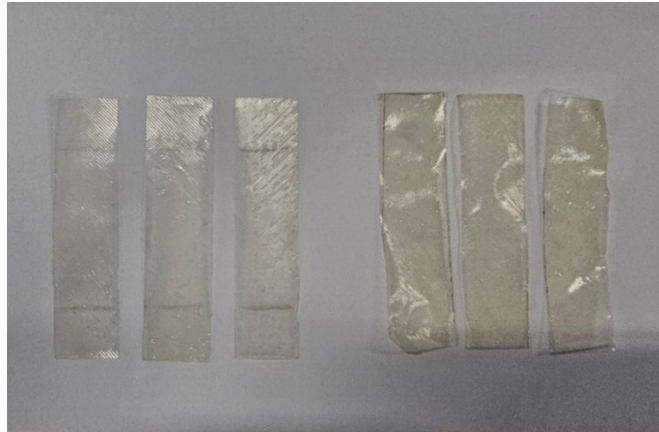
Fonte: Autora (2025)

Essa fragilidade pode ser atribuída a diferentes fatores estruturais. A reticulação entre EHEC e quitosana, induzida pela radiação UV, tende a reduzir a mobilidade das cadeias, restringindo a capacidade de deformação antes da ruptura (Wang, Somasundaran, 2006). Além disso, o processo de bio-oxidação do EHEC por aeração pode introduzir heterogeneidades e microfissuras, comprometendo a integridade estrutural e reduzindo a resistência mecânica global do material (Eckelt *et al.*, 2022). Outro fator relevante refere-se às condições do ensaio mecânico, especialmente à velocidade de deformação aplicada. Uma taxa inadequada ao comportamento viscoelástico do material pode levar à subestimação do alongamento e da resistência à tração, uma vez que as propriedades mecânicas de polímeros dependem diretamente do tempo e da taxa de aplicação de carga (Callister; Rethwisch, 2018). Assim, a elevada densidade de reticulação, associada a possíveis heterogeneidades estruturais e aos parâmetros experimentais adotados, pode justificar o comportamento mecânico mais frágil observado.

Além da EHECox4Q24, também foram avaliados filmes de EHEC purificada e de quitosana pura, preparados sob as mesmas condições experimentais e submetidos ao ensaio de tração segundo a mesma norma (**Figura 39**). Visualmente, os filmes apresentaram diferenças marcantes: a EHEC purificada exibiu um aspecto mais

translúcido e flexível, enquanto a quitosana pura mostrou-se ligeiramente mais opaca e homogênea, com menor tendência a formar rasgos durante o manuseio. Essas variações sugerem diferenças estruturais entre as matrizes, refletindo distintos graus de coesão intermolecular e de organização das cadeias poliméricas.

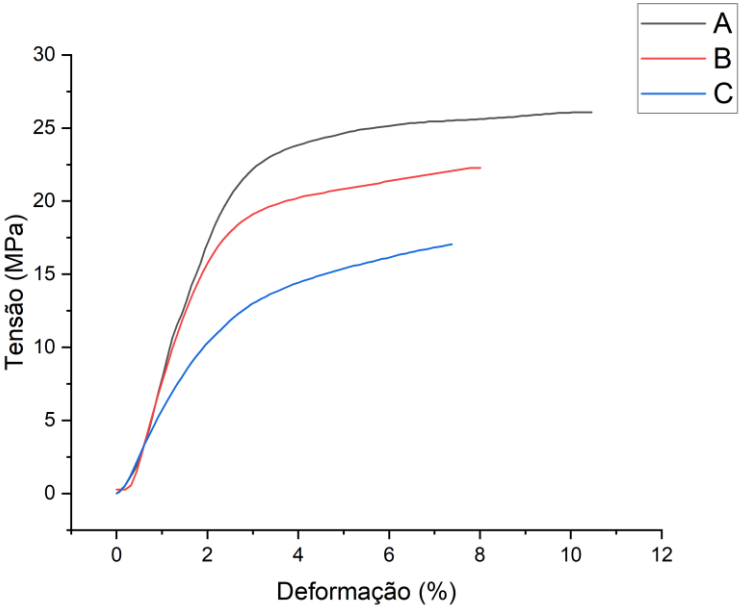
Figura 39 - Filmes EHEC purificados à esquerda e de quitosana pura à direita.



Fonte: Autora (2025).

A análise comparativa das curvas tensão–deformação (**Figura 40**) permite observar comportamentos mecânicos distintos em cada sistema. Enquanto a quitosana apresentou um perfil mais resistente e deformável, a EHEC purificada mostrou baixa resistência e deformação limitada. Já o filme de EHECox reticulada com quitosana exibiu comportamento intermediário, com leve ganho de rigidez em relação à EHEC pura, porém mantendo o caráter frágil típico de biopolímeros sem plastificantes.

Figura 40 - Tensão vs. Deformação para (A) quitosana, (B) EHECox4Q24 e (C) EHEC purificada.



Fonte: Autora (2025).

A **Tabela 4** apresenta os valores médios do módulo de elasticidade, do limite de resistência à tração, do alongamento e da tensão de ruptura obtidos para as três amostras, permitindo comparar quantitativamente o efeito da reticulação e da composição polimérica sobre o desempenho mecânico.

Tabela 4 - Propriedades mecânicas extraídas do ensaio de tração.

Amostras	Módulo de elasticidade (MPa)	Alongamento (%)	Tensão de ruptura (MPa)
EHECox4Q24	775,6 ± 272,8	7,2 ± 1,49	21,6 ± 4,57
Quitosana	752,9 ± 218,66	8,2 ± 2,22	23,7 ± 9,20
EHEC purificada	537,8 ± 214,56	6,1 ± 1,06	14,7 ± 5,61

Fonte: Autora (2025).

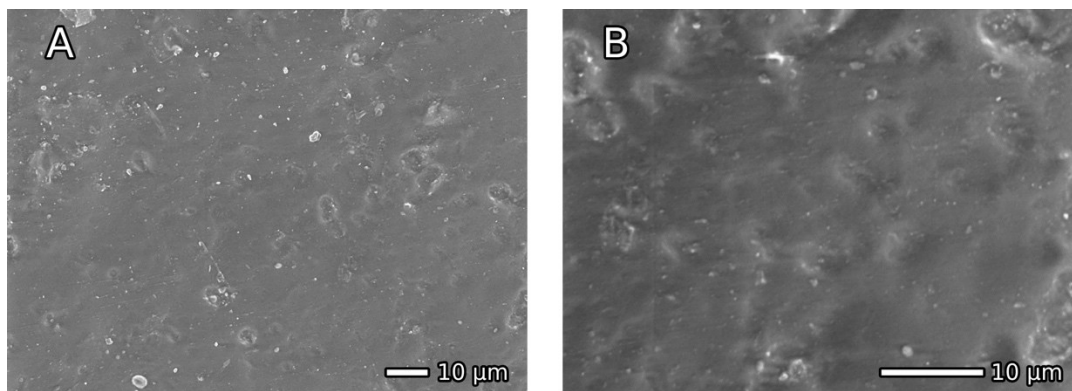
A análise comparativa entre os filmes (Figura 40 e Tabela 4) mostra que a EHEC purificada apresentou o menor desempenho mecânico, com módulo de elasticidade de $537,79 \pm 214,56$ MPa e alongamento de $6,15 \pm 1,06\%$, o que evidencia uma matriz menos coesa. A quitosana pura, por outro lado, apresentou o maior valor de resistência ($23,72 \pm 9,20$ MPa) e um módulo semelhante ($752,90 \pm 218,66$ MPa), associado a um leve aumento de deformação ($8,21 \pm 2,22\%$). Já a EHEC reticulada com quitosana em luz UV apresentou valores intermediários de tensão máxima ($21,6 \pm 4,4$ MPa) e de módulo ($775,6 \pm 272,8$ MPa), o que indica que a reticulação promoveu maior coesão estrutural e maior eficiência na transferência de carga entre as cadeias, sem, contudo, atingir a resistência observada para a quitosana pura.

Esses resultados indicam que a reticulação induzida por UV promove a formação de uma rede polimérica mais coesa, aumentando o módulo e a resistência à EHEC pura. No entanto, a elevada densidade de ligações inter- e intramoleculares limita a mobilidade das cadeias, reduzindo a ductilidade do material (ZHANG *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2023). A similaridade entre o módulo da quitosana e o da EHEC reticulada sugere que a adição da EHEC não comprometeu a rigidez do sistema, embora a menor deformação observada indique possível concentração de tensões nas interfaces entre os polímeros (LIU *et al.*, 2020). Assim, a reticulação com quitosana confere maior resistência e rigidez à EHEC, mantendo o comportamento frágil característico de biopolímeros sem plastificante.

5.3.11 MEV do filme EHECox4Q24

Na micrografia obtida a 1000x (**Figura 41.A**), observa-se uma superfície predominantemente homogênea, sem fissuras evidentes e com boa continuidade da matriz, indicando que o processo de formação do filme foi, em grande parte, eficiente. Apesar dessa uniformidade global, observa-se a presença de pequenas partículas dispersas, possivelmente relacionadas a resíduos oriundos do processo de preparação, como observado em outros estudos que empregaram ácido acético para solubilizar a quitosana (Araya; Menezes, 2010).

Figura 41 - MEV da superfície do filme EHECox4Q24 (A) aumento de 1000x; (B) aumento de 2500x.



Fonte: Autora (2025).

Na ampliação de 2500x (**Figura 41.B**), a superfície revela detalhes adicionais, como rugosidades locais e pontos de aglomeração, que se destacam em relação à matriz contínua. Uma interpretação plausível é que parte dessas partículas corresponda a sais de acetato, derivados do ácido acético utilizado para solubilizar a quitosana, conforme relatado em trabalhos sobre a influência de diferentes ácidos na morfologia de filmes (Araya; Menezes, 2010). Caso não haja evaporação completa ou neutralização, tais resíduos podem permanecer incorporados à estrutura final do filme, alterando suas propriedades.

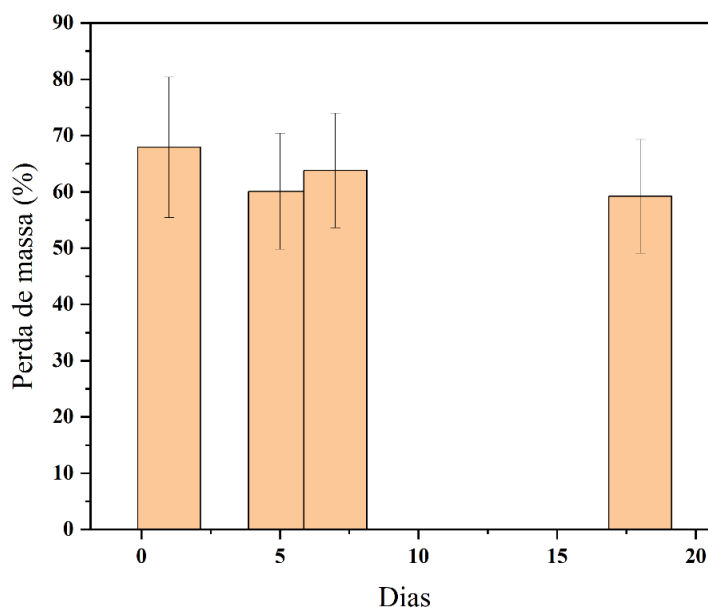
De forma geral, os resultados apontam que os filmes apresentam boa homogeneidade e coesão estrutural, características desejáveis para aplicações em materiais poliméricos (Huerta, *et al.*, 2018). Entretanto, a presença de microdefeitos e resíduos superficiais pode atuar como pontos de fragilidade, justificando a menor resistência à tração e ao alongamento observada nos ensaios mecânicos, quando comparados a filmes de quitosana pura relatados na literatura.

5.3.12 Gravimetria do filme EHECox4Q24

A perda de massa do filme EHECox4Q24 foi monitorada por até 18 dias de submersão em água. Após 1 dia, a perda foi de $67,9\% \pm 12,5\%$; após 5 dias, $60,1\% \pm 10,3\%$; e após 7 dias, $63,8\% \pm 1,9\%$, indicando uma degradação rápida nas primeiras 24 h, seguida de estabilização. Após 18 dias, a perda média foi de $59,2\% \pm 10,1\%$, sugerindo uma fase posterior de degradação mais lenta. Esses resultados indicam um

comportamento bifásico: uma etapa inicial de solubilização rápida e outra de degradação gradual (**Figura 42**).

Figura 42 - Perda de massa (%) do filme EHECox4Q24 em função do tempo de submersão em água deionizada.



Fonte: Autora (2025).

A amostra submetida a 30 dias de submersão em água não pôde ser retirada, seca e quantificada em massa, pois apresentava elevado grau de intumescimento. Esse nível de hidratação comprometeu a manipulação adequada do material, impossibilitando a determinação confiável de sua massa após esse período.

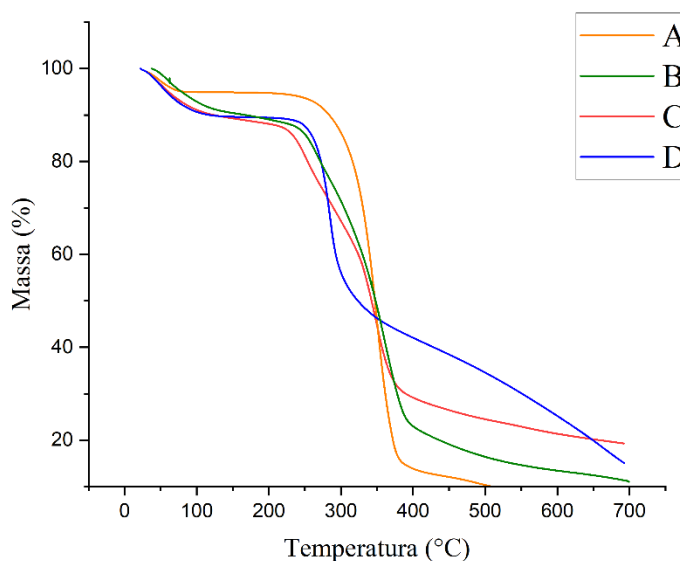
A leve elevação na perda de massa entre o quinto e o sétimo dia, acompanhada da redução do desvio padrão, indica que o processo de solubilização torna-se mais homogêneo ao longo do tempo. Esse comportamento sugere um perfil de solubilidade controlada, no qual a solubilização inicial rápida é seguida por uma fase mais estável. Apesar da perda progressiva de massa, o filme manteve-se insolúvel em água por até três meses, demonstrando resistência estrutural prolongada em meio aquoso.

5.3.13 TGA do filme EHECox4Q24

A estabilidade térmica dos filmes híbridos à base de EHECox e quitosana, obtidos por reticulação via radiação UV, foi avaliada por análise termogravimétrica

(TGA), (**Figura 43**). Essa técnica permitiu comparar o comportamento de degradação térmica das amostras, bem como avaliar o efeito da incorporação de quitosana e do tempo de interação na resistência térmica dos filmes.

Figura 43 - Curvas de análise termogravimétrica (TGA) das amostras: (A) EHEC, (B) EHECox4Q2, (C) EHEC4oxQ24 e (D) quitosana.



A análise termogravimétrica evidencia diferenças claras no comportamento térmico dos filmes híbridos EHECox4Q2 (B) e EHECox4Q24 (C). Ambos apresentam uma etapa inicial de perda de massa abaixo de 120 °C, associada à eliminação da água adsorvida, seguida da principal etapa de degradação entre 250 e 380 °C. No entanto, o filme EHECox4Q24 apresenta um deslocamento do início da degradação térmica para temperaturas mais elevadas em relação ao EHECox4Q2, indicando maior resistência térmica.

Ademais, a decomposição do EHECox4Q24 ocorre de forma mais gradual, com menor taxa de perda de massa na principal etapa de degradação, sugerindo a formação de uma rede polimérica mais estável. Em altas temperaturas, o EHECox4Q24 apresenta maior resíduo carbonáceo do que o EHECox4Q2, reforçando sua estabilidade térmica superior. Esses resultados indicam que o maior tempo de interação entre EHECox e quitosana favorece o estabelecimento de interações intermoleculares mais eficientes, o que se reflete diretamente no aumento da estabilidade térmica do filme híbrido EHECox4Q24.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a reticulação da EHEC purificada com quitosana, após bio-oxidação enzimática, constitui uma estratégia eficaz para a obtenção de filmes poliméricos com propriedades estruturais, térmicas e hidrolíticas aprimoradas. A oxidação mediada por lacase/TEMPO favoreceu a introdução de grupos funcionais capazes de estabelecer interações intermoleculares com a quitosana, viabilizando a formação de uma rede polimérica estável, como corroborado pelas análises espectroscópicas. Após diversas análises, o tempo de oxidação de 4 h foi considerado o tempo ótimo para o processo.

Entre as metodologias avaliadas na etapa de reticulação da EHECox com quitosana, a reticulação por radiação UV mostrou-se a mais eficiente, resultando em filmes com maior integridade estrutural em meio aquoso e maior resistência à solubilização, quando comparada aos métodos térmicos e químicos. A formulação contendo 50% m/m de quitosana em relação ao EHECox apresentou desempenho superior, evidenciando que a composição desempenha papel determinante na estabilidade, mobilidade e coesão da matriz polimérica. Da mesma forma, o controle adequado do tempo de reticulação foi essencial para a obtenção de filmes homogêneos, sendo a condição em que a reticulação foi aplicada por 24 h (EHECox4Q24) definida como ótima ao longo do estudo.

Os filmes obtidos pelo processo otimizado apresentaram elevada resistência à solvatação em diferentes solventes orgânicos e estabilidade em ampla faixa de pH, mantendo integridade prolongada, especialmente em meios alcalinos. Destaca-se que, em pH superiores a 10, o filme permaneceu íntegro por mais de cinco meses em água, apresentando estabilidade superior à observada em meio aquoso pH 6. As análises térmicas confirmaram a estabilidade adequada para aplicações em temperaturas moderadas, enquanto os ensaios biológicos demonstraram a ausência de citotoxicidade após a etapa de lavagem, reforçando o potencial do material para aplicações biomédicas. A estrutura predominantemente amorfa, observada por DRX, mostrou-se compatível com a funcionalização química do sistema e com o comportamento de biodegradação parcial observado *in vitro*.

De modo geral, os resultados obtidos confirmam que a combinação entre EHECox e quitosana, associada à reticulação por radiação UV, representa uma abordagem promissora, ambientalmente favorável e tecnicamente viável para o

desenvolvimento de biomateriais com resistência à água, estabilidade térmica, biodegradabilidade controlada e biocompatibilidade adequada. As propriedades alcançadas indicam potencial para aplicações em curativos, sistemas de liberação controlada e embalagens biodegradáveis. Estudos futuros poderão explorar a incorporação de agentes bioativos, o uso de reforços nanométricos e avaliações em meios fisiológicos simulados, visando ampliar o desempenho e o campo de aplicação desses materiais.

REFERÊNCIAS

- ANDRADY, A. L.; NEAL, M. A. Applications and societal benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1977-1984, 2009.
- ARAYA, A.; MENESES, L. Influencia de algunos ácidos orgánicos sobre las propiedades físico-químicas de películas de quitosano obtenidas a partir de desechos de cangrejo. **Revista Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 1–9, 2010.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM G160-03: Standard Practice for Evaluating Microbial Susceptibility of Nonmetallic Materials by Laboratory Soil Burial. **West Conshohocken**, PA, 2003.
- ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM D882-12. West Conshohocken, PA, USA: **ASTM International**, 2012.
- AVÉROUS, L. Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 3, p. 231-274, 2004.
- AZEREDO, H. M. C.; WALDRON, K. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 109-122, 2016.
- AZIZ, T. *et al.* A review on the modification of cellulose and its applications. **Polymers**, [s.l.], v. 14, p. 3206, 2022.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.
- BEAUCHAMP Jr., R. O.; CLAIR, M. B.; FENNELL, T. R.; CLARKE, D. O.; MORGAN, K. T. A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, n. 3-4, p. 143-174, 1992.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 267, n. 1, p. 99–102, 1990.
- BOYANDIN, A.; PRUDNIKOVA, S.; KARPOV, V. A.; IVONIN, V. N.; ĐO, N. L.; NGUYEN, T. H. T.; LE, T. M. H.; FILICHEV, N. L.; LEVIN, A. L.; FILIPENKO, M.; VOLOVA, T.; GITELSON, I. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 83, p. 77–84, 2013.
- CALEJO, M. *et al.* Thermoresponsive hydrogels with low toxicity from mixtures of ethyl(hydroxyethyl) cellulose and arginine-based surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 454-462, 2012.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2018.

CANEVAROLO JR., Sebastião V. **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 3. ed. São Paulo: Artliber, 2010.

CASSIE, A. B. D.; BAXTER, S. Wettability of porous surfaces. **Transactions of the Faraday Society**, v. 40, p. 546–551, 1944.

CHAICHI, M.; BADII, F.; MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M. Water resistance and mechanical properties of low methoxy-pectin nanocomposite film responses to interactions of Ca²⁺ ions and glycerol concentrations as crosslinking agents. **Food Chemistry**, v. 293, p. 429–437, 2019.

CHIGWADA, A. D.; OGOLA, H.; TEKERE, M. Multivariate analysis of enriched landfill soil consortia provide insight on the community structural perturbation and functioning during low-density polyethylene degradation. **Microbiological Research**, v. 274, p. 127425, 2023.

CHOI, I. *et al.* Crosslinking strategies for improving functional properties of polysaccharide-based films: A comprehensive review. **Food Chemistry**, v. 426, Article 136555, 2023.

COLOMBI, S.; SÁEZ, I.; BORRAS, N.; ESTRANY, F.; PÉREZ-MADRIGAL, M. M.; GARCÍA-TORRES, J.; MORGADO, J.; ALEMÁN, C. Glyoxal crosslinking of electro-responsive alginate-based hydrogels: Effects on the properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 337, Art. 122170, 2024.

CORDES, E. H.; JENCKS, W. P. On the mechanism of Schiff base formation and hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 5, p. 832–837, 1962.

DA ROSA, F. C.; SILVA, P. G. V.; VICENTE, W. C. *et al.* Covalent bioincorporation of chitosan nanoparticles containing eucalyptus and lavender essential oil on cotton fabrics. **Fibers and Polymers**, v. 26, p. 1979–1992, 2025.

DASHTIMOGHADAM, E. *et al.* Tunable viscoelastic features of aqueous mixtures of thermosensitive ethyl(hydroxyethyl) cellulose and cellulose nanowhiskers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2020.

DE NOOY, A. E. J.; BESSELING, N. A. M.; VAN BEKKUM, H. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. **Carbohydrate Research**, v. 269, p. 89–98, 1995.

DENG, W.; LUO, Z.; ZHU, J.; *et al.* Lignocellulosic nanofibrils isolate via laccase/TEMPO-mediated oxidation for stabilizing Pickering emulsions. **Cellulose**, v. 32, p. 4321–4336, 2025.

DICK, D. P.; SANTOS, J. H. Z.; FERRANTI, E. M. Chemical characterization and infrared spectroscopy of soil organic matter from two southern Brazilian soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 1, p. 29–39, 2003.

DODERO, A.; SCARFI, S.; MIRATA, S.; SIONKOWSKA, A.; VICINI, S.; ALLOISIO, M.; CASTELLANO, M. Effect of crosslinking type on the physical-chemical properties and biocompatibility of chitosan-based electrospun membranes. **Polymers**, v. 13, n. 5, p. 831, 2021.

DOUSTDAR, F.; OLAD, A.; GHORBANI, M. Effect of glutaraldehyde and calcium chloride as different crosslinking agents on the characteristics of chitosan/cellulose nanocrystals scaffold. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 912–924, 2022.

ECKELT, A. *et al.* Ethyl hydroxyethyl cellulose—A biocompatible polymer carrier in blood. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 23, n. 12, p. 6432, 2022.

EICHENBAUM, G. *et al.* Investigation of the swelling response and loading of ionic microgels with drugs and proteins: **The dependence on cross-link density**. **Macromolecules**, Washington, DC, v. 32, n. 15, p. 4867–4878, 1999.

EMADIAN, S. M.; ONAY, T. T.; DEMIREL, B. Biodegradation of bioplastics in natural environments. **Waste Manag.**, v. 59, p. 526–536, Jan. 2017.

EULÁLIO, H. Y. C.; VIEIRA, M.; FIDELES, T. B.; TOMÁS, H.; SILVA, S. M. L.; PENICHE, C. A.; FOOK, M. V. L. Physicochemical properties and cell viability of shrimp chitosan films as affected by film casting solvents: potential use as wound dressing. **Materials**, v. 13, n. 21, p. 5005, 2020.

EUROPEAN PARLIAMENT. Directive (EU) 2019/904 of the European Parliament and of the Council on the reduction of the impact of certain plastic products on the environment. **Official Journal of the European Union**, 2019.

EZATI, P.; PRIYADARSHI, R.; BANG, Y.-J.; RHIM, J.-W. CMC and CNF-based intelligent pH-responsive color indicator films integrated with shikonin to monitor fish freshness. **Food Control**, v. 126, Art. 108046, 2021.

FRENCH, A. D. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**, v. 21, n. 2, p. 885–896, 2014.

FRENCH, A. D.; SANTIAGO CINTRÓN, M. Cellulose polymorphy, crystallite size, and the Segal Crystallinity Index. **Cellulose**, v. 20, p. 583–588, 2013.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 7. ed. **Hoboken: Wiley-Blackwell**, 2016.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, 2017.

GHOSH, Arun K.; SHAHABI, D. Synthesis of amide derivatives for electron deficient amines and functionalized carboxylic acids using EDC and DMAP and a catalytic amount of HOBt as the coupling reagents. **Tetrahedron Letters**, v. 63, 2021.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VERRIERO, G.; SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 369–385, 2010.

GONIL, P.; SAJOMSANG, W. Applications of magnetic resonance spectroscopy to chitin from insect cuticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 514-522, 2012.

GU, Yaohua *et al.* Recent developments of a co-immobilized laccase-mediator system: a review. **RSC Advances**, v. 11, n. 47, p. 29498–29506, 2021.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 3479-3500, 2010.

HABIBI, Youssef; CHANZY, Henri; VIGNON, Michel R. TEMPO-mediated surface oxidation of cellulose whiskers. **Cellulose**, v. 13, n. 6, p. 679-687, 2006.

HIROTA, M.; SUGIMOTO, T.; IMAI, Y.; SAKURAI, H. Oxidation of regenerated cellulose with sodium chlorite catalyzed by TEMPO. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 590–595, 2009.

HOOSHINO, A.; SAWADA, H.; YOKOTA, M.; TSUJI, M.; FUKUDA, K.; KIMURA, M. Influence of weather conditions and soil properties on degradation of biodegradable plastics in soil. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 47, p. 35–43, 2001.

HOSLER, D.; BURKETT, S. L.; TARKANIAN, M. J. Prehistoric polymers: rubber processing in ancient Mesoamerica. **Science**, v. 284, n. 5422, p. 1988-1991, 1999.

HUERTA, A. *et al.* Obtención y caracterización de quitosano entrecruzado con ácido cítrico. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 19, p. 227–235, 2018.

LANG, X.; XU, H. Functional characteristics and cellulose degradation genes of the microbial community in soils with different initial pH values. **Agriculture**, v. 15, n. 10, artículo 1068, 2025.

IOELOVICH, M. Y. Crystallinity and hydrophilicity of chitin and chitosan. **Research and Reviews: Journal of Chemistry**, v. 3, p. 7-14, 2014.

ISO. ISO 10993-5:2009 — Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **International Organization for Standardization**, 2009.

ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUZUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**, v. 3, n. 1, p. 71–85, 2011.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; REYNOLDS, J. L.; MUTHU, J.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2010.

JEON, J. Y.; KIM, J. H.; LEE, H. Enzymatic oxidation using laccase: Sustainable functionalization of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 92-99, 2012.

JEON, J.; BALDRIAN, P.; MURUGESAN, K.; CHANG, Yoon-Seok. Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. **Microbial Biotechnology**, v. 5, p. 318-332, 2012.

JEON, Oju; PARK, Kinam. Biodegradable polymers for drug delivery systems. In: SOMASUNDARAN, P. (Ed.). **Encyclopedia of Surface and Colloid Science**. Taylor and Francis. p. 1-15, 2009.

JIANG, Jie; YE, Wenbo; LIU, Liang; WANG, Zhiguo; FAN, Yimin; SAITO, Tsuguyuki; ISOGAI, Akira. Cellulose nanofibers prepared using the TEMPO/laccase/O₂ system. *Biomacromolecules*, **Washington**, v. 17, n. 12, p. 4083–4088, 2016.

KAPRI, A.; ZAIDI, M.; GOEL, R. Implications of SPION and NBT nanoparticles upon in-vitro and in-situ biodegradation of LDPE film. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 1032–1041, 2010.

KARPOVA, S.; OLKHOV, A. A.; VARYAN, I.; POPOV, A.; IORDANSKII, A. Effect of drug encapsulation and hydrothermal exposure on the structure and molecular dynamics of the binary system Poly(3-hydroxybutyrate)-chitosan. **Polymers**, v. 15, 2023.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINKE, T.; BAUMBACHER, S.; KOLTZE, C. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Polysaccharides II**, v. 205, p. 49-96, 2006.

KUDANGA, T.; LE ROES-HILL, M. Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 15, p. 6525–6542, ago. 2014.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, A.; DUTTA, J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 196-209, 2020.

LI, F. *et al.* Changes of structure and property of alkali soluble hydroxyethyl celluloses (HECs) and their regenerated films with the molar substitution. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 206-212, 2014.

LIMA, L. R.; GUTIERREZ, R. F.; CRUZ, S. A. Challenges in the context of single-use plastics and bioplastics in Brazil: A legislative review. **Waste Management & Research**, v. 40, n. 7, 2021.

LIU, J.; WANG, T.; LV, Q.; MENG, Y.; GAO, Z.; HU, S.; REN, X. Reactive oxygen species-responsive hydrophobic crosslinked chitosan films based on triple-function crosslinkers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 257, p. 128606, 2024.

MASSY, J. A little book about BIG chemistry: the story of man-made polymers. **Cham: Springer International Publishing**, cap. 3, p. 19-21, 2017.

MIKHAILOV, S. *et al.* Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Derivatives of Nucleosides and Nucleotides. Mechanism and Comparison with Glutaraldehyde. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 35, p. 114-129, 2016.

MOEINI, A. *et al.* Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, p. 115839, 2020.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGQUIST, J. Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941-3994, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSTAFAVI, F. S.; BAGHERI, A.; ZARRINTAJ, S.; MOTLAGH, A. M.; GANJALI, M.; MOZAFARI, M. Chitosan-based hydrogel coatings with antibacterial activity for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 1165-1176, 2020.

NAIR, L. S.; SCHMIDT, C. E. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2019.

NUCCETELLI, P. *et al.* Evaluation of microbial degradation of thermoplastic and thermosetting polymers by environmental isolates. **Coatings**, 2024.

ORCUTT, K.; McCAFFREY, Z.; TORRES, L. F.; WOOD, D. F.; WILLIAMS, T. G.; KLAMCZYNSKI, A. P.; KIM, J. H.; HART-COOPER, W. M. Bioplastics from shellfish waste: tuning the tensile and solubility properties of chitosan films. **ACS Sustainable Resource Management**, v. 2, n. 2, p. 294-302, 2025.

PANARIELLO, L. *et al.* Chitosan and nano-structured chitin for biobased anti-microbial treatments onto cellulose based materials. **European Polymer Journal**, v. 113, p. 328-339, 2019.

PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on

interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 10, p. 1–10, 2010.

PERNA, V.; BAUM, A.; ERNST, H. A.; AGGER, J. W.; MEYER, A. S. Laccase activity measurement by FTIR spectral fingerprinting. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 122, p. 64-73, mar. 2019.

PEZZELLA, C.; GUARINO, L.; PISCITELLI, A. How to enjoy laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 923–940, 2015.

PIOUS, C.; THOMAS, S. **Polymeric Materials - Structure, Properties, and Applications**. 2016.

POLETTI, M.; ORNAGHI JUNIOR, H. L.; ZATTERA, A. J. Native cellulose: structure, characterization and thermal properties. **Materials**, v. 7, n. 9, p. 6105–6119, 2014.

REHMAN, A., RAZA, Z. A., MASOOD, R. Optimization of lipase activity under various chemo-physical conditions for hydrolysis of polyester fabric using multiple statistical approaches. **The Journal of the Textile Institute**, 2019.

RIAL, L. P. Classification, Types, and Chemistry of Polymers. **Pharmaceutical Analytical Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 158, 2022.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; TELKE, A.; TYAGI, R. D. Laccases: Structure, catalytic mechanism, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 60, 108010, 2022.

RODRIGUEZ-COUTO, S.; TOCA-HERRERA, Jose Luis. Laccases in the textile industry. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 1, 2006.

ROSSETO, M.; RIGUETO, C. V. T.; KREIN, D. D. C.; BALBÉ, N. P.; MASSUDA, L. A.; DETTMER, A. **Biodegradable Polymers: Opportunities and Challenges**. In: IntechOpen, 2019.

SABAGHI, M.; TAVASOLI, S.; HOSEYNI, S. Z.; MOZAFARI, M. R.; DEGRAEVE, P.; KATOZIAN, I. A critical review on approaches to regulate the release rate of bioactive compounds from biopolymeric matrices. **Food Chemistry**, v. 382, Art. 132411, 2022.

SÁNCHEZ-CID, P. *et al.* Influence of Natural Crosslinkers on Chitosan Hydrogels for Potential Biomedical Applications. **Macromolecular Materials and Engineering**, 2023.

SANDT, C.; WAEYTENS, J.; DENISET-BESSEAU, A.; NIELSEN-LEROUX, C.; RÉJASSE, A. Use and misuse of FTIR spectroscopy for studying the bio-oxidation of plastics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 258, p. 119841, 5 set. 2021.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959.

SEIDI, F. et al. Chitosan-based blends for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.

SEN, S. O.; NAYAK, A. K.; DEVBHUTI, P.; GHOSH, A. Modification of gums by periodate oxidation: a natural cross-linker. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 7, p. 1–6, 2019.

SHOKRI, Zahra *et al.* Laccase immobilization onto natural polysaccharides for biosensing and biodegradation. **Carbohydrate Polymers**, v. 262, p. 117963, 2021.

SIMONI, R. C.; LEMES, G. F.; FIALHO, S.; GONÇALVES, O. H.; GOZZO, A. M.; CHIARADIA, V.; SAYER, C.; SHIRAI, M.; LEIMANN, F. Effect of drying method on mechanical, thermal and water absorption properties of enzymatically crosslinked gelatin hydrogels. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, supl. 1, p. 745–755, 2017.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 728-765, 2010.

SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review. **Cellulose**, v. 17, p. 459-494, 2010.

SONG, X.; WANG, C.; GAO, X.; WANG, Y.; XU, R.; WANG, J.; LI, P. Thermally crosslinked hydrogen-bonded organic framework membranes for highly selective ion separation. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2173, 2023.

SPERLING, L. H. Introduction to Physical Polymer Science. 4th ed. **Hoboken: John Wiley & Sons**, 2006.

SUBRAMANIAN, A.; LIN, H.-Y. Crosslinked chitosan: its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 75, n. 3, p. 742-753, 2005.

SULTANA, N.; EDLUND, U.; GURIA, C.; WESTMAN, G. Kinetics of periodate-mediated oxidation of cellulose. **Polymers (Basel)**, v. 16, n. 3, p. 381, 2024.

SWAMY, A. Y.; PRASAD, S.; PAN, X.; ANDERSSON, M. R.; GEDEFW, D. Glutaraldehyde and glyoxal crosslinked polyethylenimine for copper ion adsorption from water. **ChemistrySelect**, v. 7, n. 9, e202104318, 2022.

THURESSON, K. et al. Effect of surfactant on structural and thermodynamic properties of aqueous solutions of hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose. **Langmuir**, v. 11, p. 3730-3736, 1995.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.

TILLET, G.; BOUCHET, J.; CAPELOUT, M. Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature. **Progress in Polymer Science**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 191-217, 2011.

TOKIWA, Yutaka; CALABIA, Buenaventurada P.; UGWU, Charles U.; AIBA, Seiichi. Biodegradability of Plastics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 9, p. 3722-3742, 2009.

TOLEDO, A. M. N. de. Encapsulação do óleo essencial de laranja em nanopartículas de quitosana: desenvolvimento e avaliação da citotoxicidade in vitro do produto final. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – **Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos**, Rio Grande, 2015.

VOLOVA, T.; BOYANDIN, A.; PRUDNIKOVA, S.; ВОЛОВА, Т. Г.; БОЯНДИН, А. Н.; ПРУДНИКОВА, С. В. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates in natural soils. **Siberian Federal University Journal**, v. 8, n. 2, p. 152–167, 2015.

WELSH, E.; PRICE, R. Chitosan cross-linking with a water-soluble, blocked diisocyanate. 2. Solvates and hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 5, p. 1357-1361, 2003.

WENDLANDT, W. W. **Thermal analysis**. 3. ed. Toronto: John Wiley & Sons, 1986. 814 p.

WITT, M. A. et al. Crosslinked chitosan/poly (vinyl alcohol) blends with proton conductivity characteristic. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1692-1698, 2010.

XU, J.; LIU, K.; CHANG, W.; CHIOU, B.; CHEN, M.; LIU, F. Regulating the physicochemical properties of chitosan films through concentration and neutralization. **Foods**, [S.l.], v. 11, n. 6, p. 1–13, 2022.

YANG, W.; LIU, R.; LI, C.; SONG, Y.; HU, C. Hydrolysis of waste polyethylene terephthalate catalyzed by easily recyclable terephthalic acid. **Waste Management**, v. 135, p. 267–274, nov. 2021.

YANG, Yue; WU, X.; SHENG, X.; ZHANG, J.; LU, P.; LI, Na; PING, Q. Immobilizing laccase to cellulose-biochar composite beads for removing phenol from an aqueous system. **Desalination and Water Treatment**, [S. l.], v. 226, p. 157-166, 2021.

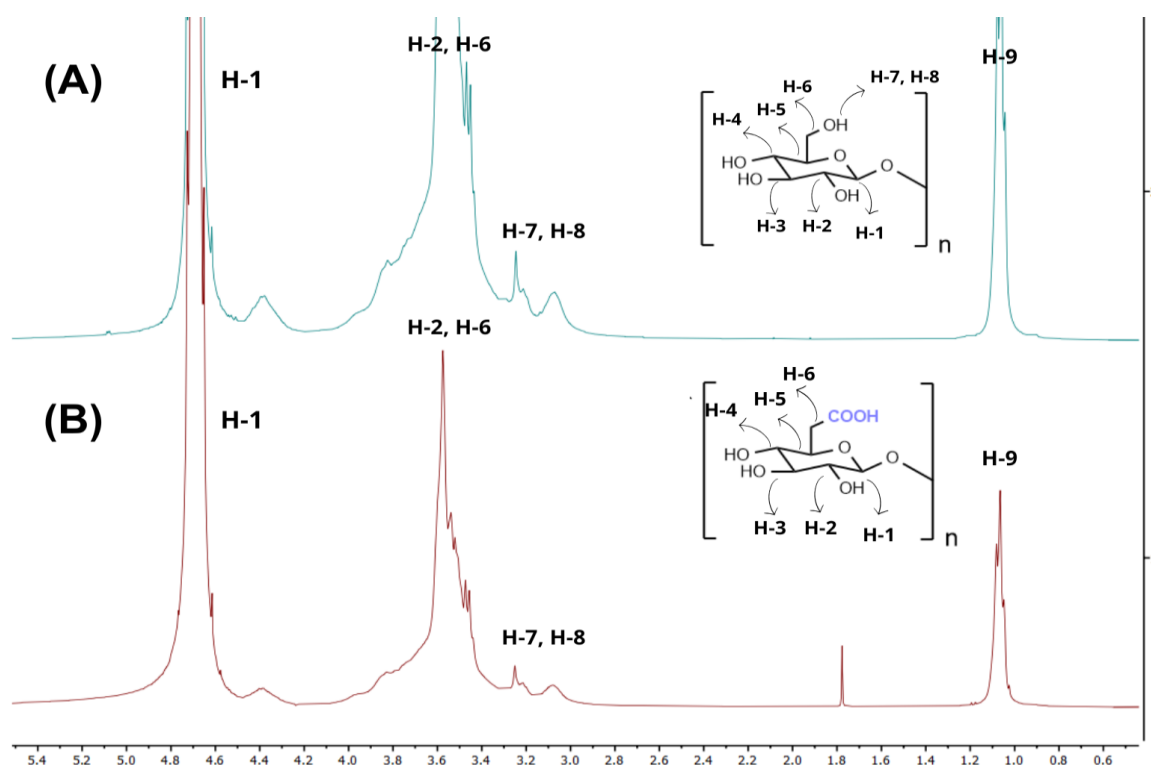
YOUNG, R. J.; LOVELL, P. A. Introduction to Polymers. 3rd ed. Boca Raton: **CRC Press**, cap 1, p. 1-22, 2011.

ZAHN, D. Theoretical study of the mechanisms of acid-catalyzed amide hydrolysis in aqueous solution. **Journal of Physical Chemistry**, v. 107, n. 40, p. 8005–8013, 2003.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA EHEC PURIFICADA E DA EHEC PARCIALMENTE OXIDADA

Neste apêndice são apresentados os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da EHEC purificada e da EHEC parcialmente oxidada, obtidos em D_2O , empregados na caracterização estrutural do polímero antes e após o processo de oxidação. Os espectros de RMN de ^1H , apresentados na **Figura A.1**, permitem a avaliação comparativa do perfil espectral da EHEC antes e depois do tratamento oxidativo, possibilitando verificar eventuais modificações estruturais decorrentes do processo.

Figura A.1 – Espectros de RMN de ^1H da EHEC purificada (A) e da EHEC parcialmente oxidada (B).

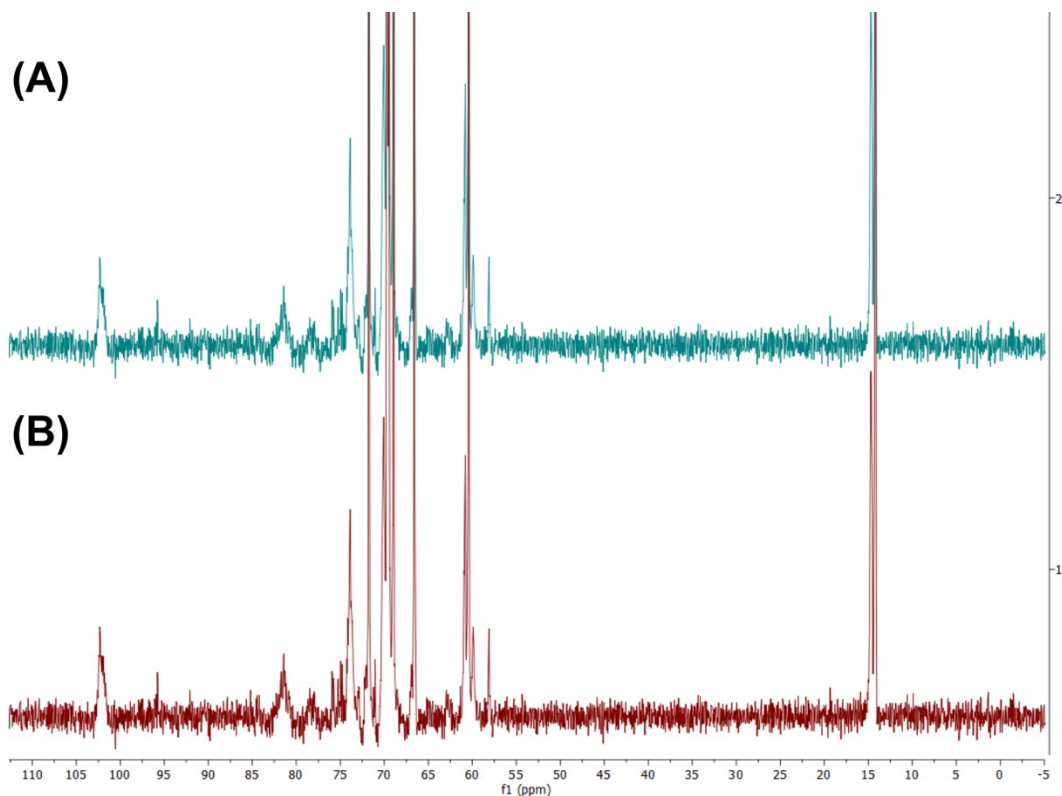


Fonte: Autora (2025)

Os espectros de RMN de ^{13}C apresentados na Figura A.2 exibem os sinais típicos da EHEC, associados principalmente aos carbonos do anel glicosídico da cadeia celulósica, localizados na faixa aproximada de 60 a 110 ppm, além das contribuições dos grupos etoxila substituintes. A comparação entre a EHEC purificada e a parcialmente oxidada não evidencia variações relevantes nos deslocamentos

químicos nem o aparecimento de novos sinais expressivos, indicando a manutenção da estrutura carbônica do polímero após o processo oxidativo.

Figura A.2 – Espectros de RMN de ^{13}C da EHEC purificada (A) e da EHEC parcialmente oxidada (B).



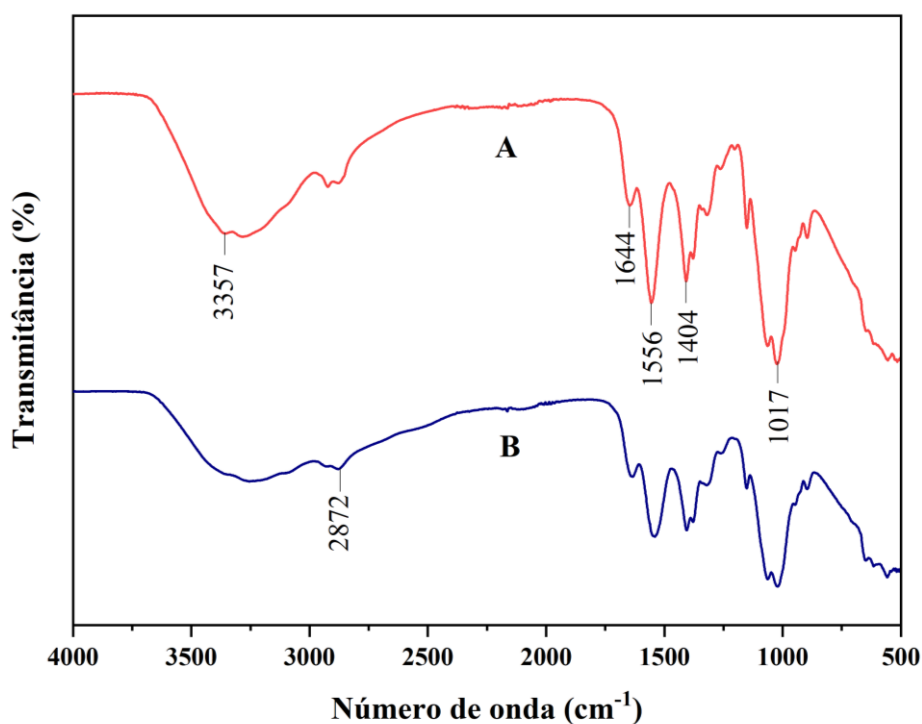
Fonte: Autora (2025)

A análise conjunta dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C apresentados neste apêndice confirma que a oxidação parcial ocorreu de maneira controlada, sem comprometer a integridade estrutural da EHEC, o que é compatível com condições oxidativas suaves aplicadas a derivados de celulose.

APÊNDICE B – ESPECTRO FTIR DA QUITOSANA COMERCIAL

Neste apêndice são apresentados os espectros de FTIR da quitosana comercial submetida à radiação UV (254 nm) e da quitosana comercial não exposta à radiação UV, empregados como ensaios de controle para a avaliação dos efeitos da irradiação sobre a estrutura química do polímero. Os espectros apresentados na **Figura B.1** permitem a análise comparativa das bandas características da quitosana antes e após a exposição à radiação UV.

Figura B.1 – FTIR da (A) Quitosana comercial exposta a irradiação UV e (B) Quitosana comercial.



Fonte: Autora (2025)