



LUIZA VALLE DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE UTILIZAÇÃO DE
FILMES DE QUITOSANA COM ENZIMA LACTASE
IMOBILIZADA EM EMBALAGENS CARTONADAS**

LAVRAS – MG

2021

LUIZA VALLE DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE UTILIZAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA
COM ENZIMA LACTASE IMOBILIZADA EM EMBALAGENS
CARTONADAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Engenharia de Materiais,
para a obtenção do título de Bacharel.

Prof^ª. Dr^ª. Marali Vilela Dias

Orientadora

Dr^ª. Ana Cristina Moreira Andrade Araújo

Coorientadora

LAVRAS – MG

2021

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

de Oliveira, Luiza Valle.

Análise da viabilidade de utilização de filmes de quitosana com
enzima lactase imobilizada em embalagens cartonadas / Luiza Valle
de Oliveira. - 2021.

47 p. : il.

Orientador(a): Marali Vilela Dias.

Coorientador(a): Ana Cristina Moreira Andrade Araújo.

TCC (graduação) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Lactase. 2. Quitosana. 3. Imobilização de enzimas. I. Dias,
Marali Vilela. II. Araújo, Ana Cristina Moreira Andrade. III. Título.

LUIZA VALLE DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE UTILIZAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA
COM ENZIMA LACTASE IMOBILIZADA EM EMBALAGENS
CARTONADAS**

**ANALYSIS OF THE FEASIBILITY OF USING CHITOSAN FILM WITH
IMMOBILIZED LACTASE ENZYME IN CARTON PACKAGING**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Materiais, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 22 de novembro de 2021.

Profª Drª. Marali Vilela Dias UFLA

Prof. Dr. Rafael Farinassi Mendes UFLA

Profª. Drª. Soraia Vilela Borges UFLA

Profª. Drª. Marali Vilela Dias

Orientadora

Drª. Ana Cristina Moreira Andrade Araújo

Coorientadora

LAVRAS – MG

2021

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Simone, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todas as decisões, com seus conselhos e carinho incondicional. Obrigada por ser meu porto seguro e maior confidente quando eu mais preciso.

Ao meu pai, José Claudio, meu exemplo de conquista, superação e crescimento profissional, por todo apoio e confiança no meu potencial em todos esses anos.

À minha avó, Maria Cecília, por ter tornado os anos em Lavras ainda mais fáceis, sendo o aconchego familiar que eu precisava nos momentos mais difíceis. Por ter se tornado a minha segunda mãe e vibrado a cada conquista, como se fosse sua. Você é a maior inspiração para o meu trabalho de conclusão de curso, e dedico à você esta vitória.

Ao meu irmão, Bernardo, aos meus tios, Denise e Lincoln, e aos meus avós (Roldão, Sueli e Odilon), por sempre acreditarem em mim e na minha capacidade. Esse sonho só é possível graças ao apoio de vocês.

Ao Otto e à Maia, por serem os melhores companheiros que poderiam existir. Por tornarem a minha vida mais leve e trazerem alegria para os meus dias mais cinzentos.

Às minhas amigas, Ana Luiza, Camila, Gabriela, Paula, Rafaella, Rebeca e, em especial, à melhor amiga que eu poderia ter, Caroline, por demonstrarem em atos a força de uma amizade, independente do tempo e da distância. Estaremos sempre juntas.

Aos meus queridos amigos, Taciane, Gustavo Lara e Maria Paula por todas as risadas, conselhos, noites de estudo, e por se tornarem a minha família em Lavras.

À Transforma Júnior, pelas amizades e experiências que muito me acrescentaram para chegar onde estou. Um carinho especial pelas amizades que fiz nesta etapa: Luiza Freire, Marco Aurélio, Lucas Zenon e Getúlio Vilela.

Às minhas orientadoras, Marali e Ana Cristina, por acreditarem no meu potencial e terem me dado a oportunidade de crescimento e aprendizado.

Ao Arthur, que sempre acreditou em mim antes que eu mesma fosse capaz de fazê-lo. Obrigada por todo apoio, e por me fazer enxergar a engenheira que sempre existiu em mim.

À minha companheira de casa, Letícia, por estar comigo na etapa final do curso e ter tornado esse último ano ainda mais leve e especial.

Muito obrigada!

RESUMO

A β -galactosidase (lactase) é uma enzima de grande importância para a indústria de alimentos. Ela é amplamente utilizada na hidrólise da lactose para obtenção de produtos com baixo teor de lactose. A imobilização de enzimas é um método vantajoso no que diz respeito principalmente à possibilidade de reuso das mesmas e consequente redução nos custos de produção. A quitosana é um biopolímero encontrado principalmente nas carapaças de crustáceos e é uma alternativa como matéria-prima na formulação de filmes para alimentos. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver filmes de quitosana incorporados com a enzima lactase imobilizada a fim de reduzir a lactose no leite, além de poderem ser utilizados como uma alternativa de substituição do material da camada interna de embalagens cartonadas, o polietileno. Para tal, foram formulados filmes utilizando-se glutaraldeído como agente reticulante e duas diferentes concentrações de lactase (3 e 5 mL). Esses foram avaliados quanto à eficiência de hidrólise da lactose do leite em diferentes temperaturas, 7 °C e 25 °C, nos períodos de 48 e 24 horas, respectivamente, em cinco ciclos de reutilização. Foram avaliadas também a influência dos filmes no aumento de acidez dos leites que entraram em contato com os mesmos. Uma pesquisa de aceitação foi realizada a fim de conhecer a percepção dos consumidores frente às inovações em embalagens de alimentos. Por fim, foram feitas análises das propriedades mecânicas através de ensaio de perfuração e tração e comparação com um filme de polietileno de baixa densidade. Os filmes analisados foram capazes de hidrolisar mais de 60% de lactose nos cinco ciclos. Os com 5 mL de lactase hidrolisaram em mais de 70% a lactose do leite, nas duas temperaturas, em todos os ciclos analisados. As embalagens desenvolvidas no presente trabalho podem ser consideradas como uma boa alternativa para serem aplicadas como embalagens de alimentos para leite. Os consumidores entrevistados apresentaram boas intenções de compra de um leite envasado na embalagem em questão. Devido à imobilização das enzimas, essa embalagem pode ser reutilizável. Através da caracterização dos filmes em relação às suas propriedades mecânicas e comparação com o polietileno de baixa densidade, sugere-se estudos mais profundos com relação a aplicação de agentes plastificantes na estrutura dos filmes de quitosana.

Palavras-chave: Lactose. Imobilização de enzimas. Embalagem ativa. Polietileno.

ABSTRACT

β -galactosidase (lactase) is an enzyme of great importance for the food industry. It is widely used in lactose hydrolysis to obtain products with low lactose content. The immobilization of enzymes is an advantageous method with regard mainly to the possibility of reusing them and the consequent reduction in production costs. Chitosan is a biopolymer found mainly in shellfish shells and is an alternative raw material in the formulation of films for food. The present work aimed to develop chitosan films incorporated with the enzyme lactase immobilized in order to reduce lactose in milk, in addition to being used as an alternative to replace the material of the inner layer of carton packs, polyethylene. To this end, films were formulated using glutaraldehyde as a crosslinking agent and two different concentrations of lactase (3 and 5 mL). They were evaluated for the efficiency of lactose hydrolysis from milk at different temperatures, 7 °C and 25 °C, in periods of 48 and 24 hours, respectively, in five cycles of reuse. The influence of the films on the increase of acidity of the milk that came into contact with them was also evaluated. An acceptance survey was carried out in order to know the perception of consumers regarding innovations in food packaging. Finally, analyzes of the mechanical properties were made through perforation and traction tests and comparison with a low-density polyethylene film. The analyzed films were able to hydrolyze more than 60% of lactose in the five cycles. The films with 5 mL of lactase hydrolyzed the lactose by more than 70%, at both temperatures, in all analyzed cycles. The packaging developed in this work can be considered as a good alternative to be applied as food packaging for milk. Consumers interviewed had good intentions to buy a milk bottled in the packaging in question. Due to the immobilization of enzymes, this packaging can be reusable. Through the characterization of the films in relation to their mechanical properties and comparison with low density polyethylene film, further studies are suggested regarding the application of plasticizing agents in the structure of chitosan films.

Keywords: Lactose. Enzyme immobilization. Active Packaging. Polyethylene.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1.	Quitosana.....	11
2.2.	Lactose.....	13
2.3.	Enzima β -galactosidase.....	14
2.4.	Imobilização de enzimas.....	16
2.4.1.	Suportes à base de quitosana para imobilização de enzimas.....	17
2.5.	Embalagens cartonadas.....	18
2.5.1.	Polietileno em embalagens cartonadas.....	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1.	Desenvolvimento dos filmes.....	20
3.1.1.	Preparação das macropartículas de quitosana.....	21
3.1.2.	Preparação de β -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.....	22
3.1.3.	Síntese do filme de quitosana.....	22
3.1.4.	Síntese do filme de QUI com lactase imobilizada em MPQS reticuladas com GLU.....	23
3.2.	Ensaio.....	23
3.2.1.	Avaliação enzimática.....	23
3.2.2.	Análise do pH.....	26
3.2.3.	Pesquisa de aceitação.....	27
3.2.4.	Espessura.....	27
3.2.5.	Ensaio de tração.....	28
3.2.6.	Ensaio de perfuração.....	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1.	Desenvolvimento dos filmes.....	29
4.1.1.	Preparação das macropartículas de quitosana.....	29
4.1.2.	Preparação de β -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.....	30
4.1.3.	Síntese do filme de quitosana.....	30

4.1.4.	Síntese do filme de QUI com lactase imobilizada em MPQS reticuladas com GLU.....	31
4.2.	Ensaio.....	31
4.2.1.	Avaliação enzimática.....	31
4.2.2.	Análise do pH.....	33
4.2.3.	Pesquisa de aceitação.....	34
4.2.4.	Espessura.....	35
4.2.5.	Ensaio de tração.....	35
4.2.6.	Ensaio de perfuração.....	37
5.	CONCLUSÃO.....	37
6.	REFERÊNCIAS.....	38
	APÊNDICE.....	46

1. Introdução

A lactose, principal carboidrato encontrado no leite, é constituída por dois monossacarídeos, glicose e galactose. A intolerância a este carboidrato, por sua vez, consiste na má digestão e absorção da lactose proveniente da redução da atividade da enzima β -galactosidase, nomeada também como lactase (BATISTA et al., 2016).

Ainda segundo Batista et al. (2016), a intolerância à lactose está presente em 65% da população mundial. E, outros estudos apontam prevalência elevada na população brasileira, sendo distribuída principalmente em duas regiões do Brasil: 44,1% em indivíduos do Sul do Brasil e 60,8% em indivíduos do Sudeste do Brasil (PEREIRA; FURLAN, 2004). Visando encontrar soluções acerca da intolerância à lactose - problema que acomete grande parte da população mundial e brasileira - muitas possibilidades vêm sendo desenvolvidas, entre elas as embalagens ativas.

De acordo com Araújo (2020), a tecnologia de embalagens ativas é baseada na incorporação de substâncias no material polimérico da embalagem e pode agir de três formas: através da migração para o alimento ao longo de sua vida útil como, por exemplo, embalagens antimicrobianas, aromatizantes; através da absorção de algum componente do alimento ou da embalagem, como por exemplo, embalagens absorvedora de umidade ou de oxigênio; ou então reagir através do contato com os constituintes do alimento, como é o caso da imobilização de enzimas.

A imobilização de enzimas no material polimérico permite a sua reutilização diminuindo custos e, além disso, segundo Araújo (2020), também proporciona um controle do processo catalítico e alta seletividade, aumenta a estabilidade da enzima e permite um processamento contínuo já que a enzima irá atuar após o envase do alimento na embalagem.

Alguns trabalhos, como de Mendes et al. (2011) e Cardoso et al. (2009), já foram realizados para a imobilização de enzimas em diferentes substratos. Dentre estes estudos, destacam-se trabalhos em que foram desenvolvidas microcápsulas de quitosana para imobilização de lactase e que utilizaram gel de alginato de cálcio para imobilizar da lactase, como em Vieira (2009). No entanto, não foram encontrados trabalhos que relatam a imobilização de enzimas em filmes contendo macropartículas de quitosana, formando uma embalagem ativa.

A quitosana (QUI) é um polímero atóxico, biodegradável e biocompatível, e por isso é considerado um polímero interessante de se utilizar para produção de embalagens (BAKSHI et al., 2019). Devido a essas características filme de quitosana pode ser considerado um promissor

biomaterial, que pode ser utilizado como estudo para a preparação de embalagens cartonadas, através da substituição da camada interna de polietileno. Assim, além da característica sustentável pela utilização de um polímero de origem natural, também pode ser estudada a possibilidade de reutilização da embalagem, quando a mesma possuir enzima imobilizada em sua formulação.

Considerando as alegações expostas acima, esse trabalho é focado em analisar a atividade enzimática de filmes de quitosana com lactase imobilizada, e comparar as propriedades mecânicas do filme produzido com o filme de polietileno presente em embalagens cartonadas.

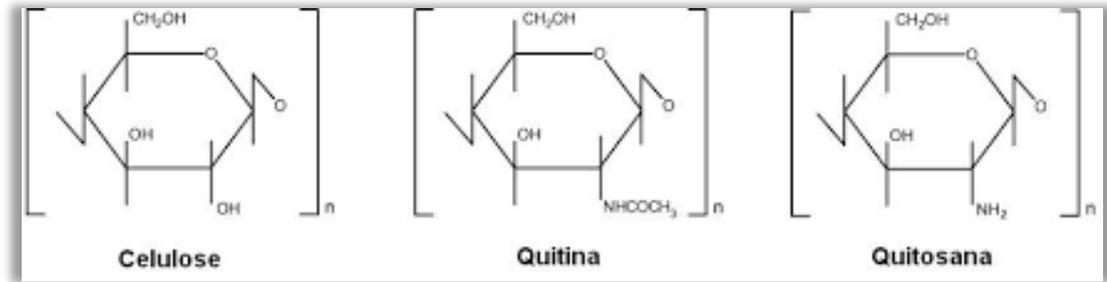
2. Revisão de literatura

2.1. Quitosana

A quitina foi descoberta em 1811, pelo professor francês Henri Braconnot. Ele isolou a quitina em algumas espécies de fungos e a nomeou de fungina. O termo “quitina” significa túnica ou cobertura, e faz referência à sua dureza por funcionar como uma capa protetora de invertebrados. Em 1823, Odier deu o nome quitina quando esta foi isolada em insetos e foi o primeiro a relatar a semelhança entre as substâncias presente na armadura dos insetos e nos tecidos vegetais. Observou-se posteriormente a presença de quitina na carapaça de caranguejo e sugeriu-se que ela seria o material formador do exoesqueleto de insetos e, possivelmente, de aracnídeos, segundo Nascimento et al. (2016).

A quitosana é um biopolímero que possui uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. Os grupos hidroxila (OH^-) estão dispostos na estrutura geral dos biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH_2) na estrutura da quitosana. De acordo com Lima (2015), ela é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais. A Figura 1 mostra a estrutura química dos biopolímeros celulose, quitina e quitosana.

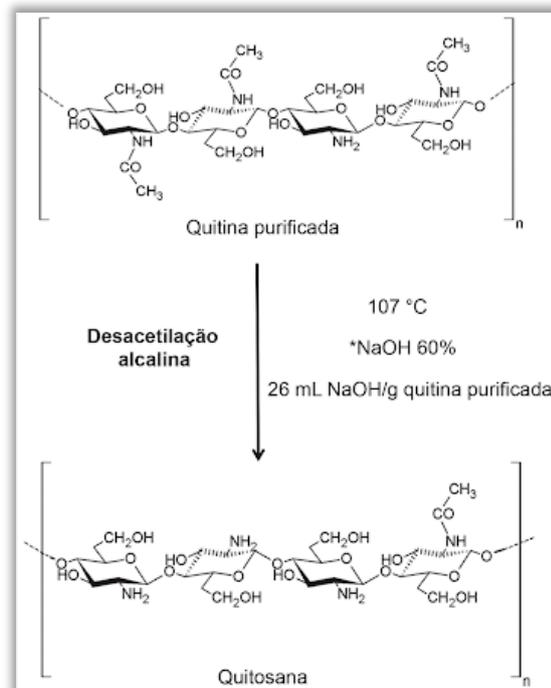
Figura 1 – Estrutura dos biopolímeros celulose, quitina e quitosana.



Fonte: Mendes et al. (2011)

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia vem sendo estudada, tendo na literatura a menção de muitos polimorfismos. Ela é obtida a partir da desacetilação química ou enzimática da quitina, como mostrado na Figura 2, que é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose. Segundo Nascimento et al. (2016), a quitina é encontrada em carapaças de crustáceos, em insetos, moluscos e na parede celular de fungos.

Figura 2 – Processo de obtenção da quitosana a partir da quitina purificada por desacetilação alcalina.



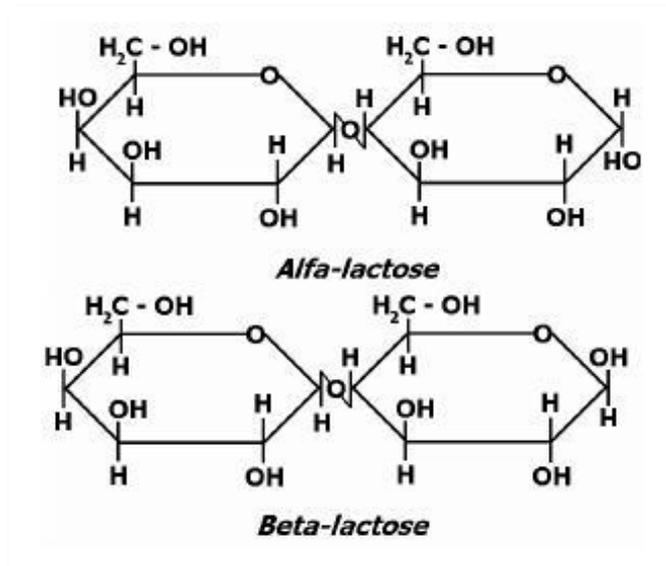
Fonte: Felipe (2017)

Quimicamente, a quitosana é uma poliamina. Ainda segundo Nascimento et al. (2016), esta é um polímero natural, de baixa toxicidade, passível de ser manufaturada em forma de filmes, fibras, lâminas e géis. Possui importantes propriedades biológicas, fisiológicas e farmacológicas. É uma molécula bastante funcional, desempenhando atividade cicatrizante, imunoestimulatória, antitumoral, hemostática, anticoagulante, mucoadesiva, hipolipêmica, antimicrobiana, dentre outras. Tem sido proposta também como suporte polimérico para liberação de gene, liberação controlada de fármacos, cultura celular, pele artificial e suturas cirúrgicas, entre outros.

2.2. Lactose

A lactose é o principal carboidrato do leite e encontra-se presente em grande quantidade no soro (em torno de 70%) e no leite integral (em torno de 5%). Segundo Pereira et al. (2012), trata-se de um dissacarídeo sintetizado nas células alveolares da glândula mamária através da reação de um radical de D-glicose e outro de D-galactose unidos por uma ligação β -1,4-glicosídica. É encontrada sob duas formas isoméricas cristalinas α hidratada e β anidra, as quais apresentam propriedades físicas distintas, como visto na Figura 3. Em solução, há a transformação de uma forma na outra até se alcançar o equilíbrio, fenômeno denominado mutarrotação.

Figura 3 – Estrutura química dos isômeros da lactose.



Fonte: Pereira et al. (2012)

As frações de alfa e beta lactose possuem solubilidades distintas e a mutarrotação torna-se um fator importante na cristalização e dulçor do leite (HOLSINGER, 1997).

A lactose é uma importante fonte de energia para o organismo humano proporcionando 16,8 kJ.g⁻¹. Ela é usada em dietas, visto que os níveis de glicemia são reduzidos quando comparados aos níveis de glicemia atingidos com o consumo de glicose. A hidrólise da lactose em monoses (glicose e galactose) aumenta este índice, sendo os monossacarídeos, mais facilmente digeríveis e solúveis (PEREIRA et al., 2012).

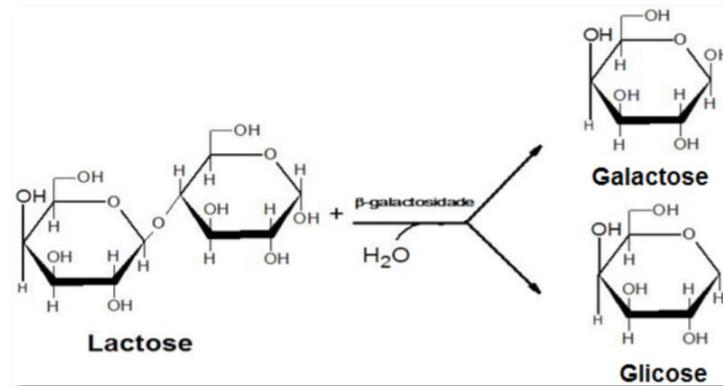
Segundo Zychar (2017), a lactose apresenta baixo poder adoçante e baixa solubilidade em água, sendo digerida no intestino delgado através da enzima dissacaridase também conhecida como lactase. A enzima lactase está localizada no revestimento do intestino delgado, e atua sobre a lactose, sendo responsável por hidrolisar a ligação glicosídica. O resultado desta hidrólise são monossacarídeos de glucose e galactose, que será convertida em glicose posteriormente. A hidrólise da lactose é de extrema importância, pois aumenta a solubilidade e digestibilidade do leite. Além disso, deficiências na enzima lactase ocasionam transtornos intestinais como diarreia e grande desconforto abdominal, a má digestão da lactose é nomeada Intolerância à Lactose (IL).

Na indústria de alimentos a lactose merece destaque na fabricação de iogurtes e queijos (fermentação da lactose), e em outros alimentos não lácteos, como sopas, bebidas, produtos cárneos e misturas de especiarias. Na indústria farmacêutica a lactose é comumente usada nas formulações como excipiente em cápsulas e comprimidos.

2.3. Enzima β - galactosidase

De acordo com Pereira et al. (2012) e Araújo (2020), a β -galactosidase é uma das enzimas mais utilizadas na indústria de alimentos. Ela pertence ao grupo das enzimas conversoras de sacarídeos da família das hidrolases e está diretamente ligada com a lactose. Para ser absorvida, a lactose precisa ser hidrolisada no intestino pela β -galactosidase, chamada simplesmente de lactase. No corpo humano, a lactase é encontrada mais abundantemente no jejuno (a porção do intestino delgado compreendida entre o duodeno e o íleo), sendo esta enzima um dos vários dissacarídeos contidos na borda das células epiteliais do intestino delgado. Sua função é, especificamente, hidrolisar a lactose em açúcar, glicose e galactose. A Figura 4 ilustra este processo de hidrólise.

Figura 4 – Hidrólise enzimática da lactose catalisada por β -galactosidase



Fonte: Moreira et al. (2018)

Na maioria dos mamíferos, a atividade da lactase diminui após o desmame, mas, em alguns grupos étnicos, como nos caucasianos da Europa Ocidental, a atividade da lactase pode persistir na vida adulta, permitindo total digestão de grandes quantidades de lactose na dieta (MATTAR; MAZO, 2010). No entanto, está se tornando cada vez mais comum problemas como a má ingestão da lactose, que ocorre devido a um declínio na atividade da enzima β -galactosidase.

Os termos lactase não persistente ou deficiência de lactase vem sendo utilizados como sinônimos de má ingestão da lactose. Os indivíduos com má ingestão de lactose podem ou não manifestar os sintomas clínicos de intolerância a lactose (IL) em função do grau de decréscimo da atividade da lactase. Dessa forma, a deficiência da lactase pode existir, sem que necessariamente o indivíduo manifeste os sintomas de IL (PEREIRA et al., 2012). Para o aparecimento dos sintomas decorrentes da deficiência primária de lactase é necessária uma redução de pelo menos 50% da atividade da enzima, o que explica parte da variação na tolerância a pequenas doses de lactose por indivíduos com intolerância (BATISTA et al. 2016).

A exclusão do leite da dieta de pacientes portadores de má ingestão da lactose pode acarretar prejuízos nutricionais e consequentes danos à saúde. Por isso, existem no mercado produtos alternativos, com reduzidos teores de lactose, capazes de suprir as necessidades nutricionais desses pacientes. Ainda assim, a busca por inovações com relação a enzima lactase continua sendo feita, para que num futuro próximo todos os indivíduos sejam capazes de consumir alimentos com alto teor de lactose sem enfrentar preocupações.

2.4. Imobilização de enzimas

As enzimas são proteínas com propriedades catalíticas e em geral obedecem ao mecanismo de catálise que relaciona a velocidade da reação com o equilíbrio de formação do complexo enzima-substrato. De acordo com Quilles (2014), assim como os catalisadores químicos, elas proporcionam uma rota reacional alternativa à rota convencional, com uma menor energia de ativação e, conseqüentemente, um menor tempo de reação. Ao final da catálise, a enzima é regenerada na sua forma inicial, disponível para catalisar outra molécula de substrato. Porém, a principal desvantagem do uso de enzimas é o tempo reacional, muito superior quando comparado com os catalisadores químicos, além de apresentarem elevado custo.

Pensando nessa última questão, os métodos de imobilização de enzimas ou células são empregados com a finalidade de reaproveitamento das enzimas e conseqüente minimização dos custos. Além disso, o método de imobilização torna a enzima inerte ao meio reacional, por estar ligada, química ou fisicamente, em um suporte sólido, de forma a minimizar ou eliminar a contaminação do produto final pela mesma. Ainda segundo Quilles (2014), a imobilização de enzimas também pode ser utilizada como método para reutilização ou purificação de proteínas, o que reduz custos e permite o emprego de operação contínua em biorreatores. Outro ponto importante com relação às enzimas quando imobilizadas é que elas apresentam, em muitos casos, maior estabilidade, tanto sob condições de armazenamento como em condições operacionais (em relação a desnaturação por calor, por solventes orgânicos ou por autólise). Isso ocorre principalmente por apresentarem uma estrutura mais rígida quando se ligam ao suporte. Além disso, a enzima imobilizada não penetra facilmente na pele, e por isso, existe baixa ou nenhuma alergenidade (SHELDON; VAN PELT, 2013).

De acordo com Araújo (2020), mesmo sendo um processo com inúmeras vantagens, após a imobilização as enzimas podem sofrer modificações nas suas propriedades químicas e físicas. Os efeitos da imobilização sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas e especificidade, além da produtividade da enzima devem ser considerados. Porém, à medida que se faz uma escolha criteriosa do método de imobilização e suporte adequado, assim como o tipo de solvente e a avaliação e otimização da quantidade de água e solubilidade dos substratos e produtos, os problemas podem ser evitados ou diminuídos.

2.4.1. Suportes à base de quitosana para imobilização de enzimas

Assim como em estudos realizados por Cao (2005), alguns carboidratos insolúveis, como o amido, a celulose e a quitosana, bem como proteínas como a gelatina e a albumina, vêm sendo utilizados como suporte para a imobilização de enzimas. Nesse sentido, os biopolímeros naturais são considerados uma alternativa interessante, do ponto de vista econômico, no que diz respeito à sua utilização como suporte para imobilização de enzimas. Dentre as proteínas, no entanto, os polissacarídeos apresentam maior destaque para aplicação deste método, por serem considerados seguros do ponto de vista biológico, além de bastante hidrofílicos, garantindo um ambiente adequado para muitas enzimas (CANTONE et al., 2013).

Dentre os polissacarídeos, é sabido que a quitosana possui inúmeras aplicações. Mais especificamente na área de alimentos, devido às suas propriedades antimicrobianas, a quitosana é usada para redução do crescimento microbiano e também como coberturas de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes processados. Em estudo recente, realizado por Goy et al. (2016), foi possível observar que a quitosana e seu derivado, N,N,N-trimetilquitosana, ambos os materiais sob a forma de gel, mostraram atividade antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Também foi realizado um estudo, por Divya et al. (2017), no qual a atividade antimicrobiana de nanopartículas de quitosana contra os patógenos *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foi comparada com a atividade antimicrobiana da quitosana e quitina contra esses mesmos patógenos. Os autores verificaram que as nanopartículas de quitosana apresentaram atividade antimicrobiana superior contra todas as bactérias, demonstrando uma boa aplicabilidade das mesmas como agente antimicrobiano.

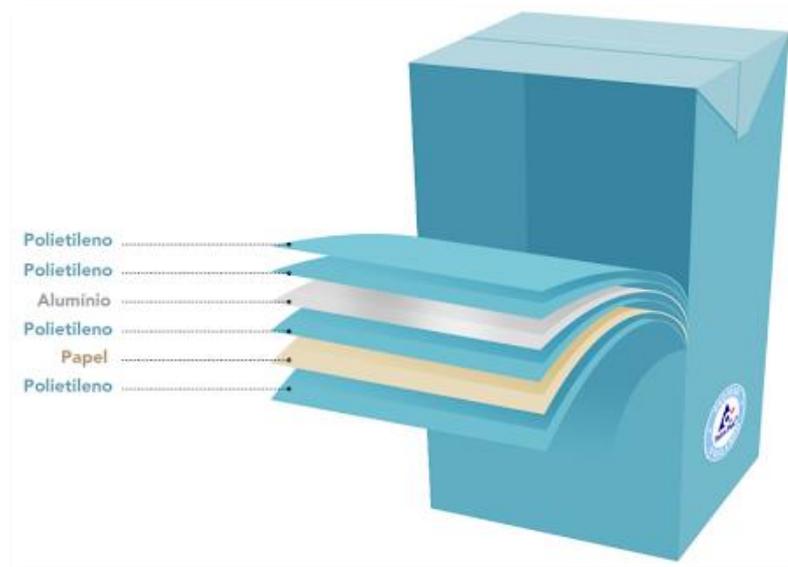
Na seleção de um suporte para determinada aplicação, é importante analisar suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material (MENDES et al., 2011). No caso da quitosana, a sua aplicação como suporte para a imobilização de enzimas deve-se às suas diferentes configurações geométricas (como pó, escamas, hidrogeis, membranas, fibras e outras), alta afinidade por proteínas e biocompatibilidade, além da presença de diferentes grupos funcionais, como hidroxila e amino, permitindo a utilização de diferentes métodos de imobilização (BERGER et al., 2004; KUMAR, 2000).

2.5. Embalagens cartonadas

Segundo Valim et al. (2015), as embalagens longa vida, introduzidas no Brasil em 1957, apresentam grande aceitação no mercado por oferecerem vantagens como barreira à entrada de luz, água, ar e microrganismos, de forma a evitar a destruição de importantes vitaminas e nutrientes nos alimentos. A proteção no contato do alimento com o oxigênio também é outro fator importante, pois assim são evitadas reações de oxidação que possam levar a deterioração do mesmo. As empresas que comercializam embalagens desta categoria, têm o foco em desenvolvimento de embalagens para leite que sejam capazes de proteger o valor nutricional e o sabor do produto envasado. Além disso, o compósito também oferece proteção no momento do transporte e durante o manuseio para consumo.

Tais embalagens apresentam um caráter de compósito laminado já que, de acordo com Valim et al. (2015), são formadas principalmente por uma combinação de 75% em massa de papel, 20% de polietileno e 5% de alumínio. Essas embalagens cartonadas na empresa são produzidas através de multicamadas desses materiais, como ilustra a Figura 5.

Figura 5 – Camadas de uma embalagem cartonada.



Fonte: Tetra Pak (2020)

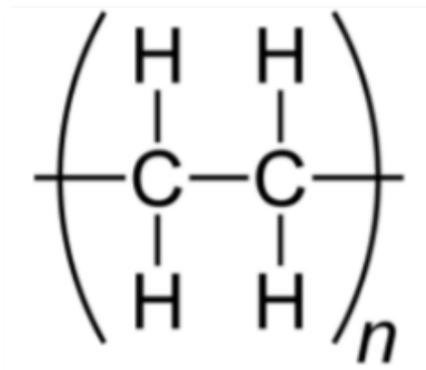
A partir da imagem é possível perceber a presença de 4 camadas de polietileno juntamente com uma folha de alumínio e uma camada de papel-cartão.

De acordo com a Tetra Pak®, cada material possui sua função nesta embalagem, sendo o papel-cartão considerado o principal material, devendo proporcionar estabilidade, resistência e suavidade para a superfície de impressão; a folha de alumínio responsável pela proteção contra o oxigênio e luz, mantendo sabor e valor nutricional do alimento; e o polietileno, que além de proteger contra a umidade externa, também funciona como adesivo entre o papel-cartão e o alumínio.

2.5.1. Polietileno em embalagens cartonadas

Segundo Ferreira e Santana (2015), uma molécula de polietileno é, na sua forma mais simples, composta por átomos de carbono ligados covalentemente a um par de átomos de hidrogênio. Nas extremidades desta cadeia estão grupos metila, como mostra a Figura 6.

Figura 6 – Estrutura química do polietileno



Fonte: Rodrigues (2018)

Apesar da mesma cadeia principal, este polímero pode apresentar variações a partir de ramificações, modificando as propriedades do material. Quanto menor a quantidade de ramificações, mais elevado será o grau de cristalinidade do material, levando a um maior empacotamento e, conseqüentemente, a uma maior densidade do polímero. Por outro lado, uma maior quantidade de ramificações levará, analogamente, a uma menor densidade do material. De acordo com Ferreira e Santana (2015), para casos em que este polímero apresentar menor densidade (entre 0,90 e 0,94 g/cm³), tem-se o Polietileno de Baixa Densidade (PEBD). Já para

casos em que o polímero apresentar maiores densidades (entre 0,94 e 0,97 g/cm³), tem-se o Polietileno de Alta Densidade (PEAD).

No caso das embalagens Tetra Pak®, o polietileno usado para produção da embalagem é o polietileno de baixa densidade (PEBD). Entre as principais características deste material, está uma combinação entre tenacidade, boa resistência ao impacto, alta flexibilidade, fácil processabilidade e estabilidade. Ainda, segundo Rodrigues (2018), este é o termoplástico mais empregado na fabricação de embalagens flexíveis, justamente por se tratar de um material com boa resistência mecânica, química e térmica. Além disso, esse polímero é muito resistente à água e atacado por poucos agentes oxidantes.

Por essas e outras características desejáveis já citadas anteriormente, em embalagens cartonadas para alimentos é importante que este polímero apresente uma boa resistência à ruptura e punctura, para que o produto não corra o risco de entrar em contato com a folha de alumínio.

3. Material e métodos

3.1. Desenvolvimento dos filmes

Primeiramente foi necessário realizar a síntese de alguns constituintes do filme e, a partir desses, foram desenvolvidos os filmes finais.

Foram formulados filmes de quitosana (QUI) com enzima lactase imobilizada em macropartículas de quitosana (MPQS) reticuladas com glutaraldeído (GLU), em duas diferentes concentrações de lactase: 3 e 5 mL. Foram realizadas análises específicas com cada um deles a fim de se ter uma comparação entre os filmes incorporados com as diferentes quantidades de constituintes.

Os materiais utilizados como principais constituintes dos filmes foram: Quitosana, com alto peso molecular (PM = 71,3 kDa) e grau de desacetilação de 85,9%, adquirida com a Polymar Ciência e Nutrição S/A; Glutaraldeído 25% em água e Ácido Lático P.A., obtidos com a Sigma-Aldrich; Lactase derivada de *Kluyveromyces lactis* (MAXILACT LGI 5000), com atividade ≥ 5000 U/g, fornecida pela Globalfood.

Concomitante ao desenvolvimento dos filmes, também foi obtido um filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) do fornecedor Reciplast Industria de Embalagens,

modelo 23836, para suporte na comparação das propriedades mecânicas com os filmes de quitosana desenvolvidos. A amostra de filme PEBD estava acompanhada de ficha técnica do produto, onde foram obtidas as principais informações sobre este material.

O desenvolvimento dos filmes foi feito conforme a Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma de desenvolvimento dos filmes

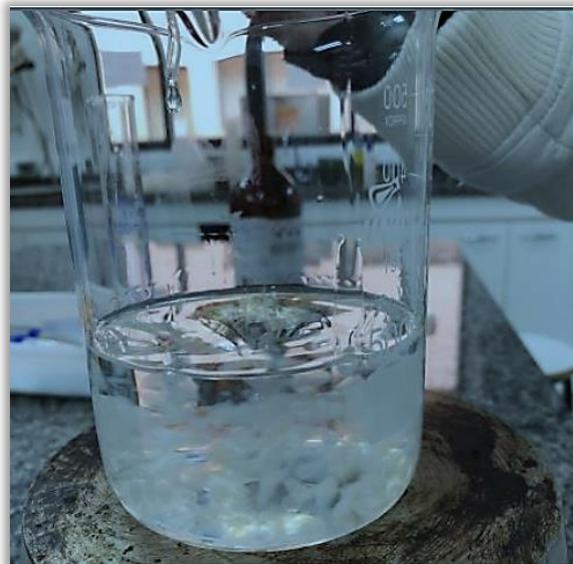


Fonte: Do autor, 2021.

3.1.1. Preparação das macropartículas de quitosana

Com base em Klein et al. (2012), as macropartículas de quitosana foram preparadas pelo método de precipitação do seguinte modo: a quitosana foi dissolvida (2% massa/volume) em ácido láctico a 0,35M através de ultrassom durante 15 minutos para remoção das bolhas de ar. A solução foi então adicionada, sob agitação lenta, gota a gota na solução de coagulação (hidróxido de sódio 1M e etanol 26% volume/volume), conforme Figura 8. As macropartículas obtidas foram lavadas com água destilada até atingir a neutralidade.

Figura 8 – Gotejamento da solução de quitosana na solução coagulante.



Fonte: Do autor (2019)

3.1.2. Preparação de β -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído

Ainda conforme Klein et al. (2016), Klein et al. (2012) e Wang et al. (2011), com modificações, as macropartículas de quitosana foram então incubadas durante 8 horas à temperatura ambiente, sob agitação suave, em solução tampão fosfato de sódio 0,02M (pH 7,0) com glutaraldeído (2,8% massa/volume). Em seguida, foi adicionada a enzima β -galactosidase, utilizando-se duas diferentes concentrações, 3 e 5 mL, onde ocorreu a reticulação (cross-linking) das macropartículas e as enzimas, com auxílio do glutaraldeído. As soluções foram mantidas a temperatura ambiente por 15 horas, sob agitação suave. Após a reticulação, lavagens sucessivas com tampão acetato 0,1M (pH 4,5), NaCl (1M) e etilenoglicol (30% volume/volume) permitiram eliminar interações iônicas e hidrofóbicas entre a enzima e o suporte (ativado).

3.1.3. Síntese da solução do filme de quitosana

Com base em Dias et al. (2014) e Liu et al. (2016), a solução filmogênica de QUI foi preparada dissolvendo-se 2,0 g de QUI em 100 mL de solução de ácido láctico 1% (volume/volume). A mistura de ácido láctico e QUI foi deixada em repouso durante vinte e quatro horas para a hidratação do polissacarídeo. Para a completa dissolução, esta solução foi agitada durante 15 minutos (500 rpm) em ultra-turrax à temperatura ambiente (24 °C). A solução filmogênica foi filtrada com a ajuda de organza para remoção da QUI não solubilizada.

Um filme de quitosana foi sintetizado inicialmente, a fim de avaliar a eficiência da solução filmogênica.

Figura 9 – Filme de quitosana após secagem e retirada da placa.



Fonte: Do autor (2019)

3.1.4. Síntese do filme de QUI com lactase imobilizada em MPQS reticuladas com GLU

Em torno de 100 macropartículas de quitosana, com lactase imobilizada, foram incorporadas em 30 mL da solução filmogênica de quitosana (item 3.1.3). Por fim, os filmes foram vertidos em placas mantendo-se uma proporção de 30mL de solução para 100 cm². Os filmes secos foram armazenados sob temperatura controlada de 25 ± 1 °C e umidade relativa de 50%.

Nesta etapa, foram sintetizados filmes com as diferentes quantidades de lactase que foram imobilizadas (3 e 5 mL) e cada formulação dos filmes foi feita em três repetições. Os filmes com 3 mL de lactase imobilizada em MPQS reticuladas com GLU foram denominados GL3, enquanto aqueles com 5 mL foram denominados GL5.

3.2. Ensaios

3.2.1. Avaliação enzimática

A fim de analisar a atividade enzimática da lactase, foi realizado o teste de atividade enzimática. Para isso, foram recortados pedaços de 4cm x 5cm (20 cm²) dos diferentes tipos de filmes, em triplicata.

Os ensaios foram feitos com leite UHT destanado mantido na geladeira (7 °C) e com leite mantido na temperatura ambiente (25 °C). Os filmes foram imersos em 20mL de leite desnatado, promovendo um raio de alcance de 1 cm² de filme/mL de leite, e as medições ocorreram da seguinte forma: nas primeiras 7 horas, para ambas as temperaturas, foram realizadas análises crioscópicas a cada hora. Após esse tempo, foi feita uma leitura para ambas as temperaturas, quando completadas 24 horas. Para a temperatura de 7 °C, foi feita uma última leitura quando completadas 48 horas, visto que para o leite refrigerado é indicado consumo em até 48 horas após aberto.

Ao final de cada ciclo, por 24 ou 48 horas, os filmes foram retirados do leite, lavados com água destilada e armazenados até o próximo uso. A Tabela 1 exemplifica a rotina de medições através das análises de crioscopia.

Tabela 1 – Delineamento experimental: tratamentos de 3 e 5 mL de lactase avaliados nas duas temperaturas (7 e 25 °C) e diferentes tempos.

7 °C	25 °C
Medição 1: após 1h	Medição 1: após 1h
Medição 2: após 2h	Medição 2: após 2h
Medição 3: após 3h	Medição 3: após 3h
Medição 4: após 4h	Medição 4: após 4h
Medição 5: após 5h	Medição 5: após 5h
Medição 6: após 6h	Medição 6: após 6h
Medição 7: após 7h	Medição 7: após 7h
Medição 8: após 24h	Medição 8: após 24h
Medição 9: após 48h	-

Ao todo, foram feitos 5 ciclos semelhantes aos da Tabela 1, a fim de avaliar se os filmes desenvolvidos ainda poderiam ser reutilizados por mais 4 vezes.

As temperaturas e tempos de análise foram escolhidos com base na proposta de aplicação da embalagem cartonada. A temperatura de 25 °C refere-se à condição de armazenamento do leite à temperatura ambiente e a temperatura de 7 °C refere-se à condição de armazenamento do leite à temperatura refrigerada.

Para as medições, 5 mL de leite de cada frasco foram medidos em um crioscópio para verificar se houve a hidrólise da lactose. Todas as amostras de leite que entraram em contato com os filmes foram descartados e substituídas por novas amostras a cada nova medição. Todas as amostras de leite, antes de serem utilizadas para análise da hidrólise da lactase, foram previamente analisadas quanto ao seu teor de lactose em um analisador automático de leite por ultrassom (Lactoscan Ultrasonic Milkonal Yzer). O valor obtido diz respeito à concentração de açúcar no leite.

O ensaio foi realizado com auxílio de um crioscópio (MK 540 FLEX, Instruments for laboratories TR Ltda.). Neste método de análise, o percentual de hidrólise pode ser estimado a partir da variação do índice crioscópico e ponto de congelamento do leite, pois a hidrólise tem efeito decrescente sobre esta propriedade (CZARNOBAY et al., 2017). O ponto de congelamento do leite foi determinado de acordo com o método da norma ISO 5764 (ISO-IDF,

2009). O cálculo da hidrólise da lactose foi realizado de acordo com as instruções do fabricante da enzima utilizada (Globalfood), de acordo com as equações:

$$\Delta T = -K \times \frac{x}{M} \quad (1)$$

Onde:

ΔT = Depressão do ponto de congelamento;

K = Constante de depressão do ponto de congelamento molecular ($K = 1,86$);

x = Concentração de açúcar no leite (teor de lactose, medido no ultrassom);

M = Peso molecular do açúcar.

$$\text{Crioscópio (100\% deslactosagem)} = (\Delta T2 - \Delta T1) + Ci \quad (2)$$

Onde:

$\Delta T1$ = Depressão do ponto de congelamento da lactose;

$\Delta T2$ = Depressão do ponto de congelamento da glicose e galactose;

Ci = Índice crioscópico inicial do leite (valor obtido no crioscópio).

$$\text{Hidrólise da lactose (\%)} = \frac{Cf - Ci}{\text{crioscopia (100\% deslactosagem)} - Ci} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

Cf = Índice crioscópico final do leite (valor obtido no crioscópio).

3.2.2. Análise do pH

Concomitante a análise de atividade enzimática, também foi realizada uma medição do pH das amostras de leite que estiveram em contato com os filmes.

Para cada amostra de leite analisada em crioscópio fazia-se, também, a medição de seu pH. O pH ótimo do leite para consumo deve apresentar pH entre 6,6 e 6,8. E, de acordo com a Portaria 146/1996 (MAPA, 1996), a acidez dos leites UHT desnatado, semidesnatado, parcialmente desnatado e integral, deve estar na faixa de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL.

Através das medidas de pH, foi possível encontrar a acidez usando a equação dada por Magri (2015):

$$\text{Acidez } (^{\circ}D) = 114,49 - 15,26 \times pH \quad (4)$$

Em seguida, o fator de correção (f) era obtido através das seguintes equações (PEREIRA et al., 2001):

$$\text{Acima de } 22,5 \text{ } ^{\circ}D, \text{ } ^{\circ}D: f = [(^{\circ}D \times 4 \div 9) - 7] \times 0,008 \quad (5)$$

$$\text{Abaixo de } 22,5 \text{ } ^{\circ}D: \text{ } ^{\circ}D: f = [(^{\circ}D \times 4 \div 9) - 7] \times 0,008 - [(^{\circ}D \times 4 \div 9) - 10] \times 0,002$$

(6)

Após o cálculo, o fator de correção é descontado do índice crioscópico determinado pelo equipamento, para a obtenção dos índices crioscópicos de acordo com a acidez da amostra.

A variação da acidez do leite entre 0 e 4 horas foi calculada para verificar um possível aumento neste índice, exercido pelos filmes de GL3 e GL5 neles incubados. O aumento da acidez foi expresso em porcentagem de ácido láctico. Para a conversão, 1 $^{\circ}D$ é o equivalente a 0,01 g de ácido láctico/100 mL (RODRIGUES et al., 1995).

3.2.3. Pesquisa de aceitação

Uma pesquisa de aceitação foi realizada com o intuito de analisar a opinião do público quanto à intenção de compra de leites acondicionados em embalagens cartonadas contendo o filme desenvolvido. Nessa pesquisa, montada através do Google Forms, foi avaliada a aceitação dos consumidores, com enfoque na região Sudeste do Brasil, com relação a utilização de um filme constituído de quitosana e enzima lactase na parte interna de embalagens cartonadas, reutilização desta embalagem para aproveitamento das enzimas imobilizadas e, análise da importância do projeto levando em consideração a porcentagem de indivíduos que apresentaram resposta positiva sobre o desconforto abdominal após o consumo de lácteos, e/ou intolerância ou alergia à lactose.

A partir disso, foi montado o formulário presente no Apêndice A deste trabalho, com as seguintes perguntas: **1.** Qual a sua idade?; **2.** Qual seu sexo?; **3.** Em qual estado você reside atualmente?; **4.** Você já foi diagnosticado com intolerância ou alergia à lactose?; **5.** Você costuma apresentar ou já apresentou desconfortos abdominais após a ingestão de alimentos lácteos?; **6.** Você costuma apresentar ou já apresentou episódios de diarreia após a ingestão de alimentos lácteos?; **7.** Se você tivesse a opção de escolher por um leite comercializado em uma embalagem capaz de quebrar a lactose, podendo ser reutilizada para a quebra da mesma por até cinco vezes, você optaria por comprá-lo ao invés do tradicional (COM LACTOSE)?; **8.** Se você tivesse a opção de escolher por um leite comercializado em uma embalagem capaz de quebrar a lactose, podendo ser reutilizada para a quebra da mesma por até cinco vezes, você optaria por comprá-lo ao invés do LEITE SEM LACTOSE?

3.2.4. Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com um micrômetro digital com resolução de 0,0001 mm (Qualitylabor, modelo MEP/Q, Perus). Foi realizada a média aritmética de 10 medidas aleatórias para cada tipo de filme sintetizado e para o filme de polietileno de baixa densidade.

3.2.5. Ensaio de tração

As propriedades de tensão de ruptura (MPa), módulo de elasticidade (MPa) e alongação (%) dos filmes foram medidas e calculadas com o auxílio da máquina universal para ensaios INSTRON, modelo 5500R, localizada no Centro de Tecnologia de Embalagem (Cetea). Foram preparados e submetidos à tração 10 corpos de prova de cada filme, com 1 cm de largura e 10 cm de comprimento, obtidos de acordo com a norma ASTM-D882-10 (ASTM, 2010), com adaptações de fixação por duas garras corrugadas distantes 8,0 cm entre si, com uma delas (garra superior) movimentando-se a uma velocidade de 12 mm/min.

Segundo Garcia et al. (2000), a tensão de ruptura refere-se a última tensão suportada pelo material antes da quebra. É definida como a força máxima obtida durante a deformação da amostra. A alongação trata-se da deformação total, relacionada com a variação do comprimento inicial e final sofrida pelo material durante toda a análise.

Já o módulo de elasticidade ou módulo de Young é a relação entre a resistência à tração e a porcentagem de alongamento, correspondente à porção linear de uma determinada curva tensão-deformação sofrida pelo filme e que pode ser ainda reversível. Este parâmetro indica a rigidez do filme, ou seja, quanto maior o valor do módulo de elasticidade mais rígido será o filme (OLIVEIRA, 1996).

Os cálculos de tensão de ruptura e módulo de elasticidade, foram obtidos através das equações a seguir.

$$\text{Tensão de ruptura (MPa)} = \frac{F_{m\acute{a}x}}{a} \quad (5)$$

$$\text{Módulo de elasticidade (MPa)} = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} \quad (6)$$

Onde:

$F_{m\acute{a}x}$: força máxima obtida, em Newton;

a : Área da seção transversal, em milímetros quadrados;

σ : Tensão na zona elástica, em MPa;

ε : Deformação na zona elástica, adimensional.

Para esse ensaio, também foi comparada a performance dos filmes confeccionados com a ficha técnica do filme PEBD obtido com a Reciplast, que aplica a mesma norma para cálculos de tensão de ruptura, módulo de elasticidade e alongamento.

3.2.6. Ensaio de perfuração

O teste de punctura, ou perfuração, foi realizado no texturômetro TA.XT.plus Texture Analyser, localizado no Centro de Tecnologia de Embalagem (Cetea). Os corpos de prova com 6,5 cm de diâmetro foram fixados em suporte circular. Uma sonda metálica de ponta esférica, com diâmetro de 0,5cm a uma velocidade de 25,2 mm/min, foi responsável pela perfuração das amostras. Foram determinados a força de perfuração (N) e o deslocamento na perfuração (mm), de acordo com a norma ASTM-F1306-16 (ASTM, 2016).

Neste ensaio, foram comparados os filmes GL3 e GL5 com uma amostra do filme de PEBD confeccionado pela Reciplast Industria de Embalagens.

4. Resultados e discussão

4.1. Desenvolvimento dos filmes

4.1.1. Preparação das macropartículas de quitosana

Durante este preparo, a formação das macropartículas de quitosana era percebida durante o gotejamento. A cada gota da solução de quitosana despejada na solução de coagulação, era perceptível a formação de encapsulamento da quitosana pela solução.

Nas Figuras 10a e 10b, na sequência, é possível observar o momento após a formação das macropartículas e, ao fim, as partículas já lavadas com auxílio do filtro.

Figura 10 – a) Macropartículas logo após a síntese. b) Macropartículas retidas em organza, após a lavagem com água destilada.



Fonte: Do autor (2019)

As macropartículas formadas apresentaram aparência e textura gelatinosas e densas. O tamanho compara-se ao de um grão de arroz.

4.1.2. Preparação de β -galactosidase imobilizada em partículas de quitosana reticuladas com glutaraldeído

A imobilização da lactase nas MPQS realizada conforme a metodologia não apresentou dificuldades ou complexidades durante o preparo.

4.1.3. Síntese do filme de quitosana

Ao final da síntese, obtiveram-se filmes sem a presença de bolhas e com coloração amarelada, característica de filmes de quitosana, como mostra a Figura 10.

4.1.4. Síntese do filme de QUI com lactase imobilizada em MPQS reticuladas com GLU

Durante a secagem dos filmes, foi notada uma melhor dispersão das macropartículas concentrada no centro do filme, e pouco nas periferias, conforme exemplifica a Figura 11.

Figura 11 – Filme final preparado com lactase imobilizada em MPQS.



Fonte: Do autor (2019)

Sugere-se que tal forma de dispersão ocorreu, principalmente por conta de um possível formato mais côncavo das placas de Petry utilizadas para secagem, que podem ter levado à concentração de macropartículas na parte central do filme.

4.2. Ensaio

4.2.1. Avaliação enzimática

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes à hidrólise da lactose presente no leite desnatado por meio dos filmes GL3 e GL5 nas temperaturas utilizadas (7 °C e 25 °C), nos cinco ciclos realizados.

Tabela 2 – Resultados da hidrólise da lactose para os diferentes filmes nas temperaturas de 7 e 25 °C.

CICLOS	7 °C		25 °C	
	GL3	GL5	GL3	GL5
	Hidrólise de lactose (%)			
1	100 ± 0,13	100 ± 0,22	100 ± 0,21	100 ± 0,13
2	100 ± 0,08	100 ± 1,19	100 ± 0,16	100 ± 0,10
3	100 ± 0,12	100 ± 0,92	100 ± 0,13	100 ± 0,02
4	77,85 ± 0,16	98,65 ± 1,87	100 ± 0,20	100 ± 0,12
5	68,34 ± 2,05	76,83 ± 2,48	60,55 ± 2,4	100 ± 0,17

Os resultados coletados e mostrados na tabela indicam que a hidrólise completa da lactose ocorre logo no primeiro ciclo em contato com a embalagem, para os diferentes tipos de filmes e temperaturas.

Além disso, é possível perceber que a enzima continuou atuando em todos os ciclos analisados para as diferentes formulações, indicando bons resultados mesmo após os cinco ciclos de contato entre o leite e os filmes, onde a porcentagem mínima de atividade enzimática capturada foi de 60,55%. Wolf et al. (2019), que imobilizou a lactase em um hidrogel à base de quitosana para aplicar este sistema na produção de leite com baixo teor de lactose, também verificou essa capacidade de atuação em diferentes ciclos no biocatalisador.

Ao fazer a comparação entre os filmes com diferentes porcentagens de lactase, observa-se que os filmes com maior quantidade da enzima obtiveram melhor desempenho ao final dos ciclos, com capacidade de hidrólise superior a 75% em ambas as temperaturas.

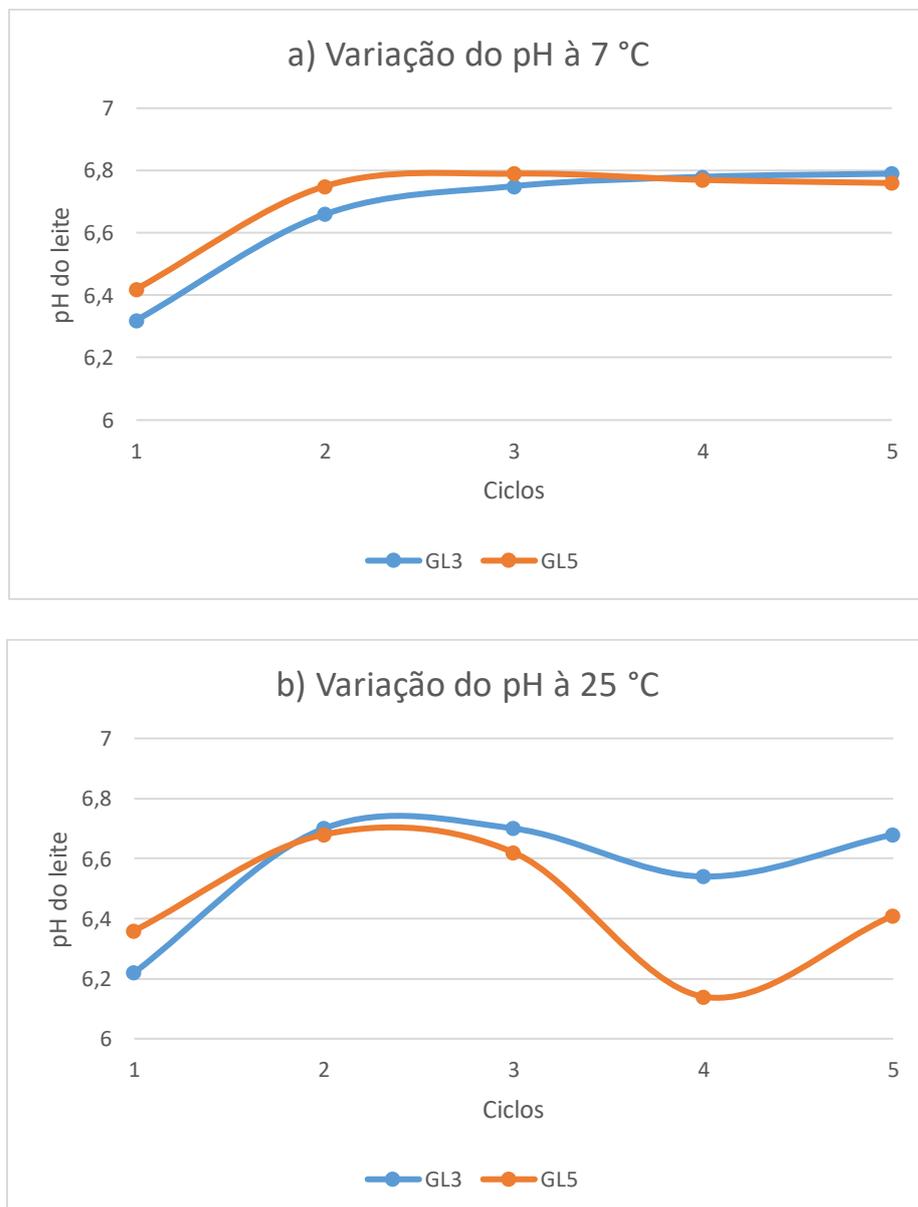
Por fim, esta análise também proporcionou uma estimativa de funcionalidade dos filmes, em especial os do tipo GL5 por, pelo menos, 5 ciclos. A eficácia da hidrólise pode variar

a depender da temperatura a que o leite for submetido e ao armazenamento adequado da embalagem (25 °C e 50% de umidade).

4.2.2. Análise do pH

Durante as primeiras quatro horas de cada ciclo de atividade enzimática, era também analisado o pH que o leite apresentava. As Figuras 12a) e b) contendo estes resultados estão expostas a seguir.

Figura 12 – Variação do pH do leite em contato com os diferentes filmes.



Os resultados obtidos demonstram um aumento considerável na acidez (diminuição do pH) de todas as amostras de leite no primeiro ciclo, para as temperaturas de 7 °C e 25 °C. Para a temperatura de geladeira (7 °C), após este primeiro ciclo, a acidez diminuiu drasticamente, o que sugere que o ácido lático utilizado nas formulações pode ter migrado para o leite neste primeiro contato, diminuindo seu pH. Tal variação, comprometeu a qualidade dos leites, que passaram a apresentar acidez acima do permitido (pH inferior a 6,6) no primeiro ciclo.

Para o leite na temperatura ambiente (25 °C), um aumento significativo de acidez ocorre também nos outros ciclos. Para o primeiro ciclo sugere-se novamente uma possível migração de ácido lático para a amostra. Já para os ciclos seguintes, a diminuição no pH do leite pode estar relacionada com o acondicionamento incorreto do leite após aberto. Segundo Raho Ghalem & Zouaoui (2013), isso pode levar a um crescimento microbiano e potencial aumento na acidez, que pode ser atribuído ao uso de carboidratos pelas bactérias. Além da liberação de aminoácidos no meio, o consumo de lactose leva à produção de ácidos lático e fórmico, e uma pequena quantidade de CO₂, que induzem um aumento significativo da acidez do leite contaminado. Conforme indicado na embalagem do leite desnatado, após aberto, o produto deve ser mantido refrigerado. Assim, novamente algumas amostras de leite apresentaram nível de acidez acima do permitido: GL3 no primeiro e quarto ciclos, e GL5 no primeiro, quarto e quinto ciclos.

Nesta análise, a diferença nas porcentagens de lactase não aparentou ter influência significativa.

4.2.3. Pesquisa de Aceitação

A pesquisa de aceitação teve um alcance de 155 indivíduos, com idades que variaram principalmente de 15 a 64 anos. A maioria declarou-se residente do estado de Minas Gerais (51,9%), mas uma porcentagem considerável também era residente dos estados do Rio de Janeiro (18,8%) e São Paulo (24,7%).

De acordo com os resultados apresentados no Apêndice A, apesar de apenas 8,4% dos indivíduos declararem já ter sido diagnosticados com intolerância ou alergia à lactose, 47,7% dos entrevistados admitiram já ter sentido desconfortos abdominais após a ingestão de

alimentos lácteos e derivados. Além disso, 48,4% afirmam ter apresentado episódios de diarreia após a ingestão desse tipo de alimento.

A porcentagem de intenção de compra do leite na embalagem desenvolvida ao invés das opções tradicionais no mercado mostraram-se consideráveis (em torno de 74% dos indivíduos entrevistados). No entanto, em torno de 25% ainda demonstrou rejeição, sugerindo alguma dúvida ou desinteresse com relação à embalagem desenvolvida.

4.2.4. Espessura

Os filmes apresentaram espessura média conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Espessura dos filmes

Espessura		
GL3	GL5	PEBD
46 ± 5 µm	45 ± 4 µm	23 ± 2 µm

É importante ressaltar que as propriedades mecânicas dos filmes podem sofrer influência da espessura. O controle da espessura é muito importante, pois através dela pode-se avaliar a uniformidade dos polímeros, a repetibilidade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre os filmes (RODRÍGUEZ et al., 2012).

No caso de embalagens cartonadas, é desejável que a espessura do filme para o processo de laminação esteja na faixa de 14 – 30 µm. A espessura nessa faixa garante maior facilidade de laminação, além de ter influência no peso e custo da embalagem final (JORGE, 2013).

4.2.5. Ensaio de tração

Pelos resultados obtidos na Tabela 4, é possível observar uma expressiva diferença entre os valores encontrados para os filmes de quitosana e o de polietileno. Para os filmes de quitosana com diferentes quantidades de lactase, os valores encontrados para tensão de ruptura não apresentam diferenças significativas, o que sugere que a porcentagem de lactase não é

responsável por afetar na tensão destes filmes. Assim, a discrepância existente entre os valores encontrados para os filmes confeccionados e o PEBD pode estar relacionada à composição da solução filmogênica e, também, à presença das macropartículas dispersas nos filmes de quitosana, criando pontos concentradores de tensões.

Tabela 4 – Propriedades de tração dos filmes quitosana e do filme de PEBD.

Filmes	Tensão de ruptura (MPa)	Elongação (%)	Módulo de elasticidade (MPa)
GL3	4,92 ± 1,03	12,64 ± 1,19	75,44 ± 17,80
GL5	4,51 ± 0,55	14,93 ± 4,60	61,99 ± 12,58
PEBD	25,4 ± 2,51	472,5 ± 8,4	78,7 ± 3,93

Novamente, entre os filmes à base de quitosana e MPQS, não houve diferença significativa na propriedade de alongação. Enquanto isso, o filme de PEBD utilizado para análise, apresenta uma porcentagem de alongação bastante expressiva, superior a 400%.

Observou-se que o filme de PEBD apresenta valor de módulo de Young próximo aos valores obtidos para os filmes de quitosana com MPQS e lactase. Como o módulo de elasticidade é obtido através da curva linear do gráfico de tensão-deformação, sugere-se que todos os filmes apresentam características semelhantes na fase elástica.

Assim, para atender as características existentes hoje na camada interna de polietileno de embalagens cartonadas, uma opção seria a introdução de agentes plastificantes na composição da solução filmogênica de quitosana. De acordo com Horn (2012), a adição de plastificantes pode promover mudanças nas propriedades mecânicas dos filmes, podendo se tornar menos quebradiços e mais flexíveis, pois ocorre uma diminuição nos valores de tensão na ruptura, concomitante com um aumento nos valores de alongamento.

Nesse sentido, a ação do plastificante consiste em diminuir a intensidade de ligação entre as moléculas do polímero. Este aditivo é responsável por diminuir essas forças, reduzindo a atração intermolecular e conseqüentemente, aumentando a flexibilidade da cadeia polimérica.

São então provocadas interferências nas condições de processamento e propriedades do produto final, tais como dureza, temperatura de amolecimento, flexibilidade, e outras (REIS, 2019).

4.2.6. Ensaio de perfuração

Os resultados obtidos no teste de punctura estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Teste de perfuração para os diferentes filmes produzidos e o filme PEBD.

Filmes	Força de perfuração (N)	Deslocamento na perfuração (mm)
GL3	6,17 ± 0,84	2,87 ± 0,13
GL5	5,93 ± 1,15	3,28 ± 0,22
PEBD	17,55 ± 1,57	9,18 ± 1,56

Não houve diferença significativa nos parâmetros força de perfuração e deslocamento na perfuração entre os filmes GL3 e GL5.

Para o PEBD no entanto, apesar da menor espessura do filme, a força requerida para romper o filme foi ainda maior, e com uma diferença significativa se comparada com GL3 e GL5. Este resultado reforça os valores encontrados no ensaio de tração, onde é necessário maior esforço para ruptura do filme PEBD e obtém-se um maior alongamento do mesmo.

5. Conclusão

Os filmes desenvolvidos apresentaram bons resultados com relação a hidrólise da lactose para o leite desnatado em diferentes temperaturas (7 °C e 25 °C). Além disso, a ação da enzima lactase imobilizada nos filmes, foi capaz de atuar com eficácia nos cinco ciclos testados. Os filmes com maior concentração de enzimas (5 mL) obtiveram melhor performance em ambas as temperaturas, levando a uma preferência pela utilização destes filmes para aplicação em embalagens cartonadas.

Os valores de pH obtidos no primeiro ciclo para ambas temperaturas e formulações, apresentou-se impróprio para consumo humano, o que sugere uma influência do contato da embalagem com o leite como responsável por esse aumento de acidez. Especificamente para o caso do contato de GL5 com leite à 25 °C, orienta-se consumo apenas se a embalagem estiver hermeticamente fechada, evitando-se contaminação microbiológica e potencial aumento expressivo de acidez.

Os resultados da pesquisa de aceitação da embalagem mostraram-se satisfatórios no que diz respeito à intenção de compra de um leite envasado na embalagem desenvolvida, por parte da maioria dos entrevistados (em torno de 70%).

Com relação a avaliação das propriedades mecânicas, os valores obtidos para os parâmetros avaliados nos filmes GL3 e GL5 apresentaram resultados significativamente inferiores aos do filme de PEBD. Assim, tentativas de formulação de soluções filmogênicas contendo agentes plastificantes em diferentes concentrações podem ser feitas, a fim de se obter filmes com maior capacidade de alongação e resistência à perfuração.

Por fim, para real atuação na indústria alimentícia, novos filmes devem ser desenvolvidos e testados, inclusive com opções alternativas de agente reticulante, devido à toxicidade e incompatibilidade do glutaraldeído com o organismo humano.

6. Referências

ASTM International. **ASTM-D882** – Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Annual Book of ASTM Standards. 2010.

ASTM International. **ASTM-F1306** - Standard Test Method for Slow Rate Penetration Resistance of Flexible Barrier Films and Laminates. Annual Book of ASTM Standards. 2016.

ARAÚJO, Ana Cristina Moreira Andrade. **Eficiência hidrolítica da lactase imobilizada em filmes flexíveis de quitosana**. Orientador: Marali Vilela Dias. 2020. 117 p. Tese (Doutorado em Biomateriais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

- BAKSHI, P. S.; SELVAKUMARA, D.; KADIRVELUB, K.; KUMARA, N. S. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 1; n. 150: p. 1072-1083, nov. 2019.
- BATISTA, R. A. B.; ASSUNÇÃO, D. C. B; PENAFORTE, F. R. O.; JAPUR, C. C. Lactose em alimentos industrializados: avaliação da disponibilidade da informação de quantidade. **Creative Commons**, [S. l.], 25 nov. 2016.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 57, 19.
- CALVO, P.; REMUNAN-LOPÉZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. **Journal Applied Polymer Science**, v.63, p.125-132, 1997.
- CANTONE, S. et al. Efficient immobilization of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilization methods. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v. 42, n. 15, p. 6262-76, 2013.
- CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes**. Principles, Applications and Design. The Netherlands: Wiley-VHC, 2005.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, [s.l.], 26 fev. 2009.
- CZARNOBAY, M., BRIÃO, V. B., RODRIGUES, V. M., MILANI, A., & CASTOLDI, V. (2017). Cinética de hidrólise de lactose em leite de ovelha e leite de vaca. *Revista CIATEC-UPF*, 9(1), 15–24.

- DIAS, M. V.; AZEVEDO, V. M.; BORGES, S. V.; SOARES, N. D. F. F.; FERNANDES, R. V. B.; MARQUES, J. J., & MEDEIROS, É. A. A. (2014). Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. **Food Chemistry**, 165, 323-329.
- DIVYA, K.; VIJAYAN, S.; GEORGE, T. K.; JISHIA, M. S. Antimicrobial Properties of Chitosan Nanoparticles: Mode of Action and Factors Affecting Activity. **Fibers and Polymers**, v.18, n.2, p.221-230.
- FERREIRA, Roberto Luiz Rodriguez; SANTANA, Ruth Marlene Campomanes. Estudo comparativo da influência da razão de sopro nas propriedades de filmes tubulares de PEBD e PEAD. **Polímeros**, São Carlos, v. 25, n. 1, p. 83-93, Fev. 2015. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010414282015000100011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 22 Fev. 2021.
- GARCIA, A.; SPIM, J. A.; SANTOS, C. A. **Ensaio dos Materiais**. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ, LTC, 260 p. 2000.
- GOY, R. C.; MORAIS, S. T. B.; ASSIS, O. B. G. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, p.122-127, 2016.
- HOLSINGER, V. H. Physical and chemical properties of lactose. In: FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1997. v. 3, p. 1-38.
- HORN, Marília Marta. **Blendas e Filmes de Quitosana/Amido de Milho: Estudo da Influência da Adição de Polióis, Oxidação do Amido e Razão Amilose/Amilopectina nas suas Propriedades**. Orientador: Ana Maria de Guzzi Plepis. 2012. 147 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

INDAGAÇÃO. *In: Prova UNESP 2021 (1ª Fase - I e II dias) com Gabarito e Resolução.* São Paulo - SP, 4 jan. 2019. Disponível em: <https://www.indagacao.com.br/2019/01/famerp-2019-remocao-da-lactose-de-leite-e-derivados-necessaria-para-que-pessoas-com-intolerancia.html>. Acesso em: 21 fev. 2021.

A.J.; HOLKAR, C. R.; KAREKAR, S. E.; PINJARI, D. V.; PANDIT, A. B. Ultrasound assisted manufacturing of paraffin wax nano emulsions: Process optimization. **Ultrasonics Sonochemistry** v. 23, p. 201–207, 2015.

ISO-IDF. 2009. **ISO 5764: Milk—Determination of freezing point—Thermistor cryoscopy method reference method.** IDF bulletin no. 108. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland; International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

JORGE, N. **Embalagens para Alimentos.** São Paulo: Cultura Acadêmica, 2013. Disponível em: <http://www.santoandre.sp.gov.br/pesquisa/ebooks/360234.PDF>. Acesso em: 4 nov. 2021.

KLEIN, M. P. **Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

KLEIN, M. P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, R. C.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; HERTZ, P. F.; NINOW, J. L. (2012). Effect of the support size on the properties of β -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. ***Biomacromolecules***, 13(8), 2456-2464. <https://doi.org/10.1021/bm3006984>.

KUMAR, M. N. V. R.; *React. Funct. Polym.* **2000**, 46, 1.

- LIMA, C. F. **Potenciais aplicações da quitosana nas áreas de biotecnologia, agroindústria e farmacêutica**. 2015. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Química) - USP, Lorena, 2015.
- LIU, K.; LIU, J.; LI, H.; YUAN, C.; ZHONG, J.; & CHEN, Y. (2016). Influence of postharvest citric acid and chitosan coating treatment on ripening attributes and expression of cell wall related genes in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit. **Scientia Horticulturae**, 198, 1-11.
- LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R. de; MATTOSO, L. H. C. Nanocompósito de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagens. **Química Nova**, v.37, n.6, p.931-936, 2017.
- MAGRI, L. P. (2015). Quantification of titratable acidity and pH using potentiometric technique as an indicator of bovine milk quality. Federal University of Juiz de Fora.
- MAPA. Ordinance N.146, of March 7, 1996. In: **Technical Regulations for Identity and Quality of Dairy Products**. Published in the Federal Official Gazette of March 11, 1996.
- MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista Assoc. Med. Bra.**, [s. l.], 10 maio 2010.
- MATTAR, R.; MONTEIRO, M. S.; VILLARES, C. A.; SANTOS, A. F.; SILVA, J. M. K.; CARRILHO, F. J. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. **Nutritional Journal** 2009. 8:46.

- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, pp. 831-840, 2011.
- NASCIMENTO, J. S.; BANDEIRA, M. G. A.; MENDES, A. G. G. Estudo prospectivo da quitosana: análise através dos pedidos de patentes e artigos científicos. *In: VII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TECHNOLOGICAL INNOVATION*, 2016, Aracaju, SE. **Innovation to Inspire and Implement** [...]. [S. l.: s. n.], 2016.
- OLIVEIRA, L. M. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis**. Campinas: Centro de Tecnologia de Embalagem, CETEA, v. 103, p. 219, 1996.
- PEREIRA, D. F.; FURLAN, S. A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do laboratório Dona Francisca. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville (SC), 1 nov. 2004.
- PEREIRA, M. C. S. *et al.* Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Rev. Inst. Latic. Candido Tostes**, Juiz de Fora, 2 out. 2012.
- QUILLES, J. C. **Imobilização de Enzimas e Células**. São Carlos, 2014. Disponível em: <https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/biologia/imobilizacao-de-enzimas-e-celulas/55930>. Acesso em: 19 abr. 2019.
- RAHO GHALEM, B., & ZOUAOUI, B. (2013). Evaluation of the quality of steamed yogurt treated by Lavandula and Chamaemelum species essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, 7(42), 3121–3126. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.1037>.
- REIS, Felipe Viegas dos. **Comportamento de tensão-deformação de filmes poliméricos produzidos de triacetato de celulose obtido através da palha de milho Zea mays**.

Orientador: Guimes Rodrigues Filho. 2019. 35 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

RODRIGUES, R., FONSECA, L. M., SOUZA, M. R. Milk acidity. **Technical Notebooks of the UFMG Veterinary School**, Belo Horizonte, n. 13, p. 63-72, 1995.

RODRIGUES, Taynara Tatiane. **Polímeros nas Indústrias de Embalagens**. Orientador: Prof^ª. Dra. Miria Hespanhol Miranda Reis. 2018. 59 p. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 2018.

RODRÍGUEZ, F. J.; GALOTTO, M. J.; GUARDA, A.; BRUNA, J. E. Modification of cellulose acetate films using nanofillers based organoclays. **Journal of Food Engineering**, London, v. 110, p. 262-268, 2012.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n.15, p. 6223-6235, 2013.

TALBERT, J. N., HOTCHKISS, J. H. Chitosan-tethered microspheres for lactase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p.78-84, 2012.

VALIM, Fernanda Cabrera Flores et al. Study of thermal, mechanical and morphological properties of the particulate composite aluminum/low density polyethylene. **Matéria (Rio J.)**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 4, p. 852-865, Dez. 2015. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151770762015000400852&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 22 Fev. 2021.

VIANA, V. R. **Microcápsulas de quitosana para e perspectivas para a administração tópica**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - IFRJ, Rio de Janeiro, 2013.

- VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação.** 2009. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, [S. l.], 2009.
- WANG, W., JIANG, Y., ZHOU, L., & GAO, J. (2011). Comparison of the properties of lipase immobilized onto mesoporous resins by different methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(5), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9157-z>.
- WOLF, M., BELFIORE, L. A., TAMBOURGI, E. B., & PAULINO, A. T. (2019). Production of low-dosage lactose milk using lactase immobilised in hydrogel. *International Dairy Journal*, 92, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.12.004>
- WONG, D. E., GODDARD, J. M. *Short communication:* Effect of active food packaging materials on fluid milk quality and shelf life. *Journal of Dairy Science*, v.97, p.166-172, 2014.
- ZYCHAR, B. C. Fatores desencadeantes da intolerância à lactose: metabolismo enzimático, diagnóstico e tratamento. **Atas de Ciências da Saúde**, São Paulo, 2017.

APÊNDICE A – Respostas do questionário online.

	N	%
Idade		
0-14 anos	0	0
15-24 anos	89	57.4
25-64 anos	65	41.9
Acima de 65	1	0.6
Sexo		
Feminino	90	58.1
Masculino	65	41.9
Prefiro não dizer	0	0
Estado que reside atualmente		
Rio de Janeiro	29	18.7
São Paulo	39	25.2
Minas Gerais	80	51.6
Espírito Santo	1	0.6
Outro	6	3.9
Já foi diagnosticado com intolerância ou alergia à lactose		
Sim	13	8.4
Não	142	91.6
Desconforto abdominal após ingestão de alimentos lácteos e derivados?		
Sim	74	47.7
Não	60	38.7
Não me lembro	21	13.5
Episódios de diarreia após ingestão de alimentos lácteos e derivados?		
Sim	62	40

Não	75	48.4
Não me lembro	18	11.6

Compraria leite comercializado em embalagem capaz de quebrar a lactose, podendo ser reutilizada por até 5 vezes, ao invés do leite embalado de forma tradicional?

Sim	113	72.9
Não	33	21.3
Outro	9	5.8

Compraria leite comercializado em embalagem capaz de quebrar a lactose, podendo ser reutilizada por até 5 vezes, ao invés do leite sem lactose embalado de forma tradicional?

Sim	116	74.8
Não	24	15.5
Outro	15	9.7

Onde:

N - quantidade de indivíduos que respondeu.

% - porcentagem de indivíduos que respondeu.