



DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS VIA RETICULAÇÃO ENZIMÁTICA COM TRANSGLUTAMINASE PARA SUBSTITUIÇÃO DE PLÁSTICOS

Lara F. Klein¹; Matheus L. Amaral¹, Schana A. da Silva¹

¹Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, Novo Hamburgo, RS, Brasil.
23000434@liberato.com.br

Palavras-Chave: Gelatina, quitosana, bioplástico.

Introdução

O aumento expressivo na produção e descarte de plásticos de origem petroquímica representa um dos maiores desafios ambientais da atualidade, devido à sua baixa biodegradabilidade e ao acúmulo em ecossistemas naturais (GEYER *et al.*, 2017). Além disso, cerca de 98% dos plásticos produzidos são derivados de fontes não renováveis, enquanto somente 2% são derivados matérias primas de origem renovável, contribuindo significativamente para emissões de gases de efeito estufa e impactos ambientais associados à exploração desses recursos (HOUSSINI; LI; TAN, 2025).

Nesse contexto, os biopolímeros surgem como uma alternativa promissora, especialmente aqueles obtidos a partir de proteínas e reforçados com polissacarídeos, por apresentarem potencial de biodegradabilidade e menor impacto ambiental (SHAH *et al.*, 2008). Entretanto, esses materiais frequentemente apresentam limitações, como baixa resistência mecânica e alta sensibilidade à umidade, restringindo sua aplicação em larga escala.

Entre esses materiais, a gelatina se destaca por ser derivada do colágeno, cuja estrutura é composta por cadeias polipeptídicas com diferentes grupos funcionais, como amidas, carboxílicos e grupos amina, que possibilitam interações intermoleculares que resultam em uma boa capacidade filmogênica. Porém, essas interações são em geral fracas, como ligações de hidrogênio, explicando sua baixa estabilidade estrutural em condições de umidade e quando submetida a esforço mecânico. Dessa forma, torna-se necessário o uso de estratégias que promovam o fortalecimento dessas interações por meio da formação de ligações mais estáveis.

A utilização de enzimas como a transglutaminase (TG) é uma estratégia inovadora para superar essas limitações. Ela catalisa reações de reticulação entre cadeias proteicas, promovendo a formação de ligações ϵ -(γ -glutamil)-lisina, que resultam em redes poliméricas mais estáveis (MOTOKI; SEGURO, 1998), resistentes e com menor solubilidade em água (WANG *et al.*, 2023). A reticulação enzimática apresenta vantagens em relação a métodos químicos convencionais, como maior especificidade, condições reacionais mais brandas e menor geração de subprodutos tóxicos, alinhando-se aos princípios da química verde (GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004).

Outra abordagem promissora consiste na incorporação de polissacarídeos, como a quitosana, à matriz proteica. Ela é um polímero natural, não-tóxico, biodegradável, catiônico em pH menor que 6,5, obtido através da desacetilação da quitina, sendo constituída majoritariamente por meros de N-acetil-D-glicosamina e resíduos de D-glicosamina. É



encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos como o camarão, a lagosta e o caranguejo, insetos (escorpiões, formigas, besouros, aranhas e baratas) e na parede celular de fungos e algas (Rinaudo, 2006). A presença de grupos amina protonáveis em sua estrutura permite interações com outros materiais, como a gelatina, sendo capaz de formar complexos poliméricos através de interações eletrostáticas com grupos carboxila (Zhou *et al.*, 2017), além de estabelecer ligações de hidrogênio com resíduos de diferentes grupos funcionais presentes em sua cadeia, contribuindo para melhorias nas propriedades mecânicas e hidrofílicas do material.

Além da reticulação enzimática e inclusão da quitosana na cadeia polimérica, estratégias complementares podem ser empregadas para potencializar as propriedades dos materiais proteicos. A precipitação com etanol, por exemplo, reduz a interação das cadeias com a água, favorecendo a aproximação molecular e a formação de estruturas mais compactas (PENG *et al.*, 2021). De forma semelhante, o Efeito de Hofmeister descreve a influência de íons na estabilidade e solubilidade das proteínas, podendo promover o fenômeno de *salting-out*, que intensifica interações hidrofóbicas e contribui para a organização da rede polimérica (ZHANG *et al.*, 2024).

Apesar dos avanços obtidos no uso da transglutaminase junto da incorporação da quitosana em cadeias poliméricas, a combinação dessas estratégias com diferentes tratamentos químicos foi pouco explorada. Assim, esse trabalho tem como objetivo investigar o potencial da transglutaminase na reticulação de proteínas, associada à precipitação com etanol ou a adição de sais associados ao efeito de Hofmeister, para a formação de redes poliméricas estáveis reforçadas com quitosana, visando obtenção de uma alternativa sustentável aos polímeros sintéticos convencionais.

Material e Métodos

A gelatina (~220 bloom), a quitosana de alto grau de desacetilação, o ácido clorídrico (HCl), o hidróxido de sódio (NaOH), o etanol absoluto ($\geq 99,5\%$), o sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ e o ácido acético (CH_3COOH), todos de grau analítico, foram cedidos pelo Curso Técnico de Química da Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha; a MTGase proveniente da Activa WM, com atividade enzimática de 97 U/g, foi adquirida por meio de comércio eletrônico, com a empresa Fermentech.

Inicialmente, uma solução 1,5% (m/v) de quitosana foi preparada em ácido acético 2% (v/v), a qual foi mantida sob agitação por 18 horas, à temperatura ambiente, até a completa dissolução. Após a dissolução, o pH foi ajustado para faixa de 5-6, utilizando NaOH 3 mol/L, para favorecer a atividade da enzima na etapa subsequente.

Em seguida, a gelatina em pó foi adicionada à solução de quitosana nas proporções de 90/10, 85/15, 80/20, 75/25 e 70/30 em relação a massa do polissacarídeo (gelatina/quitosana, m/m), com aquecimento (60°C) e agitação (180 rpm) constante por trinta (30) minutos, até a completa dissolução da gelatina. Posteriormente, as soluções foram resfriadas a $40\text{--}45^\circ\text{C}$, a fim de permitir a atuação da enzima, que foi adicionada de 3-5% (m/m), em relação a massa seca de proteína, sendo homogeneizada por 5 minutos, seguido banho ultrassônico para remoção de gases dissolvidos.

Para fins de comparação, filmes de gelatina solubilizada em água foram preparados seguindo o mesmo método. Para esses, foram testadas as concentrações de 10, 15 e 20%



(m/v) de gelatina, seguindo a concentração de 3-5% (m/m) de TG em relação à massa seca de proteína.

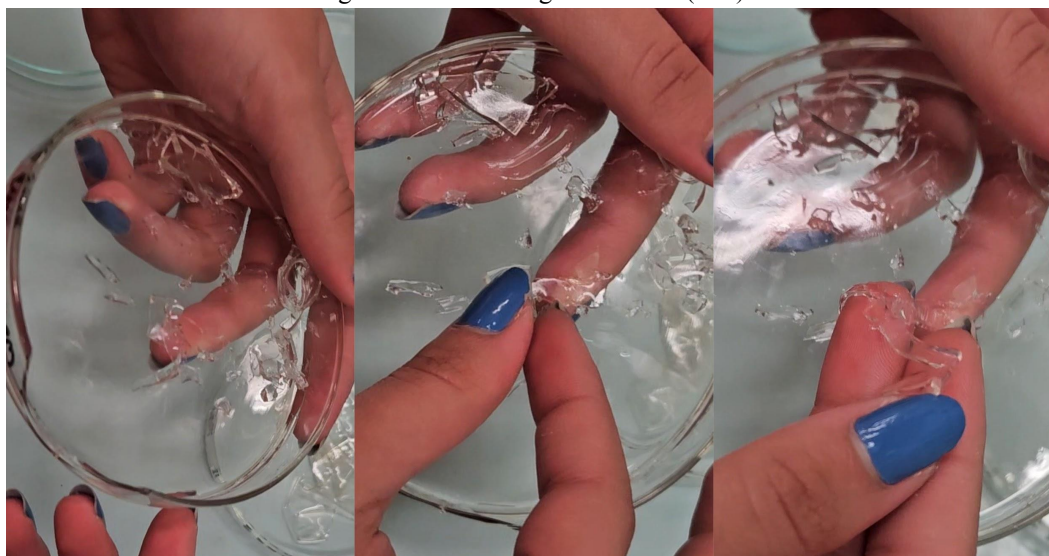
A solução foi vertida em placas de petri, utilizando o volume de 8,5 mL por molde, então mantidas em temperatura ambiente por cinco horas e, em seguida, por duas horas na geladeira a 4°C, visando a estabilização dos filmes.

Após a estabilização dos filmes, as amostras foram submetidas a diferentes tratamentos. Para o tratamento alcóolico, as amostras foram imersas em 40 mL de etanol absoluto por um período de 5 horas à temperatura ambiente. Para avaliação do efeito salino, os filmes foram imersos em solução saturada de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) por 5 horas, à temperatura ambiente, seguida da lavagem com água deionizada para remoção do excesso do sal que precipita parcialmente sobre o filme, junto de sua secagem com papel toalha. Após os tratamentos, as amostras foram levadas à estufa a 35°C por 24 horas.

Resultados e Discussão

Inicialmente, foram produzidos filmes de gelatina solubilizada em água para comparação. As amostras que não foram submetidas a nenhum tratamento, independente da sua concentração, apresentaram aspecto gelatinoso e pegajoso, dificultando seu manuseio e indicando baixa estabilidade estrutural (Figura 1).

Figura 1 - Filmes de gelatina 10% (m/v).



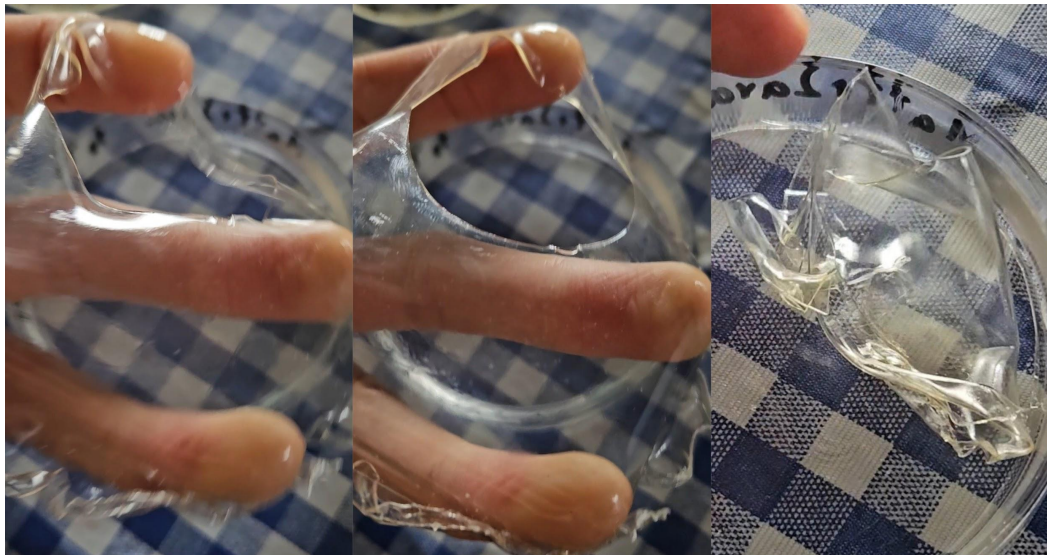
Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

A adição da enzima promoveu melhorias principalmente quanto à diminuição da solubilidade dos filmes em testes superficiais, porém, o aspecto pegajoso e pouco consolidado permaneceu, evidenciando que a utilização isolada da enzima não é o suficiente para obtenção de um filme plástico convencional (Figura 2).

As amostras não tratadas, com uso da enzima ou não, apresentaram intenso crescimento de fungos após, aproximadamente, uma semana (sete dias) de armazenamento, sugerindo baixa resistência à degradação biológica e fácil colonização de bactérias e fungos (Figura 3).

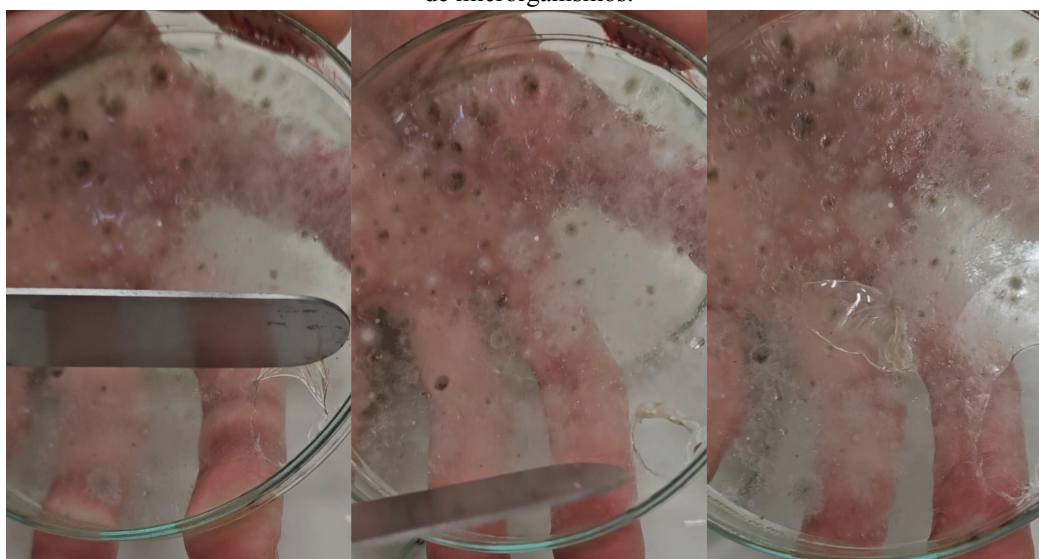


Figura 2 - Filme de gelatina 10% (m/v), com 5% (m/m) de TG em relação a massa seca de proteína.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Figura 3 - Filme de gelatina 10% (m/v), 5% (m/m) de TG em relação a massa seca de proteína e com presença de microrganismos.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Observou-se que os filmes de gelatina submetidos a imersão em etanol perderam flexibilidade e tiveram um aumento em sua rigidez, o que fez com que as amostras quebrassem durante seu manuseio (Figura 4). Em todas as composições estudadas, os filmes submetidos a esse tratamento ficaram compactos, o que resultou em um material fino e pouco flexível, embora mecanicamente resistente. Então, em comparação a amostras preparadas para o tratamento com solução de sal de Hofmeister, deve-se utilizar um volume maior de solução filmogênica, para formação de um filme mais espesso, visando resultados mais satisfatórios após o tratamento alcoólico (Figura 5).



Figura 4 - Filme de gelatina 10% (m/v), com 5% (m/m) de TG em relação a massa seca de proteína, tratado com etanol absoluto.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Figura 5 - Filme de gelatina 10% (m/v), tratado com etanol absoluto.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Já quando tratados com a solução saturada de sulfato de amônio, os filmes apresentaram melhoras significativas, como maior flexibilidade e resistência a estímulos mecânicos. Entretanto, devido a precipitação parcial do sal, houve um aumento da opacidade das amostras quando comparadas as tratadas com etanol (Figura 6).

Figura 6 - Filme de gelatina 10% (m/v), com 5% (m/m) de TG em relação a massa seca de proteína, tratado com solução saturada de sulfato de amônio.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Os filmes de gelatina/quitosana foram obtidos com sucesso em todas as formulações propostas, apresentando maior integridade estrutural, resistência a propagação de microrganismos e menor solubilidade, quando comparados visualmente e manualmente a outras amostras contendo apenas gelatina.

A menor propagação de microrganismos nos filmes com quitosana pode ser atribuída a sua capacidade antimicrobiana, pois, em pH ácido, sua forma policatiónica promove interações eletrostática com componentes aniônicos da parede celular microbiana e da membrana plasmática de bactérias e fungos, aumentando sua permeabilidade e extravasamento do conteúdo intracelular. Além disso, a quitosana atua como uma barreira física quando incorporada a filmes proteicos, dificultando a colonização da superfície (Hu; Gänzle, 2018).

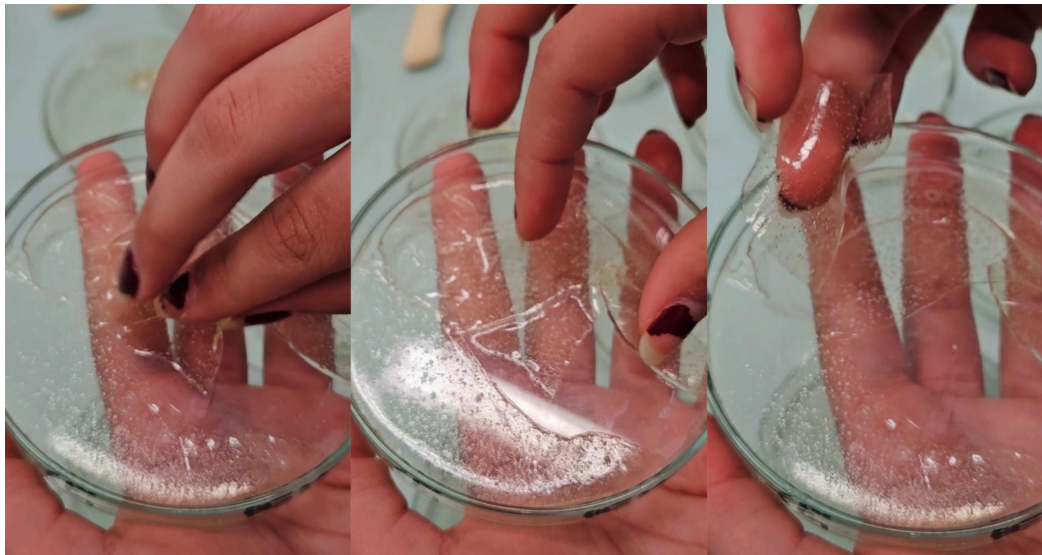
Entre as formulações estudadas, as versões 85/15 e 80/20, contendo TG, destacaram-se pela formação uniforme de filmes com maior flexibilidade e resistência ao manuseio. Esse comportamento pode estar relacionado ao equilíbrio entre a elevada disponibilidade de grupos reativos provenientes da gelatina para a ação da transglutaminase e a quantidade de quitosana suficiente para atuar como agente de reforço estrutural, sem comprometer a formação da rede proteica.

Os filmes formados pela composição 85/15 (Figura 7) apresentaram uma espessura elevada visualmente, especialmente as amostras sem enzima quando submetidas ao tratamento com a solução de sulfato de amônio (Figura 8). Por outro lado, os filmes com TG tiveram maior resistência ao manuseio e ficaram visualmente mais compactos e menos turvos (Figura 9).

Mesmo com a espessura elevada das amostras de razão 85/15 contendo TG, o tratamento com etanol ainda compactou muito os filmes, resultando em um material pouco flexível com certa resistência mecânica (Figura 10).

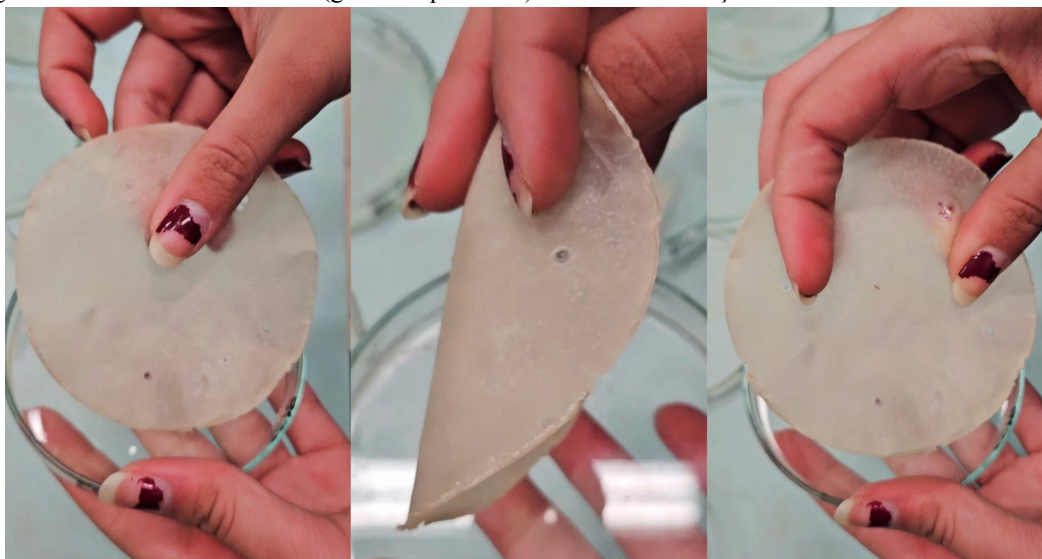


Figura 7 - Filme de razão 85/15 (gelatina/quitosana).



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Figura 8 - Filme de razão 85/15 (gelatina/quitosana) tratado com solução saturada de sulfato de amônio.

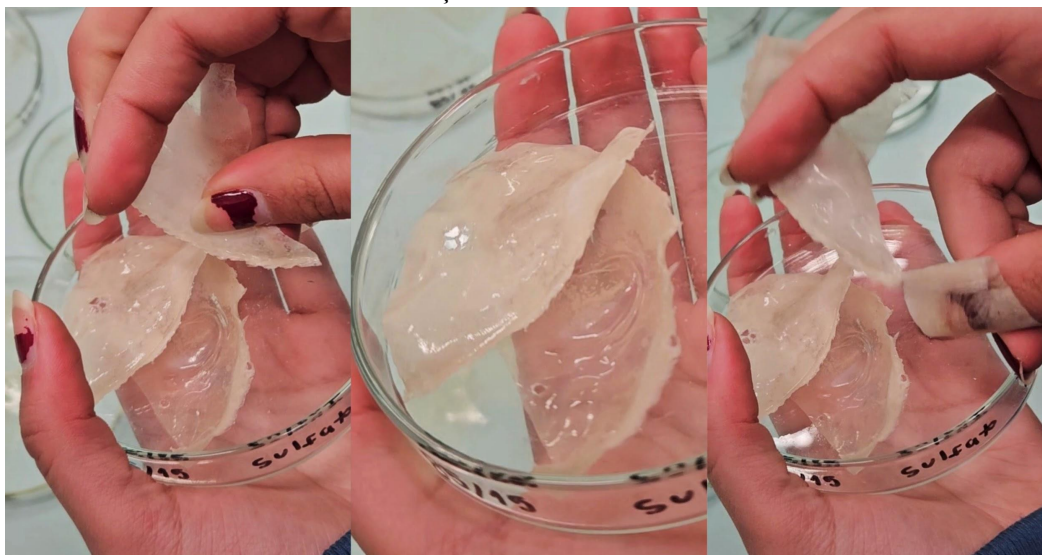


Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

A espessura, baixa ou alta, pode estar relacionada a proporção de quitosana que, em maior ou menor quantidade, promove o empacotamento da cadeia proteica de acordo com a quantidade de grupos amino protonados disponíveis para interações eletrostáticas com a proteína. Além disso, a maior proporção de gelatina disponibiliza mais resíduos de glutamina e lisina disponíveis para ação da TG, produzindo uma matriz polimérica mais rígida e menos suscetível à retração nas etapas de tratamento ou secagem.

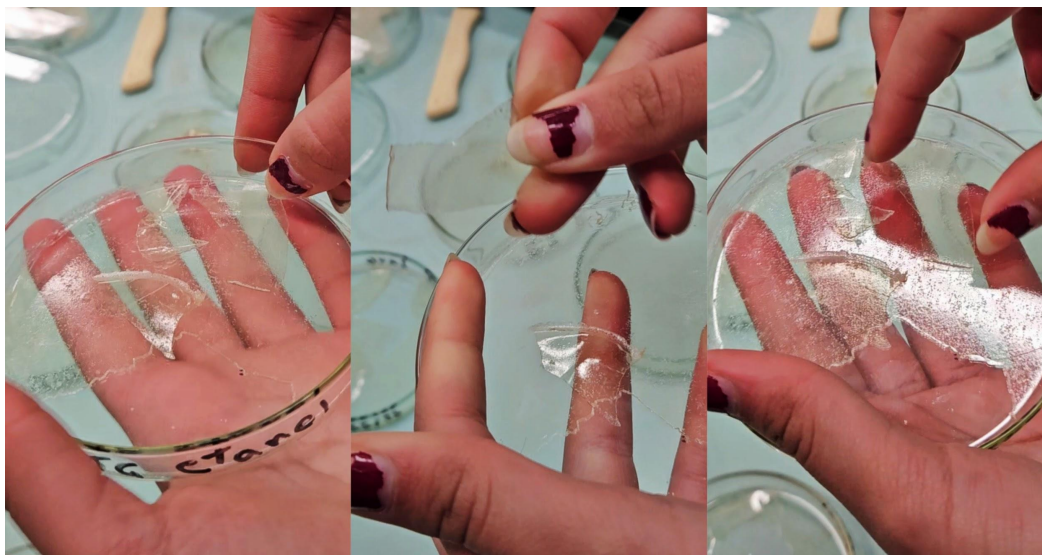


Figura 9 - Filme de razão 85/15 (gelatina/quitosana) com 5% (m/m) de TG em relação a massa seca de proteína tratado com solução saturada e sulfato de amônio.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Figura 10 - Filme de razão 85/15 (gelatina/quitosana) com 5% (m/m) de TG em relação a massa seca de proteína tratado com etanol absoluto.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

A espessura, visualmente maior ou menor, pode estar relacionada a proporção de quitosana presente, que promove um empacotamento variável da cadeia proteica, dependendo da quantidade de grupos amino protonados disponíveis para interações eletrostáticas com a proteína. Além disso, uma maior concentração de gelatina têm mais resíduos de glutamina e lisina disponíveis para ação da TG, produzindo uma matriz polimérica mais rígida e menos suscetível à retração nas etapas de tratamento ou secagem.

Já os filmes de razão 80/20 ficaram mais quebradiços e compactos após ambos tratamentos, indicando que a quantidade de quitosana presente foi capaz de compactar de



maneira eficiente a rede proteica através de interações eletrostáticas. Para essa versão, o tratamento com sulfato de amônio se mostrou mais promissor (Figura 11).

Figura 11 - Filme de razão 80/20 (gelatina/quitosana) com 5% (m/m) de TG em relação a massa seca de proteína tratado com solução saturada e sulfato de amônio.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2026.

Nas amostras de razão maior que 80/20 para a parte de quitosana, como 75/25, foi notável a falta de homogeneidade do material, assim como sua baixa resistência ao manuseio em comparação a filmes de maior concentração de gelatina. Para as amostras com razão maior que 85/15 para a parte de gelatina, como 90/10, foram obtidos materiais semelhantes aos constituídos somente por gelatina com enzima, o que sugere que a razão ideal para formação do filme está entre 85/15 e 80/20.

Conclusões

O uso da enzima transglutaminase para reticulação da cadeia proteica promoveu principalmente a redução da solubilidade e o aumento da estabilidade estrutural da matriz polimérica. Entretanto, seu uso de maneira isolada não foi suficiente para obtenção de um biopolímero com características semelhantes às de um plástico convencional.

A incorporação da quitosana aumentou a estabilidade estrutural, reduziu a propagação de microrganismos e a solubilidade dos filmes, mostrando-se uma estratégia promissora para o reforço de filmes proteicos reticulados.

O tratamento com sulfato de amônio garantiu melhorias mais evidentes quando comparado ao uso de etanol absoluto, pois produziu filmes mais flexíveis e menos quebradiços. A turbidez dos filmes pode ser contornada com lavagens consecutivas, visando a remoção do sal parcialmente precipitado na camada externa do filme.

Entre as formulações avaliadas, as composições 85/15 e 80/20 (gelatina/quitosana), junto do uso da enzima a 5% (m/m, em relação a massa de proteína seca) de transglutaminase e do tratamento com sulfato de amônio, apresentaram os resultados mais promissores, indicando grande potencial para o desenvolvimento de biopolímeros sustentáveis para a substituição de plásticos convencionais provenientes de fontes não renováveis.



Estudos complementares serão realizados para caracterizar os filmes quanto a propriedades mecânicas, por ensaio de tração, a solubilidade em água e a estabilidade térmica por análise termogravimétrica. Adicionalmente, serão realizadas análises estruturais por espectroscopia no infravermelho (FTIR), visando avaliar alterações na organização da matriz polimérica decorrentes da reticulação enzimática e dos tratamentos com etanol ou com o sal associado ao Efeito de Hofmeister. Além disso, a taxa de biodegradabilidade dos filmes será determinada através de uma adaptação dos métodos estabelecidos pela norma ASTM D6400.

Referências

ASTM INTERNATIONAL. ASTM D638-14: **Standard test method for tensile properties of plastics**. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2014.

CHENG, S. *et al.* Cross-linking and film-forming properties of transglutaminase-modified collagen fibers tailored by denaturation temperature. **Food Chemistry**, v. 271, p. 527–535, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618313827>. Acesso em: 24 abr. 2026.

GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R.; LAW, Kara Lavender. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, e1700782, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>. Acesso em: 30 mar. 2026.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2471–2483, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996905002048>. Acesso em: 9 mar. 2026.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Gelatin-based films modified by transglutaminase. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 717–726, 2004.

HOUSSINI, K.; LI, J.; TAN, Q. **Complexities of the global plastics supply chain revealed in a trade-linked material flow analysis**. *Communications Earth & Environment*, v. 6, art. 257, 2025. DOI: 10.1038/s43247-025-02169-5.

Ji, Fangqi; ZHOU, Wei; ZHANG, Ze; ZHANG, Bing. Effects of relative molecular weight distribution and isoelectric point on the swelling behavior of gelatin films. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 857976, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/chemistry/articles/10.3389/fchem.2022.857976/full>. Acesso em: 24 abr. 2026.

MA, Yanli; YANG, Ruijin; ZHAO, Wei. Innovative water-insoluble edible film based on biocatalytic crosslink of gelatin. **Foods**, v. 9, n. 4, p. 503, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/4/503>. Acesso em: 24 abr. 2026.

MANO, Eloisa Biasotto. **Polímeros como materiais de engenharia**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2019.

MOTOKI, Masao; SEGURO, Kiyoshi. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 204–210, 1998.

PENG, Lin; WANG, Hongxia; DAI, Hongjie; FU, Yu; MA, Liang; ZHU, Hankun; YU, Yong; LI, Lin; WANG, Qiang; ZHANG, Yuhao. Preparation and characterization of gelatin films by transglutaminase cross-linking combined with ethanol precipitation or Hofmeister effect. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106421, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106421>. Acesso em: 2 mar. 2026.



SHAH, Aamer Ali *et al.* Biological degradation of plastics: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.

TEIXEIRA, Carlos Eugênio Fortes; REBECHI, Ingrid de Almeida; FONTANELI, Renato Serena. Digital micrometer used in thickness measurement of plastic film compared to standardized instrument. **Materials Sciences and Applications**, v. 8, n. 7, p. 577–583, 2017. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1078812>. Acesso em: 24 abr. 2026.

XU, Jiamin *et al.* Effect of transglutaminase crosslinking on the structural, physicochemical, functional, and emulsion stabilization properties of three types of gelatins. **LWT**, v. 163, p. 113543, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643822004789>. Acesso em: 24 mar. 2026.