

KARINA COELHO MOREIRA DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LACTOSE EM PRODUTOS LÁCTEOS:
COMPARAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Ítalo Tuler Perrone

Coorientadores: Rodrigo Stephani
Antonio Fernandes de Carvalho

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586d
2020

Silva, Karina Coelho Moreira da, 1992-
Determinação do teor de lactose em produtos lácteos:
comparação de métodos analíticos / Karina Coelho Moreira da
Silva. – Viçosa, MG, 2020.
1 dissertação eletrônica (37 f.): il.

Orientador: Ítalo Tuler Perrone.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2020.
Referências bibliográficas: f. 32-37.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.047>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leite - Análise. 2. Lactose. 3. Intolerância a lactose.
I. Perrone, Ítalo Tuler, 1978-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
III. Título.

CDD 22. ed. 637.14

KARINA COELHO MOREIRA DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LACTOSE EM PRODUTOS LÁCTEOS:
COMPARAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente

KARINA COELHO MOREIRA DA SILVA

Data: 16/02/2023 10:21:53-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Karina Coelho Moreira da Silva
Autora



Documento assinado digitalmente

ITALO TULER PERRONE

Data: 16/02/2023 10:26:53-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Ítalo Tuler Perrone
Orientador

A todas as mulheres que encontram na ciência e na educação
as ferramentas para se expressarem e para promover mudança.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos os acasos da vida que me trouxeram à Viçosa. Uma cidade que me ensinou muitas lições e me trouxe muitas pessoas importantes e queridas. Que expandiu meu olhar enquanto engenheira de alimentos e futura Mestra. Agradeço ao meu orientador Ítalo Tuler Perrone, que sempre foi um ótimo líder e exemplo enquanto professor.

Aos meus coorientadores, Antonio Fernandes de Carvalho e Rodrigo Stephani, pelas reuniões, materiais compartilhados e críticas – muito importantes para meu desenvolvimento ao longo destes dois anos.

Aos professores que passaram pela minha trajetória, com os quais aprendi quase tudo o que sei. A educação é empoderadora. Educação é o mínimo que merecemos. A educação é o máximo!

À DSM, pela parceria.

Aos meus colegas de laboratório, que buscam trabalhar com excelência e coletividade. Cada um de vocês ajudou a colocar um tijolo nesta construção que é meu (nosso) trabalho de mestrado.

Aos amigos, das terras cariocas, do mundo e da UFV. Aos amigos do laboratório em especial... Obrigada por fazerem desta a melhor “temporada” do INOVALEITE. Nós nos acolhemos como família e não há nada que arranque estes momentos de minha memória.

À minha família. Mãe, pai e irmão, que de um jeito único e diferente me tornaram uma pessoa forte e disposta a mudar. Não sou capaz de pensar em tudo pelo que passamos sem me emocionar...

Ao meu terno namorado, Macedo, pelo companheirismo que cresce entre nós a cada dia. Pelas idas e vindas e os 400 km que nos separam – mas que nos unem. Os mares atravessados. Pelo que nos tornamos. Pelo que ainda iremos nos tornar.

RESUMO

SILVA, Karina Coelho Moreira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Determinação do Teor de Lactose em Produtos Lácteos: Comparação de Métodos Analíticos.** Orientador: Ítalo Tuler Perrone. Coorientadores: Antonio Fernandes de Carvalho, Rodrigo Stephani e Luiz Fernando Cappa de Oliveira.

A lactose é o principal carboidrato do leite. Aproximadamente 68% da população mundial e 60% dos brasileiros apresentam algum nível de má digestão desse dissacarídeo. Essa parcela relevante dos cidadãos desperta nas indústrias o interesse na diversificação de seus portfólios. Ao reduzir a concentração da lactose, é necessário um olhar regulatório mais atento e o emprego de metodologias que tragam confiabilidade aos resultados obtidos. Quatorze amostras foram analisadas por seis métodos de quantificação de lactose. Os métodos aplicados foram: titulação, glicosímetro, biossensor, eficiência de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (HPLC-RID), cromatografia de troca aniônica de alta performance com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) e três kits enzimáticos. Um protocolo de cromatografia de troca aniônica de alto desempenho validado foi utilizado como método de controle. Resultados da quantificação de lactose residual com resposta analítica estatisticamente semelhante ao método de controle (cromatografia de troca aniônica de alto desempenho) foram obtidos utilizando HPLC-RID e o biossensor. No entanto, apenas o método do biossensor foi capaz de realizar a quantificação em todos os produtos.

Palavras-chave: Zero Lactose. Leite. Produtos Lácteos. Métodos.

ABSTRACT

SILVA, Karina Coelho Moreira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Comparison of Methods for Determination of Lactose in Low Lactose Dairy Products.** Adviser: Ítalo Tuler Perrone. Co-advisers: Antonio Fernandes de Carvalho, Rodrigo Stephani and Luiz Fernando Cappa de Oliveira.

Lactose is the main carbohydrate in milk. Approximately 68% of the world population and 60% of the Brazilian population have some level of poor digestion of this disaccharide. This citizens relevant portion arouses interest in industries in the diversification of their portfolios. When reducing the concentration of lactose, it is necessary to have a closer regulatory look and use of methodologies which bring reliability to the results obtained. Fourteen samples were analyzed using six lactose quantification methods. The applied methods were: titrimetric, glucometer, biosensor, high-performance liquid chromatography efficiency with refractive index detector (HPLC-RID), high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and three enzymatic kits. A validated high-performance anion exchange chromatography protocol was used as reference method. Results of residual lactose quantification with statistically similar analytical response to the control method (HPAEC-PAD) were obtained by using HPLC-RID and the biosensor. However, only the biosensor method was able to perform the quantification in all the products.

Keywords: Zero Lactose. Milk. Dairy Products. Methodologies

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Lactose e Intolerância à Lactose	10
2.2. Produtos “zero Lactose” e Panorama Mercadológico	10
2.3. Legislação de Alimentos para Fins Especiais	12
2.4. Metodologias de Controle	12
2.4.1. Glicosímetro	13
2.4.2. Método Titulométrico	13
2.4.3. Métodos enzimáticos e Mecanismo de produção de Galacto- oligossacarídeos	14
2.4.3.1. Métodos Enzimáticos	14
2.4.3.2. Mecanismo de produção de GOS	15
2.4.4. Métodos Cromatográficos.....	16
2.4.4.1. HPAEC-PAD	17
2.4.4.2. HPLC-RID	17
2.4.5. Biossensores	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Preparo de soluções e amostras	20
3.2. Glicosímetro.....	20
3.3. Método Titulométrico	21
3.4. Métodos Enzimáticos	21
3.5. Métodos Cromatográficos	21
3.5.1. HPAEC-PAD.....	21
3.5.2. HPLC-RID.....	21
3.6. Biossensor	22
3.7. Análises Estatísticas	22
4. RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES	23
4.1. Glicosímetro e Método Titulométrico	26
4.2. Métodos Enzimáticos	26
4.3. Métodos Cromatográficos	27
4.3.1. HPAEC-PAD.....	27

4.3.2. HPLC-RID.....	27
4.4. Biossensor	29
4.5. Amostras Adicionadas de Lactose	29
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	31
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

Esta dissertação dispõe de uma revisão teórica (Seção 2) a respeito de tópicos que nortearam o trabalho de mestrado ao longo dos dois anos de execução. Para realizar análises em produtos reduzidos ou isentos em lactose é necessário compreender o que motiva esta ação, do ponto de vista de necessidade do mercado, do consumidor e expor o que as indústrias têm a oferecer neste seguimento.

Há uma diversidade de metodologias disponíveis para detecção de lactose. A escolha é influenciada por aspectos como custo de aplicação; limite de detecção, que deve ser baixo; facilidade de operar e treinar para operação; dentre outros aspectos. Ainda, as metodologias podem apresentar performance distinta a depender do processamento do alimento e de sua composição centesimal. Não menos importante, é essencial que as metodologias apresentem resultados confiáveis para apresentação às agências regulatórias.

Por caráter de padronização e comparação com a literatura, as metodologias seguiram estritamente protocolos oficiais (Seção 3). Os resultados (Seção 4) são estatisticamente comparados com uma metodologia validada em laboratório oficial e discutidos com base na revisão. Ao final do trabalho (Seção 5) são apresentadas conclusões conforme o objetivo do trabalho e visões de aplicação do conteúdo do mesmo.

Considerando estes aspectos, o objetivo deste estudo foi comparar metodologias de detecção de lactose em diferentes produtos comerciais de baixo teor em lactose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lactose e Intolerância à Lactose

A lactose é o principal carboidrato encontrado no leite da maioria dos mamíferos, incluindo humanos e vacas. É um dissacarídeo composto por uma molécula de D-galactose e outra de D-glicose unidas via ligação β -1,4-glicosídica (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Outros carboidratos estão presentes no leite apenas como traços, incluindo a glicose, frutose, glucosamina, galactosamina, ácido neuramínico e oligossacarídeos. No leite de vaca a lactose apresenta concentrações na faixa de 4,6 a 4,9%, sendo seu percentual pouco oscilante ao longo do período de lactação quando comparado ao teor de proteínas e lipídeos (FOX; MCSEENEY, 1998).

A lactose é uma fonte de energia para o organismo, por efeito da metabolização de seus constituintes (glicose e galactose) após clivagem da ligação entre os mesmos. Esta quebra em suas unidades básicas é possível devido à presença da enzima β -galactosidase no intestino delgado. É possível que indivíduos apresentem reduzida atividade desta enzima, e a lactose deixe de ser uma fonte de energia para o organismo. Contudo, a molécula passa a atuar como substrato para bactérias no cólon, que a fermentam produzindo gases e causando desconforto abdominal. A lactose também promove desequilíbrio osmótico, causando diarreia e pode ocasionar sintomas mais sistêmicos, como dor de cabeça. Nestes casos, é necessário um diagnóstico ratificando que o indivíduo apresenta intolerância à lactose (DENG et al., 2015; JELLEMA et al. 2010; MATTAR; MAZO; CARRILHO, 2012).

2.2. Produtos “zero Lactose” e Panorama Mercadológico

A hidrólise da lactose apresenta vantagens tecnológicas e sensoriais em relação a alguns produtos tradicionais. Segundo McCain, Kaliappan e Drake (2018), devido à lise da lactose em suas unidades básicas, ocorre aumento no poder edulcorante do leite. Esta característica possibilita a redução da adição de açúcar em alguns produtos, como iogurtes. A hidrólise da lactose na fabricação de sorvetes

reduz o aspecto de arenosidade, que é um defeito tecnológico resultante da formação de grandes cristais de lactose (ABBASI, SAEEDABADIAN, 2015). Este defeito é indesejável também na produção de produtos concentrados, como leite condensado e doce de leite (SABIONI et al., 1984).

Em alguns derivados de leite o menor teor de lactose é inerente ao processo tecnológico, como em queijos maturados e iogurtes. Estes alimentos sofrem fermentação, processo anaeróbio no qual os microrganismos utilizam a lactose como fonte de carbono e formam ácido láctico dentre outros produtos (GILLE et al., 2018). Como não é realizado um tratamento específico para diminuição do nutriente em questão, a nível regulatório estes alimentos não podem ser declarados como reduzidos ou isentos em lactose.

O lançamento de novos produtos reduzidos ou isentos em lactose tornou-se uma necessidade para marcas que querem se destacar e acompanhar as necessidades de seus consumidores, visto que 68% da população mundial e 60% de brasileiros apresenta algum nível de incapacidade de hidrólise deste açúcar (STORHAUG; FOSSE; FADNES, 2017). O mercado brasileiro tem sido promissor, uma vez que 37% da população aceitaria investir um maior valor nestes produtos em relação aos tradicionais. Esta receptividade foi identificada, e a produção no mercado zero lactose tem se ampliado nos últimos anos, representando 2,5% em 2016, 3,3% em 2017, e em 2018 representou cerca de 4% (EMBRAPA, 2018).

A justificativa para esta tendência no mercado de produtos especiais ocorre devido ao fato de que, indivíduos com e sem intolerância à lactose têm a percepção do leite e derivados como importantes fontes de vitaminas e minerais. Produtos isentos deste carboidrato oferecem a oportunidade para consumidores com a restrição dietética de estarem inclusos na adoção de uma rotina mais saudável (NOVOZYMES, 2018a). Outras razões para a ampliação a nível global têm sido estudadas. As correntes de migrações, seja por refúgio ou intercâmbio cultural e acadêmico, mobilizam populações de áreas de alta prevalência de indivíduos intolerantes à lactose para países com apreciável consumo de leite. O desenvolvimento econômico também colabora com o crescimento deste mercado em países nos quais uma parcela dos habitantes apresenta esta restrição alimentar. Ademais, é possível destacar a “ocidentalização” na dieta em países asiáticos, como a China, que apresenta uma população altamente intolerante à lactose (HRA, 2017;

NOVOZYMES, 2018b, 2018c). A América Latina representa uma fatia expressiva deste mercado, atrás apenas da Europa Ocidental, mercado de maior e mais rápido crescimento atualmente (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019).

Satisfazer a este mercado é benéfico para os laticínios em receita e para os consumidores que desejam desfrutar de uma variedade de produtos. Porém, atender à demanda de produtos especiais acarreta em maior responsabilidade na produção e controle de qualidade.

2.3. Legislação de Alimentos para Fins Especiais

Há atualmente duas resoluções que estabelecem as obrigações quanto à rotulagem de lactose nos alimentos, ambas adotadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 136/2017 (BRASIL, 2017d) estabelece a redação do rótulo de alimentos a respeito da presença de lactose, enquanto a RDC n° 135/2017 (BRASIL, 2017c) trata da distinção entre produtos isentos em lactose e reduzidos em teor de lactose. Com o objetivo de instituir um maior controle, a RDC n° 135/2017 diminuiu o limite de 0,5% ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$ ou $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) de lactose no produto para 0,1% ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$ ou $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) no alimento “zero lactose” pronto para consumo. Para alimentos com apelo de “baixo teor de lactose”, foi estabelecido que a concentração do açúcar deve estar acima de 0,1% ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$ ou $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) e igual ou menor que 1% ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$ ou $\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) no produto pronto para consumo.

A RDC n° 136/2017 complementa que os alimentos que atendam ao primeiro critério devem ser declarados no rótulo como “isento de lactose”, “zero lactose”, “0% lactose”, “sem lactose” ou “não contém lactose” próximo à denominação de venda do produto. Os alimentos reduzidos em lactose devem ter a declaração “baixo teor de lactose” ou “baixo em lactose” próximo à denominação de venda.

2.4. Metodologias de Controle

A ANVISA divulgou um guia que responde a possíveis dúvidas relacionadas à rotulagem de alimentos para dietas com restrição em lactose, e aborda as metodologias analíticas que devem ser utilizadas para controle destes produtos.

Neste guia, fica definido que a empresa é responsável por estabelecer metodologias e protocolos de validação de acordo com as características de produção e de composição do alimento (BRASIL, 2017a). Nesta seção é apresentada uma revisão de metodologias para a determinação de lactose que são observadas na literatura.

2.4.1. Glicosímetro

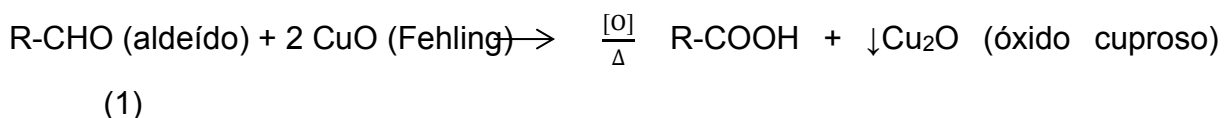
O glicosímetro é um equipamento comumente utilizado por indivíduos diabéticos para checagem do nível da glicemia sanguínea. Os medidores disponíveis no mercado utilizam fitas que promovem reações bioquímicas com a amostra de sangue. Podem diferir-se no tipo de detector utilizado; aqueles que seguem o princípio da fotometria avaliam a amostra por mudança de intensidade da cor, enquanto os amperométricos detectam a intensidade da corrente elétrica que atravessa a amostra. A sua adaptação ao uso em produtos lácteos é justificada por sua praticidade, rapidez e eficiência na quantificação de lactose (MACIEL, 2014). A faixa de medição do método é de 10 a 600 mg/dL (ACCU-CHECK, 2008).

Campos et al. em 2014 realizaram ensaios de determinação de lactose em leite e soro de leite comparando com metodologia de titulação e obtiveram boa correlação entre as técnicas. Também foi realizado monitoramento de hidrólise da lactose em leite desnatado. O glicosímetro respondeu ao aumento da concentração de glicose e galactose no meio, até determinado ponto da hidrólise. No trabalho de Metzger (2013), foi estudado o uso de glicosímetro como um método de baixo custo e que exige mínimo treinamento para que operadores pudessem utilizar em linha. Diferentemente do trabalho de Campos et al. (2014), alguns etapas foram adicionadas ao experimento, como a prévia hidrólise enzimática da lactose de soro e queijos processados. Demonstrou-se que o método foi eficaz do ponto de vista abordado, e expressava com acurácia a concentração de lactose.

2.4.2. Método Titulométrico

O método de Lane-Enyon (LE) baseia-se na determinação do volume de amostra necessário para reduzir uma medida da solução de Fehling, de concentração conhecida. A solução de Fehling é formada por íons bivalentes de

cobre (Cu^{+2}) complexados com tartarato em meio alcalino. Nestas condições, os carboidratos são oxidados a ácidos aldônicos, formando óxido de cobre I (precipitado vermelho-tijolo) (BRASIL, 2013), conforme mecanismo apresentado em (1).



Tempo de aquecimento, temperatura e concentração dos reagentes devem ser bem controlados para a execução do método de LE. A amostra necessariamente deve ser neutra e nenhum agente redutor deve estar presente na matriz a fim de não haver alteração nos resultados (TEGGE, BIRCH, 1986). A ebulição deve ser mantida na análise para evitar que o óxido cuproso entre em contato com o oxigênio do ar e seja oxidado, retornando à forma de óxido cúprico. O aquecimento prolongado pode decompor os açúcares da amostra, portanto a titulação deve ser realizada em, no máximo, três minutos (TAVARES et al., 2010).

A titulação apresenta custo mais alto em relação ao uso do glicosímetro. Na literatura não foram encontrados artigos que utilizassem essa metodologia para a determinação de lactose residual em lácteos hidrolisados ou que pontuassem o limite de detecção da técnica.

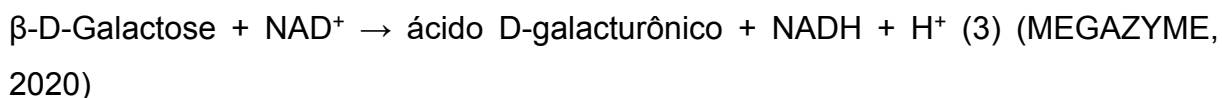
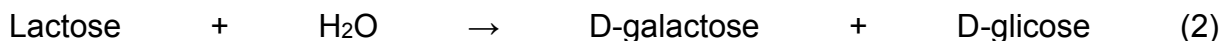
2.4.3. Métodos enzimáticos e Mecanismo de produção de Galacto-oligossacarídeos

2.4.3.1. Métodos Enzimáticos

São métodos em que o substrato de interesse sofre ação de uma ou mais enzimas e o produto é quantificado em equipamentos como o espectrofotômetro. Os reagentes e tampões necessários são em geral vendidos em kits. Os fabricantes seguem o protocolo da AOAC (2005), mas podem acrescentar etapas visando otimizar a aquisição de resultados.

O princípio deste método em relação à lactose é a hidrólise em seus açúcares mais simples pela β -galactosidase (2). Em sequência, o analista promove uma reação de oxirredução, na qual o agente oxidante nicotinamida-adenina (NAD^+)

é reduzido a NADH e a β -galactose é oxidada a ácido D-galacturônico (3). É possível então determinar a concentração de lactose pela relação estequiométrica com o NADH formado, que é o produto de interesse na leitura por espectrofotometria.



Blais em 1993 e em 1995 (junto a Vailhen) trabalharam com uma modificação do método a fim de agilizar a execução da análise. Na etapa inicial permanece a hidrólise da lactose em seus dois monossacarídeos pela β -galactosidase e, em seguida, conversão da glicose em D-glucono-1-4-lactona e peróxido de hidrogênio, por meio de glicose oxidase e na presença de oxigênio. O peróxido de hidrogênio é então mensurado por reação com iodeto gerando iodo, que forma um complexo colorido com álcool polivinílico. O ensaio foi realizado em placa de microtítulo e a leitura realizada em equipamento específico para este tipo de placa. Os resultados com a nova metodologia foram comparáveis com aos do kit tradicional e o novo sistema de detecção apresentou uma relação linear de resposta à concentração de lactose presente em amostras de queijo parmesão. Anteriormente, outros autores já buscavam métodos enzimáticos que fossem eficazes para a quantificação de lactose em amostras. Kleyn e Trout (1984) realizaram um trabalho em colaboração com oito indústrias de alimentos para determinação de lactose em oito amostras desconhecidas de leite integral, desnatado e semidesnatado, mas obtiveram resultados ineficientes em relação à técnica oficial da época. O limite de detecção varia de acordo com o fabricante.

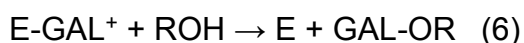
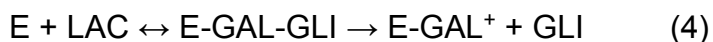
2.4.3.2. Mecanismo de produção de GOS

A β -galactosidase é uma enzima que não atua apenas na lactose. Algumas podem atuar sobre polissacarídeos, galactolipídeos, glicoproteínas e não ter afinidade pela lactose. Estas enzimas também apresentam diferente preferência entre substratos e a formação de produtos pode variar com os fatores extrínsecos

(pH, temperatura e tipo de processamento) (GOSLIN et al., 2010; OTIENO, 2010; DEKKER; DAAMEN, 2011; FRENZEL et al., 2015; INTANON et al., 2014).

As β -galactosidases podem ser extraídas de diversas fontes animais e vegetais, mas têm-se destacado comercialmente o uso de enzimas de origem microbiana. As enzimas de fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*) e de leveduras (*Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*) apresentam *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e apreciável rendimento na hidrólise da lactose (DEKKER; DAAMEN, 2011).

A base do mecanismo de hidrólise da lactose (LAC) é a formação do complexo enzima-galactose (E-GAL). Nesta etapa há liberação de glicose (GLI) (4). Na etapa seguinte, o complexo é transferido para um acceptor com grupamento hidroxil. Neste ponto a reação pode seguir dois caminhos: sob baixa concentração de lactose, a água é acceptora do complexo e a galactose libera o sítio ativo da enzima (E) (5); porém, o complexo pode reagir com outra molécula (lactose, galactose, glicose, frutose – oriunda de outras fontes, por exemplo) (R-OH), e ocorre formação de galacto-oligossacarídeos (GAL-OR) (6) (FAI et al., 2014).



2.4.4. Métodos Cromatográficos

A Cromatografia Líquida de Alta Performance vem sendo investigada em trabalhos por apresentar, de forma geral, sensibilidade, riqueza de resultados, utilizar baixa quantidade de amostra, detectar e quantificar não apenas lactose, mas outros sacarídeos simultaneamente e ser uma técnica automatizada (GALANT et al., 2015; RESENDE; MATOS, 2010; SEXTON, 2004; TROIANO et al., 2016). Por migração de uma amostra dispersa em uma fase móvel líquida, ocorre a separação de seus componentes por interação com a fase estacionária e ao passar pelo detector, o sinal gerado é proporcional à concentração dos analitos, permitindo a separação e a quantificação por meio desta técnica (SILVA, A. 2016).

2.4.4.1. HPAEC-PAD

High-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) ou cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada, é uma metodologia escolhida como controle por autores como Mangan et al. (2018) e Churakova et al. (2019) na detecção de lactose a níveis residuais em produtos lácteos.

O manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal estabelece o método por cromatografia de troca iônica para detecção de lactose em uma ampla gama de produtos lácteos, exceto caseinatos e queijo em pó. (BRASIL, 2017b).

Barragan (2016) realizou um trabalho voltado para a melhoria na detecção de carboidratos em cromatógrafo de íons, modificando a detecção. Na comparação entre pulsos de detecção, os limites encontrados foram equivalentes, sendo 13,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a atual tecnologia utilizada e 14,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a nova possibilidade (SAD, detecção amperométrica por varredura, do inglês, *Scanning Amperometric Detection*).

2.4.4.2. HPLC-RID

High-Performance Liquid Chromatography with Refraction Index Detector (HPLC-RID), ou Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Detector de Índice de Refração é o método cromatográfico que realiza a distinção dos componentes de uma amostra ao captar mudanças no índice de refração do eluente à medida que o atravessa com os componentes da amostra separados (SILVEIRA et al. 2015).

Alguns autores utilizam acetonitrila ou metanol (FREITAS et al., 2017; RESENDE; MATOS, 2010; SEXTON, 2004; TROIANO et al., 2016) como fase móvel na HPLC, o que acarreta em riscos para o analista (PUBCHEM, 2019a, 2019b). Outros trabalhos, como o de Acquaro Júnior et al. (2013) e o de Naegele (2018), utilizam água ultrapura como fase móvel, o que também promove praticidade para a utilização em grandes quantidades quando se tem disponível equipamento que purifique a água destilada. Os outros solventes já mencionados precisam ser

constantemente adquiridos e podem necessitar de permissão da Polícia Federal, como no caso da acetoneitrila (POLÍCIA FEDERAL, 2003). Acquaro Júnior e seus colaboradores (2013) trabalharam no desenvolvimento e validação de uma metodologia que permitisse a extração e determinação de lactose baseada em princípios da Química Verde (reagentes de fácil obtenção, custo relativamente baixo e baixa toxicidade). A extração em amostras de leite pasteurizado foi realizada com etanol, o conteúdo foi ressuspenso com água ultrapura e levado para análise por HPLC com detector de índice de refração. O limite de detecção para a lactose estabelecido foi de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ e o limite de quantificação de $0,15 \text{ g.L}^{-1}$. Gonzaga et. al (2019) também trabalharam com princípios da Química Verde em determinação de lactose e lactulose em leite, utilizando apenas água para a extração das moléculas.

2.4.5. Biossensores

Biossensores utilizam como princípio reações que ocorreriam na natureza, aplicadas a um equipamento que detecta e traduz o sinal produzido pelo composto de interesse em contato com a biocamada. Para isto, um componente biológico, como uma enzima, anticorpo ou ácido nucléico, é empregado. A estrutura de um biossensor conta com o compartimento de amostra, o sistema de reconhecimento (que tem contato direto com a amostra), um transdutor (traduz a reação em um sinal mensurável) e processador de sinal, que filtra, amplifica, analisa e transfere o sinal para um monitor (CALIL; ROBERTO, 2011). Há grande cenário para emprego de biossensores na detecção de açúcares, e o principal é a glicose, mas há também aplicações na análise de contaminantes, no acompanhamento de fermentações e na garantia da qualidade de alimentos (DORNEMANN, 2016).

Como mencionado, biossensores podem apresentar diversos tipos de materiais em sua composição, e este universo de possibilidades aplica-se também à detecção de lactose. Salvo-Comino e seus colaboradores (2018) trabalharam em um multissensor de ftalocianina de cobre sulfonado (camada aniônica), tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio com quitosana (camada catiônica) e galactose oxidase imobilizada, e realizaram testes em amostras de leite com diferentes concentrações de lactose e gordura. Este sensor também realizava determinação da acidez, proteínas e gorduras, de maneira simples e sem necessidade de pré-tratamento da

amostra. Trabalhando com outros materiais de base (polímeros e eletrodo de platina), a enzima galactose oxidase e a β -galactosidase foram exploradas por Gursoy et al. (2018), obtendo um limite de detecção de 14 μM . Caron e Trowell (2018) trabalharam em um biossensor sensível a baixas concentrações de lactose que superasse o método de cromatografia líquida, ou seja, que fosse capaz de separar a lactose de outros componentes do leite. A abordagem utilizada baseou-se em um regulador de transcrição encontrado em *Clostridium perfringens* que é altamente seletivo à lactose. O sensor apresentou-se duzentas vezes mais sensível ao dissacarídeo que aos resíduos de sua hidrólise, com limite de detecção de 0,2 μM , sem a necessidade de remover previamente gordura e proteínas. Soluções para a detecção de lactose em derivados de leite, como iogurte, manteiga e queijo, sem a necessidade de previa retirada de interferentes foram estudadas por Conzuelo et al. (2010). A equipe desenvolveu um eletrodo baseado em monocamada de ácido 3-mercaptopropiônico, enzimas β -galactosidase, glicose oxidase, peroxidase em ouro modificado e um mediador, coimobilizados em uma membrana de diálise. O princípio da técnica é a hidrólise da lactose e a rápida oxidação da glicose a ácido glucônico e água oxigenada, que é reduzida pela peroxidase.

Todos estes trabalhos encontrados na literatura voltados para produtos com redução de lactose são bastante recentes, mas comercialmente existem biossensores já disponíveis (Biomilk 300 da Biolan, Delta LactoScope da Perten, Lactosens R da DirectSens e YSI biochemistry analyser da XylemBran). O Biomilk 300 utiliza enzimas e componentes eletroativos, que geram um sinal percebido pelo transdutor amperométrico. Este sensor pode ser utilizado para diversos produtos lácteos, com exceção de manteiga, por não ser miscível em solução aquosa. Dependendo da calibração realizada, o sensor alcança 50 mg.L^{-1} como limite de detecção. O equipamento é fornecido com suprimentos (tampões e soluções de calibração) e apresenta fácil operação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades do mestrado foram desenvolvidas simultaneamente no Laboratório de Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados (INOVALEITE), no Laboratório Nacional Agropecuário de Porto Alegre – RS e no laboratório LZBW (Landwirtschaftliches Zentrum Baden-Württemberg), na Alemanha.

3.1. Preparo de soluções e amostras

As amostras comerciais analisadas representativas dos produtos do mercado estão apresentadas na Tabela 1, totalizando quatorze amostras lácteas. As amostras de leite UHT e achocolatado foram aquecidas a 90 °C, para inativar a enzima β -galactosidase que ainda pudesse estar presente nos produtos. Os produtos líquidos e pastosos foram fracionados em tubos cônicos com capacidade para 50 mL e congelados a -60 °C até o momento da análise, quando foram descongelados em geladeira. As amostras em pó foram armazenadas também em tubos cônicos, em ambiente seco e ao abrigo da luz.

Tabela 1 - Relação de amostras

Código	Amostra
L1, L2	Leite UHT lactose hidrolisado (LH).
L3	Leite em pó LH.
L4	Composto lácteo LH em pó.
L5	Leite UHT LH adicionado de 0,06% (m / m) de lactose.
Y1	logurte natural LH.
Y2, Y3, Y4	logurte LH.
Y5	logurte LH adicionado de 0,06% (m / m) de lactose.
R	Requeijão LH.
D	Doce de leite LH.
F	<i>Cream cheese</i> LH.
C	Achocolatado LH.

Fonte: Silva, K. (2020).

3.2. Glicosímetro

A amostra de doce de leite LH e as amostras em pó (leite em pó LH e composto lácteo LH em pó) foram diluídas em água destilada a 2% (m·m⁻¹), para adequação à escala de leitura do equipamento (10 a 600 mg de carboidrato por dL

de solução) (Accu Check Active, Roche, German), enquanto o restante das amostras foi diluído a 10 % (m·m⁻¹) com água destilada. Uma gota de cada amostra foi aplicada na tira teste compatível com equipamento Accu-Chek, no qual foram realizadas as leituras.

3.3. Método Titulométrico

Empregou-se o método de Lane-Eynon cuja metodologia é descrita na instrução normativa n° 68 (BRASIL, 2006c) para glicídios redutores em lactose.

3.4. Métodos Enzimáticos

O estudo foi realizado com três kits comerciais: K-LOLAC e K-LACGAR (Megazyme, Irlanda) e Lactose / D-glicose (R-Biofarm AG, Alemanha). Este último é administrado com uma pré-etapa de remoção de monossacarídeos com o kit Glucose Removal do mesmo fabricante. As instruções fornecidas pelo manual foram rigorosamente seguidas durante a análise e a absorvância avaliada a 340 nm em espectrofotômetro (Global Analyzer modelo UV-5100).

3.5. Métodos Cromatográficos

3.5.1. HPAEC-PAD

A cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada segue a metodologia do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (BRASIL, 2017b). As amostras também foram destinadas para a análise em laboratório de referência na Alemanha, por HPAEC-PAD, seguindo protocolo da Dionex (PERATI, BORBA E ROHRER, 2016) em um sistema Dionex ICS-3000 (Estados Unidos), com coluna analítica CarboPac PA20 e coluna de proteção CarboPac PA20.

3.5.2. HPLC-RID

A análise por HPLC-RID foi executada segundo metodologia da ISO 22662: 2007 (2007) em um equipamento Shimadzu (Japão) modelo 20 A, coluna de exclusão cromatográfica modelo Shim-pack SPR-Pb e pré-coluna da Phenomenex (Estados Unidos).

3.6. Biossensor

Foi utilizado o Biomilk 300 da DSM, que dispõe de todos os reagentes necessários para a análise. O equipamento foi ativado e calibrado com os reagentes inclusos em seu kit, de acordo com a concentração de lactose da amostra. Amostras líquidas e pastosas foram diluídas em água destilada a 10 % ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$), enquanto as amostras em pó foram diluídas em água destilada a 2% ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$).

3.7. Análises Estatísticas

Os dados foram analisados com o auxílio do programa *SAS University Edition Software*. Oito metodologias de análise de lactose foram aplicadas a cada amostra e comparadas ao método controle (HPLAEC-PAD do laboratório LZBW) utilizando o teste de Dunnett a 5% de probabilidade. As amostras foram analisadas em duplicata, exceto para testes nos laboratórios parceiros e em ensaios enzimáticos.

4. RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES

As metodologias de análise foram aplicadas a diferentes perfis de produtos: leites (L1, L2, L5), leites desidratados (L3 e L4), concentrado (D), queijos (R e F), leite fermentado e iogurtes (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5) e bebida láctea (C) para observar o efeito da composição. As técnicas se comportaram diferentemente entre as amostras, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração de lactose detectada em cada metodologia (% m m⁻¹ ou m v⁻¹)

	Titulométrico		Glicosímetro		Enzimáticos				Biossensor		Cromatográficos					
	Lane-Eynon				K-LACGAR		K-LOLAC		BIOMILK 300		HPLC-RID		HPAEC-PAD LANAGRO		HPAEC-PAD LZBW	
	%	DP	%	DP	%	DP	%	DP	%	DP	%	DP	%	DP	%	DP
L1	6,228*	2,515	0,385*	0,008	0,085	/	0,026	/	0,016	0,007	0,004	0,001	<		<0,01	/
L2	6,581*	2,617	0,414*	0,005	0,097	/	0,031	/	0,005	0,001	0,005	0,001	<		<0,01	/
L3	29,91*	0,911	2,903*	0,004	2,257*	/	0,480	/	0,340	0,004	0,073	0,001	<		0,04	/
L4	25,64*	0,127	2,598*	0,067	3,834*	/	0,951*	/	0,640*	0,019	0,120	0,001	<		0,08	/
L5	2,947*	3,004	0,331*	0,014	0,161*	/	0,115*	/	0,085	0,021	0,052	0,001	0,04	/	0,07	/
Y1	8,511*	8,095	0,469*	0,001	0,690*	/	0,046	/	0,016	0,000	0,008	0,002	-	/	0,01	/
Y2	5,835*	9,656	0,333*	0,004	0,512*	/	0,060	/	0,008	0,003	/	/	-	/	<0,01	/
Y3	8,497*	10,087	0,426*	0,002	0,715*	/	0,030	/	0,019	0,003	0,008	0,001	-	/	0,01	/
Y4	7,238*	10,737	0,408*	0,000	0,484*	/	0,020	/	0,007	0,002	/	/	-	/	0,01	/
Y5	8,223*	11,450	0,366*	0,001	0,846*	/	0,101	/	0,050	0,014	0,008	0,001	-	/	0,06	/
R	1,622*	12,409	0,108*	0,004	0,626*	/	0,187*	/	0,156	0,003	0,016*	0,000	-	/	0,15	/
F	2,905*	12,468	0,233*	0,002	0,273*	/	0,102*	/	0,005	0,002	0,01	0,001	-	/	<0,01	/

C	4,823*	12,115	0,235*	0,009	2,073*	/	0,016*	/	0,576	0,011	/	/	-	/	0,62	/
D	10,74*	10,327	0,890*	0,014	0,350*	/	0,042*	/	0,034	0,002	0,061*	0,001	0,0005	/	<0,01	/

Fonte: Silva, K. (2020).

Nota: L1 e L2 = 2 marcas de leite UHT lactose hidrolisada; L3 = 1 amostra de leite em pó lactose hidrolisada; L4 = 1 amostra de composto lácteo lactose hidrolisada; L5 = 1 marca de leite UHT lactose hidrolisada adicionada de 0,06% (m/m) de lactose; Y1, Y2, Y3 e Y4 = 4 tipos de iogurtes lactose hidrolisada; Y5 = 1 marca de iogurte lactose hidrolisada adicionada de 0,06% (m/m) de lactose; R = 1 amostra de requeijão lactose hidrolisada, D = 1 amostra de doce de leite lactose hidrolisada, F = 1 amostra de *cream cheese* lactose hidrolisada; C = 1 amostra de bebida láctea sabor chocolate lactose hidrolisada; HPLC-RID = cromatografia líquida de alta performance com detector de índice de refração; HPAEC-PAD = cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada; - = análise não realizada; / = não foi possível determinar. Médias seguidas por asterisco na coluna diferem significativamente do controle (HPAEC-PAD LZBW) ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

4.1. Glicosímetro e Método Titulométrico

O glicosímetro Accu-Check é um dispositivo que contém glicose-desidrogenase com coenzima pirroloquinolinaquinona (PQQ) e realiza medição amperométrica. O PQQ é apresenta baixa sensibilidade ao oxigênio ambiente e à interferência eletroquímica, fatores determinantes para a escolha. Porém, é conhecida a característica da galactose e lactose em interferir neste método, sendo detectadas como glicose no sangue (REBEL, 2012). Outras substâncias como triglicerídeos e colesterol podem interferir na medição (EASTHAM, 2009). O ácido ascórbico também atua como interferente na detecção, neste caso fornecendo uma falsa baixa resposta (CONZUELO, 2010). O método Lane-Eynon também é suscetível a interferências por não ser específico para a lactose. É uma técnica de baixo investimento, que apresentou altos valores de desvio padrão. As duas metodologias apresentaram resultados estatisticamente distantes do método de controle em 100% das amostras.

4.2. Métodos Enzimáticos

O kit enzimático K-LOLAC apresentou resultados semelhantes aos da metodologia de controle em 57% das amostras. Divergências também foram observadas em outros estudos (CHURAKOVA et al., 2019; TRANI et al., 2017). Estes resultados podem ser justificados pela hidrólise de GOS inerentes aos produtos; uma vez que o método realiza quantificação indireta de lactose, o resultado pode ser superestimado na presença de glicose de outras fontes, que não apenas a lactose. Devido ao uso de uma β -galactosidase mais seletiva ao dissacarídeo, K-LOLAC supera o outro kit do mesmo fabricante em relação à detecção sob baixa concentração da lactose (K-LACGAR). Essa alteração tecnológica permitiu o desenvolvimento de um material com limite de detecção mais baixo (1,62 mg.L⁻¹ de lactose) em comparação ao K-LACGAR (2,96 mg.L⁻¹), de acordo com os manuais.

O ensaio com K-LACGAR forneceu resultados não estatisticamente diferentes do controle apenas nas amostras mais simples: L1 e L2 (leite UHT LH). O kit R-Biopharm não foi capaz de quantificar o conteúdo de lactose, fornecendo

resultados negativos. Trani et al. (2017). descreveram o mesmo comportamento em amostras com baixa lactose e Churakova et al. (2019) obtiveram valores 20 % superestimados em todas as amostras em comparação com HPAEC-PAD.

4.3. Métodos Cromatográficos

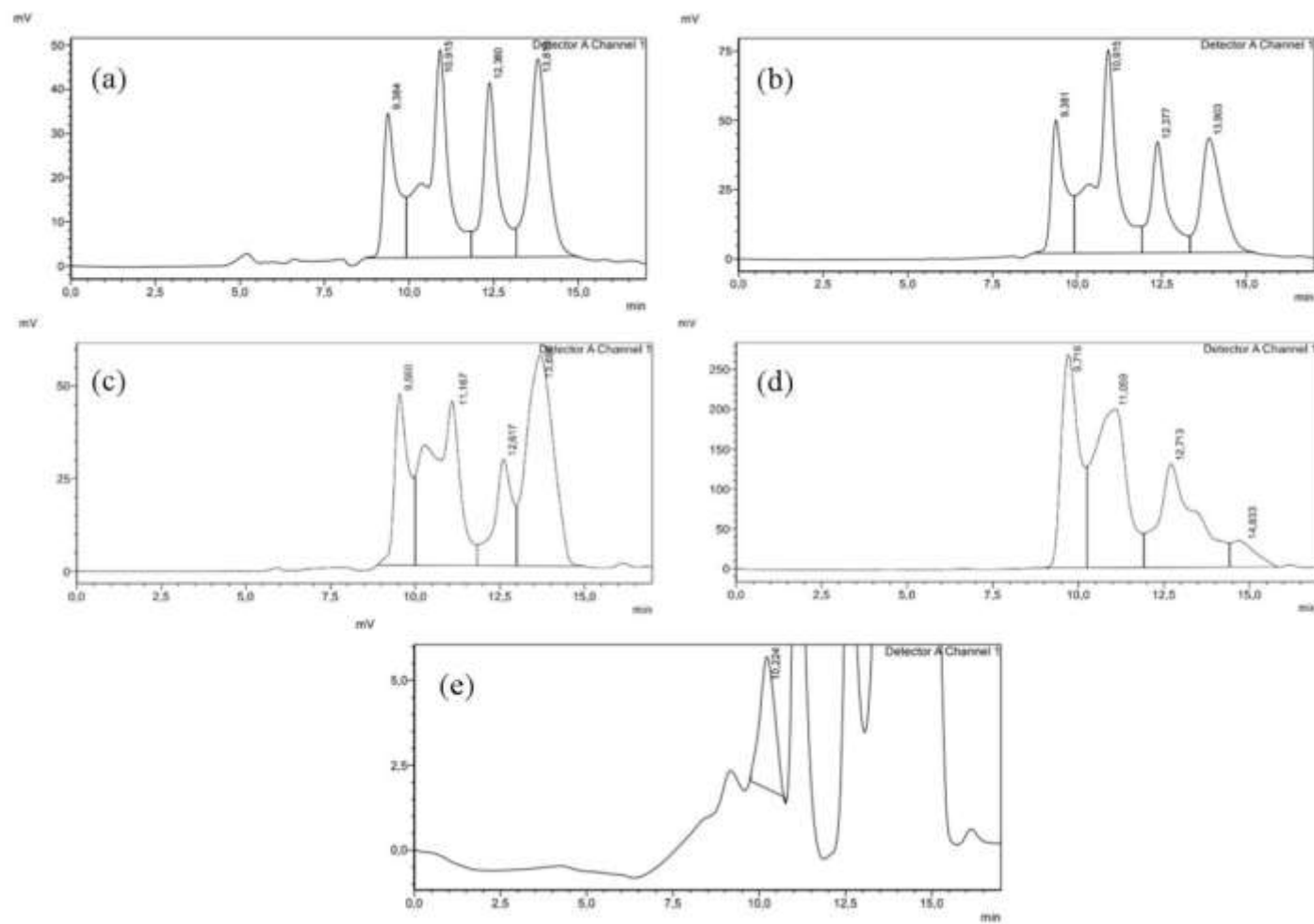
4.3.1. HPAEC-PAD

O laboratório oficial LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário) não possuía metodologias estabelecidas para todos os produtos lácteos. Portanto, foi possível analisar amostras de leite UHT, laticínios desidratados e doce de leite. A metodologia não foi capaz de detectar lactose residual nesses produtos, exceto na amostra adicionada de lactose (L5). Nenhuma amostra analisada apresentou diferença estatística em relação à técnica padrão, convergindo com a literatura (CHURAKOVA et al, 2019; MANGAN et al., 2018; MONTI et al., 2017; TRANI et al., 2017)

4.3.2. HPLC-RID

A metodologia oficial (ISO 22662:2007) (2007) instrui a aplicação de um pré-tratamento para precipitar as frações de gordura e componentes proteicos do leite, mantendo os carboidratos em maior proporção. Neste contexto, os GOS e outros açúcares podem atuar como interferentes no HPLC-RID, sobrepondo o pico de lactose no cromatograma. Dependendo da complexidade da formulação do produto, estas moléculas atuam como interferentes: impossibilitam completamente a leitura da área do pico (Y2, Y4 e C); subestimando-a (D); ou mesmo diminuindo-a (R). Essas interferências são elucidadas na Figura 1.

Figura 1 - Perfil cromatográfico de (a) Y2, (b) Y4, (c) C, (d) D e (e) R obtido a partir da análise por HPLC-RID



Fonte: Silva, K. (2020).

Os cromatogramas apresentam três tipos de interferência na determinação da lactose. Na Figura 1a, Figura 1b e Figura 1c, GOS formam uma cadeia de montanhas impedindo a determinação do tempo de retenção de lactose. Na Figura 1d, o pico mais próximo incrementa o pico de lactose (tempo de retenção = 9,716 min) e torna-se árduo determinar o ponto final em ambos. Na Figura 1e, o software não pode determinar a base real da coleta de lactose (tempo de retenção = 10,224 min) no cromatograma.

A ISO 22662: 2007 (2007) informa que a metodologia não é aplicável a amostras como leite fermentado e produtos lácteos adicionados com oligossacarídeos. No entanto, 65% das amostras não diferiram significativamente do referencial e o DP foi baixo para 79% destas. Churakova et al. (2019) não obtiveram sucesso na quantificação de amostras de conteúdo de lactose abaixo de 0,3% (m.m⁻¹) usando HPLC-RID, devido à co-eluição com alolactose e, possivelmente, com GOS.

4.4. Biossensor

O biossensor possibilitou a quantificação com baixo desvio padrão em todas as amostras e diferiu estatisticamente do controle apenas na amostra L4 (composto lácteo LH em pó). O uso de carvão ativado como pré-tratamento é uma recomendação do manual que pode ser usado para melhorar o desempenho da técnica. Churakova et al. (2019) trabalharam com o mesmo biossensor em comparação com equipamentos de outros fornecedores em amostras de leite e apontaram o Biomilk 300 como o único biossensor comercial capaz de quantificar com precisão a lactose residual no leite com redução de lactose.

4.5. Amostras Adicionadas de Lactose

Nas amostras L5 e Y5 foi possível avaliar a resposta analítica de cada técnica. HPAEC-PAD, HPLC-RID, Biomilk 300, K-LOLAC e K-LACGAR apresentaram aumento na resposta analítica em comparação com amostras sem adição de lactose. No que concerne à legislação brasileira, os métodos enzimáticos

apresentaram valores que seriam reprovados, embora a metodologia de controle conteste estes resultados.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O trabalho utilizou o método HPAEC-PAD como controle para quantificação de lactose e o comparou com oito outras metodologias. Concluiu-se que o HPLC-RID e o biossensor Biomilk 300 apresentaram soluções mais ajustadas para a determinação de lactose em concentração inferior a 0,1% (m.m^{-1} ou m.v^{-1}) em produtos lácteos.

A maior parte das técnicas requer tratamento prévio, capaz de remover macromoléculas, como proteínas e lipídios, mas não é capaz de remover outros carboidratos. A esse respeito, o biossensor é um método prático e eficiente; etapas de pré-tratamento foram dispensadas e foi capaz de determinar resultados para todos os produtos analisados.

A composição das amostras influenciou a resposta de análise, configurando um fator importante e determinante na escolha do método a ser utilizado para quantificar a lactose residual em produtos lácteos hidrolisados.

Almeja-se que os resultados contribuam para a tomada de decisão das equipes de Pesquisa e Desenvolvimento e Qualidade em indústrias de laticínios no que se refere à escolha de metodologias analíticas. Também é esperado que o material forneça relevantes informações ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Em consequência, o trabalho impactará também consumidores que estão em busca de alimentos compatíveis com seus hábitos e que poderão se beneficiar da garantia da qualidade do que é servido.

REFERÊNCIAS

ABBASI, S., SAEEDABADIAN, A. Influences of lactose hydrolysis of milk and sugar reduction on some physical properties of ice cream. **J Food Sci Technol** 52, 367–374 (2015).

ACCU-CHECK. 2008. Monitor de Glicemia. **Manual de Instruções**. Disponível em: https://debemcomavida.accuchek.com.br/media/6114/manual_active.pdf. Acesso em fevereiro de 2020.

AOAC. AOAC Official method 984.15. Lactose in milk. Enzymatic method, in **Official Methods of Analysis of AOAC International**, AOAC, 2005.

ACQUARO JÚNIOR, V. R. et al. Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação através de HPLC com índice de refração para lactose em leite pasteurizado. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 137–145, 2013.

BARRAGAN, J. T. C. **Melhorias nos sistemas de detecção de carboidratos para cromatografia de íons**. 2016. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/325053/1/Barragan_JoseTiagoClau_dino_D.pdf Acesso em: fevereiro de 2020.

BLAIS, B. An automated microassay for lactose in foods employing a simple and inexpensive enzymatic detection system. **Microbiologie-Aliments-Nutrition**, v. 11, p. 43–49, 1993.

BLAIS, B. W.; VAILHEN, C. A novel enzymatic microassay for the determination of lactose in grated parmesan cheese. **Food Control**, v. 6, n. 4, p. 215–217, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Perguntas e Respostas**, 2017a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/2810640/Rotulagem+de+Alerg%C3%AAnicos/283b1a22-d923-4eb1-84fa-cb1a662b7846> Acesso em: fevereiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Determinação de glicídios redutores em lactose pelo Método de Lane-Eynon em Leite**, 2013. Disponível em: <https://docplayer.com.br/22111129-Determinacao-de-glicidios-redutores-em-lactose-pelo-metodo-de-lane-eynon-em-leite.html> Acesso em: fevereiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal./ **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília : MAPA, 2017b.

BRASIL. RESOLUÇÃO - RDC No 135, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017. **Altera a Portaria SVS/MS no29, de 13 de janeiro de 1998, que aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre os**

alimentos para dietas com restrição de lactose. Brasília, DF, 08 fevereiro 2017. Diário Oficial da União, 2017c.

BRASIL. RESOLUÇÃO - RDC No 136, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017. **Estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos.** Brasília, DF, 08 de fevereiro de 2017. Diário Oficial da União, 2017d.

CALIL, S. S.; ROBERTO, P. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. **6ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, p. 1–20, 2011.

CAMPOS, N. S. et al. Lactose quantification in dairy products by accu-check® glucometer. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, 2014.

CARON, K.; TROWELL, S. C. Highly sensitive and selective biosensor for a disaccharide based on an AraC-like transcriptional regulator transduced with bioluminescence resonance energy transfer. **Analytical Chemistry**, v. 6, p. 12986–12993, 2018.

CONZUELO, F. et al. An Integrated Amperometric Biosensor for the Determination of Lactose in Milk and Dairy Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7141–7148, 2010.

CHURAKOVA, E.; PERI, K.; VIS, J. S.; SMITH, D. W.; BEAM, J. M.; VIJVERBERG, M. P.; STOR, M. C.; WINTER, R. T. Accurate analysis of residual lactose in low-lactose milk: comparing a variety of analytical techniques. **Int. Dairy J.** 2019,96, 126–131.

DEKKER, P. J. T.; DAAMEN, C. B. G. Enzymes exogenous to milk in dairy technology: β -d-Galactosidase. In: FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Eds.). **Encyclopedia of dairy sciences**. 2nd. ed. London, UK: Elsevier Ltd, 2011, p. 2:276.

DEKKER, P. J. T.; KOENDERS, D.; BRUINS, M. J. Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. **Nutrients**. 2019.11(3), 551.

DENG, Y.; MISSELWITZ, B., DAI, N.; FOX, M. Lactose Intolerance in adults: biological mechanism and dietary management. **Nutrients**. 2015. 7, 8020–35.

DORNEMANN, G. M. **Comparação de métodos para determinação de açúcares redutores e não – redutores**, 2016. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/143940/000998082.pdf?sequence=1> Acesso em: fevereiro de 2020.

EASTHAM, J. H.; MASON, D.; BARNES, D.I.; KOLLINS, J. Prevalence of interfering substances with point-of-care glucose testing in a community hospital. **Am. J. Health-Syst. Pharm.** 2009, 66:167–170.

EMBRAPA. Gado de Leite. **Anuário Leite 2018: Indicadores, Tendências E Oportunidades Para Quem Vive No Setor Leiteiro**. 2018. p. 62. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>. Acesso em: Fevereiro de 2020.

FAI, A. E. C.; SILVA, J. B.; ANDRADE, C. J.; BUTION, M. L.; PASTORE, G.M. 2014. Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 03: 343-350.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry. **Blackie Academic Professional**, London, 1998. p. 146-237.

FREITAS, M. C. et al. Desenvolvimento de metodologia para análise de amostras lácteas com teor reduzido de lactose utilizando HPLC-ELSD. 11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017. **Anais...** Campinas, São Paulo: 2017.

FRENZEL, M.; ZERGE, K.; CLAWIN-RADECKER, I.; LORENZEN, P.C.. Comparison of the galactooligosaccharide forming activity of different b-galactosidases. 2015. **LWT Food Science and Technology** 60: 1068-1071

GALANT, A. L.; KAUFMAN, R. C.; WILSON, J. D. Glucose: Detection and analysis. **Food Chemistry**, v. 188, p. 149–160, 2015.

GILLE, D; WALTHER, B; BADERTSCHER, R; BOSSHART, A; BRÜGGER, C; BRÜHLHART, M; GAUCH, R; NOTH, P; VERGÈRES, G.; EGGER, L. Detection of lactose in products with low lactose content. **International Dairy Journal**, v. 83, p. 17–19, 2018.

GONZAGA, N. et al. Green method using water for lactose and lactulose extraction and determination in milk by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. **LWT**, 2019. p. 113.

GOSLIN, A.; STEVENS, G.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. 2010. Recent advances refining galactooligo-saccharide production from lactose. **Food Chemistry** 121 (2): 307-318.

GURSOY, O. et al. Development of a new two-enzyme biosensor based on poly(pyrrole-co-3,4-ethylenedioxythiophene) for lactose determination in milk. **Polymer Engineering & Science**, v. 58, n. 6, p. 839–848, 2018.

HRA. **Food & Drink Experts. European Lactose Free Market Report 2017/2018**. 2017. Disponível em: <https://hra-global.com/insights-and-reports/european-lactose-free-market-report-2017-2018/>. Acesso em: fevereiro de 2020.

INTANON, M.; ARREOLA, S. L.; PHAM, N. H.; KNEIFEL, W.; HALTRICH, D.; NGUYEN, T. H. 2014. Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk. **FEMS Microbiology Letters** 353: 89-97.

ISO (International Organization for Standardization). 2007. 22662. Milk and milk products—Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (reference method). **ISO**, Geneva, Switzerland.

JELLEMA; P.;SCHELLEVIS, F. G.; VAN DER WINDT, D. A., KNEEPKENS, C. M., VAN DER HORST, H. E. Lactose malabsorption and intolerance: a systematic review on the diagnostic value of gastrointestinal symptoms and self-reported milk intolerance. **QJM**. 2010. 103: 555–72.

KLEYN, D. H.; TROUT, J. R. Enzymatic-ultraviolet method for measuring lactose in milk: collaborative study. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 67, n. 3, p. 637–40, 1984.

MACIEL, T. E. S. **Correlação de medidas de glicosímetros e dosagem laboratorial.** 2014. Disponível em: http://repositorio.utfpr.edu.br:8080/jspui/bitstream/1/971/1/CT_PGEB_M_Maciel%20c%20Tavany%20Elisa%20Santos_2014.pdf Acesso em: janeiro de 2020.

MANGAN, D., MCCLEARY, B. V., CULLETON, H., CORNAGGIO, C., IVORY, R., MCKIE, V. A., DELANEY, E.; KARGELIS, T. A novel enzymatic method for the measurement of lactose in lactose-free products. **J. Sci. Food Agric.**,2018, 99, 947–956.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. DE C.; CARRILHO, F. J. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. **Clinical and Experimental Gastroenterology** 2012. 5: 113-121.

MCCAIN, H.R.; KALIAPPAN, S.; DRAKE, M.A. Sugar reduction in dairy products. **Journal of Dairy Science**, 2018. 101, 8619–8640.

MEGAZYME. **Lactose & D-galactose (Rapid) Assay Prossedure**. 2020. Disponível em: https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-lacgar_data.pdf Acesso em: fevereiro de 2020.

METZGER, L. Rapid measurement of the lactose content of cheese whey and process cheese using a commercially available blood glucose meter. **Agricultural Utilization Research Institute**, p. 0–10, 2013.

MONTI, L; NEGRI, S.; MEUCCI, A.; STROPPIA, A.; GALLI, A.; CONTARINI, G. Lactose, galactose and glucose determination in naturally lactose free hard cheese: HPAEC-PAD method validation, **Food Chem.** 2017, 220, 18–24.

NAEGELE, E. **Analysis of Lactose Free Dairy Products using the Agilent 1220 Infinity LC with Evaporative Light Scattering Detection**. 2018. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-2252EN.pdf%0A%0A>>. Acesso em: 20 outubro 2018.

NOVOZYMES. **Report: The market for zero-lactose in Brazil.** 2018a. Disponível em: <https://dairylab.novozymes.com/report-zero-lactose-opportunities-in-brazil>. Acesso em: janeiro de 2020.

_____. **Regional opportunities in low lactose.** 2018b. Disponível em: <https://dairylab.novozymes.com/regional-opportunities-in-low-lactose> Acesso em: janeiro de 2020.

_____. **Top trends driving lactose-free opportunities.** 2018c. Disponível em: <https://dairylab.novozymes.com/trends-driving-lactosefree-opportunities> Acesso em: janeiro de 2020.

OTIENO, D.O. 2010. Synthesis of β -galactooligosaccharides from lactose using microbial β -galactosidases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 9: 471-482.

PERATI, P.; BORBA, B. DE; ROHRER, J. **Determination of lactose in lactose-free milk products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection.** 2016. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-248-IC-Lactose-Milk-AN70236-EN.pdf> Acesso em: 28 setembro 2018.

Polícia Federal. 2003. Disponível em: <http://www.pf.gov.br/servicos-pf/produtos-quimicos/legislacao/anexos-da-portaria-1274-03/01-Anexo I - Listas.pdf/view> Acesso em: fevereiro de 2020.

PUBCHEM. Acetonitrile - **OPEN CHEMISTRY DATABASE.** 2019a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetonitrile#section=Top>. Acesso em: fevereiro de 2020.

PUBCHEM. Methanol - **OPEN CHEMISTRY DATABASE.** 2019b. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/887>. Acesso em: fevereiro de 2020.

REBEL, A.; RICE, M. A.; FAHY, B. G. Accuracy of point-of-care glucose measurements. **J. Diabetes Sci. Technol.** 2012, 1;6(2), 396-411.

RESENDE, M. F.; MATOS, M. A. C. Determinação de galactose , glicose e lactose em leite por HPLC. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 33., 2010. Anais... Juiz de Fora: UFJF.

SABIONI, J. G.; SILVA, D. O.; PINHEIRO, A. J. R.; BORGES, A. C.; CHAVES, J. B. P. Control of lactose crystallization in "Dulce de Leche" by *Kluyveromyces lactis* fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n.8, p. 1694-1698, 1984.

SALVO-COMINO, C. et al. Discrimination of Milks with a Multisensor System Based on Layer-by-Layer Films. **Sensors**, v. 18, n. 8, p. 2716, 18 ago. 2018. SBAN. SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO.

SEXTON, D. L. **Determination of lactose by reversed-phase high performance liquid chromatography.** Electronic Theses and Dissertations. East Tennessee State University, 2004.

SILVA, A. F. A. S. **Validação de Métodos Analíticos para controlo de Qualidade de um Medicamento, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, 2016. Disponível em: https://run.unl.pt/bitstream/10362/19455/1/Silva_2016.pdf Acesso em: fevereiro de 2020.

SILVA, K. C. M. **Determinação do Teor de Lactose em Produtos Lácteos: Comparação de Métodos Analíticos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2020.

SILVEIRA, M. F. et al. Simultaneous Determination of Lactulose and Lactose in Conserved Milk by HPLC-RID. **Journal of Chemistry**. 2015.

STORHAUG, C. L.; FOSSE, S. K.; FADNES, L. T. Country, regional, and global estimates for lactose malabsorption in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Gastroenterol Hepatol**. 2017. V.2: p.738–746.

TAVARES, J. T. Q. et al. Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 805–809, 2010.

TEGGE, G., BIRCH, G. G. Analysis of food carbohydrates. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London and New York 1985. **Starch - Stärke**, v. 38, n. 2, p. 71–71, 1 jan. 1986.

TRANI, A.; GAMBACORTA, G.; LOIZZO, P.; CASSONE, A.; FASCIANO, C.; ZAMBRINI, A. V.; FACCIA, M. Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk. **Food Chem**. 2017, 233, 385-390.

TROIANO, R.; DENARO, F.; REUTER, W. M. **The analysis of lactose in milk and cheese products by HPLC with RI detection**, 2016. disponível em: [https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_The_Analysis_of_Lactose_in_Milk_and_Cheese_Products_by_HPLC_Note_012755_01\(1\).pdf](https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_The_Analysis_of_Lactose_in_Milk_and_Cheese_Products_by_HPLC_Note_012755_01(1).pdf) Acesso em fevereiro, 2020.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2nd ed. Taylor e Francis Group, USA, 2006. 739p.