

Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa com incorporação de lactase

Development and evaluation of active packaging incorporated with lactase

Luciana Rodrigues da CUNHA¹, Nilda de Fátima Ferreira SOARES^{1*}, Flávia Cristina Costa ASSIS¹,
Nathália Ramos de MELO¹, Alexandre Fontes PEREIRA¹, Camila Batista da SILVA¹

Resumo

A intolerância à lactose consiste na ausência ou deficiência na produção da lactase, enzima responsável por hidrolisar a lactose proveniente do leite e derivados. Indivíduos acometidos desse mal são privados de ingerir o leite em virtude dos desconfortos intestinais promovidos pela não hidrólise desse carboidrato no intestino. Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver filme de base celulósica incorporado com lactase para redução do teor de lactose presente no leite. Os filmes foram produzidos pelo método "cast", imersos em frascos contendo 100 mL de leite pasteurizado, e mantidos a 25 °C/25 horas ou a 7 °C/48 horas. 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. Os filmes apresentaram estabilidade quando estocados à temperatura ambiente e de refrigeração. Testes de migração mostraram que, em média, 21,94% da lactase incorporada no filme migrou para a água após 14 dias de contato. Portanto, o filme desenvolvido apresenta potencialidade de ser usado como revestimento interno de embalagens para acondicionar leite.

Palavras-chaves: leite delactosado; lactase; embalagem ativa; filmes.

Abstract

Lactose intolerance is caused by reduced or absent activity of lactase that prevents the splitting of lactose. People deficient in lactase should eliminate diet milk and milk products due to the gastrointestinal symptoms caused by the individual inability to hydrolyse the lactose. Therefore, the aim of this work is to develop celulosic film incorporated with lactase to reduce the lactose level in milk. The films were cast immersed in 100 mL pasteurized milk and kept at 25 °C/25 hours or at 7 °C/48 hours. The films incorporated with 1 and 1.5 mL of lactase enzyme reduced respectively, 78 and 85% of lactose after 24 hours/7 °C and 92% and 100% after 25 hours/25 °C. These films presented stability when stored at room and refrigerated temperatures. Migrations test showed, on average, 21.94% of the incorporated enzyme migrated to aqueous solution after 14 days. Therefore, the developed films showed a potential use as an internal layer of milk multilayer carton packaging.

Keywords: lactose-free milk; lactase; active packaging; films.

1 Introdução

A intolerância à lactose consiste na ausência ou deficiência na produção da lactase, que é a enzima responsável por degradar a lactose proveniente do leite e derivados durante a alimentação⁸. Este é um problema que atinge mais de 50% da população mundial⁴, sendo no Brasil, 58 milhões de pessoas acometidas desse mal².

Em indivíduos intolerantes, a lactose ingerida permanece no intestino delgado sem sofrer hidrólise, provocando um fluxo de água extracelular para o interior do duodeno e jejuno, bem como para o estômago, em razão da diferença da pressão osmótica⁷. A lactose não absorvida é fermentada pela microbiota do cólon, resultando em ácidos orgânicos, gases e o aumento do peristaltismo dos músculos do intestino, com manifestações de flatulência, fluxo intestinal anormal, cólicas abdominais e diarreias com fezes aquosas. A intensidade dessas perturbações digestivas pode variar de simples mal-estar até o impedimento das atividades normais do indivíduo⁹.

Diante desse quadro, normalmente recomenda-se evitar o consumo de leite e seus derivados¹⁰. No entanto, esses indivíduos estariam deixando de usufruir dos benefícios do leite à saúde humana.

Torna-se necessário, então, o desenvolvimento de métodos para a preparação de leite livre da lactose. O leite com baixo

teor de lactose pode ser preparado por meio de sua remoção física ou por meio de sua hidrólise enzimática, pela liberação dos seus correspondentes monossacarídeos, glicose e galactose. Esse último método é preferido, pelo fato de não modificar a concentração nem a qualidade dos outros componentes do leite. A lactose é hidrolisada por meio de enzimas produzidas por leveduras mais ativas do que a de fungos, em baixas temperaturas. Quando a lactose é hidrolisada pela lactase, obtém-se a D-galactose e a D-glicose. O aumento da molaridade dos compostos solúveis diminui o ponto de congelamento da solução; portanto, a depressão do ponto de congelamento causada pela hidrólise da lactose, pode ser usada para determinar o grau de lactose hidrolisada⁶.

Tradicionalmente, os materiais de embalagens têm sido selecionados no sentido de ter mínima interação com o alimento que acondicionam, constituindo assim barreiras inertes. Entretanto, nas últimas décadas, diversos sistemas de embalagem têm sido desenvolvidos com o objetivo de interagir de forma desejável com o alimento – são as embalagens ativas, geralmente planejadas para alterar propriedades desejadas no produto¹¹. As embalagens ativas vêm sendo usadas em grande número de produtos alimentícios tais como pães, bolos, biscoitos, pizza, massa fresca, *croissant*, queijo, peixe, carnes (curadas, desidratadas, defumadas) café, chá, leite em pó, feijão, frutas desidratadas, farinhas, vinhos, "snacks", frutas e hortaliças, legumes, etc. Cada um desses produtos tem mecanismos diferentes de deterioração, que deverão ser entendidos para que se possa definir uma embalagem ativa¹². Dentre as inúmeras embalagens

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA,
Universidade Federal de Viçosa – UFV, Campus Universitário, CEP 36570-000
Viçosa - MG, Brasil,
E-mail: nfoares@ufv.br
^{*}A quem a correspondência deve ser enviada

ativas, podem-se destacar os filmes antimicrobianos, as embalagens com atmosferas modificadas, absorvedores de oxigênio e de etileno, absorvedores e geradores de CO₂, reguladores de umidade, liberadores de aditivos, liberadores e/ou absorvedores de sabores e odores, indicadores de temperatura, incorporação de enzimas e absorvedores de radiação^{12,3,5}. Várias enzimas têm sido imobilizadas em polímeros para produção de filmes a serem utilizados no acondicionamento dos alimentos^{11,1}, como a naringinase que hidrolisa o composto naringin responsável pelo gosto amargo em grapefruit. O desenvolvimento da tecnologia de embalagem ativa para produção de leite delactosado é uma área inovadora. Essas embalagens concorrem com as convencionais (sem a imobilização da enzima), por apresentarem um grande valor agregado em relação aos benefícios trazidos aos consumidores, proporcionando-lhes melhorias na qualidade da alimentação.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da enzima lactase incorporada em filme de base celulósica na redução do teor de lactose presente no leite.

2 Material e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Viçosa - MG.

2.1 Obtenção da curva padrão

A 100 mL de leite pasteurizado foram adicionadas diferentes quantidades da enzima lactase (Prozyn®) (0, 20, 40, 60, 80, 100 µL). As amostras de leite contendo a enzima foram mantidas a 7 °C/24 horas, sendo realizadas análises de crioscopia ao longo do período de incubação. Os dados de porcentagem de hidrólise foram obtidos através da Equação 1 e plotados versus a concentração de enzima. Uma equação foi então ajustada aos dados.

$$\% \text{Hidrólise} = 350,87 \cdot (Cf) - \left(\frac{Ci}{0,00285} \right) \quad (1)$$

sendo Ci: crioscopia inicial

Cf: crioscopia final

2.2 Preparo e incorporação da enzima no filme

Os filmes foram produzidos pelo método "cast", inoculando-se 0,1; 1 e 1,5 mL de enzima lactase (Prozyn®) na base filмоgênica (patente requerida). Posteriormente cortou-se 100 cm² (considerando os dois lados) de cada filme para avaliação da hidrólise a 7 °C e a 25 °C.

2.3 Avaliação da eficiência de hidrólise do filme a 7 °C e a 25 °C

Os filmes (100 cm²) foram inoculados (triplicata) em 100 mL de leite pasteurizado e em leite UHT, promovendo uma relação de 1 cm² de filme/mL de leite. Os frascos foram mantidos a 7 °C/48 horas (leite pasteurizado) e a 25 °C/ 24 horas (leite UHT) e análises crioscópicas foram realizadas ao longo do período de incubação.

2.4 Avaliação da estabilidade do filme

Os filmes preparados com 1 mL da enzima lactase foram acondicionados à temperatura ambiente e sob refrigeração por 7 dias, sendo posteriormente inoculados em 100 mL de leite pasteurizado e incubados a 7 °C/ 48 horas, para verificação da atividade da enzima. Análises crioscópicas foram realizadas durante o período de incubação para verificação da hidrólise da lactose.

2.5 Avaliação da migração da enzima incorporada na base celulósica

A migração da enzima incorporada no filme foi verificada por meio do Kit de quantificação de proteína (Bio Rad®) e comparação com a curva padrão construída (densidade ótica x concentração de proteína).

Construção da curva padrão

Adicionaram-se 20 mL de água milli-Q à proteína padrão (albumina bovina), obtendo-se uma solução 20 mg de proteína/mL, a partir da qual foram preparadas soluções 0,0875, 0,175, 0,35, 0,7 e 0,93 mg.mL⁻¹. Posteriormente, 100 µL de cada solução foram transferidos (triplicata) para tubos contendo 5 mL de Coomassie Brilliant Blue. As amostras foram agitadas e incubadas à temperatura ambiente por cinco minutos e posteriormente submetidas a análises em espectrofotômetro (595 nm).

Migração da enzima do filme

Foram cortados (triplicata) 50 cm² do filme preparado com 1,5 mL de enzima lactase, que posteriormente foram imersos em 50 mL de água milli-Q e incubados à temperatura ambiente por 14 dias. Após esse período, 100 µL de cada amostra foram transferidos para tubos contendo 5 mL de Coomassie Brilliant Blue e incubados à temperatura ambiente por cinco minutos, sendo posteriormente submetidos a análises em espectrofotômetro (595 nm).

3 Resultados e discussão

3.1 Obtenção da Curva-Padrão

Os resultados obtidos para a elaboração da curva-padrão são mostrados na Figura 1.

De acordo com a curva padrão obtida, pode-se verificar que 60 µL de enzima lactase adicionadas diretamente ao leite foram suficientes para promover uma redução de 85% da lactose presente no leite.

3.2 Avaliação da eficiência de hidrólise do filme a 7 °C e a 25 °C

As Figuras 2 e 3 mostram, respectivamente, a hidrólise 7 °C e a 25 °C dos filmes produzidos com 0,1; 1 e 1,5 mL de lactase.

Verificou-se que o filme produzido com 0,1 mL de enzima lactase promoveu baixa redução (inferior a 20%) da lactose do

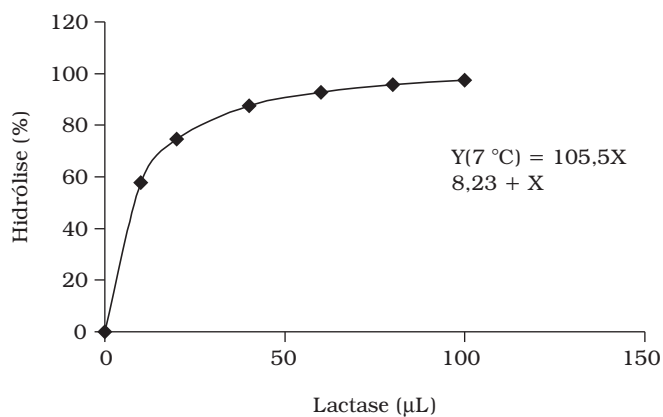


Figura 1. Porcentagem de hidrólise de lactose em leite pasteurizado integral em função de diferentes concentrações de enzima lactase.

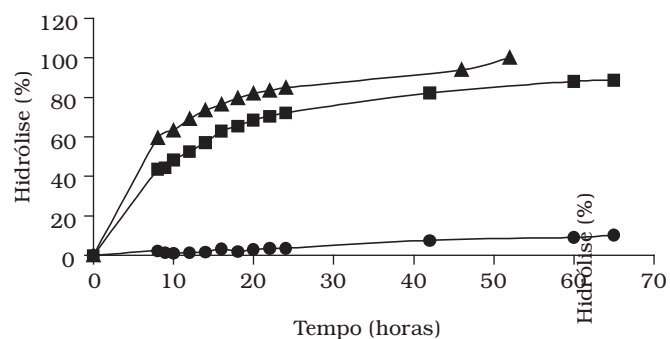


Figura 2. Porcentagem de hidrólise a 7 °C dos filmes incorporados com 0,1 mL (●), 1 mL (■) e 1,5 mL (▲) de lactase.

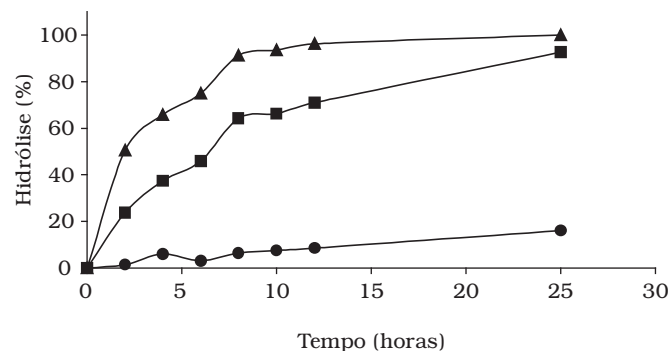


Figura 3. Porcentagem de hidrólise a 25 °C dos filmes incorporados com 0,1 mL (●), 1 mL (■) e 1,5 mL (▲) de lactase.

leite, tanto a 7 quanto a 25 °C. A baixa concentração de lactase incorporada (0,1 mL) não foi suficiente para promover a hidrólise da lactose devido ao fato da enzima ter ficado no interior da matriz polimérica, diminuindo assim o contato com o leite.

Os filmes produzidos com 1 e 1,5 mL da mesma enzima, 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. Cabe salientar que a elevada hidrólise a 25 °C é aplicável ao leite UHT, que, sendo a caixa cartonada revestida com esse

filme (1,5 mL de enzima), necessitaria apenas de 12 horas para promover hidrólise de 97% da lactose presente no leite.

3.3 Avaliação da estabilidade do filme

A Figura 4 indica a porcentagem de hidrólise da lactose a 7 °C dos filmes produzidos com 1 mL de lactase e estocados a 7 °C/7 dias e à temperatura ambiente/7 dias.

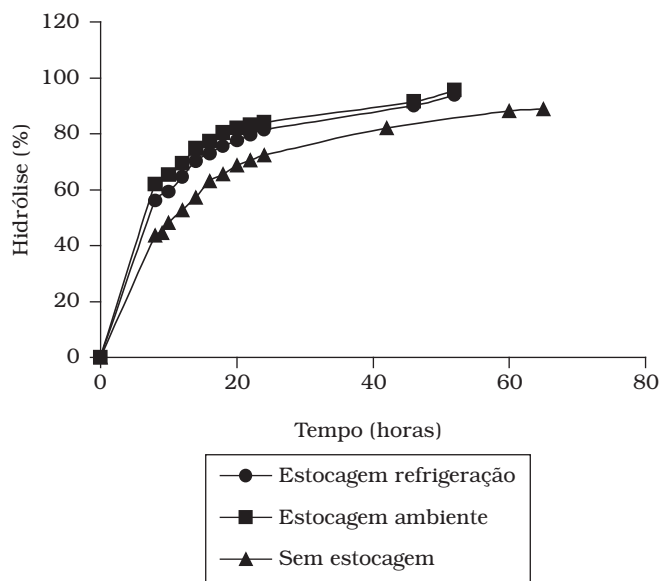


Figura 4. Filme incorporado com 1 mL de lactase e estocados a 7 °C/7 dias (●), à temperatura ambiente/7 dias (■) e sem estocagem (▲).

De acordo com os resultados indicados na Figura 4, verificou-se que o filme apresentou estabilidade quando acondicionado à temperatura ambiente e a 7 °C por 7 dias, sendo efetivo no processo de redução do teor de lactose presente no leite quando utilizado após o período de estocagem.

3.4 Migração da enzima para o leite

Curva-padrão

Os resultados obtidos para a construção da curva-padrão são mostrados na Figura 5.

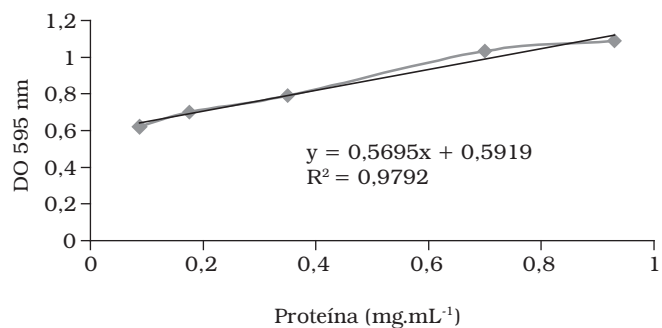


Figura 5. Relação entre a densidade óptica (595 nm) e a concentração de albumina bovina (mg.mL^{-1}).

Migração da enzima incorporada no filme

A Tabela 1 indica a concentração de lactase incorporada no filme e a porcentagem de enzima migrada deles, após 14 dias de contato com a água.

Tabela 1. Porcentagens de enzima migrada para a água após 14 dias de contato com os diferentes filmes incorporados com lactase.

Filme	Enzima incorporada (mg) no filme de 50 cm ²	Enzima (mg) migrada	Migração de lactase (%)
I	42,4	11,2	26,52
II	50,4	10,19	20,22
III	54,4	10,37	19,06
Média			21,94

Observou-se que, em média, 21,94% da enzima incorporada no filme migrou para a água após 14 dias de contato.

4 Conclusões

O filme incorporado com lactase apresentou eficiência no processo de hidrólise do leite e estabilidade à temperatura ambiente e de refrigeração, sendo, portanto, uma tecnologia potencial para o revestimento interno de embalagens cartonadas e barriga mole usadas para acondicionar leite. O leite hidrolisado poderá ser produzido na mesma linha de processamento do leite convencional, não havendo assim a necessidade de disponibilização de uma nova linha de processamento.

O desenvolvimento deste produto irá atender a uma grande parcela de consumidores deficientes na enzima lactase que são privados de ingerir o leite.

Agradecimentos

Ao CNPq, CAPES, FINEP, FAPEMIG pelo apoio financeiro. À empresa Prozyn® pela doação da enzima.

Referências bibliográficas

- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative food science e emerging technologies**, v. 3, p. 113-126, 2002.
- BATAVO. **Leite Batavo Sensy baixa lactose**. 2004. 2 p. Publicidade da indústria Batavo.
- BRANDÃO, L. S. **Inibição da microbiota de exsudado de frango por nisina incorporada em sachês de celulose**. Viçosa - MG: UFV, 2001, 54 p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, UFV.
- DURING, M. J. et al. Peroral gene therapy of lactase intolerance using an adeno-associated virus vector. **Nature Medicine**, v. 4, n. 10, p. 1131-1135, 1998.
- HAN, J. H. **Active food packaging**. Disponível em: <<http://www.wmrc.com>>. Acesso em: out. 2002.
- HENG, M. H.; GLATZ, C. E. Ion exchange immobilization of charged B-galactosidase fusions for lactose hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, n. 6, p. 745-752, 1994.
- JOHNSON, A. et al. Correlation of lactose maldigestion, lactose intolerance and milk intolerance. **Arm. J. Chem. Nutr.**, v. 57, n. 3, p. 399-401, 1993.
- KRAUSE, M. V., MAHAN, L. K., **Alimentos, nutrição e dietoterapia: um livro texto do cuidado nutricional**, 9. ed. São Paulo: Roca, 2002.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo - SARVIER, 1986.
- SALOFF-COSTE, C. J. De. **La microflora gastrointestinal y láis leches fermentadas**. Danone World Newsletter, n. 14, 22p. maio, 1997. Disponível em: <http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/esp/news_14/ref.htm> Acesso em: 13 mar. 2002.
- SOARES, N. F. F. **Bitterness Reduction in Citrus Juice Through Naringinase Immobilized into Polymer Film**. Ph.D. New York, 1998, 130 p. Dissertation, Cornell University.
- VERMEIREN, L. J. et al. Development in the active packaging of foods. **Trends in Food Science e Technology**, v. 10, p. 77-86, 1999.