



ANA CRISTINA MOREIRA ANDRADE ARAUJO

**EFICIÊNCIA HIDROLÍTICA DA LACTASE
IMOBILIZADA EM FILMES FLEXÍVEIS DE
QUITOSANA**

**LAVRAS – MG
2020**

ANA CRISTINA MOREIRA ANDRADE ARAUJO

**EFICIÊNCIA HIDROLÍTICA DA LACTASE IMOBILIZADA EM FILMES
FLEXÍVEIS DE QUITOSANA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Produtos e Nanoprodutos Alimentícios, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Marali Vilela Dias
Orientadora

Profa. Dra. Soraia Vilela Borges
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

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

Araujo, Ana Cristina Moreira Andrade.

Eficiência hidrolítica da lactase imobilizada em filmes flexíveis
de quitosana / Ana Cristina Moreira Andrade Araujo. - 2020.

116 p. : il.

Orientador(a): Marali Vilela Dias.

Coorientador(a): Soraia Vilela Borges.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Embalagem ativa. 2. Imobilização de enzimas. 3. Inovação
em embalagens. I. Dias, Marali Vilela. II. Borges, Soraia Vilela. III.
Título.

ANA CRISTINA MOREIRA ANDRADE ARAUJO

**EFICIÊNCIA HIDROLÍTICA DA LACTASE IMOBILIZADA EM
FILMES FLEXÍVEIS DE QUITOSANA**

**HYDROLYTIC EFFICIENCY OF IMMOBILIZED LACTASE IN
FLEXIBLE CHITOSAN FILMS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais, área de concentração em Produtos e Nanoprodutos Alimentícios, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 06 de março de 2020.

Dr. Mario Guimarães Junior CEFET-MG

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Dr. Gustavo Henrique Denzin Tonoli UFLA

Dr. Diego Alvarenga Botrel UFLA

Profa. Dra. Marali Vilela Dias
Orientadora

Prof. Dra. Soraia Vilela Borges
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, me dando força nos momentos em que mais precisei, e por nunca me abandonar. À Nossa Senhora Aparecida, Santa Rita de Cássia e Santa Terezinha, por intercederem por mim a todo instante.

À minha orientadora, professora Marali Vilela Dias, pela orientação, pela confiança, por acreditar que eu seria capaz de executar essa pesquisa quando nem eu mesma acreditava, pelo apoio, amizade e incentivo.

Aos membros da banca, Mario Guimarães Junior, Luiz Ronaldo de Abreu, Diego Alvarenga Botrel e Gustavo Henrique Denzin Tonoli, pela disponibilidade em fazerem parte como membros da banca na defesa da tese.

À minha mãe, Cristina, por ser a melhor mãe do mundo, a melhor amiga e a melhor conselheira. Obrigada por se fazer sempre presente em minha vida e acreditar em mim durante todo o tempo.

Ao meu pai (*in memoriam*), por todo o carinho e ensinamentos deixados. Sei que está vibrando com a minha conquista aí do céu. Saudade eterna.

Aos meus irmãos, Juliana e Vinícius, e aos meus cunhados, Rodolfo e Pri, pela amizade e incentivo.

À minha família, pelo apoio e por estarem sempre comigo.

Ao Léo, pelo amor, pelo carinho, companheirismo, e por ter me dado forças nos momentos em que eu me sentia mais fraca.

Aos meus amigos, por sempre torcerem por mim.

Às amigas do laboratório de embalagens e encapsulação, pelos auxílios no laboratório e por tornarem a rotina mais leve e prazerosa. Em especial às amigas Bruna e Laura, pela disponibilidade em me ajudar na realização do trabalho. Sem vocês eu não conseguiria. Muito obrigada!

À Luiza por toda a ajuda na realização das análises.

Ao professor Luiz Ronaldo, que foi extremamente solícito e me permitiu realizar as análises de crioscopia com o crioscópio do laboratório de Laticínios pelo tempo que eu precisasse.

À Creusa, pelo acolhimento e pelo auxílio durante a utilização do crioscópio.

Ao professor Fabiano Magalhães, que me cedeu as nanopartículas de dióxido de titânio.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais, ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Microestrutural (LME), pela estrutura oferecida ao executar o projeto de doutorado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esta etapa fosse vencida.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

A quitosana é um biopolímero que é biodegradável e apresenta atividade antimicrobiana. Na tentativa de intensificar essa última característica, alguns materiais podem ser adicionados aos filmes de quitosana, como nanopartículas de TiO_2 . Nos laticínios, para a produção de alimentos sem lactose, utiliza-se majoritariamente a lactase livre. A imobilização dessa enzima é uma alternativa para que a mesma possa ser reutilizada em diferentes ciclos de hidrólise da lactose. O presente trabalho propõe o desenvolvimento de filmes de quitosana com lactase imobilizada, incorporados com nanopartículas de TiO_2 e a avaliação de sua aplicabilidade como uma embalagem que seja capaz de hidrolisar a lactose e produzir leite com baixo teor e/ou sem lactose em diferentes ciclos de reutilização. Para tal, foram formulados filmes com diferentes concentrações de lactase (3 e 5 mL), diferentes agentes reticulantes (glutaraldeído e genipina) e com diferentes concentrações de nanopartículas de TiO_2 (0 e 1 %). Os filmes foram verificados quanto à sua atividade antimicrobiana. Foi constatado que todos os filmes exibiram atividade antimicrobiana, sendo que a presença das nanopartículas não influenciou em um aumento dessa atividade. Sendo assim, somente os filmes sem nanopartículas de TiO_2 foram selecionados e avaliados nas análises posteriores. Os filmes selecionados 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, e a estabilidade operacional dos filmes foi avaliada em cinco ciclos. Foram avaliadas também, a influência dos filmes no aumento de acidez dos leites que entraram em contato com os mesmos, e a solubilidade desses filmes em simulante de leite. Por fim, foi realizada uma pesquisa de mercado, a fim de conhecer a percepção dos consumidores frente às inovações em embalagens de alimentos. Os filmes analisados foram capazes de hidrolisar uma determinada quantidade de lactose nos cinco ciclos. Os filmes com genipina e 5 mL de lactase hidrolisaram 100% a lactose em todos os ciclos nas duas temperaturas, apresentando excelente estabilidade operacional. Todos os filmes exerceram influência no aumento da acidez dos leites que estavam em contato com os mesmos. Foram obtidos filmes com baixa solubilidade em meio aquoso. Os filmes desenvolvidos no presente trabalho podem ser considerados como uma boa alternativa para serem aplicados como embalagens de alimentos para leite. Os consumidores entrevistados estão abertos às novas tecnologias empregadas em embalagens de alimentos.

Palavras-chave: Embalagem ativa. Imobilização de enzimas. Atividade antimicrobiana. Biopolímeros. Inovação em embalagens.

GENERAL ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer that is biodegradable and has antimicrobial activity. In an attempt to intensify this last characteristic, some materials can be added to chitosan films, such as TiO₂ nanoparticles. In dairy products without lactose, it's mostly used lactase in its free form. The immobilization of this enzyme is an alternative for their use in different cycles of lactose hidrolisys. The present work proposes the development of chitosan films with immobilized lactase and nanoparticles of TiO₂ and the evaluation of its applicability like a package, which is capable of, hydrolyze lactose and produce milk with low or no content of lactose in different cycles of reutilization. For such, were formulated films with different concentrations of lactase (3 and 5 mL), different crosslinking agents (glutaraldehyde and genipin) and with different concentrations of TiO₂ nanoparticles (0 and 1%). The films were evaluated for their antimicrobial activity. It was found that all films exhibited antimicrobial activity, and the presence of nanoparticles did not influence an increase in this activity. Therefore, only films without TiO₂ nanoparticles were selected and evaluated in the subsequent analyzes. Selected films were evaluated regarding the efficiency of milk lactose hydrolysis at different temperatures, 7 °C and 25 °C, in periods of 48 and 24 hours, respectively, and its operational stability was evaluated in five cycles. It was also evaluated the films influence in increasing the acidity of the milk which were in contact with it and solubility in a milk solution. Lastly, a market research was conducted in order to meet the perception of the consumers through the food packaging innovations. All of the films were capable of hydrolyze an amount of lactose in all five cycles. The films with genipin and 5mL of lactase, hydrolyzed 100% of the lactose in all cycles and temperatures, showing excellent operational stability. All films shown an influence in acidity increasing of the milk which were in contact with it. Films with low solubility in aqueous media were obtained. The films developed in the present work can be considered as a good alternative to be applied as milk food packaging. The interviewed consumers are open to new technologies used in food packaging.

Keywords: Active food packaging. Enzyme immobilization. Antimicrobial activity. Biopolymers. Food packaging innovation.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Estrutura química da a) quitina e b) quitosana	21
Figura 2 - Estrutura das moléculas de lactose nas configurações α e β	27
Figura 3 - Esquema da atuação da lactase na hidrólise da lactose.	30
Figura 4 - Diferentes métodos de imobilização de enzimas.....	36
Figura 5 - Imobilização de enzimas em um suporte poroso (A) e em nanopartículas (B).	38
Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de reação da genipina com a) grupo amino b) biopolímeros c) algumas formas de estruturas reticuladas intra ou intermolecular.	42
Figura 7 - Quitosana quimicamente reticulada com glutaraldeído.	44

SEGUNDA PARTE

Figure 1 - Influence of temperatures 7 °C and 25 °C on the hydrolysis of lactose by films.....	84
Figure 2 - Influence of different concentrations of lactase (3 and 5 mL) on the hydrolysis of lactose by the films.....	87
Figure 3 - Influence of the crosslinking agent on the hydrolysis of lactose by the films.....	89
Figure 4 - Operational stability of films in five reuse cycles.....	95
Figure 5 - Increased acidity of milks in contact with different films.....	98

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

Table 1.	Chitosan films with immobilized lactase	69
Table 2.	Antimicrobial activity of the films against <i>S. aureus</i> and <i>L. monocytogenes</i> (diameter of the inhibition zone given in cm)	78
Table 3.	Hydrolysis of lactose by different films at 25 ° C and 7 ° C	77
Table 4.	Lactose hydrolysis by different films at 25°C and the respective activity times	88
Table 5.	Lactose hydrolysis by different films at 7°C and the respective activity times	92

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1.1	Filmes biodegradáveis e biopolímeros	17
2.2	Embalagem ativa	20
2.3	Quitosana	21
2.3.1	Filmes de quitosana	22
2.4	Nanopartículas de dióxido de titânio	24
2.5	Lactose	27
2.6	Lactase	29
2.6.1	Hidrólise da lactose em laticínio utilizando lactase em sua forma livre	32
2.7	Imobilização de enzimas	33
2.7.1	Métodos para imobilização de enzimas	36
2.7.2	Suportes à base de quitosana para a imobilização de enzimas	38
2.7.3	Imobilização de lactase	40
2.8	Genipina	41
2.9	Glutaraldeído	43
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
4	CONCLUSÃO GERAL	48
	REFERÊNCIAS	49
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO*	64
1.	INTRODUCTION.....	66
2.	MATERIAL AND METHODS.....	68
2.1	Material	68

2.2	Experimental Design	68
2.3	Development of films.....	69
2.3.1	Preparation of chitosan macroparticles	69
2.3.2	Activation of chitosan macroparticles and immobilization of lactase	69
2.3.3	Preparation of the chitosan film-forming solution	70
2.3.4	Preparation of the chitosan film-forming solution with titanium dioxide nanoparticles	70
2.3.5	Synthesis of chitosan films with lactase immobilized on chitosan macroparticles cross-linked with glutaraldehyde or genipin .	71
2.3.6	Synthesis of chitosan films with titanium dioxide and lactase nanoparticles immobilized in chitosan macroparticles cross-linked with glutaraldehyde or genipin.....	71
2.4	Antimicrobial activity	72
2.5	Evaluation of the activity efficiency of films in lactose hydrolysis at 7°C and 25°C	72
2.6	Evaluation of the operational stability of films in lactose hydrolysis at 7°C and 25°C.....	75
2.7	Acidity of the milks used during each cycle of the lactose hydrolysis process, in contact with the different films	75
2.7.1	Influence of films on increasing milk acidity	76
2.8	Solubility of films in simulated milk solution.....	76
2.9	Statistical analysis.....	77
2.10	Consumer perception assessment of new technologies applied to food packaging.....	77
3.	RESULTS.....	78
3.1	Antimicrobial activity	78
3.2	Lactose hydrolysis	79

3.2.1	Influence of the temperatures to which the films were submitted in the lactose hydrolysis	81
3.2.2	Influence of lactase concentration of films on lactose hydrolysis	85
3.2.3	Influence of the crosslinking agent used in the films, in the lactose hydrolysis	88
3.3	Hydrolysis of milk lactose across all films.....	90
3.3.1	Lactose hydrolysis by films at 25°C.....	90
3.3.2	Hydrolysis of lactose by films at 7°C	92
3.4	Operational stability of films in lactose hydrolysis.....	93
3.5	Influence of films on milk acidity.....	96
3.6	Solubility of films in simulated milk solution.....	98
3.7	Assessment of consumer perception of new technologies applied to food packaging.....	100
4.	CONCLUSION.....	102
5.	Acknowledgment	103
6.	References	103
	APPENDIX	116

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A maioria das embalagens tradicionais utilizadas pela indústria é produzida a partir de resinas derivadas de fontes fósseis, como os plásticos derivados do petróleo, devido às diversas vantagens que os mesmos apresentam, como o fato de serem quimicamente inertes, leves, resistentes e flexíveis, além de apresentarem ótima relação custo/benefício e serem recicláveis. Porém, estes materiais, por sua vez, além de serem oriundos de fontes não renováveis, são muito resistentes à degradação e um dos responsáveis pelo grande acúmulo de resíduos no meio ambiente. A fim de atender à crescente demanda em relação à sustentabilidade e segurança ambiental, investigações têm sido direcionadas para o desenvolvimento de novos materiais que sejam capazes de originar embalagens que possam se degradar rapidamente no ambiente. Com isso, surgem as embalagens biodegradáveis originadas de biopolímeros (polímeros oriundos de fontes renováveis), como a quitosana, os polímeros verdes, que são obtidos a partir do etanol da cana-de-açúcar e os polímeros biodegradáveis.

As embalagens exercem relevante importância na indústria de alimentos. Elas desempenham diversas funções, como conter, proteger, conservar e transportar os alimentos. Algumas embalagens, além de exercerem funções tradicionais sobre os alimentos, auxiliam para que os mesmos apresentem melhor qualidade e maior vida útil, sendo essas denominadas de embalagens ativas (BENITO-PEÑA et al., 2016; BIJI et al., 2015; YILDIRIM et al., 2018). Esta tecnologia é baseada na incorporação de substâncias no material polimérico da embalagem e objetiva a interação entre alimento e embalagem. Os filmes ativos podem ser incorporados com diferentes compostos, como agentes antimicrobianos e enzimas, que irão conferir propriedades específicas a esses filmes.

Embalagens ativas contendo lactase podem se tornar uma opção para auxiliar na produção de alimentos com reduzido teor de lactose, tendo em vista que hoje em dia, mais de 60% da população mundial não consegue digerir a lactose de maneira satisfatória (OAK; JAH, 2018), e com isso, o consumo de produtos com lactose se torna um problema. As indústrias de laticínios têm, portanto, investido na fabricação de produtos com reduzido teor de lactose.

Nos laticínios, o processo utilizado para reduzir o teor de lactose em leite é feito majoritariamente com a adição da enzima lactase em sua forma livre, diretamente no leite, o qual apresenta algumas desvantagens, como a mudança na coloração do leite e a possibilidade de contaminação do produto pela enzima, podendo ainda ser alergênico para algumas pessoas. Além disso, a enzima não poder ser recuperada em sua forma ativa para posterior reutilização, o que acaba acarretando um custo maior. Diante disso, a imobilização de enzimas tem sido pesquisada a fim de ser uma possível solução para os problemas práticos da utilização de enzimas em sua forma livre.

Nenhum trabalho envolvendo filme de quitosana para embalagem de alimentos com função antimicrobiana e de hidrólise da lactose do leite, através da lactase imobilizada e incorporada em sua matriz, simultaneamente, foi publicado até o momento, e não são muitos os trabalhos que apresentam lactase imobilizada em filmes para embalagens de alimentos. Ayoub e Caseli (2017) imobilizaram lactase em filmes de fosfolipídios de Langmuir-Blodgett. Os filmes preservaram mais de 80% da atividade enzimática após vinte dias. Klein et al. (2011) imobilizaram a lactase diretamente em filme de celulose/líquido iônico modificado com uma poliamina ativado com glutaraldeído, e não incorporaram agente antimicrobiano. Os autores observaram uma alta eficiência na hidrólise da lactose, podendo reutilizar o filme por dezesseis ciclos repetidos sem diminuição drástica em sua atividade enzimática. Goddard et al. (2007) imobilizaram lactase em filmes de polietileno de baixa densidade utilizando glutaraldeído como agente

reticulante. Nesses filmes, 74% da enzima ficou retida após os mesmos passarem por um tratamento térmico na presença de um desnaturante iônico. Da Cunha et al. (2007) desenvolveram um filme de base celulósica incorporado com lactase, porém, em sua forma livre (sem estar imobilizada) para redução do teor de lactose presente no leite, e também não incorporaram nenhum agente antimicrobiano a esse filme. Os filmes produzidos com 1 e 1,5 mL da enzima lactase reduziram, respectivamente, 78 e 85% da lactose após 24 horas de contato a 7 °C e 92 e 100% após 25 horas de contato a 25 °C.

Diante deste contexto, a fim de criar uma possibilidade de embalagem que seja capaz de hidrolisar a lactose e que apresente função antimicrobiana, este trabalho propõe o desenvolvimento de filmes ativos de quitosana incorporados com enzima lactase imobilizada em macropartículas de quitosana, utilizando diferentes agentes de reticulação, glutaraldeído e genipina, e acrescidos ou não de nanopartículas de dióxido de titânio. Após a elaboração desses filmes, os mesmos serão avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana, sua eficiência de hidrólise da lactose do leite, sua estabilidade operacional em cinco ciclos de reutilização, sua influência no aumento da acidez dos leites, e sua solubilidade em simulante de leite. Além disso, será realizada uma pesquisa de mercado, a fim de conhecer a percepção dos consumidores frente às novas tecnologias aplicadas às embalagens.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1 Filmes biodegradáveis e biopolímeros

Uma embalagem pode apresentar diversas funções e, quando utilizada para alimentos, pode prolongar sua vida útil, oferecer proteção mecânica, evitar contaminações, facilitar o transporte e armazenamento, transmitir informações, comunicar e despertar o desejo de compra no consumidor (MESTRINER, 2002; SIRACUSA et al., 2008).

Atualmente, a maioria dos materiais utilizados na fabricação de embalagens são provenientes de fontes não renováveis, como o petróleo (SIRACUSA et al., 2008). Inclusive, a maioria das embalagens de alimentos são embalagens plásticas (NERIN, 2016). As embalagens produzidas a partir de polímeros de origem petroquímica, os chamados plásticos, apresentam diversas características que as tornam atraentes para serem utilizadas como embalagens de alimentos. As mesmas são resistentes quimicamente e mecanicamente, são leves, possuem boas propriedades de barreira, podem ser termossoldadas ou impressas, apresentam baixo custo, dentre outras (THARANATHAN, 2003). Porém, esse tipo de embalagem contribui significativamente para o acúmulo de resíduos no meio ambiente, permanecendo praticamente intacta ao longo dos anos (DO SUL; COSTA, 2014). Alternativas têm surgido a fim de minimizar os efeitos negativos causados pelos resíduos gerados pelas embalagens derivadas do petróleo, sendo a substituição parcial ou total dos materiais sintéticos por polímeros biodegradáveis, uma delas (GARCIA; MARTINO; ZARITZKY, 2000).

Polímeros cuja degradação é resultado da ação de microrganismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas, são chamados de polímeros biodegradáveis (ASTM, 1999) e podem ser consumidos em semanas ou meses sob condições favoráveis de biodegradação (MOHANTY et al., 2008). Já os

biopolímeros consistem em macromoléculas produzidas por organismos vivos, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos (IUPAC, 1996). São polímeros produzidos a partir de matérias primas de fontes renováveis, como milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, dentre outras (ABNT, 2008). Esses, por sua vez, são uma alternativa inovadora para polímeros à base de petróleo, devido às suas propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, comestibilidade e seu baixo custo (FERFERA-HARRAR; DAIRI, 2014).

Os biofilmes, também chamados de filmes biodegradáveis, são embalagens produzidas a partir de biopolímeros (WIHODO; MORARU, 2013). Biofilme é o termo dado aos filmes ou coberturas que são formados a partir de macromoléculas biodegradáveis. Quando a solução filmogênica é aplicada diretamente nas superfícies dos alimentos, é chamada de cobertura. Enquanto os filmes são películas finas obtidas pela secagem da solução filmogênica sobre um suporte (PETERSSON; STADING, 2005). Uma fina camada de material comestível pode revestir diretamente os alimentos ou pode formar filme e ser usado como um envoltório de alimentos (GALUS; KADZIŃSKA, 2015). Amidos, quitosana, gomas, proteínas (animal ou vegetal) e lipídeos, constituem a classe dos biopolímeros de ocorrência natural que podem ser usados para a produção de biofilmes. Esses filmes, quando utilizados como embalagem de alimentos frescos ou processados, podem estender sua vida útil e até mesmo agir como aditivos ou como transportadores de aditivos para o alimento acondicionado, como antioxidantes, antimicrobianos, aromatizantes, nutracêuticos (ELSABEE; ABDON, 2013).

O método mais utilizado para a produção de filmes em laboratório é o *casting*, no qual a solução filmogênica é depositada sobre um molde ou superfície não adesiva, como acrílica, teflon, dentre outras, e levado à secagem. O filme obtido pode, então, ser utilizado como uma embalagem (ANDRADE-MAHECHA; TAPIA-BLACIDO; MENEGALLI, 2012). Já as coberturas podem

ser aplicadas mergulhando o alimento em recipiente com a solução filmogênica ou através da pulverização da solução filmogênica sobre o alimento que, posteriormente, é deixado em repouso à temperatura ambiente ou refrigerado para evaporação do solvente e formação da película (DAS; DUTTA; MAHANTA, 2013).

As propriedades de um filme, como barreira à umidade, gases e solutos, solubilidade em água ou óleo, propriedades mecânicas, ópticas, reológicas e térmicas, dependem da composição da matriz polimérica, do seu processo de obtenção, do seu modo de aplicação, do condicionamento e da espessura do filme (ROBERTSON, 2012). Durante a produção dos filmes, alguns compostos podem ser adicionados a fim de fornecer propriedades específicas, como por exemplo, propriedades antioxidantes e antimicrobianas (MACIEL; YOSHIDA; FRANCO, 2012).

Os biofilmes podem atuar de maneiras variadas sobre os alimentos em função da sua composição. Diferentes alimentos demandam embalagens com funcionalidades distintas e, com isso, é possível desenvolver biofilmes com características desejáveis para cada tipo de aplicação (FALGUERA et al., 2011). No caso de frutas e vegetais, por exemplo, pesquisas estão sendo realizadas a fim de detectar substâncias naturais que não sejam tóxicas, e que possam retardar o processo de maturação ou reduzir a deterioração desses alimentos após a colheita, para que sejam adicionadas a embalagens que possam acondicionar os mesmos (KUMAR et al., 2020). Biofilmes para acondicionar frutas e vegetais minimamente processados necessitam apresentar boa propriedade de barreira ao vapor de água, a fim de evitar uma possível desidratação do produto (OLIVAS et al., 2003). Biofilmes produzidos para acondicionar peixes, carnes e queijos, por exemplo, que são alimentos ricos em gordura, devem possuir características que previnem a oxidação lipídica e a perda de umidade (GENNADIOS; HANNA; KURTH, 1997).

2.2 Embalagem ativa

Embalagens ativas são aquelas que, além de proteger, interagem positivamente com os alimentos (GONTARD, 1997), mantendo e/ou melhorando sua qualidade, aumentando sua vida útil e segurança alimentar (BENITO-PEÑA et al., 2016; BIJI et al., 2015; YILDIRIM et al., 2018). Elas podem apresentar diferentes funções de acordo com sua composição, podendo ser: embalagens com propriedades de absorção/eliminação de algum elemento, como oxigênio, dióxido de carbono, etileno, umidade, aromas, luz UV; embalagens com propriedades de liberação/emissão, por exemplo, de etanol, dióxido de carbono, dióxido de enxofre, antioxidantes, conservantes, aromas; embalagens com propriedades de remoção, catalisando a remoção de algum componente alimentício, como a lactose e o colesterol por exemplo (RESTUCCIA et al., 2010; YILDIRIM et al., 2018).

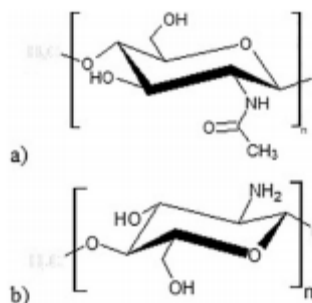
As embalagens ativas são preparadas pela incorporação, revestimento, imobilização ou modificação da superfície dos materiais na embalagem (BASTARRACHEA et al., 2015). Muitas das embalagens ativas podem ser desenvolvidas a partir de matérias primas naturais e renováveis, as quais, além de conferir caráter ativo, são biodegradáveis (SANTANA et al., 2013).

Existem diversos sistemas de embalagens ativas disponíveis no mercado e comercializados por diferentes empresas, como Biomaster® (embalagem antimicrobiana à base de prata, da Addmaster Limited, EUA), Bioka (removedor de O₂ a base de enzima, da Bioka Ltda, Finlândia), Peakfresh (removedor de etileno à base de argila ativada, da Peakfresh Products Ltda., Austrália), Dri-Loc® (absorvedor de umidade, da Sealed Air Corporation, EUA), FreshPax Type® (liberador de O₂, da Multisorb Technologies Inc., EUA), dentre outros (BIJI et al., 2015; WYRWA; BARSKA, 2017).

2.3 Quitosana

A quitosana é um copolímero de β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-D-glicose, com o último normalmente excedendo a 80% (YOON et al., 2000). É composto por dois açúcares comuns, glucosamina e N-acetilglucosamina, sendo que suas proporções dependem do tratamento alcalino recebido. Ela possui uma amina primária e dois grupos hidroxilas livres para cada monômero, sendo sua fórmula $C_6H_{11}O_4N$ (BAKSHI et al., 2019). Sua estrutura química é descrita na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura química da a) quitina e b) quitosana.



Fonte: Frank et al. (2020).

A quitosana é o segundo polissacarídeo natural mais abundante presente na natureza, ficando atrás apenas da celulose. É obtida através da desacetilação da quitina, proveniente dos materiais esqueléticos dos crustáceos e insetos e das paredes celulares de bactérias e fungos (ARANAZ et al., 2009; ZHANG et al., 2018). Industrialmente, a principal fonte de biomassa para a produção de quitina e quitosana são os resíduos de carapaças de caranguejo e camarão (BAKSHI et al., 2019).

A quitosana é insolúvel em soluções com pH acima de 7,0 e solúvel em diferentes ácidos orgânicos e inorgânicos, como ácido láctico, ácido acético, ácido

clorídrico, ácido cítrico, dentre outros (CHEN; LIN; LIN, 1994). A solubilidade da quitosana em solução ácida está relacionada ao seu grau de desacetilação. Comercialmente, existem quitosanas com grau de desacetilação que varia de 40 a 98% (BAKSHI et al., 2019; FRANK et al., 2020).

Para a produção da quitosana, as carapaças dos crustáceos, que são compostas por proteínas, sais inorgânicos, quitina e lipídeos, são trituradas em tamanhos menores. É feita a remoção de minerais, principalmente carbonato de cálcio, através da extração com ácido clorídrico diluído, seguida de agitação à temperatura ambiente, onde ocorre a precipitação do cloreto de cálcio. A remoção das proteínas é feita por solubilização com hidróxido de sódio aquoso diluído. A obtenção de quitosana se dá através da desacetilação em hidróxido de sódio a 40-45%, a 120 °C, no período de uma a três horas com exclusão de oxigênio (PAUL et al., 2014; YOUNES; RINAUDO, 2015).

A quitosana é um polissacarídeo de grande interesse não apenas por ser proveniente de fontes renováveis abundantes, mas porque é um biomaterial muito biocompatível, biodegradável (o que a torna atraente do ponto de vista ecológico), não tóxico, apresenta capacidade antimicrobiana e é eficaz quando utilizada em uma infinidade de aplicações (BAKSHI et al., 2019; WEI et al., 2019) pelo fato de apresentar características desejáveis para diversas finalidades. É um material biocompatível que se decompõe lentamente em produtos inofensivos (açúcares amino), que são totalmente absorvidos no corpo (SINGH; RAY, 2007).

2.3.1 Filmes de quitosana

A quitosana é um biopolímero de relevante importância quando se trata de embalagens de alimentos, devido a sua capacidade de formar filmes, por possuir atividade antimicrobiana inerente e por ser biodegradável (HARISH PRASHANTH; THARANATHAN, 2007; KUMAR et al., 2019).

Quitosana tem sido utilizada em diversas aplicações industriais, inclusive na preservação de alimentos e em suas embalagens (KAUSAR, 2017; KUMAR et al., 2019; MIHAI; POPA, 2015). Filmes poliméricos utilizando a quitosana têm sido amplamente desenvolvidos (XIA et al., 2019). Atualmente, compostos de quitosana com diversos componentes antimicrobianos e nanomateriais se tornaram foco para o desenvolvimento de importantes pesquisas (KUMAR; MUKHERJEE; DUTTA, 2020).

Li et al. (2019) citam que é interessante misturar quitosana com outros polímeros como polissacarídeos, proteínas e lipídeos para que seja aplicada na forma de filmes e de revestimentos e para que sua funcionalidade como material de embalagem de alimentos potencialize.

Li et al. (2019) citam que é interessante misturar quitosana com outros polímeros como polissacarídeos, proteínas e lipídeos para que seja aplicada na forma de filmes e de revestimentos e para que sua funcionalidade como material de embalagem de alimentos potencialize.

A quitosana é um biopolímero que apresenta atividade antimicrobiana contra vários tipos de microrganismos (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017), porém, uma melhoria em suas propriedades antimicrobianas é desejável. A fim de que isso aconteça, agentes antimicrobianos naturais e nanopartículas antimicrobianas, como nanopartículas de metal e de óxido de metal, têm sido utilizados (MATHARU; CIRIC; EDIRISINGHE, 2018). Se tratando da utilização de agentes antimicrobianos naturais para produção de embalagens de alimentos, Guo et al. (2019) produziram filmes comestíveis de quitosana com óleo essencial de canela e verificaram ação antimicrobiana contra os microrganismos *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureous*. Riaz et al. (2018) incorporaram casca de maçã como agente antimicrobiano em filmes ativos a base de quitosana, e verificaram sua atividade contra os microrganismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureous*. Sani, Pirsá e Tagi (2019)

produziram filmes de quitosana com óleo essencial de erva-cidreira e encontraram que o mesmo teve ação antimicrobiana contra o microrganismo *Escherichia coli*.

A utilização de nanopartículas antimicrobianas em filmes a base de quitosana para embalagens de alimentos, tem promovido resultados satisfatórios. Wu et al. (2018) desenvolveram filmes de quitosana com nanopartículas de prata e relataram boa atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum*. Rahman, Mujeeb e Muraleedharan (2017) desenvolveram uma embalagem antimicrobiana flexível de quitosana com nanopartícula de óxido de zinco para a utilização em carne crua e verificaram sua atividade contra os microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Zhang et al. (2017) produziram filme de quitosana com nanopartícula de dióxido de titânio e encontraram ação antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

2.4 Nanopartículas de dióxido de titânio

Nanomateriais são materiais emergentes com dimensões menores que 100nm (ARORA; PADUA, 2010). Devido ao seu tamanho, nanomateriais apresentam uma área de superfície maior quando comparados aos materiais que se encontram em macroescala, fazendo com que suas propriedades sejam diferentes (USKOKOVIĆ, 2007).

Nanomateriais de óxidos metálicos são comumente utilizados em filmes de matrizes biopoliméricas basicamente para melhorar suas propriedades antimicrobianas, mecânicas e de barreira (DIZAJ et al., 2014; GALSTYAN et al., 2018). Dióxido de titânio (TiO₂) é um material quimicamente inerte e amplamente utilizado em produtos alimentícios, biológicos e medicinais (TANG et al., 2016; VEJDAN et al., 2016). É considerado um atraente fotocatalisador pois é estável quimicamente, não tóxico, barato e Geralmente Reconhecido como Seguro

(GRAS) (LIN et al., 2015). As nanopartículas de dióxido de titânio apresentam alto desempenho fotocatalítico, alta estabilidade química, biocompatibilidade (MA et al., 2016) e têm sido apontados como bons agentes antimicrobianos (ANDRÉ et al., 2015; DIZAJ et al., 2014; SATHE et al., 2017).

Zhang et al. (2019) desenvolveram quatro tipos de filmes para embalagens de alimentos, sendo eles compostos de: quitosana; quitosana com nanopartículas de dióxido de titânio; quitosana com extrato rico em antocianina de casca de ameixa preta; quitosana com nanopartículas de dióxido de titânio e extrato rico em antocianina de casca de ameixa preta. Foram testadas as propriedades antimicrobianas de todos esses filmes e eles constataram que o filme de quitosana com nanopartículas de TiO_2 e o extrato, foi o que apresentou a maior atividade antimicrobiana, sendo eficaz contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, além dessa embalagem ter apresentado atividade antioxidante devido à adição do extrato.

Kaewklin (2018) produziram filmes de quitosana com diferentes concentrações de dióxido de titânio (0%; 0,25%; 0,5%; 1% e 2%) e selecionaram o filme com 1% desse composto e o filme sem a presença do mesmo, para verificar suas atividades antimicrobianas. A seleção do filme com 1% se deu com base nas ótimas características mecânicas, de barreira e de degradação fotocatalítica do etileno exibidas pelo mesmo, que foram verificadas em análises anteriores. O filme com 1% de TiO_2 na presença de luz UV, foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana quando comparado ao mesmo filme sem a presença de luz e ao filme de quitosana sem TiO_2 , tanto na presença como na ausência de radiação UV. Foi inibido o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus, Pennicillium*.

Ainda não existem legislações para regulamentar a utilização de nanomateriais em embalagens de alimentos, apesar da nanotecnologia estar

ganhando cada vez mais espaço nesse setor. A aplicação de nanotecnologia em embalagens de alimentos está, portanto, coberta pela legislação existente que envolve especificações sobre materiais em contato com alimentos (DUDEFOI et al., 2017).

Na Europa, nanomateriais devem cumprir as disposições contidas no Regulamento (CE) 1935/2004 (COMMISSION REGULATION, 1995; 2004), assim como qualquer outro material que esteja em contato com o alimento. Tal regulamento é o responsável por definir requisitos gerais, a fim de garantir que a migração das substâncias do material para o alimento não coloque em risco a saúde humana e não afete as características organolépticas do alimento de maneira inaceitável.

Nos Estados Unidos, o *Food and Drug Administration* (FDA) regula os nanomateriais como os demais tipos de aditivos em contato com alimentos, de forma que, para os aditivos indiretos simples, ou para substâncias reconhecidas como seguras (GRAS) pelo FDA, a autorização em macroescala pode ser aplicada para a nanoescala. A agência afirma que o quadro atual de avaliação da segurança de aditivos é, simultaneamente, robusto e flexível o suficiente e, portanto, adequado a uma vasta gama de materiais, incluindo os nanoescalados (FDA, 2014).

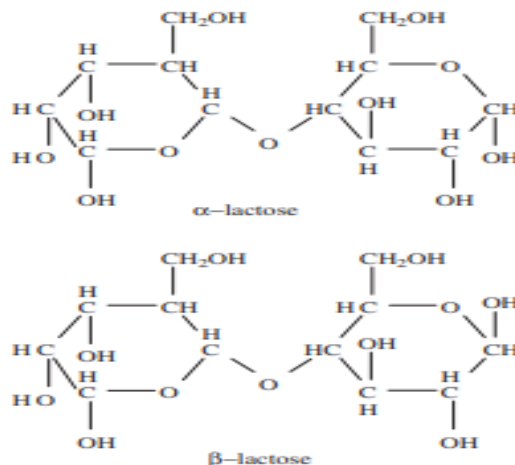
No Brasil, a Resolução RDC nº 51/2010 (BRASIL, 2010), a qual estabelece os critérios de migração para materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados ao contato com alimentos, não menciona critérios específicos para materiais nanoescalados (BRASIL, 2010a).

Tanto nos Estados Unidos, como na Europa, é permitido a utilização de dióxido de titânio como aditivo alimentício, com a ressalva de que o mesmo não exceda 1% p/p (EC, 1994; FDA 2002; FDA 2015). No Brasil, a resolução RDC nº 45/2010 permite a utilização do dióxido de titânio na função de corante alimentício sem quantidade máxima determinada (BRASIL, 2010b).

2.5 Lactose

A lactose (β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glicose), cuja fórmula química é $C_{12}H_{22}O_{11}$, apresenta massa molar de 342,3 g/mol. Ela é um dissacarídeo composto por uma D-galactose e uma D-glicose que são unidas por uma ligação β -1-4-glicosídica e pode ocorrer nas formas α e β (FIGURA 2). As duas formas são estereoisômeros e se diferem pelo arranjo espacial do grupo hidroxila no carbono 1 do grupo hemiacetal (HOLSINGER, 1988).

Figura 2 - Estrutura das moléculas de lactose nas configurações α e β .



Fonte: Ganzle, Gottfried e Jelen (2008).

A lactose é o principal carboidrato do leite humano, aproximadamente 7,5%, e de mamíferos, cerca de 5,0% em leite de vaca (WOJCIK et al., 2009), representando mais de um terço do teor de sólidos totais nesse produto. No sorvete e no soro de leite, a lactose representa 20% e 72% dos sólidos totais presentes nesses produtos, respectivamente (GROSOVÁ; ROSENBERG; REBROŠ, 2008). Ela é essencial para promover a saúde de recém-nascidos (WAHLQVIST, 2015) e sua hidrólise nos açúcares glicose e galactose, através da enzima lactase no intestino delgado, é necessária para que o organismo consiga absorvê-la (ROSSI;

LENTZI, 1984). A ingestão e absorção de lactose é importante, pois fornece energia ao ser humano (SURI et al., 2019).

Mais de 60% da população possui uma capacidade prejudicada de digerir a lactose, podendo levar essas pessoas a apresentarem sintomas de inchaço, náusea, dor abdominal, cólicas e diarreia (OAK; JAH, 2018). A distinção entre os termos ‘deficiência de lactase’, ‘má absorção de lactose’ e ‘intolerância à lactose’ é de relevante importância, tendo em vista que se trata de diferentes conceitos, e hoje em dia, têm sido usados indiscriminadamente (HEINE et al., 2017).

Deficiência de lactase é quando o ser humano possui uma quantidade reduzida da enzima em seu organismo, má absorção de lactose sugere que nem toda a lactose que foi consumida foi absorvida e, intolerância à lactose apresenta uma definição clínica de que existe uma incapacidade na digestão e absorção da lactose capaz de causar sintomas gastrointestinais (HEINE et al., 2017). A quantidade de lactose que causa os sintomas varia de pessoa para pessoa, dependendo da quantidade de lactose consumida, do nível de lactase presente no organismo que é capaz de absorver o carboidrato, e a forma com que o alimento que contém a lactose é ingerido (TOMAR, 2014).

Alimentos sem lactose ou com reduzido teor de lactose vêm sendo produzidos a fim de atender a necessidade das pessoas que apresentam alguma restrição em relação ao consumo desse açúcar. Segundo Suri et al. (2019), até o momento, a dieta com restrição de lactose é o único tratamento para pessoas que sofrem de intolerância à lactose.

Produzir alimentos sem lactose não é uma tarefa fácil para os fabricantes. Diversas considerações devem ser feitas durante a formulação de um produto sem lactose, a fim de que o produto final seja bem aceito pelo consumidor. Evitar produtos ou ingredientes alimentícios que contenham lactose utilizando fontes alternativas, tratar produtos lácteos com lactase, garantir que os aspectos sensoriais do produto formulado não sejam muito distintos dos produtos lácteos,

com os quais podem ser comparados, priorizar os aspectos nutricionais do novo produto, considerar os custos durante o desenvolvimento desses alimentos para que o produto final não saia caro para o consumidor, e estar em conformidade com as normas e regulamentos emitidos por órgãos nacionais e internacionais, são importantes considerações que devem ser feitas durante o desenvolvimento de um alimento sem lactose (SURI et al., 2019).

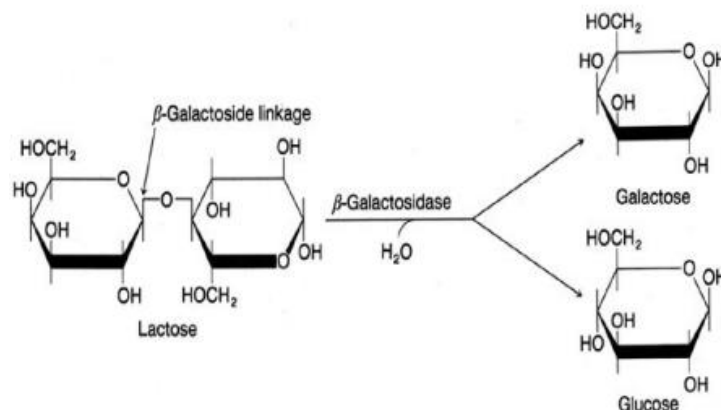
De acordo com o processo do Conselho Nórdico de Ministros (ANONYMOUS DIETECT FOODS, 1994), deve haver no máximo 10 mg de lactose em 100 g de alimento pronto para consumo, para o mesmo ser considerado um alimento sem lactose e no máximo 1 g de lactose em 100 g de produto para o mesmo ser considerado um alimento com baixo teor de lactose.

2.6 Lactase

Lactase (EC 3.2.1.108) é uma β -galactosidase (EC 3.2.1.23), cujo nome sistemático é β -D-galactosideo-galactohidrolase, classificada como uma hidrolase, com capacidade transferase para grupos galactosil, catalisando o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose (FIGURA 3) (LOPEZ-LEIVA; GUZMAN 1985).

Esta enzima se encontra amplamente distribuída na natureza, podendo ser isolada de diferentes fontes, como espécies vegetais, principalmente amêndoas, pêssego, damasco e maçã, órgãos de animais, leveduras, bactérias e fungos (RICHMOND; GRAY; STINE, 1981). No ser humano, a lactase é produzida pela flora intestinal e atua hidrolisando o dissacarídeo lactose nesses dois monossacarídeos, glicose e galactose, no intestino delgado (BRODELIUS, 1978). Como nosso organismo é incapaz de absorver dissacarídeos, é necessário que a lactose seja hidrolisada, a fim de ser absorvida.

Figura 3 - Esquema da atuação da lactase na hidrólise da lactose.



Fonte: Lopez-Leiva e Guzman (1985).

Segundo Oak e Jha (2018), 60% da população apresentam níveis reduzidos de atividade da lactase em seu organismo, reduzindo, conseqüentemente, sua capacidade de digerir a lactose. Com isso, hoje em dia, há um aumento na demanda, por parte de grande parcela da população que sofre de intolerância à lactose, de produtos lácteos sem lactose (SURI et al., 2019). Existe uma especificação na legislação brasileira, através da Resolução RDC nº 53/2014 (BRASIL, 2014), que a enzima lactase utilizada na indústria de alimentos deve ser de origem microbiana, proveniente dos seguintes microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces sp.*, sendo essas espécies classificadas como Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) (BRASIL, 2014).

As diferentes fontes de lactases são responsáveis por suas diferentes propriedades. Em geral, quando as fontes são fungos filamentosos, o pH ótimo de atuação da lactase se encontra numa faixa ácida (2,5-4,5), enquanto lactases provenientes de leveduras e bactérias possuem o pH ótimo de atuação em uma região mais neutra (6,0-7,0 e 6,5-7,5, respectivamente). Com base em suas

diferentes propriedades, é possível selecionar a lactase mais apropriada para uma determinada aplicação. Estas diferentes condições de pH ótimo sugerem que lactases de fungos filamentosos são mais adequadas para hidrólise de soro ácido, enquanto lactases de leveduras e bactérias são mais apropriadas para hidrólise do soro doce e do leite (GEKAS; LOPEZLEIVA, 1985).

As lactases utilizadas em indústrias de laticínios atuam como biocatalisadores para hidrólise da lactose do leite e soro, que permite a produção de produtos lácteos de baixo teor de lactose e serve para reciclar o soro e utilizá-lo como um aditivo para a alimentação humana ou de animais (LADERO; SANTOS; GARCIA-OCHOA, 2006). Lactase proveniente da levedura *Kluyveromices Lactis* é uma fonte comercialmente importante de lactase, tendo em vista que é amplamente utilizada em indústrias na produção de leite e produtos lácteos sem lactose (SOUZA et al., 2019).

Para fins de aplicação industrial, foram desenvolvidos dois métodos de hidrólise da lactose, utilizando-se lactase. Um método consiste na utilização da lactase imobilizada, no qual a mesma age em leite desnatado. Após completa hidrólise da lactose, a gordura é adicionada a esse leite na proporção desejada. A enzima imobilizada é reciclada e, posteriormente, reutilizada no processo de hidrólise novamente, o que torna esse método vantajoso em relação à utilização da enzima livre no que diz respeito ao reaproveitamento da enzima, conseqüentemente, tornando o processo mais viável economicamente. Além disso, nesse processo, o produto final fica livre de componentes adicionais, como enzimas, que são componentes alérgicos em potencial. O outro método, que é o mais utilizado, mais simples, porém, mais caro, consiste na adição da lactase diretamente ao leite (BASSO; SERBAN, 2019).

2.6.1 Hidrólise da lactose em laticínio utilizando lactase em sua forma livre

Segundo informações técnicas obtidas diretamente de laticínios, nessas indústrias o processo utilizado para reduzir o teor de lactose em leite é feito majoritariamente com a adição da enzima lactase em sua forma livre, diretamente no leite, e pode ocorrer das seguintes maneiras:

a) Hidrólise por batelada

É o processo mais utilizado nos laticínios. Nele, a hidrólise da lactose é feita antes do tratamento térmico. Adiciona-se a enzima ao leite que está no tanque e agita-se para que ocorra a mistura dessa enzima ao mesmo. Após essa etapa, mantém-se o leite em repouso por um período mínimo de 24 horas, a uma temperatura em torno de 5 °C, para que ocorra a hidrólise da lactose em glicose e galactose. Posteriormente, faz-se o tratamento térmico e depois o envase. Nesse processo, ocorre a desnaturação da enzima pela ação da temperatura do tratamento térmico.

A temperatura ótima de atuação da lactase proveniente de microrganismos varia em função de sua fonte de obtenção, podendo variar de 30 a 60 °C (SEGEL, 1993). Como nesse processo de hidrólise por batelada a enzima atua em temperatura baixa, pode ser necessário uma maior dosagem de lactase para a realização do processo, já que a temperatura ideal de ação da enzima é mais alta. Neste processo, o fluxo de fábrica é prejudicado pelo fato de ter que deixar um tanque parado até que ocorra a hidrólise da lactose, o que atrapalha a velocidade de produção de uma grande fábrica. Além disso, pode haver uma perda de qualidade do leite, que precisa ficar mais tempo cru exposto durante a hidrólise da lactose, que é no mínimo 24 horas, o que pode acarretar em um aumento no número de microrganismos psicrotróficos, como *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*, dentre outros, contribuindo para a deterioração do leite.

A hidrólise por batelada também traz consequências negativas em relação à coloração do leite, ocorrendo o escurecimento do mesmo como consequência da reação de Maillard, durante o tratamento térmico, sofrida pelos monossacarídeos (glicose e galactose) que são produzidos através da hidrólise da lactose. Além disso, também devido a reação de Maillard, o produto fica com um sabor caramelizado mais intenso.

b) Hidrólise por processo contínuo

Nesse processo ocorre a adição asséptica da lactase no produto após o tratamento térmico, de forma que a enzima continua ativa no produto final. A lactase irá agir durante a quarentena do leite (tempo que ele fica parado em estoque), em temperatura ambiente, reduzindo o teor de lactose no mesmo. Este método impacta em menores alterações físico-químicas e sensoriais no produto. O leite obtido por esse processo não apresenta diferença de coloração em relação ao leite tradicional, já que não ocorre a reação de Maillard. É um processo mais rápido quando comparado à hidrólise por batelada, o que evita o crescimento de microrganismos e mantém o fluxo da empresa. Entretanto, para realizar esse processo, é necessário que seja utilizado um equipamento específico que apresenta um alto custo para a indústria (em torno de R\$1.000.000,00).

2.7 Imobilização de enzimas

Enzimas são proteínas que catalisam as reações químicas e bioquímicas, e são amplamente encontradas em plantas, animais e microrganismos. Elas são catalizadores com as vantagens de possuírem alta atividade catalítica, seletividade, especificidade e biodegradabilidade (SCHMID et al., 2001; KOELLER; WONG, 2001).

São muitas e relevantes as vantagens na utilização de enzimas, porém, também existem alguns problemas práticos em seu uso, como por exemplo, o alto

custo para seu isolamento e purificação, a instabilidade de suas estruturas, uma vez que são isoladas de seus ambientes naturais e sua sensibilidade às condições que são diferentes de suas ótimas, e às substâncias que podem atuar como inibidores. Além disso, muitas enzimas operam dissolvidas em sistemas homogêneos, o que pode levar à contaminação do produto, e, como regra, não podem ser recuperadas em sua forma ativa para posterior reutilização (KRAJEWSKA, 2004). Muitos métodos têm sido propostos para superar essas limitações, sendo a imobilização de enzimas o de maior sucesso (REJIKUMAR; DEVI, 2001; GROSOVÁ et al., 2008).

Segundo Chibata (1978) uma enzima imobilizada pode ser definida como uma enzima que poderá ser utilizada diversas vezes e de maneira contínua, a qual se encontra fisicamente aderida ou confinada em um material e há retenção de sua atividade catalítica.

A imobilização de enzimas apresenta diversas vantagens. Há facilidade no manuseio de enzimas imobilizadas, além da imobilização permitir sua separação do meio reacional, minimizando ou eliminando a contaminação do produto final pela enzima. A enzima imobilizada não penetra facilmente na pele, e, por isso, exibe baixa ou nenhuma alergenicidade (SHELDON; VAN PELT, 2013). Além disso, a enzima imobilizada é reutilizada, o que reduz custos e permite o emprego de operação contínua em biorreatores. Outro benefício é, em muitos casos, a estabilização da estrutura da enzima, tanto sob condições de armazenamento como em condições operacionais, em relação à desnaturação por calor, por solventes orgânicos ou por autólise (KRAJEWSKA, 2004; GROSOVA et al., 2008). A melhoria nas características catalíticas da enzima, associada às repetidas reutilizações, se reflete em ganhos em produtividade (kg de produto por kg de enzima) o que, por sua vez, determina o custo da enzima por kg de produto (SHELDON; VAN PELT, 2013).

Apesar das inúmeras vantagens, após a imobilização, as enzimas podem sofrer algumas modificações em 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. Segundo Kennedy e Cabral (1987) e Sheldon (2007), diferentes fatores podem ocasionar as mudanças nas propriedades das enzimas imobilizadas, como a modificação conformacional na molécula de enzima em decorrência da alteração na estrutura terciária do sítio ativo (efeitos conformacionais); a imobilização de uma parte da molécula numa determinada posição que o sítio ativo é relativamente inacessível (efeitos estereoquímicos); o surgimento de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a matriz e moléculas de baixa massa molecular presentes na solução, acarretando em uma modificação de microambiente, tal efeito é relatado para a natureza química do material do suporte (efeitos de partição); resistência de difusão de solução de substrato para os sítios catalíticos e; difusão de produtos (efeitos difusionais).

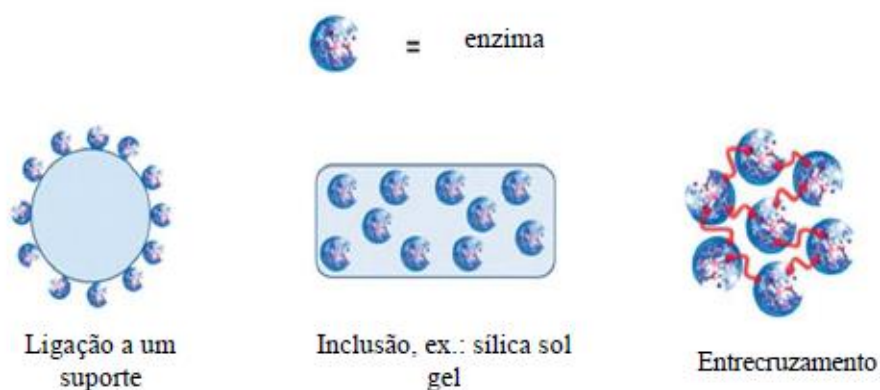
As propriedades das enzimas imobilizadas podem, portanto, ser influenciadas por todos esses fatores e, dessa maneira, elas podem adquirir novas propriedades cinéticas, variações nos valores de pH e comportamentos diferentes de acordo com a temperatura (KENNEDY; CABRAL, 1987; MARKOGLOU; WAINER, 2003). Porém, à medida que se faz uma escolha criteriosa do método de imobilização e do suporte adequado, os problemas citados podem ser evitados ou diminuídos.

A utilização de enzimas imobilizadas em indústrias de alimentos necessita que as mesmas sejam capazes de produzir grandes quantidades de produtos a um baixo custo, o que significa que o biocatalisador, que no caso é a enzima imobilizada, deve apresentar uma boa estabilidade operacional, a fim de realizar um grande número de ciclos (BASSO; SERBAN, 2019).

2.7.1 Métodos para imobilização de enzimas

De acordo com Sheldon e Van Pelt (2013), os métodos de imobilização de enzimas podem ser divididos em três categorias: ligação a um suporte, inclusão (ou encapsulação) e entrecruzamento. A Figura 4 traz um esquema representativo desses métodos.

Figura 4 - Diferentes métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Sheldon e Van Pelt (2013).

A ligação da enzima a um suporte pode ser de natureza física, iônica ou covalente (CAO, 2005). O método de adsorção física é considerado o método de imobilização mais simples, no qual a enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, por meio de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Este método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima, porém, é limitado pela tendência de dessorção da enzima do suporte, e por ser sensível às condições do ambiente, como temperatura e concentração de íons (BICKERSTAFF, 1997; CHIBATA, 1978; GROSOVÁ et al., 2008; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). Ligações iônicas são geralmente mais fortes e ligações covalentes previnem que a enzima se solte do suporte. No método de

ligações covalentes, a enzima fica retida na superfície do suporte pela formação de ligações covalentes através de certos grupos funcionais como amina, carboxila, hidroxila e grupos sulfidrilos (PANESAR KUMARI; PANESAR, 2010). Uma desvantagem apresentada por esse método é o fato de que enzima e suporte não poderão ser reutilizados em um novo processo de imobilização caso a enzima perca sua atividade (SHELDON; VAN PELT, 2013).

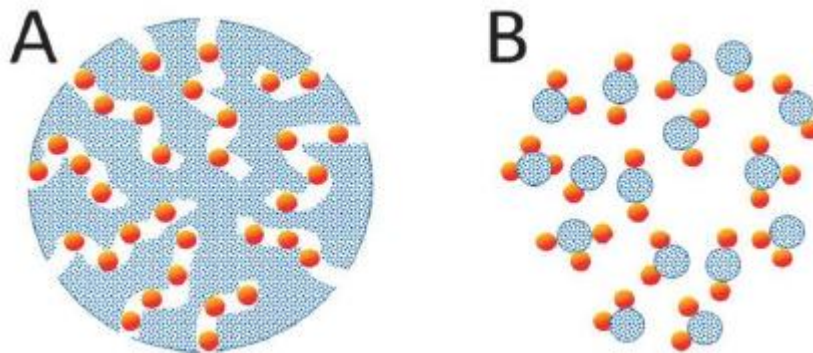
A inclusão é um método no qual as enzimas são aprisionadas dentro da estrutura interna de alguns materiais (geralmente polímeros) na forma de géis, microcápsulas, fibras, filmes ou membranas. Para a formação do material polimérico na forma desejada, contendo a enzima, é comum realizar um procedimento no qual há a preparação da solução contendo a enzima e o material de inclusão seguido da utilização de alguma técnica como a secagem ou a polimerização (GEKAS; LOPES-LEIVA, 1985). Segundo Grosová et al. (2008), a maior desvantagem dessa técnica de inclusão é a possível perda da enzima através da difusão durante repetidos usos pelo fato de a mesma possuir pequenas dimensões moleculares, mesmo que a matriz possua pequenos poros (GROSOVÁ et al., 2008).

O entrecruzamento é um método onde ocorre a formação de uniões intermoleculares entre as enzimas, gerando ligações irreversíveis e agregados com conformação tridimensional. É um método livre de suportes. As enzimas estão ligadas umas às outras, ou a um segundo composto, normalmente proteínas inativas, como a albumina por exemplo (OLIVEIRA et al., 2007). A ligação cruzada pode ser obtida via métodos físicos ou químicos, sendo que, neste último, são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi ou multifuncionais, obtendo-se uma enzima quase pura. A necessidade de grande quantidade de enzima é uma desvantagem desse método, pois resulta em baixas retenções da atividade e baixa estabilidade mecânica, além

de pouca reprodutibilidade, dificultando, portanto, sua aplicação industrial (SHELDON, 2007).

Os suportes utilizados poderão influenciar na localização da enzima. Em suportes porosos, a superfície interna acomoda a maior parte das enzimas, já em suportes nanométricos a enzima se liga à superfície acessível (FIGURA 5). A aglomeração de suportes nanométricos é um fenômeno comum de ser observado, principalmente quando se trata de suportes paramagnéticos ou ferromagnéticos. A dificuldade de difusão do substrato até o sítio ativo da enzima, é menor nesses aglomerados, quando comparado aos suportes porosos (LIESE; HILTERHAUS, 2013).

Figura 5 - Imobilização de enzimas em um suporte poroso (A) e em nanopartículas (B).



Fonte: Liese e Hilterhaus (2013).

2.7.2 Suportes à base de quitosana para a imobilização de enzimas

As propriedades físicas, químicas e também as relativas à possibilidade de regeneração do material, devem ser analisadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação (CANTONE et al., 2013). Algumas características devem ser consideradas na escolha do suporte, como a estabilidade frente aos

parâmetros de processo e ataque microbiano, funcionalidade química, a durabilidade e capacidade de reutilização, a compatibilidade aceitável com a enzima e o substrato, o custo, a facilidade de manuseio, o tamanho e forma adequados (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos. Exemplos de suportes orgânicos são amido, ágar, alginatos, carragena, quitosana, dentre outros. Já os inorgânicos podem ser exemplificados por areia, celite, cerâmica, géis de sílica, dentre outros (CABRAL; KENNEDY, 1991).

Do ponto de vista econômico, os biopolímeros naturais são considerados uma alternativa atrativa como suporte para a imobilização de enzimas. Carboidratos insolúveis como amido, celulose e quitosana, assim como proteínas como gelatina e albumina, têm sido muito utilizados como suporte para a imobilização de enzimas (CAO, 2005). Deste grupo, os polissacarídeos acabam se destacando pelo fato de serem seguros do ponto de vista biológico e bastante hidrofílicos, assegurando um ambiente adequado para muitas enzimas (CANTONE et al., 2013).

Algumas características que a quitosana possui, como alta afinidade por proteínas, biocompatibilidade, disponibilidade de grupos funcionais para reação direta com enzimas ou para modificação química, hidrofiliçidade, propriedades antimicrobianas, resistência à degradação química e facilidade de preparação em várias formas físicas, fazem com que a mesma se torne desejável como suporte para imobilização de enzimas (HSIEH; LIU; LIAO, 2000; JUANG; WU; TSENG, 2001; KRAJEWSKA, 2004).

Diversas pesquisas envolvendo a imobilização de enzimas em suporte de quitosana têm sido realizadas. Singh, Singh e Kennedy (2017) imobilizaram a enzima inulase em quitosana para a hidrólise de inulina em um sistema descontínuo. Manan et al. (2018) imobilizaram lipase em suporte biopolimérico de quitosana e o biocatalisador obteve maior rendimento quando comparado à

mesma enzima em sua forma livre. Liu, Chen e Shi (2019) utilizaram papel de celulose com quitosana modificada para imobilizar α -glucosidase e, após 10 ciclos, observaram que 71% da atividade inicial da enzima havia sido preservada. Lorenzoni et al. (2015) imobilizaram β -frutofuranosidase e β -frutossiltransferase em esferas de quitosana a fim de produzir açúcar invertido e frutooligossacarídeos.

2.7.3 Imobilização de lactase

A imobilização da enzima lactase melhora a estabilidade do biocatalisador, permitindo que o mesmo seja reutilizado em vários ciclos de reação (URRUTIA et al., 2013) e opere em processos contínuos de longo prazo (KLEIN et al., 2013), além de melhorar a estabilidade da enzima e simplificar a separação do produto (PANESAR et al., 2018).

Trabalhos que retratam a imobilização de lactase nos mais variados suportes têm sido desenvolvidos. Klein et al. (2012) imobilizaram a lactase em macropartículas de quitosana e em nanopartículas de quitosana utilizando o glutaraldeído como agente reticulante, e concluíram que ambos os biocatalisadores apresentaram excelente estabilidade operacional na hidrólise da lactose. Em um trabalho mais atual, Klein et al. (2016) imobilizaram lactase em partículas de quitosana reticuladas com genipina e verificaram a ação dessas partículas na hidrólise da lactose para produção de galactooligossacarídeos (oligossacarídeos formados pela transgalactosilação da galactose por meio da ação da lactase). Foram encontrados bons resultados relacionados à hidrólise da lactose e sua estabilidade operacional.

Ayoub e Caseli (2018) utilizaram a complexação entre lactase e alginato de sódio, e lactase e l-carragena, para imobilizar a enzima, e observaram que esses sistemas obtiveram menor atividade enzimática quando comparados à enzima

livre, porém, afirmaram que esse efeito não torna impraticável a utilização dessa enzima imobilizada. Misson et al. (2015) fabricaram nanofibra de poliestireno como suporte para imobilizar lactase. Seus resultados demonstraram um aumento na produção de galactooligossacarídeos comparado à enzima livre. Haghju, Bari e Khaled-Abad (2018) imobilizaram lactase em blendas de nanofibras de quitosana/álcool polivinílico e concluíram que a enzima foi imobilizada com sucesso nas nanofibras.

Wolf et al. (2019) utilizaram um hidrogel à base de quitosana como suporte para a imobilização da lactase, com o objetivo de hidrolisar a lactose e produzir leite com baixo teor desse açúcar. Eles constataram que a lactase imobilizada nesse hidrogel pode ser utilizada para a produção de leite com baixo teor de lactose por pelo menos dez ciclos de hidrólise.

2.8 Genipina

A genipina é um agente reticulante de baixa toxicidade e de ocorrência natural, encontrado em frutos de uma tradicional planta medicinal chinesa, a *Gardenia Jasminoides* Ellis (AZEREDO; WALDRON, 2016; NICKERSON et al., 2006) ou em frutos de *Genipa Americana* L. (jenipapeiro), uma planta encontrada nas planícies da floresta Amazônica e em outros locais da América Latina (NERI-NUMA et al., 2017). Os frutos da gardênia não possuem genipina livre, eles apresentam a forma glicosilada e é necessário utilizar a β -glicosidase no tratamento enzimático, a fim de liberar a genipina. Já os frutos do jenipapeiro possuem genipina livre (BENTES et al., 2015; BRAUCH, 2016; RAMOS-DE-LA-PEÑA et al., 2014).

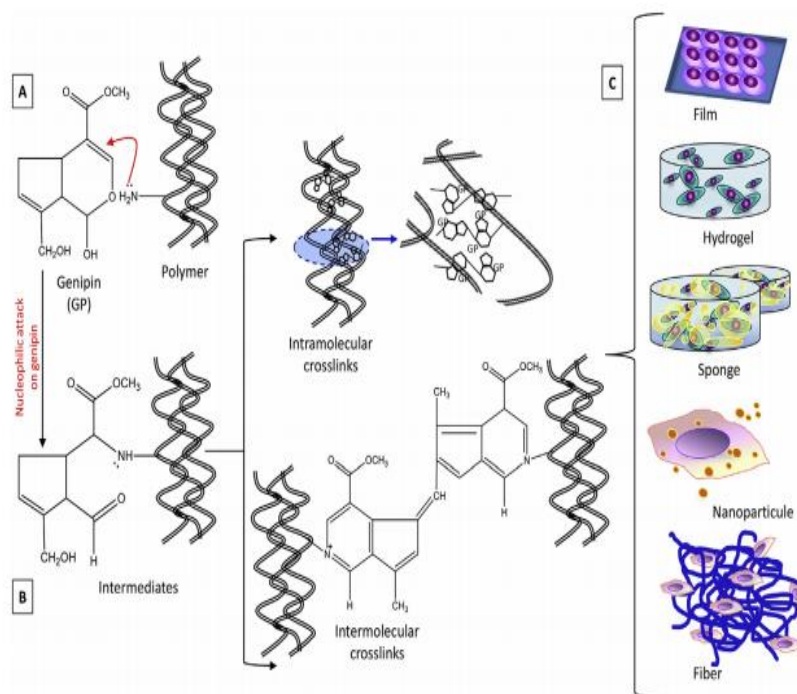
A genipina é incolor, mas sua reação com aminas primárias e proteínas, na presença de oxigênio, resulta em pigmentos azul-violeta solúveis em água (BUCHWEITZ, 2016; TOKAREVA; IVANTSOVA; MIRONOV, 2017).

Portanto, a reticulação com substâncias que possuam tais grupamentos químicos, resulta em produtos de coloração azul (PUJANA et al., 2013).

Alguns agentes reticulantes naturais, provenientes de materiais vegetais, apresentam potencial adequado para a obtenção de fortes ligações entre cadeias de biopolímeros, além de oferecer maior segurança, por apresentar efeitos menos tóxicos. Um exemplo de agente reticulante seguro e de ocorrência natural que tem sido aplicado em biopolímeros é a genipina (GARAVAND et al., 2017).

A Figura 6 ilustra esquematicamente a reação de reticulação entre a genipina e biopolímeros que contenham grupos de amina primária, e possíveis estruturas de reticulação intramolecular e intermolecular.

Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de reação da genipina com a) grupo amino b) biopolímeros c) algumas formas de estruturas reticuladas intra ou intermolecular.



Fonte: Neri-Numa et al. (2017).

Trabalhos têm sido realizados com a utilização da genipina como agente reticulante em filmes de proteínas ou de polissacarídeos (AZEREDO; WALDRON, 2016; GIOFFRÉ et al., 2015; GONZÁLEZ et al., 2011; JIN; SONG, HOURSTON, 2004; MA et al., 2013; PANZAVOLTA et al., 2013).

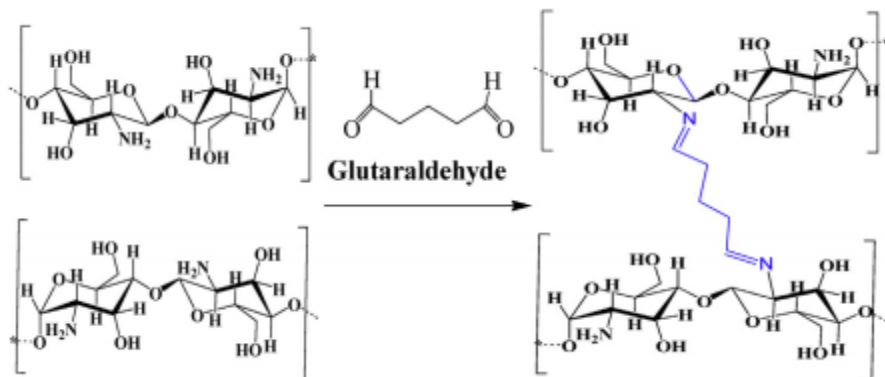
González, Strumia e Igarzabal (2011) utilizaram diferentes concentrações de genipina como agente reticulante em filmes de isolado protéico de soja com glicerol, e verificaram que essas concentrações influenciavam nas propriedades mecânicas de resistência à tração e alongamento na ruptura, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água e taxa de degradação dos filmes. Gioffré et al. (2015) produziram filmes de gelatina reticulados com genipina em diferentes pHs e observaram variações no módulo de elasticidade, alongamento na ruptura e resistência à tração desses filmes. Jin, Song e Hourston, (2004) desenvolveram filmes de quitosana com polietileno que foram reticulados com diferentes concentrações de genipina. Eles também observaram variações nas propriedades de resistência à tração e alongamento na ruptura. Ma et al. (2013) produziram filmes de gelatina reticulados com genipina em diferentes concentrações para serem usados como transportadores de lisozima. Eles observaram que com a presença e maiores concentrações de genipina, a liberação inicial da lisozima diminuiu assim como sua liberação cumulativa após quatro horas.

2.9 Glutaraldeído

O glutaraldeído ($C_5H_8O_2$) é um importante reagente, amplamente utilizado como agente reticulante, pois é barato, está prontamente disponível, é altamente solúvel em solução aquosa (JAYAKRISHNAN; JAMEELA, 1996), além de apresentar alta estabilidade na formação de uma ligação covalente estável entre o agente reticulante e cadeias polissacarídicas. É o agente de reticulação

covalente mais comum para filme de quitosana, devido à capacidade dos aldeídos reagirem com o grupo amina primário da quitosana (FIGURA 7) (LI et al., 2013).

Figura 7 - Quitosana quimicamente reticulada com glutaraldeído.



Fonte: Islam, Dmour e Taha (2019).

O glutaraldeído não está isento de toxicidade (BANERJEE et al., 2002) e apresenta características de ser um agente irritante e um neurotóxico em potencial, porém, esses fatos ainda não são totalmente compreendidos no corpo humano (BALLANTYNE; JORDAN, 2001; BEAUCHAMP JR. et al., 1992). A superexposição de glutaraldeído ao ser humano acarreta em típicos efeitos sensoriais irritantes nos olhos, pele e trato respiratório, podendo levar a uma dermatite crônica e asma. Mas apesar de terem sido postulados mecanismos para a toxicidade do glutaraldeído, os resultados de pesquisas são inconsistentes sobre seu potencial toxicológico. Pesquisas em desenvolvimento sobre a toxicidade do glutaraldeído mostram que ele não é teratogênico, e estudos farmacocinéticos mostram baixa penetração na pele, com valores muito baixos medidos *in vitro* em ratos e na pele humana (BALLANTYNE; JORDAN, 2001; TAKIGAWA; ENDO, 2006).

O glutaraldeído tem sido muito utilizado como agente reticulante na produção de filmes, como nos filmes de quitosana com α -tocoferol desenvolvidos

por Yeamsuksawat e Liang (2019), e filmes de quitosana e amido produzidos por Li et al. (2013). Também tem sido amplamente utilizado na imobilização de enzimas, como nos filmes de celulose com líquido iônico produzido por Klein et al. (2011) para imobilizar lactase, nas nanopartículas de dióxido de titânio, para imobilização de lacase desenvolvidas por Ji et al. (2017), nos suportes à base de sílica para imobilização de pectinase produzidos por Alagöza, Tükelb e Yildirim (2016), dentre tantos outros.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de produtos sem lactose é uma tendência para atender aos consumidores que apresentam capacidade prejudicada de digerir este carboidrato. O processo tradicional de produção de leite sem lactose, que é o mais utilizado pelos laticínios hoje em dia, não é um processo contínuo, já que é necessário um tempo durante o processo para que a lactase adicionada ao alimento, reaja, clivando a lactose. Além disso, a enzima utilizada se encontra em sua forma livre, não sendo possível o seu reaproveitamento, o que resulta em maior custo do produto final, e ainda pode resultar em um produto com a cor alterada. Alternativamente, pode-se incorporar enzimas imobilizadas ao material de embalagem, permitindo, desta maneira, que a ação de hidrólise do substrato ocorra na etapa do acondicionamento, ou antes do consumo, caso o material com enzima imobilizada seja utilizado para produção de embalagem rígida, permitindo também o reuso das mesmas.

Existe uma necessidade tanto para os fabricantes de alimentos como para os consumidores, de que a vida útil do produto seja prolongada, portanto, uma embalagem que contenha agente antimicrobiano pode contribuir para o aumento dessa vida útil, como é o caso da quitosana. Além disso, a utilização de nanopartículas de dióxido de titânio tem se mostrado uma boa alternativa contra a proliferação de alguns microrganismos e, portanto, pode ser usada a fim de verificar se a mesma é capaz de intensificar a atividade antimicrobiana da embalagem.

Além disso, é importante contribuir para a diminuição do impacto ambiental através da utilização e valorização de resíduos que são descartados no meio ambiente. As carapaças dos crustáceos são resíduos abundantes, que quando utilizadas para a obtenção da quitosana, podem auxiliar na redução do impacto

ambiental causado pelo seu acúmulo nos locais onde são gerados, além de ser fonte para a obtenção de um produto de alto valor comercial e ampla utilização.

A elaboração de filme polimérico de quitosana, incorporado com lactase imobilizada em macropartículas de quitosana, com ou sem nanopartículas de dióxido de titânio, a fim de constituir uma embalagem ativa que seja capaz de hidrolisar a lactose e que apresente função antimicrobiana simultaneamente, ainda não foi relatada na literatura até o presente momento. Além disso, são raras as pesquisas que apresentem filmes poliméricos para embalagens de alimentos com lactase imobilizada. Portanto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento desse tipo de filme utilizando dois diferentes agentes de reticulação para a imobilização da enzima, o glutaraldeído, que é o agente mais comumente utilizado, porém apresenta certa toxicidade, e a genipina, um agente reticulante natural e seguro; duas concentrações de lactase (3 e 5 mL); nanopartículas de dióxido de titânio (0 e 1 % m/m); duas diferentes temperaturas (7 °C e 25 °C) para a realização do processo de hidrólise. Propõe-se também, a verificação da influência desses diferentes fatores na eficiência dos filmes na hidrólise da lactose, na sua estabilidade operacional, a influência dos próprios filmes no aumento da acidez dos leites, assim como a caracterização dos mesmos quanto às propriedades de solubilidade em simulante de leite e antimicrobianas.

4 CONCLUSÃO GERAL

Todos os filmes apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos estudados. Foi verificado que a adição de 1% (m/m) de nanopartículas de TiO_2 não influenciou na atividade antimicrobiana dos filmes, portanto, incorporar essa quantidade de nanopartículas de TiO_2 , não faz sentido. Sendo assim, novas pesquisas, com diferentes quantidades incorporadas, devem ser realizadas a fim de se obter um filme com maior atividade antimicrobiana devido a esse nanomaterial. Diante desse resultado, somente os filmes sem nanopartículas de TiO_2 foram selecionados para as análises posteriores.

Com base no estudo da hidrólise da lactose, foi possível verificar que os filmes selecionados atuaram em cinco ciclos diferentes, nas temperaturas de 7 °C e 25 °C, indicando que incorporar a lactase imobilizada em filme de quitosana é uma alternativa viável para a atuação dessa enzima. A fim de serem utilizados em indústria de alimentos, os filmes com 5 mL de lactase e genipina como agente reticulante, foram os que apresentaram melhor desempenho.

Foi verificado uma possível influência dos filmes no aumento da acidez dos leites que estavam em contato com os mesmos, e a caracterização dos filmes mostrou que os agentes reticulantes foram importantes para a obtenção de filmes com baixa solubilidade em simulante de leite.

Tendo em vista os bons resultados que esses filmes apresentaram, principalmente em relação ao objetivo principal, que era a capacidade de hidrolisar a lactose em diferentes ciclos, aliados à boa aceitação que os consumidores têm em relação às inovações em embalagens, conclui-se que a embalagem de alimentos para leite, proposta neste trabalho, destacando-se principalmente o filme composto por 5 mL de lactase e genipina como agente reticulante, apresenta grande potencial de aplicação.

REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis**. Parte 1: Terminologia. Degradable and/or renewable plastic packaging Part 1: Terminology. ABNT NBR 15448-1:2008 equivale o conjunto ABNT NBR 15448-1, 2006.
- ALAGÖZA, D.; TÜKELB, S.S.; YILDIRIM, D. Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 426–432, 2016.
- ANDRADE-MAHECHA, M.M.; TAPIA-BLACIDO, D.R.; MENEGALLI, F. Development and optimization of biodegradable films based on achira flour. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 88, n. 2, p. 449-458, 2012.
- ANDRÉ, R.S. et al. Antimicrobial activity of TiO₂:Ag nanocrystalline heterostructures: Experimental and theoretical insights. **Chemical Physics**, v. 459, p. 87-95, 2015.
- ANONYMOUS DIETETIC FOODS. **Proposed Nordic Guidelines for Assessment and Regulation**. The Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 1994.
- ARANAZ, I. et al. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 203–230, 2009.
- ARORA, A.; PADUA, G.W. Nanocomposites in food packaging. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 75, p. 43–49, 2010.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard terminology relating to plastics – D 883**, Annual book of ASTM, Philadelphia, PA, 1999.
- AYOUB, F.P.; CASELI, L. Controlling the molecular architecture of lactase immobilized in Langmuir-Blodgett films of phospholipids to modulate the enzyme activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 150, p. 8–14, 2017.
- AZEREDO, H.M.C.; WALDRON, K.W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact e A review. **Trends in Food Science and Technology**, [S.l.], v. 52, p. 109-122, 2016.

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.

BALLANTYNE, B.; JORDAN, S.L. Toxicological, medical, and industrial hygiene aspects of glutaraldehyde with particular reference to its biocidal use in cold sterilization procedures. **Journal of Applied Toxicology**, [S.l.], v. 21, p. 131–151, 2001.

BANERJEE, T. et al. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 243, p. 93–105, 2002.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, [S.l.], v. 479, p. 1-20, 2019.

BASTARRACHEA, L.J. et al. Active packaging coatings. **Coatings**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 771–791, 2015.

BEAUCHAMP JR., R.O. et al. A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. **Critical Reviews in Toxicology**, [S.l.], v. 22, p. 143–174, 1992.

BENITO-PEÑA, E. et al. Molecularly imprinted hydrogels as functional active packaging materials. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 190, p. 487–494, 2016.

BENTES, A. de S.; MERCADANTE, A.Z. Influence of the stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap (*Genipa americana*L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.l.], v. 62, n. 44, p. 10800-10808, 2014.

BICKERSTAFF, G.F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Human Press, 1997.

BIJI, K.B. et al. Smart packaging systems for food applications: A review. **Journal of Food Science & Technology**, [S.l.], v. 52, n. 10, p. 6125–6135, 2015.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. In: CASTRO, H.F. et al. **Imobilização de Enzimas sua Estabilização**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 45, de 03 de novembro de 2010**. Em: aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF), 2010a.

_____. **Resolução RDC nº 51, de 26 de novembro de 2010**. Em: Regulamento Técnico que estabelece os critérios de migração para materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos, 2010b.

_____. **Resolução RDC nº 53, de 07 de outubro de 2014**. Em: Lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral, 2014.

BRAUCH, J.E. Underutilized fruits and vegetables as potential novel pigments sources. In: CARLE, R.; SCHWEIGGERT, R. **Handbook on natural pigments in food and Beverages: Industrial applications for improving food color**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2016. p. 305-327.

BRODELIUS P. Industrial applications of immobilized biocatalysts. In: **Advances in Biochemical Engineering**. Berlin: Springer, 1978. v. 10.

BUCHWEITZ, M. Natural Solutions for Blue Colors in Food. **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial applications for improving food color**, 2016. c. 17. p. 355-384, 2016.

CABRAL, J.M.S; KENNEDY, J.F. Covalent and coordination immobilization of Proteins. **Bioprocess Technology**, [S.l.], v.114, p.73-138, 1991.

CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation 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.

CHEN, R.H.; LIN, W.C.J.; LIN, H. Effects of pH, ionic strength, and type of anion on the rheological properties of chitosan solutions, **Acta Polymerica**, [S.l.], v. 5, p. 41-46, 1994.

CHIBATA, I. **Immobilised Enzymes-Research and Development**. New York: Kodansha, 1978.

DA CUNHA, L.R. da et al. Development and evaluation of active packaging incorporated with lactase. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 23-26, 2007.

DAS, D. K.; DUTTA, H.; MAHANTA, C. L. Development of a rice starch-based coating with antioxidant and microbe-barrier properties and study of its effect on tomatoes stored at room temperature. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 272-278, 2013.

DIZAJ, S.M. et al. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 44, p. 278-284, 2014.

DO SUL, J.A.I.; COSTA, M.F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. **Environmental Pollution**, [S.l.], v. 185, p. 352-364, 2014.

DUDEFOI, W.; VILLARES, A.; PEYRON, S.; MOREAUS, C.; ROPERS, M. H.; GONTARD, N.; CATHALAB, B. **Nanoscience and nanotechnologies for biobased materials, packaging and food applications**: New opportunities and concerns. Innovative Food Science and Emerging Technologies. USA: Elsevier, 2018. v. 46. p. 107-121.

EC. Comissão Europeia. Commission Regulation. **Nº 1935/2004** of the European Parliament and the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food. **Official Journal of the European Union**, OJ L 338, 13.11.2004, p. 4.

_____. **Nº. 237/13/1994** of the European Parliament and Council directive of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. Official Journal of the European Union, 1994.

ELSABEE, M.Z.; ABDOL, E.S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering: C**, [S.l.], v. 33, n. 4, p. 1819-1841, 2013.

FALGUERA, V. et al. Edible films and coatings: Structures, active functions, and trends in their use. **Trends in Food Science and Technology**, [S.l.], v. 22, n. 6, p. 292-303, 2011.

FDA. Food and Drug Administration. **Summary of color additives for use in the United States in in foods, drugs, cosmetics, and medical devices.** United States: Food and Drug Administration, 2015.

_____. **Guidance for industry:** safety of nanomaterials in cosmetic products. United States: Food and Drug Administration, 2014.

_____. Listing of color additives Exempt from Certification. In: **Code of Federal Regulations Title 21-Food and Drugs.** United States. Government Printing Office, Washington, DC, USA 2002.

FERFERA-HARRAR, H.; DAIRI, N. Green nanocomposite films based on cellulose acetate and biopolymer-modified nanoclays: studies on morphology and properties. **Iranian Polymer Journal**, [S.l.], v. 23, n. 12, p. 917–931, 2014.

FRANK, L.A.; ONZI, G.R.; MORAWSKI, A.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; CONTRI, R.V. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. **Reactive and Functional Polymers**, [S.l.], v. 147, 2020

GALSTYAN, V. et al. Metal Oxide Nanostructures in Food Applications: Quality Control and Packaging. **Chemosensors**, [S.l.], v. 6, n. 2, p. 16, 2018.

GALUS, S.; KADZIŃSKA, J. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 45, n. 2, p. 273-283, 2015.

GANZLE, M.G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, [S.l.], v. 18, p. 685–694, 2008.

GARAVAND, F. et al. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 104, p. 687-707, 2017.

GARCIA, M.A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 65, n. 6, p. 941-947, 2000.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: A literature review. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 20, p. 2-12, 1985.

GENNADIOS, A.; HANNA, M.A.; KURTH, L.B. Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 30, n. 4, p. 337-350, 1997.

GIOFFRÉ, M. et al. Role of pH on stability and mechanical properties of gelatin films. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [S.l.], v. 27, p. 67-77, 2015.

GODDARD, J.M.; TALBERT, J.N.; HOTCHKISS, J.H. Covalent attachment of lactase to low-density polyethylene films. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 72, p. 36-41, 2007.

GONZÁLEZ, A.; STRUMIA, M.C.; IGARZABAL, C.I.A. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: synthesis, characterization and biodegradation. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 106, p. 331-338, 2011.

GONTARD, N. Active packaging. In: SOBRAL P.J.A.; CHUZEL, G. **Workshop sobre biopolímeros**. Pirassununga: CENDOTEC, 1997, p. 23-27.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. **Czech Journal of Food Science**, [S.l.], v. 26, p. 1–14, 2008.

GUO, Y. et al. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Ternary Blend Edible Films with Efficient Antimicrobial Activities for Food Packaging Applications. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 84, n. 6, p. 1411-1419, 2019.

HAGHJU, S.; BARI, M.R.; KHALED-ABAD, M.A. Affecting parameters on fabrication of β -D-galactosidase immobilized chitosan/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 200, n. 15, p. 137-143, 2018.

HARISH PRASHANTH, K.V.; THARANATHAN, R.N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 117-131, 2007.

HEINE, R.G. et al. Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children – common misconceptions revisited. **World Allergy Organization Journal**, [S.l.], p. 10-41, 2017.

HOLSINGER V.H. Lactose. In: WONG N.P et al. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. Boston: Springer, 1988, p. 279-342.

HSIEH, H.J.; LIU, P.C.; LIAO, W.J. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. **Biotechnology Letters**, [S.l.], v. 22, n. 18, p. 1459-1464, 2000.

ISLAM, N.; DMOUR, I.; O TAHA, M. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. **Heliyon Research**, [S.l.], v. 5, p. 1-9, 2019.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. 2nd ed. (The "Gold Book"). MCNAUGHT, A.D.; WILKINSON A. (Compiled). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1996.

JAYAKRISHNAN, A.; JAMEELA, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. **Biomaterials**, [S.l.], v. 17, p. 471-484, 1996.

JI, C. et al. Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of *P. ostreatus* culture for micro-pollutant degradation. **Separation and Purification Technology**, [S.l.], v. 178, p. 215–223, 2017.

JIN, J.; SONG, M.; HOURSTON, D.J. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 5, p. 162-168, 2004.

JUANG, R.S.; WU, F.C.; TSENG, R.L. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 80, n. 3, p. 187-193, 2001.

KAEWKLIN, P. et al. Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 112, p. 523–529, 2018.

KAUSAR, A. Scientific potential of chitosan blending with different polymeric materials: A review. **Journal of plastic film and sheeting**, [S.l.], v. 33, p. 384-412, 2017.

KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. Enzyme immobilization. **Enzyme Technology**, [S.l.], v.72, p. 347-406, 1987.

KLEIN, M.P. et al. Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 46, p. 1375–1379, 2011.

KLEIN, M.P. et al. Effect of the Support Size on the Properties of β - Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 13, n. 8, p. 2456-2464, 2012.

KLEIN, M.P. et al. High stability of immobilized β -D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 95, p. 465–470, 2013.

KLEIN, M.P. et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -D-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 137, p. 184-190, 2016.

KOELLER, K.M.; WONG, C.H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, [S.l.], v. 409, p. 232-240, 2001.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.l.], v.35, p.126–139, 2004.

KUMAR, S.; YE, F.; DOBRETSOV, S.; DUTTA, J. Chitosan Nanocomposite Coatings for Food, Paints, and Water Treatment Applications. **Applied Sciences**, [S.l.], v. 9, p. 1- 27, 2019.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, A.; DUTTA, J. Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], p. 1-40, 2020.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modelling of the thermal inactivation of an industrial beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.l.], v. 38, p. 1-9, 2006.

LI, H. et al. Comparison of chitosan/starch composite film properties before and after cross-linking. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 52, n. 1, p. 275–279, 2013.

LI, K. et al. Preparation of chitosan-sodium alginate films through layer-by-layer assembly and ferulic acid crosslinking: Film properties, characterization, and formation mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 122, p. 485-492, 2019.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v. 42, n. 15, p. 6236-6249, 2013.

LIN, B. et al. Development of silver/titanium dioxide/chitosan adipate nanocomposite as an antibacterial coating for fruit storage. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology**, [S.l.], v. 63, n. 2, p. 1206-1213, 2015.

LIU, D.M.; CHEN, J.; SHI, Y.P. Alpha-Glucosidase immobilization on chitosan modified cellulose filter paper: preparation, property and application, **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 122, p. 298-305, 2019.

LOPEZ-LEIVA, M.H.; GUZMAN, M. Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 30, p. 757-762, 1985.

LORENZONI, A.S.G. et al. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.l.], v. 111, p. 51–55, 2015.

MA, W. et al. Preparation and characterization of excellent antibacterial TiO₂/N-halamines nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.l.], v. 506, p. 284-290, 2016.

MA, W. et al. Genipin-crosslinked gelatin films as controlled released carriers of lysozyme. **Food Research International**, [S.l.], v. 51, p. 321-324, 2013.

MACIEL, V.B.V.; YOSHIDA, C.M.P.; FRANCO, T.T. Development of a prototype of a colourimetric temperature indicator for monitoring food quality. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 111, p. 21 - 27, 2012.

MANAN, F.M.A. et al. Insight into the *Rhizomucor miehei* lipase supported on chitosan-chitin nanowhiskers assisted esterification of eugenol to eugenyl benzoate. **Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 280, p. 19–30, 2018.

MARKOGLU, N.; WAINER, I. W. In: WILSON, I. D. **Bioanalytical Separations**. New York: Elsevier Science, 2003. cap. 7.

MATHARU, R.K.; CIRIC, L.; EDIRISINGHE, M. Nanocomposites: suitable alternatives as antimicrobial agents. **Nanotechnology**, [S.l.], v. 29, 2018.

MESTRINER, F. **Design de embalagem – curso básico**. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 2002.

MIHAI, A.L.; POPA, M.E. Chitosan coatings, a natural and sustainable food preservation method. **Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 208, 81-81, 2015.

MISSON, M. et al. Enhancing enzyme stability and metabolic functional ability of β -galactosidase through functionalized polymer nanofiber immobilization. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 10, p. 1915–1923, 2015.

MOHANTY, A.K. et al. Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction. In: _____. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Oxford: Elsevier, 2008.

NERI-NUMA, I.A. et al. A natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science and Technology**, [S.l.], v. 67, p. 271-279, 2017.

NERIN, C. Plastics and Polymers for Food Packaging Manufacturing. In: SMITHERS, G. W. et al. **Reference Module in Food Science**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/referenceworks/9780081005965>>.
Acesso em: 22 dez. 2019.

NICKERSON, M.T.; FARNWORTH, R.; WAGAR, E.; HODGE, S.M.; ROUSSEAU, D.; PAULSON, A.T. Some physical and microstructural properties of genipin-crosslinked gelatin–maltodextrin hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 38, p. 40–44, 2006.

OAK, S.J.; JHA, R. The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S.l.], v. 59, n. 11, p. 1675-1683, 2018.

OLIVAS, G.I; RODRIGUEZ, J.J.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Edible coatings composed of methylcellulose stearic acid, and additives to preserve quality of pear wedges. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S.l.], v. 27, p. 299-320, 2003.

OLIVEIRA, A.S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J.K.C.; MACEDO, L.L.P.; ANDRADE, L.B.S.; BEMQUERER, M.; SANTOS, E.A.; KIYOTA, S.; SALES, M.P. Purification and characterization of a trypsin/papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology Biochemistry**, [S.l.], v. 45, p. 858-865, 2007.

PANESAR, P.S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, [S.l.], p.1- 16, 2010.

PANESAR, P.S. et al. Biocatalytic strategies in the production of galacto-oligosaccharides and its global status. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 111, p. 667–679, 2018.

PANZAVOLTA, S.; TORRICELLI, P.; AMADORI, S.; PARRILLI, A.; RUBINI, K.; DELLA BELLA, E.; BIGI, A. 3D interconnected porous biomimetic scaffolds: In vitro cell response. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [S.l.], v. 101, p. 3560-3570, 2013.

PAUL, S. et al. Extraction and purification of chitosan from chitin isolated from sea prawn (*Fenneropenaeus indicus*). **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, [S.l.], v. 7, p. 201–204, 2014.

PETERSSON, M.; STADING, M. Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions. **Food Hydrocolloids**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 123-132, 2005.

PUJANA, M.A. et al. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 94, p. 836-842, 2013.

RAHMAN, P.M.; MUJEEB, V.M.A.; MURALEEDHARAN, K. Flexible chitosan-nano ZnO antimicrobial pouches as a new material for extending the shelf life of raw meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 97, p. 382-391, 2017.

RAMOS-DE-LA-PENA, A.M. et al. A review through recovery, purification and identification of genipin. **Phytochemistry Reviews**, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 37-49, 2014.

REJIKUMAR, S.; SUREKHA, D. Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β -galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly (vinyl alcohol). **International Journal of Food Science and Technology**, [S.l.], v.36, p.91-98, 2001.

RESTUCCIA, D. et al. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. **Food Control**, [S.l.], v. 21, n. 11, p. 1425–143, 2010.

RIAZ, A. et al. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 114, p. 547-555, 2018.

RICHMOND, M.L.; GRAY, J.I.; STINE, C.M. Beta-galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns, and immobilization. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 64, p. 1759-1771, 1981.

ROBERTSON, G.L. **Food Packaging: Principles and Practice**. 3. ed. Taylor & Francis: CRC Press, 2012.

ROSSI, E.; LENTZE, M.J. Clinical significance of enzymatic deficiencies in the gastrointestinal tract with particular reference to lactase deficiency. **Annals of Allergy**, [S.l.], v. 53, n. 6, p. 649-656, 1984.

SANI, I.K.; PIRSA, S.; TAGI, S. Preparation of chitosan/zinc oxide/Melissa officinalis essential oil nano-composite film and evaluation of physical, mechanical and antimicrobial properties by response surface method. **Polymer Testing**, [S.l.], v. 79, p. 1-10, 2019.

SANTANA, W.; PINHEIRO, A.P.; SILVA C.M.R.; SARAIVA, A.A. A new fossil caridean shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Cretaceous (Albian) of the Romualdo Formation, Araripe Basin, northeastern Brazil. **Zootaxa**, [S.l.], v. 3620, p. 293-300, 2013.

SATHE, P. et al. Bioinspired nanocoatings for biofouling prevention by photocatalytic redox reactions. **Scientific Reports**, [S.l.], v.7, p. 1-12, 2017.

SCHMID, A. et al. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, [S.l.], v. 409, p. 258-268, 2001.

SEGEL, I.H. **Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems**, 1993. 992 p.

SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis e Catalysis**, [S.l.], v. 349, p. 1289-1307, 2007.

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

SINGH, D.K.; RAY, A.R. Biomedical applications of chitin, chitosan and their derivatives, **Journal of Macromolecular Science, Part C**, [S.l.], v. 40, p. 69–83, 2007.

SINGH, R.S.; SINGH, R.P.; KENNEDY, J.F. Immobilization of yeast inulinase on chitosan beads for the hydrolysis of inulin in a batch system. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 95, p. 87–93, 2017.

SIRACUSA, V. et al. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, [S.l.], v. 19, n. 12, p. 634-643, 2008.

SIRIPATRAWAN, U.; KAEWKLIN, P. Fabrication and characterization of chitosan-titanium dioxide nanocomposite film as ethylene scavenging and antimicrobial active food packaging. **Food Hydrocolloids**, [S.l.], v. 84, p. 125-134, 2018.

SOUZA, C.J.F.; GARCIA-ROJAS, E.E.; SOUZA, C.S.F.; VRIESMANN, L.C.; VICENTE, J.; CARVALHO, M.G.; PETKOWICZ, C.L.O.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Immobilization of β -galactosidase by complexation: Effect of interaction on the properties of the enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 122, p. 594-602.

SURI, S. et al. Considerations for development of lactose-free food. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, [S.l.], v. 15, p. 27–34, 2019.

TAKIGAWA, T.; ENDO, Y. Effects of glutaraldehyde exposure on human health. **Journal of Occupational Health**, [S.l.], v. 48, p. 75–87, 2006.

TANG, Y. et al. Chitosan/titanium dioxide nanocomposite coatings: rheological behavior and surface application to cellulosic paper. **Carbohydrates Polymers**, v. 151, p. 752–759, 2016.

THARANATHAN, R.N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, [S.l.], v. 14, n. 3, p.71-78, 2003.

TOKAREVA, M.I.; IVANTSOVA, M.N.; MIRONOV, M.A. Heterocycles of natural origin as non-toxic reagents for cross-linking of proteins and polysaccharides. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, [S.l.], v. 53, n. 1, p. 21-35, 2017.

TOMAR, B.S. Lactose Intolerance and Other Disaccharidase Deficiency. **The Indian Journal of Pediatrics**, [S.l.], v. 81, n. 9, p. 876–880, 2014.

URRUTIA, P. et al. Immobilization of *Bacillus circulans* β -galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation. **Biochemical Engineering Journal**, [S.l.], v. 77, p. 41–48, 2013.

USKOKOVIĆ, V. Nanotechnologies: What we do not know. **Technology in Society**, [S.l.], v. 29, p. 43–61, 2007.

VEJDAN, A. et al. Effect of TiO₂ nanoparticles on the physico-mechanical and ultraviolet light barrier properties of fish gelatin/agar bilayer film. **LWT Food Science Technology**, [S.l.], v. 71, p. 88–95, 2016.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 164, p. 268-283, 2017.

WAHLQVIST, M.L. Lactose nutrition in lactase nonpersisters. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, [S.l.], v. 24, p. 21–25, 2015.

WEI, Q. et al. Enhanced antioxidant and antifungal activity of chitosan derivatives bearing 6 O-imidazole-based quaternary ammonium salts. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 206, p. 493-503, 2019.

WIHODO, M.; MORARU, C.I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 114, n. 3, p. 292-302, 2013.

WOJCIK, K.Y, et al. Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. **Journal of the American Dietetic Association**, [S.l.], v. 109, p. 137–40, 2009.

WOLF, M. et al. Production of low-dosage lactose milk using lactase immobilised in hydrogel. **International Dairy Journal**, [S.l.], v. 92, p. 77-83, 2019.

WU, Z. et al. Novel chitosan films with laponite immobilized Ag nanoparticles for active food packaging. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], n. 199, p. 210-218, 2018.

WYRWA, J.; BARSKA, A. Innovations in the food packaging market: Active packaging. **European Food Research and Technology**, [S.l.], v. 243, p. 1681–1692, 2017.

YEAMSUKSAWAT, T.; LIANG, J. Characterization and release kinetic of crosslinked chitosan film incorporated with α -tocopherol. **Food Packaging and Shelf Life**, [S.l.], v. 22, p. 1-9, 2019.

YILDIRIM, S. et al. Active packaging applications for food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [S.l.], v. 17, p. 165–199, 2018.

YOON, H.G. et al. Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 66, p. 3727–3734, 2000.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, [S.l.], v. 13, p. 1133–1174, 2015.

ZHANG, J. et al. Synthesis, characterization, and the antifungal activity of chitosan derivatives containing urea groups. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 109, p. 1061–1067, 2018.

ZHANG, X. et al. Development of multifunctional food packaging films based on chitosan, TiO₂ nanoparticles and anthocyanin-rich black plum peel extract. **Food Hydrocolloids**, [S.l.], v. 94, p. 80-92, 2019.

ZHANG, X. et al. Preparation of chitosan-TiO₂ composite film with efficient antimicrobial activities under visible light for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 169, p. 101-107, 2017.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO*

A versão preliminar do manuscrito a seguir, se encontra nas normas da revista Food Control, para a qual o mesmo foi submetido.

ARTICLE - Obtaining low lactose milk from flexible biodegradable films incorporated with immobilized lactase

ABSTRACT

Chitosan films incorporated with TiO₂ nanoparticles and immobilized lactase in chitosan macroparticles were developed with the objective of hydrolyzing lactose and producing milk with reduced lactose content and with microbiological quality in different reuse cycles. Two concentrations of lactase (3 and 5 mL), two crosslinking agents (glutaraldehyde and genipin) and two concentrations of titanium dioxide nanoparticles (0 and 1%) were used in the formulation of the films. The films were checked for their antimicrobial activity by the agar diffusion test against the microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Listeria Monocytogenes*. As all films exhibited antimicrobial activity against the microorganisms studied, and there was no difference between those containing or not the nanoparticles, only films without TiO₂ nano were evaluated in the subsequent analyzes. These, in its turn, were evaluated for the hydrolysis efficiency of UHT milk lactose, through cryoscopy, at different temperatures, 7°C and 25°C, in periods of 48 and 24 hours, respectively, and their operational stability was evaluated in five reuse cycles. The influence of the films in increasing the acidity of the milks that came into contact with them was also evaluated, through constant pH measurements, and the solubility of these films in milk simulant. In addition, market research was carried out to verify the acceptance of packaging with new technologies by consumers. In general, the hydrolysis of lactose by the films happened in a shorter time at the highest temperature and the films with 5 ml of lactase and with genipin hydrolyzed a greater amount of lactose during more cycles. All films influenced the increase in the acidity of the milks that were in contact with them. Films with low solubility

in aqueous medium were obtained using the crosslinking agents genipin and glutaraldehyde. In view of the results, it was found that the developed films are presented as a good alternative to be applied as milk food packaging, mainly films with genipin and 5 mL of lactase, which hydrolyzed 100% lactose in all cycles at both temperatures. Through the research, it was possible to realize that although most consumers do not understand what active, intelligent and nanotechnology packaging is, they are open to innovations and willing to buy products contained in these packages.

Keywords: Enzyme immobilization; Chitosan films; Active Packaging; Lactose hydrolysis.

1. INTRODUCTION

Recent developments in food packaging include the production of biodegradable films that interact with food (active packaging), increasing its shelf life, improving its quality and food safety (Benito-Peña et al., 2016; Biji et al., 2015; Li & Pan, 2018; Yildirim et al., 2018).

Among the biodegradable polymers, there is chitosan, which is a biopolymer of great interest. It has the ability to form a film and has antimicrobial activity (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007; Kumar et al., 2019). Currently, chitosan compounds with various materials, such as enzymes, have become the focus for the development of important research in the area of active packaging (Kumar et al., 2020).

Active packaging is a modern approach and has emerged as an attractive solution for food packaging films containing active compounds, such as antimicrobial agents and enzymes (Adilah et al., 2018; Yildirim et al., 2018).

Lactase is a hydrolase that hydrolyzes lactose into glucose and galactose for the production of foods with a low content and / or without lactose (Geka & Lopez-leiva, 1985). In most lactose hydrolysis methods for the production of these types of foods, the enzyme is used in its free form, which increases the cost of an industrial process, since the enzyme is easily denatured and cannot be reused (Wolf et al., 2018). The immobilization of lactase in packages that come into contact with food is an alternative to perform lactose hydrolysis in view of the disadvantages of using free enzymes. This technology, if processed efficiently and affordably, could reduce the cost of lactose-free products, eliminate or decrease product contamination by the enzyme, which would cause low or no allergenicity and increase the accessibility and variety of products available to customers (Brody & Budny, 1995; Goddard et al., 2007; Grosová et al., 2008; Krajewska, 2004; Sheldon & van Pelt, 2013).

Different cross-linking agents have been used to activate the supports on which the enzymes will be immobilized, such as glutaraldehyde (Alagöz et al., 2016; Ji et al., 2017; Klein et al., 2012; Klein et al., 2011; Verma et al., 2012; Vieira et al., 2013) and genipin (Flores et al., 2019; Klein et al., 2016), so that the supports are able to retain the enzymes in their structures. For food purposes, the use of genipin is more viable, considering that it is a safe and naturally occurring crosslinking agent (Garavand et al., 2017), while glutaraldehyde is not exempt from toxicity (Banerjee et al., 2002). In addition, it has been reported that genipin can be about 5,000 to 10,000 times less cytotoxic than glutaraldehyde (Sung et al., 1999), however it has a higher cost.

In order to produce milk with low content and/or without lactose, the objective of this work was to develop biopolymeric films of chitosan with lactase immobilized in chitosan macroparticles, using different concentrations of lactase in their formulations, as well as different cross-linking agents (genipin and glutaraldehyde) and verify the hydrolysis efficiency of UHT milk lactose by these

films, through cryoscopy, at different temperatures (7°C and 25°C) in periods of 48 and 24 hours, respectively. The objective was also to verify its operational stability in five reuse cycles, as well as to observe, through constant pH measurements, if the contact with the films influenced the acidity of the milk.

In addition, to verify the application of these films as milk packaging, this work aimed to characterize these films in relation to solubility in food simulant and antimicrobial activity (agar diffusion test). And finally, in order to have knowledge about the perception and acceptance of consumers in relation to food packaging used with new technologies, a market research was carried out.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Material

The materials used for this research were: Chitosan, with high molecular weight (PM = 71.3kDa) and 85.9% deacetylation degree, acquired from Polymar Ciência e Nutrição S / A; Glutaraldehyde 25% in water, Genipin and Lactic Acid P.A., obtained by Sigma – Aldrich; Lactase (β -galactosidase) derived from *Kluyveromyces lactis* (MAXILACT LGI 5000), with declared activity ≥ 5000 U / g, provided by Globalfood; Nanoparticles of high purity Titanium Dioxide (min.99%), type P-25, acquired from Degussa.

2.2 Experimental Design

Six treatments of chitosan films incorporated with immobilized lactase, TiO₂ nanoparticles and glutaraldehyde or genipin were formulated as a crosslinking agent (Table 1). The experiment was conducted using a completely randomized design.

Table 1. Chitosan films with immobilized lactase

Film	Lactase (mL)	Crosslinking agente	TiO ₂ nanoparticles (%)
GL3	3	Glutaraldehyde	0
GLT3	3	Glutaraldehyde	1
GL5	5	Glutaraldehyde	0
GLT5	5	Glutaraldehyde	1
GENL5	5	Genipin	0
GENLT5	5	Genipin	1

2.3 Development of films

First, it was necessary to carry out the synthesis of some constituents of the films separately and from these constituents the final films were developed.

2.3.1 Preparation of chitosan macroparticles

Chitosan macroparticles were prepared according to Klein et al. (2012) using the precipitation method, with modifications. Chitosan was dissolved (2% mass / volume) in 0.35 M lactic acid and the solution was sonicated (Sonifier Cell Disruptor Branson - Model 450D, Manchester, UK) at 80% amplitude (320 W), for 20 minutes, to remove air bubbles. This solution was added, under slow stirring, dropwise in the coagulation solution (1 M sodium hydroxide and 26% volume / volume ethanol) to obtain the macroparticles. Subsequently, they were washed with distilled water to remove excess reagents.

2.3.2 Activation of chitosan macroparticles and immobilization of lactase

Activation and immobilization of lactase was carried out according to Klein et al. (2016), Klein et al. (2012) and Wang et al. (2011) with modifications.

One hundred chitosan macroparticles were incubated for 4 hours at room temperature, under gentle agitation, in 50 mL of 0.02 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) with glutaraldehyde (2.8% w/v solution) or in 50 mL of 0.02 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) with genipin (0.005% w/v solution). Then, the enzyme lactase was added, using two different concentrations, 3 and 5 ml for macroparticles cross-linked with glutaraldehyde, and only one concentration, 5 ml, for those cross-linked with genipin, concentrations defined in pre-tests not shown here and this solution was kept for 18 hours under slow stirring at room temperature. After immobilization, the macroparticles were washed with the same buffer used.

2.3.3 Preparation of the chitosan film-forming solution

Filmogenic chitosan solution was prepared with changes according to Dias et al. (2014) and Liu et al. (2016). Was dissolved 2.0 g of chitosan in 100 ml of 1% (v / v) lactic acid solution and this mixture was left to stand for 24 hours for hydration of the polysaccharide. This solution was completely homogenized in Ultra Turrax (Kika Labortchnik) for 15 min (500rpm) at room temperature (24° C). The film-forming solution was filtered with the help of organza to remove particles that did not solubilize.

2.3.4 Preparation of the chitosan film-forming solution with titanium dioxide nanoparticles

The filmogenic chitosan solution with titanium dioxide nanoparticles was prepared according to item 2.3.3 followed by the steps of adding the 1% nanoparticles (w/w of the polysaccharide), stirring in Ultra Turrex for 15 minutes

and sonication for 15 min at 80% amplitude (320W) (Dias et al., 2014; Kaewklin et al., 2018).

2.3.5 Synthesis of chitosan films with lactase immobilized on chitosan macroparticles cross-linked with glutaraldehyde or genipin

For each film, one hundred chitosan macroparticles with immobilized lactase (item 2.3.2) were incorporated in 30mL of chitosan filmogenic solution (item 2.3.3), poured into a plate and subjected to drying at room temperature. The dry films were stored under a controlled temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and a relative humidity of 50%.

In this stage, films were made with the different amounts of lactase that were immobilized (3 mL and 5 mL when glutaraldehyde was used, and 5 mL when genipin was used) (item 2.2.2) and each formulation of the films was made in three repetitions. The films with 3 mL of lactase immobilized in chitosan macroparticles cross-linked with glutaraldehyde were called GL3, while those with 5 mL were called GL5. The films with 5 ml of lactase immobilized in chitosan macroparticles cross-linked with genipin were called GENL5.

2.3.6 Synthesis of chitosan films with titanium dioxide and lactase nanoparticles immobilized in chitosan macroparticles cross-linked with glutaraldehyde or genipin

Obtaining chitosan films with titanium dioxide and lactase nanoparticles immobilized in chitosan macroparticles cross-linked with glutaraldehyde or genipin was done in a similar way to obtaining the films in item 2.3.5, differing only in the chitosan filmogenic solution used (item 2.3.4), in which titanium dioxide nanoparticles were incorporated.

The films that were obtained with 3 ml of lactase and glutaraldehyde, were called GLT3 and those with 5 ml were called GLT5. The films obtained here with 5 ml of lactase and genipin were called GENLT5.

2.4 Antimicrobial activity

To check the antimicrobial activity of the films, the agar diffusion method recommended by CSLI (2019) with modifications was performed. All films were used for analysis (Table 1).

The microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, which are possible microorganisms to be present in milk, were reactivated in THY broth (TODD + supplementation + rabbit serum) at 37°C for 24 hours and the standardized inoculum with cell density corresponding to 10⁸ CFU/mL by McFarland Scale.

Surface spreading was performed on Mueller Hinton agar and later discs of films measuring 6 mm in diameter were added. The disks were placed under UV light for 30 minutes on each side before analysis and placed under plates with Mueller Hinton culture medium containing the microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 1602 and 25923 and *Listeria monocytogenes* Scott A and ATCC 12112. The plates were incubated at 37°C, for 24 hours. The negative controls used were chloramphenicol discs (30 mcg) and to assist in the final evaluation, inhibition halos were measured at the end of the tests.

2.5 Evaluation of the activity efficiency of films in lactose hydrolysis at 7°C and 25°C

To evaluate the performance of the films, three film treatments were tested, being them, GL3, GL5 and GENL5, described in Table 1. They were

evaluated at two temperatures (7°C and 25°C) and in five reuse cycles. The temperatures and times chosen were based on the proposed application of this packaging. The temperature of 25°C refers to the condition of storage of milk at room temperature and the temperature of 7°C refers to the condition of storage of milk at refrigerated temperature. The selected films were cut at 20 cm² and incubated in 20 mL of skimmed UHT milk, promoting a ratio of 1 cm² of film/mL of milk. The vials were kept at 7°C for 48 hours and at 25 °C for 24 hours, with cryoscopic analyzes being performed over time. In the first seven hours, for both temperatures, cryoscopic analyzes were performed every hour. After that time, a reading was taken, for both temperatures, when 24 hours were completed, and for the temperature of 7°C, a last reading was made when 48 hours were completed. At the end of each cycle, for 24 or 48 hours, the films were removed from the milk, washed with distilled water and stored at 25 °C ± 1 and 50% relative humidity until their next use. All milks that were in contact with the films were discarded and replaced with new milks with each new cycle. All milks, before being used for the analysis of lactose hydrolysis, were previously analyzed for their lactose content in an automatic ultrasound milk analyzer (Lactoscan Ultrasonic Milkonal Yzer).

Cryoscopy is a traditional method used by dairy products to determine lactose levels in milk in the process of hydrolysis of this carbohydrate. The percentage of hydrolysis can be estimated from the variation in the freezing point of milk, because the lactose hydrolysis has a decreasing effect on this property (Czarnobay et al., 2017). To evaluate the hydrolysis efficiency of the films, a cryoscope was used (MK 540 FLEX, Instruments for laboratories TR Ltda.) And the freezing point of the milk was determined according to the ISO 5764 standard method (ISO-IDF, 2009). The calculation of lactose hydrolysis was performed according to the instructions of the manufacturer of the enzyme used (Globalfood), according to the following equations:

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

Where:

ΔT = freezing point depression;

K = molecular freezing point depression constant;

X = concentration of sugar in milk;

M = molecular weight of sugar.

$$\text{Cryoscopy (100\% delactation)} = (\Delta T_2 - \Delta T_1) + C_i \quad (2)$$

Where:

ΔT_1 = lactose freezing point depression;

ΔT_2 = depression of the freezing point of glucose and galactose;

C_i = initial cryoscopic index of milk.

$$\text{Lactose hydrolysis (\%)} = \frac{C_f - C_i}{\text{cryoscopy (100\% delactation)} - C_i} \times 100 \quad (3)$$

Where:

C_f = final cryoscopic index of milk;

C_i = initial cryoscopic index of milk.

Obs: Correction factors were used to calculate the cryoscopic indices according to the acidity of the sample (Pereira et al., 2001):

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

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

After being calculated, the correction factor was deducted from the cryoscopic index determined by the cryoscope in order to obtain cryoscopic indexes according to the acidity of the sample.

2.6 Evaluation of the operational stability of films in lactose hydrolysis at 7°C and 25°C

The operational stability of GL3, GL5 and GENL5 films was evaluated. The operational stability of the films refers to the ability to retain their initial activity on lactose hydrolysis after the five cycles in which they were reused. The hydrolysis activity of the immobilized enzyme after the first cycle was defined as control and 100% relative activity was attributed to it (Flores et al., 2019).

2.7 Acidity of the milks used during each cycle of the lactose hydrolysis process, in contact with the different films

To assess the acidity of the milks, pH measurements were performed over time, after cryoscopy analyzes on the milks at 7°C and 25°C that contained the incubated GL3, GL5 and GENL5 films, and through the pH measurements it was possible to find acidity using Equation 6 given by Magri (2015):

$$\text{Acidity } ({}^\circ\text{D}) = 114,49 - 15,26 \times \text{pH} \quad (6)$$

Acidity was calculated in order to be used in cryoscopy calculations and to check if there was a variation in its measurements with the time it was in contact with the films.

2.7.1 Influence of films on increasing milk acidity

The variation in milk acidity between 0 and 4 hours was calculated in order to verify a possible increase in this index exerted by the GL3, GL5 and GENL5 films incubated in them. Care was taken to limit the final evaluation time so that the possibility of interference from other factors in acidity was minimized. The increase in acidity was expressed in% lactic acid. For the conversion, $1^{\circ} D = 0.01g$ of lactic acid / 100 mL (Rodrigues et al., 1995).

2.8 Solubility of films in simulated milk solution

The GL3, GL5 and GENL5 films were subjected to solubility analysis in simulated milk solution. The solubility test was carried out gravimetrically, with the difference in mass before and after the contact of the film with the simulant solution (da Cunha, 2011; Rhim et al., 2005).

Initially, test specimens of the films (2 cm x 2 cm) were prepared for each treatment, in 3 repetitions. The films were dried in an oven at 105°C for 24 h and the mass of each specimen was verified. Then, each film was individually packed in a beaker, containing 30 mL of 50% (v / v) ethanol solution as a milk simulant, according to RDC No. 51 (Brazil, 2010), under agitation in a water bath (100 rpm and 25°C) for 24 h. The films were recovered and placed in an oven again at 105°C for 24 h. The mass was recorded after the final drying and the solubility was determined by the difference in mass, between the initial and final values

(before and after contact with the simulant, respectively), on the test taking, according to equation 1.

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{\text{Mass}_{\text{inicial}} - \text{Mass}_{\text{final}}}{\text{Mass}_{\text{inicial}}} \times \quad (7)$$

2.9 Statistical analysis

To assess the results, analysis of variance was performed and the means were compared using the Scott-Knott test, with a 95% confidence level, using SISVAR 5.0.

2.10 Consumer perception assessment of new technologies applied to food packaging

In order to verify the degree of knowledge and interest of Brazilian consumers about active, intelligent and nanotechnological packaging, as well as the resistance to the purchase of products packaged in these types of packaging, a market survey was carried out through the application of an online questionnaire (Appendix) with 196 consumers, through the online survey development company, SurveyMonkey.

3. RESULTS

3.1 Antimicrobial activity

The diameters of the zones of inhibition against the microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Listeria Monocytogenes* of each film are shown in Table 2.

Table 2. Antimicrobial activity of the films against *S. aureus* and *L. monocytogenes* (diameter of the inhibition zone given in cm)

Film	<i>S. aureus</i> ATCC 1602	<i>S. aureus</i> 25923	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	<i>L.monocytogenes</i> ATCC 12112
GL3	0,8	0,9	1,1	1,0
GLT3	0,9	1,0	1,0	1,1
GL5	0,9	1,0	1,0	0,9
GLT5	0,9	0,9	1,1	1,3
GENL5	0,9	1,0	1,0	1,1
GENLT5	0,9	1,0	1,0	1,1

It is possible to verify that all films showed inhibitory effects against *S. aureus* and *L. monocytogenes*. However, practically no differences were noticed between the sizes of the halos formed by the films with and without the presence of TiO₂ nanoparticles (1% w / w), leading to the conclusion that the observed antimicrobial activity is due to the presence of chitosan, which presents intrinsic antimicrobial properties (Cazón et al., 2017; de Moraes Crizel et al., 2018; Vilela et al., 2017). The presence of glutaraldehyde and genipin as crosslinking agents may also have contributed to the antimicrobial activity of the films. As a dialdehyde, glutaraldehyde has potent germicidal activity due to its interaction with amino groups in proteins and enzymes (Valizadeh et al., 2019). Khan et al. (2014) reported that chitosan films with cellulose nanocrystals crosslinked with

genipin showed better antimicrobial activity against *Listeria Monocytogenes* when compared to the same films without the crosslinking agent.

Unlike what was found in this work, Siripatrawan & Kaewklin (2018) found a significant increase in the inhibition of microbial growth when chitosan film with TiO₂ nanoparticles was used compared to pure chitosan film. Although both films showed antimicrobial activity against all tested microorganisms (*S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *Aspergillus* and *Penicillium*), the authors justified the fact that the film with TiO₂ probably had greater antimicrobial activity. due to the combination of the effects of TiO₂, chitosan and UV light. Karthikeyan et al. (2017) also found greater antimicrobial activity for chitosan films with TiO₂ nanoparticles than for films without the presence of this nanomaterial. Lin et al. (2015) found that chitosan nanocomposites with silver and TiO₂ demonstrated better antimicrobial activity than silver nitrate or silver nanoparticles in similar concentrations.

As the addition of titanium dioxide nanoparticles to the films formulated in this work did not result in films whose antimicrobial effect was greater than that presented by the films formulated without these nanoparticles, the GLT3, GLT5 and GENLT5 films were not used in the analyzes and consequently in the results later.

3.2 Lactose hydrolysis

Table 3 presents the results of lactose hydrolysis present in UHT skimmed milk through GENL5, GL5 and GL3 films at the two temperatures used (7°C and 25°C), in the five cycles.

Table 3. Hydrolysis of lactose by different films at 25 ° C and 7 ° C

CYCLES	25 ° C			7 ° C		
	GENL5	GL5	GL3	GENL5	GL5	GL3
	Hydrolysis of lactose (%)	Hydrolysis of lactose (%)	Hydrolysis of lactose (%)	Hydrolysis of lactose (%)	Hydrolysis of lactose (%)	Hydrolysis of lactose (%)
1	100±0,23 ^{aA}	100±0,13 ^{aA}	100±0,21 ^{aB}	100±0,20 ^{aA}	100±0,22 ^{aB}	100±0,13 ^{aC}
2	100±0,13 ^{aA}	100±0,10 ^{aA}	100±0,16 ^{aB}	100±0,21 ^{aA}	100±1,19 ^{aB}	100±0,08 ^{aC}
3	100±0,04 ^{aA}	100±0,02 ^{aA}	100±0,13 ^{aB}	100±0,10 ^{bA}	100±0,92 ^{bB}	100±0,12 ^{bC}
4	100±0,12 ^{bA}	100±0,12 ^{bA}	100±0,20 ^{bB}	100±0,17 ^{dA}	98,65±1,87 ^{dB}	77,85±0,16 ^{bB}
5	100±0,21 ^{dA}	100±0,17 ^{dA}	60,55±2,4 ^{aA}	100±0,12 ^{eA}	76,83±2,48 ^{dA}	68,34±2,05 ^{cA}

Different capital letters between columns and different lowercase letters between lines represent values with significant difference a ($p \geq 0.05$) using the Scott-Knott test.

Observing the results it is possible to verify that it was possible to obtain films with immobilized lactase in the chitosan macroparticles that were incorporated to them, since all of them were able to hydrolyze 100% the lactose present in milk in at least two cycles, indicating that there was complete action of the enzyme when the film was reused. In addition, it is possible to see that the enzyme continued to act in all cycles analyzed, even though it was not always able to hydrolyze 100% lactose. Wolf et al. (2019) immobilized lactase in a chitosan-based hydrogel in order to apply this system in the production of milk with low lactose content and also verified that the biocatalyst could act in different cycles. Like Vieira et al. (2013) who immobilized lactase in chitosan-based matrices with alginate, chitosan with k-carrageenan and agarose spheres to catalyze the hydrolysis of milk lactose in different cycles.

Comparing all the films, it is possible to observe a difference in the amount of lactose that each of them was able to hydrolyze, in different cycles and at different temperatures. Such facts may have been caused by the difference in the compositions of the films in relation to the amount of lactase, the type of crosslinking agent used, as well as the temperature to which they were subjected. The influences of these factors on lactose hydrolysis were better analyzed separately, according to the items below.

3.2.1 Influence of the temperatures to which the films were submitted in the lactose hydrolysis

The figure 1 shows the results of lactose hydrolysis by the same films at two different temperatures, 7 °C and 25 °C. It is possible to perceive an influence of temperature on the rate of lactose hydrolysis, as well as on the amount of lactose hydrolyzed in the corresponding cycles at both temperatures, when this hydrolysis is not 100%.

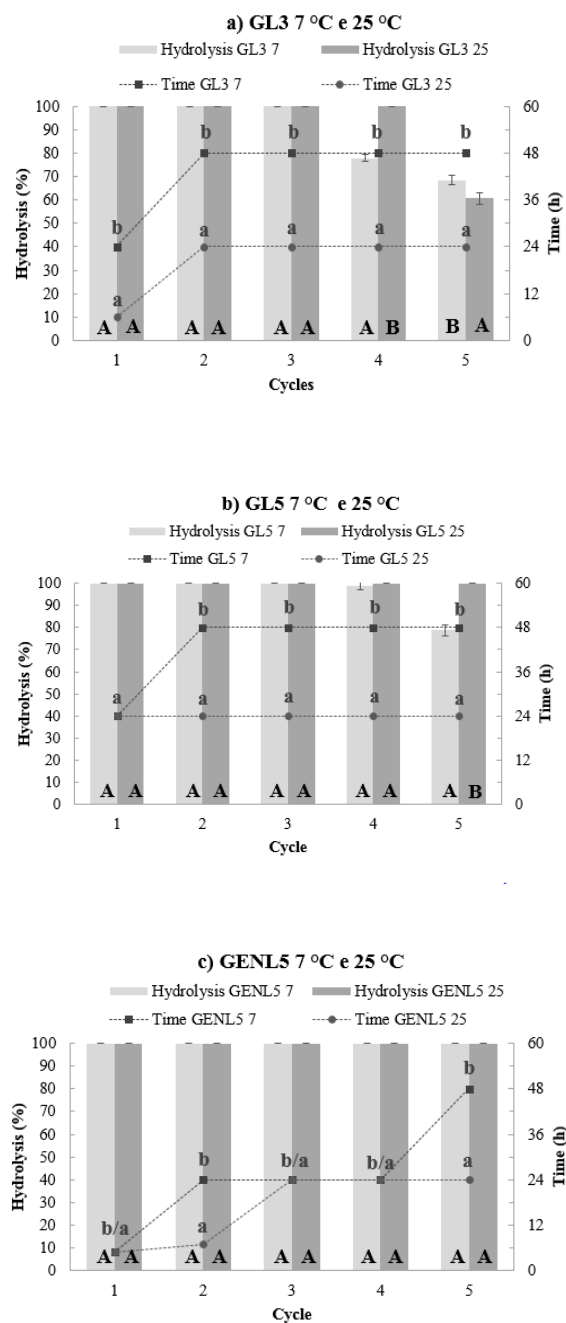
With the exception of the GENL5 film that hydrolyzed 100% lactose in all five cycles (Figure 1 - c) at both temperatures, the other films always hydrolyzed 100% lactose in a greater number of cycles when they acted at a temperature of 25°C compared at a temperature of 7°C (Figure 1 - a, b). It is possible to verify that, mainly, the time to perform the lactose hydrolysis is shorter at the highest temperature used, which was 25°C, when compared to the lowest temperature, 7°C. In addition, when there was no 100% lactose hydrolysis, in most cases, the amount of lactose hydrolyzed in the corresponding cycles between the two temperatures, was greater when the film acted at 25°C.

Such facts can be justified by the fact that lactase performs better at higher temperatures. The optimal temperature for each lactase to act depends on its microbiological origin. Lactase derived from *Kluyveromyces lactis*, which was used in this work, presents an optimum temperature between 35 - 40°C (Cavaille & Combes, 1995).

Klein et al. (2013) immobilized *Kluyveromyces lactis* lactase in chitosan macroparticles and investigated changes in their activities in a temperature range of 10 to 70°C, obtaining greater activity for this enzyme immobilized at 45°C. Compared to the free enzyme, the authors observed that the immobilized enzyme showed higher activities over a wider temperature range, attributing the result to the immobilization effect, in which the chitosan macroparticles offer protection to the enzyme and it is able to resist a greater temperature variation. It is important to highlight that these authors carried out a study with a direct focus on chitosan macroparticles with immobilized lactase, they did not incorporate these macroparticles in any other material or matrix, and, therefore, also did not develop films with their presence. Vieira et al. (2013) immobilized lactase from *Kluyveromyces fragilis* in chitosan spheres coagulated with KOH and found that its maximum activity occurred at 45°C. Verma et al. (2012) immobilized *Kluyveromyces lactis* lactase on silicon dioxide nanoparticles and evaluated the

effect of temperature, in a range of 20 to 55°C, on the activity of the immobilized enzyme. The optimum activity temperature of the immobilized enzyme found by the authors was 35°C. Such researches involved in ascertaining the optimal temperature of lactase activity prove that they actually perform better at higher temperatures.

Figure 1. Influence of temperatures 7 °C and 25 °C on the hydrolysis of lactose by films



3.2.2 Influence of lactase concentration of films on lactose hydrolysis

The figure 2 shows how much the films that differ in the amounts of lactase (3 mL and 5 mL) are capable of hydrolyzing lactose, and the films compared to each other have the same crosslinking agent and act at the same temperature. As the concentration of lactase in films with genipin did not vary, they were not compared to other films at that time.

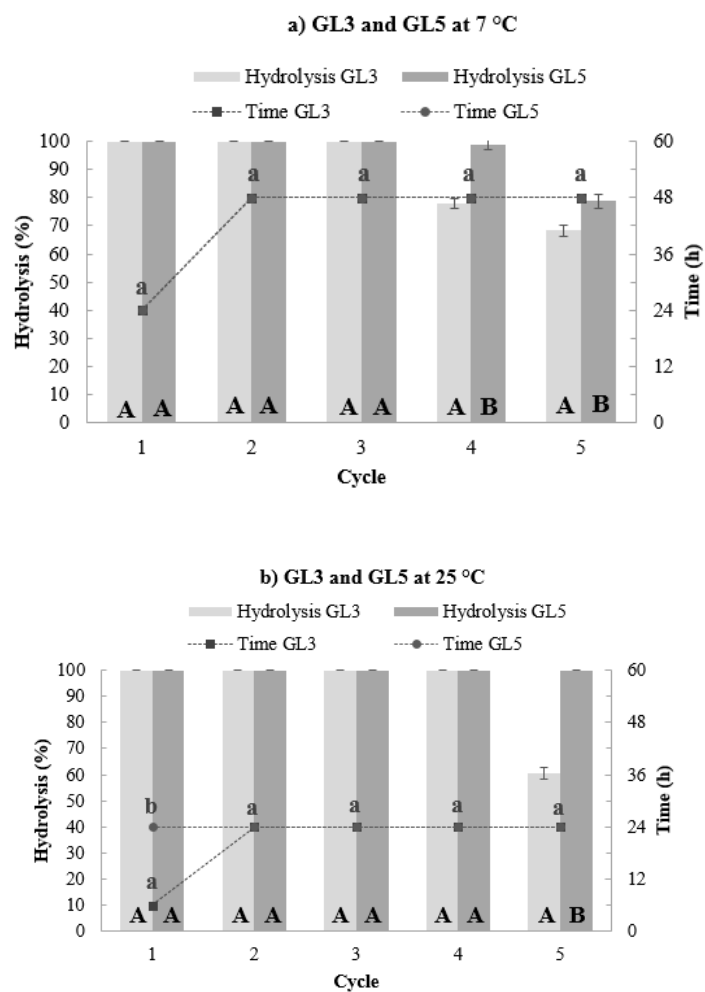
The films with 5 ml of lactase hydrolyzed 100% lactose in a greater number of cycles when compared to films with 3 ml of lactase, and when there was no 100% hydrolysis, films with 5 ml also hydrolyzed a greater amount of lactose than films with 3 mL when compared to each other. In two situations, films with 3 ml of lactase hydrolyzed lactose in less time than those with 5 ml of the enzyme, in a situation film with 5 ml hydrolyzed in less time than with 3 ml of lactase and in all other situations (85%), the hydrolysis times, whether they were complete (100% deactivated milk), or not, were the same. In general, films with 5 ml of lactase were able to hydrolyze a greater amount of lactose when compared to films with 3 ml of the enzyme. Thus, it is found that a higher concentration of lactase results in greater amounts of hydrolyzed lactose during more cycles of reuse of the enzyme.

In the literature, in most of the research found on lactase immobilization, the concentration of the enzyme to be immobilized is already pre-defined and is not varied. The authors use this pre-established concentration, possibly by pretesting, and after that, studies are carried out verifying the effects of other factors on the immobilization of the enzyme, but not the effect of its concentration on the lactose hydrolysis process. In one of the few studies found, Klein et al. (2012) applied different concentrations of lactase, from 0 to 15,000 U of lactase / g of dry support (chitosan particles), in order to verify how much of this lactase could be immobilized. The authors observed that the maximum activity achieved

by the support with the immobilized enzyme was 210 U / g of dry support, when the applied activity was approximately 9,000 U / g of dry support. These authors verified, therefore, what was the maximum concentration of immobilized enzyme obtained according to the amount of enzyme that was applied for this purpose. However, these authors also did not study the effect of different concentrations of immobilized lactase on lactose hydrolysis.

Puri et al. (2010) immobilized lactase derived from *Kluyveromyces marxianus* in gelatin and investigated the influence of the enzyme concentration on lactose hydrolysis. The authors concluded that the amount of hydrolyzed lactose increased concomitantly with the increase in the concentration of the enzyme. However, when hydrolysis reached 95%, they found that using a higher concentration of enzyme did not change this result.

Figure 2. Influence of different concentrations of lactase (3 and 5 mL) on the hydrolysis of lactose by the films



3.2.3 Influence of the crosslinking agent used in the films, in the lactose hydrolysis

The figure 3 shows a comparison between the films used at the same temperature, with the same concentrations of lactase (5 mL), but composed of the different crosslinking agents used in this work, glutaraldehyde and genipin. Films with 3 mL of lactase were not presented, because with this concentration, films with genipin were not obtained, only with glutaraldehyde.

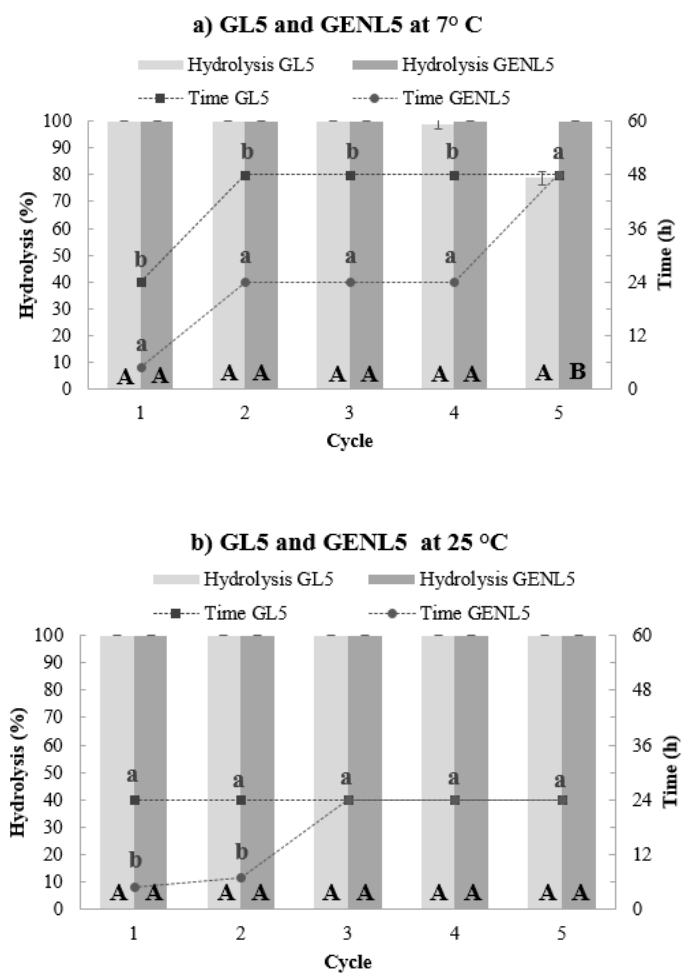
Films with genipin showed better results in relation to the amount of lactose hydrolyzed in the different cycles, as they were able to hydrolyze 100% lactose at all times when they were reused, which did not happen with films with glutaraldehyde. In addition, whenever there was less time in the hydrolysis process between the films, it was the ones with genipin that performed this activity more quickly. Similar results were found by Fujikawa et al. (1988), Klein et al. (2016) and Wang et al. (2011), who compared the immobilization of enzymes using genipin and glutaraldehyde as crosslinking agents and observed greater immobilization efficiency with the use of genipin.

Vieira et al. (2013) immobilized lactase from *Kluyveromyces fragilis* in chitosan spheres coagulated with KOH and cross-linked with glutaraldehyde and verified a lactose hydrolysis around 95% after four hours of reaction at 25°C and 400 rpm. Verma et al. (2012) immobilized lactase derived from *Kluyveromyces lactis* in silicon dioxide nanoparticles cross-linked with glutaraldehyde and found that after eight hours the lactose was 100% hydrolyzed at a temperature of 40°C. In this work, an intermediate result to those mentioned was found with the GL3 film at 25°C, which hydrolyzed 100% lactose in 6 hours.

Flores et al. (2019) immobilized *Aspergillus Oryzae* lactase in chitosan beads cross-linked with genipin and analyzed lactose hydrolysis within the established time of four hours of reaction, at 40°C. A hydrolysis of 67.6% of lactose was verified in the first cycle. Lactase derived from *Aspergillus Oryzae*

was immobilized on chitosan particles cross-linked with genipin by Klein et al. (2016). The authors observed a hydrolysis of 70% of lactose in 6 hours in the first cycle, at a temperature of 40°C, a longer time than that verified in the present study, which was 5 hours, for complete hydrolysis of lactose at a temperature of 25°C, by genipine film, GENL5.

Figure 3. Influence of the crosslinking agent on the hydrolysis of lactose by the films



3.3 Hydrolysis of milk lactose across all films

After analyzing the influence of different factors on the lactose hydrolysis of milk, in this item there is a general perception of the efficiency of all the films developed in the lactose hydrolysis of skimmed milk UHT, at 25°C and 7°C.

3.3.1 Lactose hydrolysis by films at 25°C

As can be seen in Table 4, all films performed 100% hydrolysis until the third cycle and films GL5 and GENL5 performed complete lactose hydrolysis in the five cycles analyzed. Among these films, the GENL5 film hydrolyzed lactose in less time in the first and second cycles compared to GL5. Thus, the GENL5 film stood out for hydrolyzing 100% lactose in five cycles and more quickly in the first and second cycles.

Standing out for hydrolyzing lactose more quickly in two cycles is not a decision factor to consider this film as being the one with the best performance, considering that these films were developed to be reused in different lactose hydrolysis cycles, and not in two only. Therefore, it can be considered that the GL5 and GENL5 films were the ones that showed the best efficiency.

Table 4. Lactose hydrolysis by different films at 25°C and the respective activity times

CICLES	GENL5		GL5		GL3	
	Hydrolysis of lactose (%)	Time (h)	Hydrolysis of lactose (%)	Time (h)	Hydrolysis of lactose (%)	Time (h)
1	100±0,23 ^{aA}	5	100±0,13 ^{aA}	24	100±0,21 ^{aB}	6
2	100±0,13 ^{aA}	7	100±0,10 ^{aA}	24	100±0,16 ^{aB}	24
3	100±0,04 ^{aA}	24	100±0,02 ^{aA}	24	100±0,13 ^{aB}	24
4	100±0,12 ^{bA}	24	100±0,12 ^{bA}	24	100±0,20 ^{bB}	24
5	100±0,21 ^{dA}	24	100±0,17 ^{dA}	24	60,55±2,4 ^{aA}	24

Different uppercase letters between columns and different lowercase letters between lines represent values with significant difference a ($p \geq 0.05$) using the Scott-Knott test.

3.3.2 Hydrolysis of lactose by films at 7°C

At 7°C all films completely hydrolyzed lactose in milk until the second cycle and the GENL5 film was able to 100% hydrolyze lactose in all five cycles in which it was used as can be seen in Table 5. Therefore, it considers the GENL5 film was the one that showed the best performance in the lactose hydrolysis process of milk at 7°C.

In contrast, the GL3 film was the one with the lowest efficiency among all films when performing the comparison until the fifth cycle, in which it was able to hydrolyze 68.34% of the lactose.

Table 5. Lactose hydrolysis by different films at 7°C and the respective activity times

CICLES	GENL5		GL5		GL3	
	Hydrolysis of lactose (%)	Time (h)	Hydrolysis of lactose (%)	Time (h)	Hydrolysis of lactose (%)	Time (h)
1	100±0,20 ^{aA}	5	100±0,22 ^{aB}	24	100±0,13 ^{aC}	24
2	100±0,21 ^{aA}	24	100±1,19 ^{aB}	48	100±0,08 ^{aC}	48
3	100±0,10 ^{bA}	24	100±0,92 ^{bB}	48	100±0,12 ^{bC}	48
4	100±0,17 ^{dA}	24	98,65±1,87 ^{dB}	48	77,85±0,16 ^{dB}	48
5	100±0,12 ^{eA}	48	76,83±2,48 ^{dA}	48	68,34±2,05 ^{cA}	48

Different uppercase letters between columns and different lowercase letters between lines represent values with significant difference a ($p \geq 0.05$) using the Scott-Knott test.

3.4 Operational stability of films in lactose hydrolysis

The figure 4 shows the operational stability of each film, in each cycle, at both temperatures. After the first cycle, all films reached 100% hydrolysis at temperatures of 7°C and 25°C and this value was considered to be 100% of initial relative activity to serve as a reference for checking the relative activity in the other cycles.

The five cycles of lactose hydrolysis by GENL5 film, at two temperatures (Figure 4 - c) and by GL5 film at 25°C (Figure 4 -) were performed with maximum activity, in which the films retained 100% of their activity until the last cycle. Vieira et al. (2013) produced chitosan spheres with immobilized lactase derived from *Kluyveromyces fragilis* and glutaraldehyde as a crosslinking agent and found that there was also no loss of initial activity after four successive cycles at 25°C. Thus, they stated that this biocatalyst has the potential to be used in the preparation of lactose-free products.

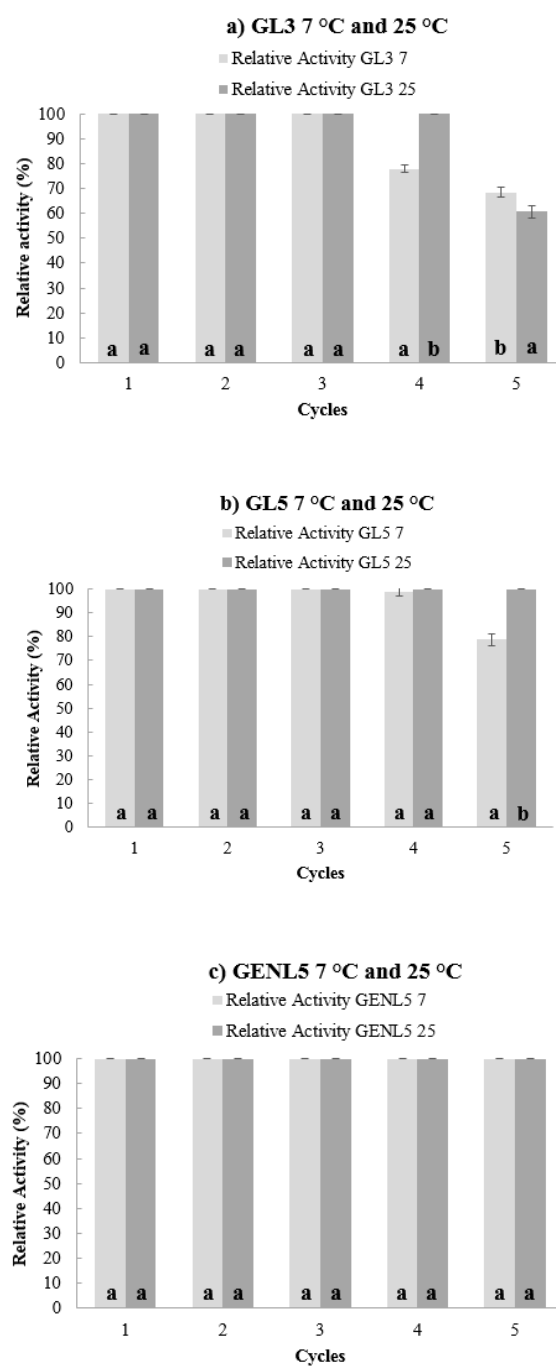
Excellent results of operational stability were found by some authors when genipin was used as a crosslinking agent, as was the case in this work. In research by Flores et al. (2019), the biocatalyst developed by them (*Aspergillus Oryzae* lactase immobilized in chitosan spheres cross-linked with genipin) was used for 40 cycles at 40°C without losing its initial activity, demonstrating the feasibility of reusing it. The authors attributed this result to the rigidity of the enzyme binding to the support, preventing deformation of the catalytic site and thus maintaining the same activity during all cycles (Kishore & Kayastha, 2012). Klein et al. (2016) studied the immobilization of lactase derived from *Aspergillus Oryzae* in chitosan particles reticulated with genipin and found that the biocatalyst acted for twenty-five cycles of hydrolysis at 40°C with maximum activity. From these results the authors concluded that the biocatalyst demonstrated satisfactory operational stability in lactose hydrolysis.

The films GL3 and GL5 at 7°C, managed to retain, respectively, 68.34% and 76.83% of their initial relative activity in the last cycle (Figure 4 - a, c), showing good operational stability. A similar result was found by Wolf et al. (2019), who immobilized *Kluyveromyces lactis* lactase in a chitosan-based hydrogel crosslinked with N, N'-Methylenebisacrylamide and observed that the biocatalyst was efficiently applied after ten cycles of lactose hydrolysis contained in UHT milk, retaining 73.33% of its initial activity at 37°C. The authors stated that lactase immobilized in hydrogel can be applied to the production of milk with low lactose content for at least ten successive hydrolysis cycles. Ansari & Husain (2012) also found operational stability similar to the aforementioned stabilities immobilizing lactase from *Aspergillus Oryzae* in concanavalin A-celite 545 with glutaraldehyde, noting that the biocatalyst retained 71% of its initial activity after seven cycles of lactose hydrolysis from milk to 50°C.

The film with the least operational stability was GL3 at 25°C, which retained 60.55% of its initial activity in the last cycle (Figure 4 - a). A lower result compared to the research cited above was found in a study by Verma et al. (2012), in which lactase derived from *Kluyveromyces lactis* was immobilized on silicon dioxide nanoparticles cross-linked with glutaraldehyde. It was found that the immobilized enzyme remained stable until the eleventh cycle at 40°C and that it retained approximately half of its initial activity.

The ability to reuse is an advantage of immobilized enzymes compared to free enzymes, and is highly desirable in order to cause a decrease in the operational cost of the process (Sheldon & van Pelt, 2013).

Figure 4. Operational stability of films in five reuse cycles



3.5 Influence of films on milk acidity

As in this work the developed films came into direct contact with the milks, being incubated in them, it is important to check if there may have been a possible change in the acidity caused by the films themselves. According to Ordinance 146/1996 (MAPA, 1996) the acidity of skimmed, semi-skimmed and partially skimmed and whole UHT milks should be in the range of 0.14 to 0.18 g of lactic acid / 100 mL.

The data obtained showed a considerable increase in the acidity of all milks in the first cycle at 7°C, in the evaluated time (0 to 4 hours), compared to all other cycles (Figure 5 - a), which suggests that the components Film acids, like the lactic acid used in its formulations, may have migrated assiduously in this first cycle of films to milk, thus increasing its acidity. This increase compromised the quality of the milks that were in contact with the GL3 and GL5 films, as they started to present acidity above the allowed. The milks in contact with the GENL5 film reached the maximum allowed acidity. In the following cycles, the increase in the acidity of the evaluated milks was small, which did not compromise the quality of the milks.

As can be seen in Figure 5 (b), at a temperature of 25°C, the greatest increases in milk acidity did not always occur in the first cycle. In the GL5 film, the biggest increase occurred in the fourth cycle. In addition, in many cycles there has been a significant increase in the acidity of the milks, compromising their quality. With the increase in acidity, some milks started to present acidity above the permitted level, being that they were in contact with the films: GL3 in the first and fourth cycles; GL5 in the first, fourth and fifth cycles; GENL5 in the first cycle.

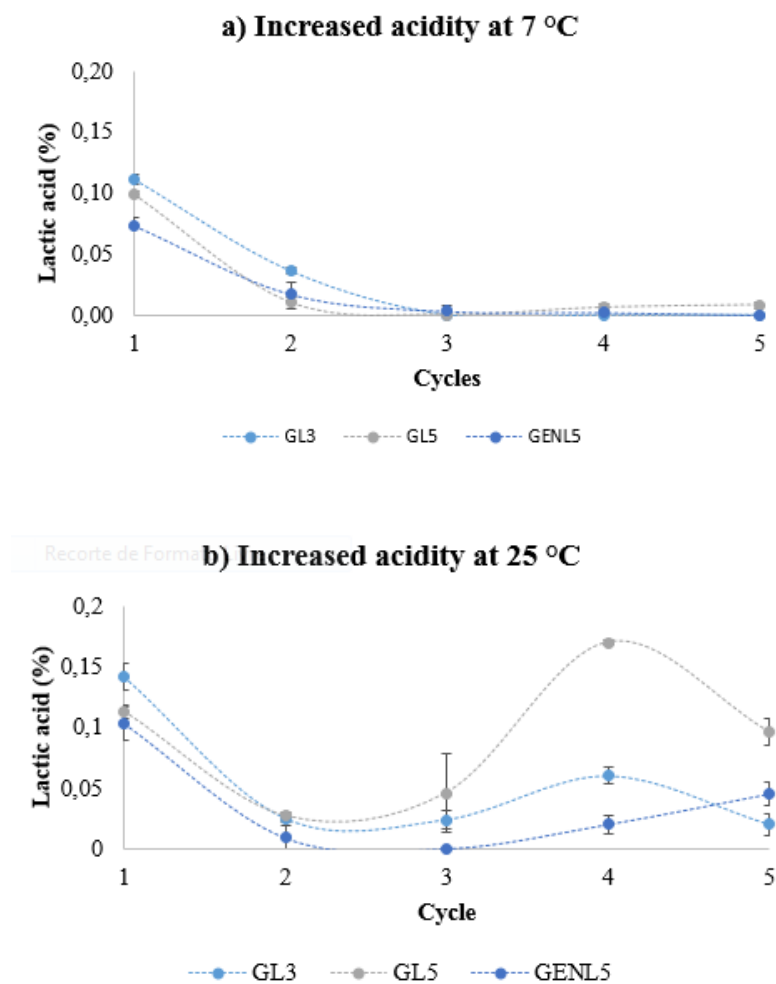
Observing these results it is possible to verify that although the time of four hours was selected for analysis in order to be able to verify mostly the

influence of the films on the acidity of the milk, minimizing the interference of other factors if the analysis happened at the end of each cycle (after 24 or 48 hours), at this temperature of 25°C, in addition to the influence of the film itself on the acidity of the milks, possibly there was also microbial growth, which ends up influencing the acidity. The increase in acidity in contaminated milk can be attributed to the use of carbohydrates by bacteria. In addition to the release of amino acids in the medium, the consumption of lactose leads to the production of lactic and formic acids, in addition to a small amount of Co₂, which induce a significant increase in the acidity of contaminated milk (Raho Ghalem & Zouaoui, 2013).

In view of what was verified, the increase in acidity that occurred in milks at 7°C was probably influenced by the films themselves, as at this temperature there is inhibition of the growth of mesophilic microorganisms and although there is the possibility of multiplication of psychrotrophic bacteria, this process occurs very slowly. Unlike milks at a temperature of 25°C, which probably had an increase in acidity not only due to the films, but also to the contamination of milk by microorganisms that multiply quickly when the milk is not stored under refrigeration (Brito & Dias, 1998).

For the application of the film in packaging that will be used at 25°C, it should be considered that it will act at this temperature only when it is hermetically sealed, as it happens with conventional UHT milk packaging. Therefore, the milk will not suffer microbiological contamination, and therefore its acidity will only be influenced by the film itself.

Figure 5. Increased acidity of milks in contact with different films



3.6 Solubility of films in simulated milk solution

Solubility is an important property of films that affects their future applications (Liu et al., 2020). The solubility of films in an aqueous medium can provide information about the behavior of a film in this environment, including its degradability or resistance under these conditions (Nunes et al., 2013). In this

work, the films were developed in order to constitute food packaging to be used in obtaining milk with low lactose content and / or free of this sugar. Therefore, knowing its solubility in this food is of great importance.

There was no significant difference ($p \geq 0.05$) in the solubility of GL3, GL5 and GENL5 films in milk simulant. They showed, on average, 23.77% solubility.

The incorporation of different materials in films based on chitosan can influence its solubility. Lin & Pascall (2014) incorporated vitamin E into a chitosan film and found that higher concentrations of the vitamin were responsible for increasing the solubility of the films in water. A similar result was observed by Yang et al. (2019), who incorporated syringic acid in a chitosan film and observed greater solubility of films with higher concentrations of acid. In this study, the use of different concentrations of lactase did not interfere with the solubility of the films.

High degradability in aqueous middle is one of the main problems of films based on chitosan (Mourya & Inamdar, 2008). Crosslinking agents can be used to control the solubility of these types of films (Rinaudo, 2006). The incorporation of glutaraldehyde in chitosan and carboxymethylcellulose films led to a 16% reduction in the water solubility of the film compared to the film without this crosslinking agent, as verified by Valizadeh et al. (2019). In research by Nunes et al. (2013), the authors found a decrease in solubility in an aqueous acidic medium, which was used as a wine simulant, of the films reticulated with genipin when compared to films without this agent. Nunes et al., (2016) developed chitosan films with genipin, using glycerol as a plasticizer and analyzed its solubility in an aqueous acidic medium. The authors quantified glycerol and genipin in the solution where the films were immersed for the solubility analysis and found that the solubility of the films was due only to the diffusion of glycerol, as no genipin was found in the solution. Given the statements, it can be said that the use of

crosslinking agents in the formulation of the films developed in this work favored the achievement of films with low solubility in aqueous media. The solubility of the films showed no difference for the different crosslinking agents used, genipin and glutaraldehyde.

3.7 Assessment of consumer perception of new technologies applied to food packaging

In the market research carried out in this work, the majority of the people interviewed (73.5%) were female. Regarding the age group, 2.5% of respondents were 0-18 years old, 52.6% were 18-30 years old, 24.5% comprised the 30-50 year old group and 20.4% were over 50 years. The majority (77%) of consumers had completed higher education, and of these, 26% also had completed graduate education.

When asked if they knew what active packaging and smart packaging are, 77% said they did not know what it was about. Given the above, it is possible to verify that the lack of knowledge in relation to these new technologies is not associated with a low level of education. However, even though they were not aware of these concepts, 78% said they would buy a food contained in these types of packaging or in packaging with nanotechnology application. The consumers interviewed showed themselves open to innovations, and those who did not know what these types of packaging were about, said they believed that new technologies used in food packaging would probably bring benefits to it, and consequently to the consumer, providing a better quality of food product. Many people emphasized that they would buy this type of packaging due to the fact that there is a better conservation of the food, aiming at its quality. This result shows the great market potential of new packaging technologies. However, some

consumers stressed that they would buy such types of packaging, but that they would not pay much more for it.

The attitudes of consumers and sellers towards technological innovations involving food are very important, as they directly influence the success and permanence of the product in the market. According to Frewer et al. (2011) people's opinions regarding new technologies can be very varied, and their attitudes may differ depending on the characteristics of the technology and the level of technological neophobia. According to Murray & Delahunty (2000), the success of an innovation also depends on the product to which the technology will be applied. A food such as cheese, for example, is considered suitable for the application of new technologies in its packaging, due to the fact that it is widely consumed and this consumption is growing worldwide (Sheehan, 2013). In addition, it is a food of a perishable nature, especially when opened for consumption, which undergoes a deterioration process (O' Callaghan & Kerry, 2016).

The portion (16%) of respondents resistant to the purchase of such products made it clear in their responses that, due to the fact that they do not have knowledge about them and because they do not know what their benefits or harms would be, they would not be able to buy them. In addition, there was a portion of consumers (6%) who did not answer whether or not they would buy such types of packaging, emphasizing that because they do not know what they are, it would not be possible to answer this type of question. According to Jinkarn & Suwannaporn (2015), despite the existence of new structures and functions of innovative packaging, consumers sometimes do not understand exactly the real benefits or objectives of these functionalities, which can hinder the acceptance of new technologies.

In view of this research, it is clear that an improvement in the provision of information (through marketing, for example) about these new technologies

would be essential to assist the consumer in the purchase decision. In Europe there is already a trend observed in its legislation (Article 15, EC1932 / 2004) regarding the requirement for information on the label for food packaging companies and for consumers indicating whether the materials are active and / or intelligent. This information should be about using the active and intelligent systems in a safe and appropriate manner. It is also important to note that there is a large portion of consumers willing to pay for innovative products, which leads us to believe, therefore, that it is not only the lack of information about these technologies that is responsible for people not buying these packages, but also the lack of them to be available in the market.

4. CONCLUSION

All developed films showed antimicrobial activity against the studied microorganisms, and the presence of TiO₂ nanoparticles did not influence an increase in this activity.

The films analyzed in lactose hydrolysis (GL3, GL5 and GENL5) were able to act in different cycles at 7°C and 25°C and it was observed that at the highest temperature analyzed the hydrolysis happened more quickly. Films with a higher concentration of lactase (5 ml) and with genipin hydrolyzed higher amounts of lactose during more cycles when compared to films with 3 ml of the enzyme and glutaraldehyde, respectively. The films had a possible influence in increasing the acidity of the milks that were in contact with them.

The films that showed the best lactose hydrolysis performance and the best operational stability at a temperature of 25°C, were GL5 and GENL5, and at a temperature of 7°C was the GENL5 film. To work in the food industry, films with genipin, which is a safe and naturally occurring crosslinking agent, stand out. Therefore, the GENL5 film is the one with the greatest potential to be used as food

packaging for the hydrolysis of lactose in obtaining milk without lactose or with a low content of this sugar, and it is noteworthy that at 25°C this packaging should be hermetically sealed until consumption.

The crosslinking agents used in the formulation of the films, genipin and glutaraldehyde, were important for obtaining chitosan films with low solubility in aqueous medium. In view of the results it is possible to conclude that the developed films are presented as a good alternative to be applied as milk packaging.

Through research conducted with consumers, it was possible to see that food packaging with new technologies has great market potential. Although most of the interviewees do not understand what active, intelligent or nanotechnology packaging is, they have shown themselves open to innovations and to the purchase of products contained in these types of packaging.

5. Acknowledgment

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG), the Federal University of Lavras (UFLA) for financial support.

6. References

- Adilah, A. N., Jamilah, B., Noranizan, M. A., & Hanani, Z. A. N. (2018). Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.01.006>

- Alagöz, D., Tükel, S. S., & Yildirim, D. (2016). Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *87*, 426–432. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.007>
- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2012). Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. *Food and Bioproducts Processing*, *90*(2), 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.07.003>
- Banerjee, T., Mitra, S., Kumar Singh, A., Kumar Sharma, R., & Maitra, A. (2002). Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, *243*(1–2), 93–105. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00267-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00267-3)
- Benito-Peña, E., González-Vallejo, V., Rico-Yuste, A., Barbosa-Pereira, L., Cruz, J. M., Bilbao, A., Alvarez-Lorenzo, C., & Moreno-Bondi, M. C. (2016). Molecularly imprinted hydrogels as functional active packaging materials. *Food Chemistry*, *190*, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.128>
- Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Mohan, C. O., & Srinivasa Gopal, T. K. (2015). Smart packaging systems for food applications: a review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 52, Issue 10, pp. 6125–6135). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1766-7>

- Brazil. (2010). National Health Surveillance Agency. Resolution RDC n° 51, of November 26, 2010. In: Technical Regulation that establishes the migration criteria for materials, packaging and plastic equipment intended to come into contact with food.
- Brito, J. R. F., & Dias, J. C. (1998). The milk quality. In *Uncomplicating somatic cells* (pp. 75–82).
- Brody, A. L., & Budny, J. A. (1995). Enzymes as active packaging agents. In *Active Food Packaging* (pp. 174–192).
- Cavaille, D., & Combes, D. (1995). Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 22(1), 55–64.
- Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2017). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
- 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.
- da Cunha, Â. M. M. V. (2011). *Development of chitosan films with antioxidant activity*. University of Aveiro.

de Moraes Crizel, T., de Oliveira Rios, A., D. Alves, V., Bandarra, N., Moldão-Martins, M., & Hickmann Flôres, S. (2018). Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. *Food Hydrocolloids*, *74*, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.007>

Dias, M. V., Machado Azevedo, V., Borges, S. V., Soares, N. D. F. F., De Barros Fernandes, R. V., Marques, J. J., & Medeiros, É. A. A. (2014). Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. *Food Chemistry*, *165*, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.120>

Flores, E. E. E., Cardoso, F. D., Siqueira, L. B., Ricardi, N. C., Costa, T. H., Rodrigues, R. C., Klein, M. P., & Hertz, P. F. (2019). Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. *Process Biochemistry*, *84*, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.001>

Frewer, L. J., Bergmann, K., Brennan, M., Lion, R., Meertens, R., Rowe, G., Siegrist, M., & Vereijken, C. (2011). Consumer response to novel agri-food technologies: Implications for predicting consumer acceptance of emerging food technologies. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 22, Issue 8, pp. 442–456). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.05.005>

Fujikawa, S., Yokota, T., & Koga, K. (1988). Immobilization of β -glucosidase in calcium alginate gel using genipin as a new type of cross-linking reagent of natural origin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *28*(4–5), 440–441. <https://doi.org/10.1007/BF00268210>

- Garavand, F., Rouhi, M., Razavi, S. H., Cacciotti, I., & Mohammadi, R. (2017). Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 104, pp. 687–707). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093>
- Geka, V., & Lopez-leiva, M. (1985). Hydrolysis of lactose: A literature review. *Process Biochemistry*, 20, 2–12.
- Goddard, J. M., Talbert, J. N., & Hotchkiss, J. H. (2007). Covalent attachment of lactase to low-density polyethylene films. *Journal of Food Science*, 72(1), E036–E041. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00203.x>
- Grosová, Z., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2008). Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(1), 1–14. <https://doi.org/10.17221/1134-cjfs>
- Harish Prashanth, K. V., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 117–131). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
- ISO-IDF. 2009. ISO 5764: Milk—Determination of freezing point— Thermistor cryoscope method reference method. IDF bulletin no. 108. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland; International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

- Ji, C., Nguyen, L. N., Hou, J., Hai, F. I., & Chen, V. (2017). Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of *P. ostreatus* culture for micro-pollutant degradation. *Separation and Purification Technology*, *178*, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.043>
- Jinkarn, T., & Suwannaporn, P. (2015). Trade-off analysis of packaging attributes for foods and drinks. *British Food Journal*, *117*(1), 139–156. <https://doi.org/10.1108/BFJ-08-2013-0231>
- Kaewklin, P., Siripatrawan, U., Suwanagul, A., & Lee, Y. S. (2018). Active packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite film for prolonging storage life of tomato fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, *112*, 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.124>
- Karthikeyan, K. T., Nithya, A., & Jothivenkatachalam, K. (2017). Photocatalytic and antimicrobial activities of chitosan-TiO₂ nanocomposite. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 1762–1773. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.121>
- Khan, A., Salmieri, S., Frascini, C., Bouchard, J., Riedl, B., & Lacroix, M. (2014). Genipin cross-linked nanocomposite films for the immobilization of antimicrobial agent. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *6*(17), 15232–15242. <https://doi.org/10.1021/am503564m>

- Kishore, D., & Kayastha, A. M. (2012). Optimisation of immobilisation conditions for chick pea β -galactosidase (CpGAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its applications in lactose hydrolysis. *Food Chemistry*, *134*(3), 1650–1657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.055>
- Klein, Manuela P., Fallavena, L. P., Schöffner, J. D. N., Ayub, M. A. Z., Rodrigues, R. C., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2013). High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, *95*(1), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.044>
- Klein, Manuela P., Hackenhaar, C. R., Lorenzoni, A. S. G., Rodrigues, R. C., Costa, T. M. H., Ninow, J. L., & Hertz, P. F. (2016). Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, *137*, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>
- Klein, Manuela P., Nunes, M. R., Rodrigues, R. C., Benvenuti, 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>
- Klein, Manuela Poletto, Scheeren, C. W., Lorenzoni, A. S. G., Dupont, J., Frazzon, J., & Hertz, P. F. (2011). Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. *Process Biochemistry*, *46*(6), 1375–1379. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.021>

- rajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2–3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>
- Kumar, S., Mukherjee, A., & Dutta, J. (2020). Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 97, pp. 196–209). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.002>
- Kumar, S., Ye, F., Dobretsov, S., & Dutta, J. (2019). Chitosan nanocomposite coatings for food, paints, and water treatment applications. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/app9122409>
- Li, Z., & Pan, X. (2018). Strategies to modify physicochemical properties of hemicelluloses from biorefinery and paper industry for packaging material. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 47–69). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9460-7>
- Lin, B., Luo, Y., Teng, Z., Zhang, B., Zhou, B., & Wang, Q. (2015). Development of silver/titanium dioxide/chitosan adipate nanocomposite as an antibacterial coating for fruit storage. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 1206–1213. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.049>
- Lin, S. J., & Pascall, M. A. (2014). Incorporation of vitamin E into chitosan and its effect on the film forming solution (viscosity and drying rate) and the solubility and thermal properties of the dried film. *Food Hydrocolloids*, 35, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.015>

- Liu, C., Huang, J., Zheng, X., Liu, S., Lu, K., Tang, K., & Liu, J. (2020). Heat sealable soluble soybean polysaccharide/gelatin blend edible films for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, *24*, 100485. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100485>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.008>
- 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.
- Mourya, V. K., & Inamdar, N. N. (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. In *Reactive and Functional Polymers* (Vol. 68, Issue 6, pp. 1013–1051). <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.03.002>
- Murray, J. M., & Delahunty, C. M. (2000). Mapping consumer preference for the sensory and packaging attributes of Cheddar cheese. *Food Quality and Preference*, *11*(5), 419–435. [https://doi.org/10.1016/s0950-3293\(00\)00017-3](https://doi.org/10.1016/s0950-3293(00)00017-3)

- Nunes, C., Maricato, É., Cunha, Â., Nunes, A., Silva, J. A. L. Da, & Coimbra, M. A. (2013). Chitosan-caffeic acid-genipin films presenting enhanced antioxidant activity and stability in acidic media. *Carbohydrate Polymers*, *91*(1), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.033>
- Nunes, C., Maricato, É., Cunha, Â., Rocha, M. A. M., Santos, S., Ferreira, P., Silva, M. A., Rodrigues, A., Amado, O., Coimbra, J., Silva, D., Moreira, A., Mendo, S., Lopes Da Silva, J. A., Pereira, E., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2016). Chitosan-genipin film, a sustainable methodology for wine preservation. *Green Chemistry*, *18*(19), 5331–5341. <https://doi.org/10.1039/c6gc01621a>
- O' Callaghan, K. A. M., & Kerry, J. P. (2016). Consumer attitudes towards the application of smart packaging technologies to cheese products. *Food Packaging and Shelf Life*, *9*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.05.001>
- Pereira, D. B. C., da Silva, P. H. F., Júnior, L. C. G. C., & Oliveira, L. L. (2001). *Físico-química do leite e derivados: Métodos Analíticos* (2nd ed.).
- Puri, M., Gupta, S., Pahuja, P., Kaur, A., Kanwar, J. R., & Kennedy, J. F. (2010). Cell disruption optimization and covalent immobilization of β -d-galactosidase from *kluveromyces marxianus* YW-1 for lactose hydrolysis in milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *160*(1), 98–108. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8542-y>

- 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>
- Rhim, J. W., Lee, J. H., & Kwak, H. S. (2005). Mechanical and water barrier properties of soy protein and clay mineral composite films. *Food Science and Biotechnology*, 14(1), 112–116.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 31, Issue 7, pp. 603–632). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- 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
- Sheehan, D. (2013). *Cheese diversification and the IDB-Teagasc cheese programme: a milk quality perspective*. <http://www.teagasc.ie>
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
- Siripatrawan, U., & Kaewklin, P. (2018). Fabrication and characterization of chitosan-titanium dioxide nanocomposite film as ethylene scavenging and antimicrobial active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 84, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.049>

- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. H., & Tsai, C. C. (1999). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *10*(1), 63–78. <https://doi.org/10.1163/156856299X00289>
- Valizadeh, S., Naseri, M., Babaei, S., Hosseini, S. M. H., & Imani, A. (2019). Development of bioactive composite films from chitosan and carboxymethyl cellulose using glutaraldehyde, cinnamon essential oil and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.071>
- Verma, M. L., Barrow, C. J., Kennedy, J. F., & Puri, M. (2012). Immobilization of β -d-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *50*(2), 432–437. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.029>
- Vieira, D. C., Lima, L. N., Mendes, A. A., Adriano, W. S., Giordano, R. C., Giordano, R. L. C., & Tardioli, P. W. (2013). Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. *Biochemical Engineering Journal*, *81*, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.007>
- Vilela, C., Pinto, R. J. B., Coelho, J., Domingues, M. R. M., Daina, S., Sadocco, P., Santos, S. A. O., & Freire, C. S. R. (2017). Bioactive chitosan/ellagic acid films with UV-light protection for active food packaging. *Food Hydrocolloids*, *73*, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.037>

- 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>
- Wolf, M., Gasparin, B. C., & Paulino, A. T. (2018). Hydrolysis of lactose using β -D-galactosidase immobilized in a modified Arabic gum-based hydrogel for the production of lactose-free/low-lactose milk. *International Journal of Biological Macromolecules*, *115*, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.058>
- Yang, K., Dang, H., Liu, L., Hu, X., Li, X., Ma, Z., Wang, X., & Ren, T. (2019). Effect of syringic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antibacterial properties of chitosan film for quail eggs preservation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *141*, 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.045>
- Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., & Coma, V. (2018). Active Packaging Applications for Food. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 17, Issue 1, pp. 165–199). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>

APPENDIX

Research answers - Innovations in food packaging

	N	%
Sex		
Women	144	73.5
Men	52	26.5
Age		
0-18	5	2.5
18-30	103	52.6
30-50	48	24.5
Above 50	40	20.4
What is your educational attainment?		
Incomplete elementary school	0	0
Complete elementary school	2	1
Incomplete high school	2	1
Complete high school	19	9.7
Incomplete higher education	22	11.3
Complete higher education	69	35.2
Incomplete graduate	31	15.8
Complete graduate	51	26
Do you know what active packaging is?		
Yes	46	23
No	150	77
Do you know what smart packaging is?		
Yes	46	23
No	150	77
Would you buy a food contained in an active, smart or nanotechnology-enabled packaging?		
Yes	153	78
No	31	16