



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA DETERMINAÇÃO DE LACTOSE EM PRODUTOS LÁCTEOS PROCESSADOS
QUALIFICADOS COMO “ZERO LACTOSE”**

Suellen Cristina Gouvêa **Simião**¹; Maria Celeste Teixeira **Diniz**²; Marta Gomes da **Silva**²;
Vera Sonia Nunes da **Silva**³; Sueli Regina **Baggio**⁴

Nº18231

RESUMO – Um método simples e rápido para preparação de amostra e quantificação de lactose em produtos lácteos com baixo teor de lactose ou denominados “zero lactose” por HPLC-ELSD foi avaliado. A lactose é o principal açúcar presente no leite e seus derivados: é um hidrato de carbono, mais especificamente um dissacarídeo, que é composto por dois monossacarídeos: a glicose e a galactose. Uma parcela da população apresenta dificuldade com a digestão da lactose e, para suprir esse público, foram desenvolvidos diversos tipos de alimentos com teores reduzidos desse carboidrato ou sua isenção. A cromatografia líquida é a técnica mais empregada para a determinação de lactose. O objetivo do trabalho foi a quantificação da lactose em produtos lácteos “zero lactose” utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espalhamento de luz evaporativo (HPLC-ELSD). As amostras utilizadas foram: manteiga, nata, requeijão, cottage e queijos (minas, mussarela, prato e parmesão). O método utilizado se baseou em Burgner e Feinberg (1992), utilizando extração dos açúcares através do uso de Carrez. A separação cromatográfica foi obtida utilizando uma coluna base sílica do tipo amino ligado, e fase móvel acetonitrila:água (80:20, v/v). O método foi validado através de linearidade (20 a 125 mg/L - $r^2 > 0,98$), limite de detecção (0,005 a 0,01 g/100 g), limite de quantificação (0,01 a 0,02 g/100g) e recuperação (96,09 a 105,29 %). O teor de lactose foi quantificado em algumas amostras classificadas como zero lactose (cottage), baixo teor de lactose (manteiga, requeijão e queijos) e com alto teor de lactose (nata).

Palavras-chaves: Lactose, produtos lácteos, HPLC-EL SD.

¹ Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Nutrição, UNIP, Campinas-SP; suellengouvea_@hotmail.com

² Colaborador: Assistente Técnico de Pesquisa, ITAL, Campinas-SP.

³ Colaborador: Pesquisador Científico, ITAL, Campinas-SP.

⁴ Orientador: Pesquisador Científico, ITAL, Campinas-SP; sueli@ital.sp.gov.br.



ABSTRACT – *A simple and rapid method for sample preparation and quantification of lactose in dairy products with low level of lactose or so-called "zero lactose" by HPLC-ELSD was evaluated. Lactose is a carbon's hydrate, the principal sugar in milk and its derivatives, more specifically a disaccharide, who is composed by two monosaccharides: glucose and galactose. A Part of population presents difficult with the digestion of lactose. To supply this public, several types of foods were developed with limited contents of this carbohydrate or even its exemption. The liquid cromatography is the most applied technique for determination of lactose. The focus of the research was based at the measurement of lactose in dairy products who presents "lactose free" using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). The samples utilized were: butter, cream, cheese spread, cottage cheese and cheese (minas, mozzarella, process cheese and parmesan). The method was based by Burgner & Feinberg (1992), using sugar's extraction with Carrez. The chromatographic separation was achieved with a silica-based amino column and mobile phase acetonitrile:water (80:20, v/v). The method was validated for linearity (20 to 125 mg/L - $r^2 > 0,98$), limits of detection (0,005 a 0,01 g/100 g), quantification (0,01 a 0,02 g/100g) e recovery (96,09 a 105,29%). The lactose level was quantified in some samples classified as zero lactose (cottage), low level lactose (butter, cheese spread and cheeses) and high level of lactose (cream).*

Keywords: *Lactose, dairy products, HPLC-ELSD*



1. INTRODUÇÃO

Os carboidratos são a maior fonte de energia na dieta humana, representando cerca de 40 a 80% dos valores energéticos necessários. Além do fornecimento de energia, é notável que os carboidratos têm muitos efeitos na fisiologia humana, incluindo saciedade e esvaziamento gástrico (MUIR et al., 2009).

A lactose é o principal carboidrato dos produtos derivados lácteos. É um dissacarídeo composto por glicose e galactose, o único sacarídeo sintetizado por animais (XINMIN et al., 2007)

Na intolerância à lactose o corpo não consegue digerir facilmente a lactose, um tipo de açúcar presente no leite e nos seus derivados. Os sintomas da intolerância podem ser leves ou severos, dependendo da quantidade de lactase que o corpo da pessoa produz. Esses sintomas geralmente se iniciam de 30 minutos a 2 horas depois do consumo de leite ou de algum produto lácteo e se caracteriza por: inchaço, dores e cólicas abdominais, borboríngos, gases, fezes amolecidas e diarreia. (LAKKA e REDDAMONI, 2014).

Pensando na necessidade dos indivíduos que sofrem com a intolerância a lactose, a ANVISA (2017) publicou uma resolução que regulamente a rotulagem de alimentos quanto ao principal sacarídeo do leite, a RDC Nº 135, de 08 de Fevereiro de 2017. Esta norma determina a discriminação nos rótulos como "isentos de lactose" quando a quantidade de lactose for igual ou menor a 100 mg/100 g ou 100 mg/100 mL do alimento pronto para o consumo e "baixo teor de lactose" quando a quantidade de lactose for maior que 100 mg/100 g ou 100 mg/100 mL e igual ou menor do que 1 g/100 g ou 1 g/100 mL do alimento pronto para o consumo.

Existem vários métodos de análise de açúcares e novos instrumentos têm surgido. O HPLC tem consolidado sua posição como técnica analítica no desenvolvimento e aperfeiçoamento, principalmente utilizando colunas de carboidratos. Tem sido uma das técnicas mais indicadas, utilizando o índice de detecção e refração (RID) e a detecção por espalhamento de luz evaporativo (ELSD) (MA et al, 2014). O ELSD é uma interessante alternativa por ser um detector que apresenta maior sensibilidade quando comparado ao RID.

A técnica de HPLC possui muitas vantagens quando comparada aos outros métodos de análise de lactose em leites e derivados. O procedimento de HPLC é mais rápido, mais exato e preciso que técnicas de redução por cobre. A interferência na determinação da lactose pela presença de outros carboidratos tem sido minimizada empregando coluna cromatográfica



adequada e otimizando as condições cromatográficas. Na verdade, o método HPLC é capaz de analisar uma ampla variedade de carboidratos juntamente com a lactose (MA et al, 2014).

Baseado no exposto, o estudo teve como objetivo validar uma metodologia analítica para avaliar o teor de lactose em produtos ‘zero lactose’ utilizando a técnica de HPLC-ELSD.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Para a validação das metodologias foram utilizadas amostras “zero lactose” de manteiga, nata, requeijão, cottage, queijo minas, queijo mussarela, queijo prato e queijo parmesão. O padrão analítico de lactose foi adquirido da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). A fase móvel foi constituída por acetonitrila (grau HPLC) e água deionizada (80:20, v/v). A fase móvel foi filtrada em membrana de 0,45 μm e degaseificada. Os reagentes utilizados para a clarificação das amostras foram: Carrez I (ferrocianeto de potássio 15% m/v) e Carrez II (sulfato de zinco 30% m/v) adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA).

2.2 Métodos

A extração da lactose foi baseada no método de Burgner e Feinberg (1992). O método consiste na extração dos açúcares (lactose) em meio aquoso e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência, como sumariamente descrito na Figura 1.

Para a determinação de lactose nas matrizes “zero lactose” avaliadas (manteiga, nata, requeijão, cottage, queijo minas, queijo mussarela, queijo prato e queijo parmesão) foram testadas diferentes concentrações dos clarificantes Carrez I e II e diferentes alíquotas de amostras, com a finalidade de promover maior eficiência dos clarificantes na precipitação de proteínas e na eliminação de emulsões formadas nas amostras lácteas, com mínima interferência na separação e quantificação da lactose por HPLC-ELSD. A etapa de limpeza tem como finalidade preservar as colunas e pré-colunas utilizadas e manter a integridade do sistema de detecção (ELSD).

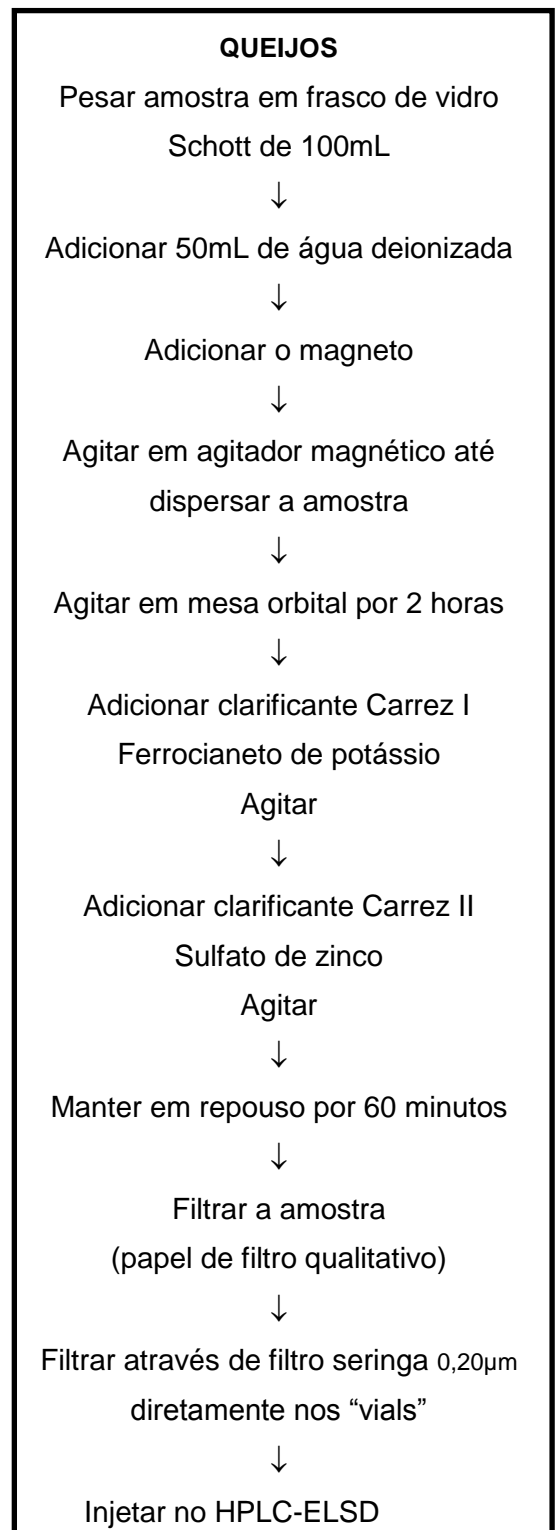
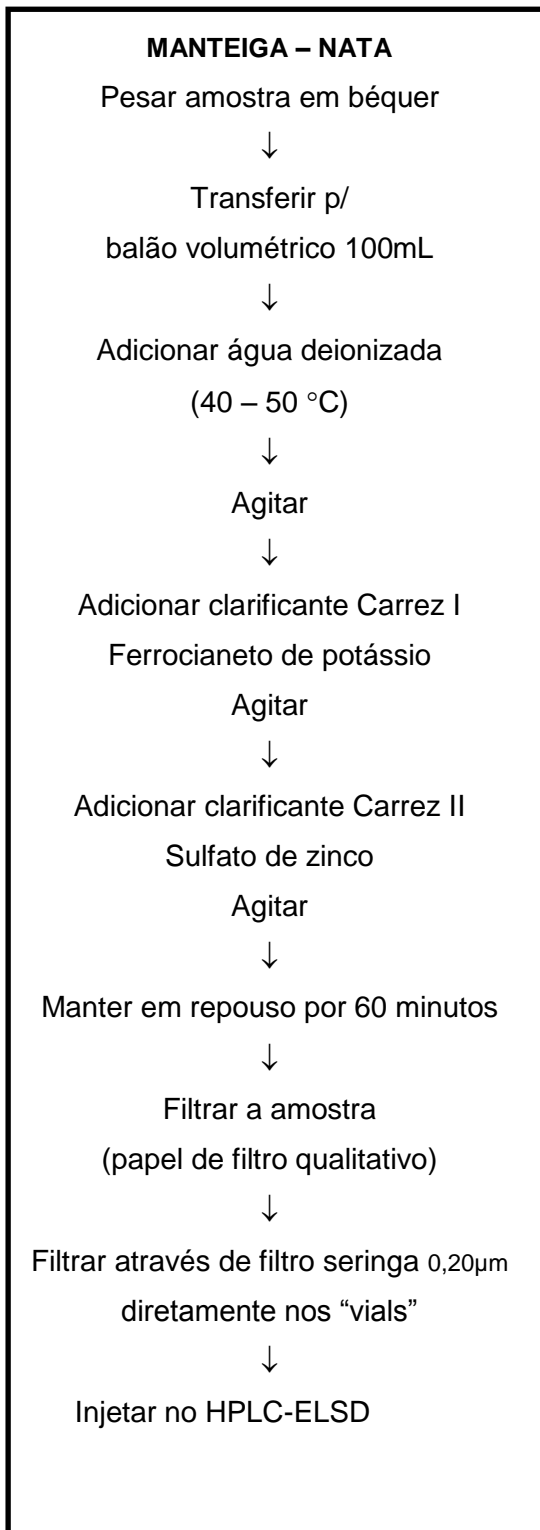


Figura 1 – Fluxogramas da análise de lactose utilizando HPLC-ELSD



Foi utilizado um cromatógrafo líquido marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, com amostrador automático (injeção de 20µL), sistema quaternário de solventes, forno de coluna e detector ELSD.

As condições cromatográficas utilizadas no presente estudo, para a quantificação da lactose, foram as mesmas já estabelecidas no Projeto PIBIC anterior (2016/2017), a saber: coluna Zorbax Carboidrato (4,6 mm ID x 250mm) 5 µm; temperatura da coluna 30°C; fase móvel de acetonitrila:água (80:20) com fluxo de 1,1mL/min; volume de injeção 20 µL; temperatura de nebulização: 50°C; temperatura de evaporação: 80 °C; fluxo de nitrogênio: 2,0 SLM; ganho: 5 PMT; LED: 100%; smoothing: 40 STH; data rate: 40 HZ.

A metodologia analítica foi validada de acordo com Quattrocchi et al. (1992) e DOQ-CGCRE-008 (2017), seguindo os seguintes parâmetros: especificidade/seletividade, linearidade, sensibilidade (limite de detecção e limite de quantificação), exatidão (recuperação) e precisão. Os testes de recuperação foram realizados em triplicata, com adição de três níveis diferentes de concentração de lactose nas amostras.

A identificação dos picos de lactose determinados nas amostras analisadas por HPLC-ELSD foi feita pela comparação dos tempos de retenção do padrão analítico e o da amostra e a confirmação por cromatografia.

A quantificação da lactose foi realizada por padronização externa, empregando uma curva de calibração de lactose de 20 mg/L a 125 mg/L ($r^2 > 0,98$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sensibilidade

Em relação à sensibilidade, os limites de detecção e quantificação para a lactose foram calculados, respectivamente, segundo as Equações 1 e 2, utilizando três pontos com concentrações de lactose inferiores ao menor ponto da curva de calibração, injetados em triplicata.

$$\text{Limite de Detecção} = \frac{y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (1)$$



$$\text{Limite de Quantificação} = \frac{y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

Onde:

y_{bl} = estimativa da resposta do branco

S_{bl} = estimativa de desvio padrão do branco

b = inclinação da curva de calibração

N = número de medidas

Na Tabela 1 estão expressos os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) obtidos para as respectivas matrizes avaliadas na validação.

Precisão do sistema e Precisão do método

Para o cálculo da precisão do sistema cromatográfico (HPLC-ELSD) foram feitas 9 injeções de um padrão de lactose de concentração conhecida (35 mg/L), obtendo um resultado de $34,04 \pm 1,79$ (CV % = 5,28 e CV_{Max} % = 9,41). Para o cálculo da precisão do método foram realizadas no mínimo 6 repetições do procedimento de extração para cada matriz avaliada na validação. A Tabela 1 representa a precisão do método para as matrizes avaliadas.

Tabela 1. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão do método nas matrizes avaliadas

Matriz	LD (g/100g)	LQ (g/100g)	Média (g/100g)	Precisão do método		
				s	CV %	CV _{Max} %
Manteiga	0,01	0,02	0,535	0,016	2,9	4,4
Nata	0,01	0,02	3,654	0,047	1,3	3,3
Requeijão	0,01	0,02	0,129	0,007	5,1	5,4
Cottage	0,005	0,01	0,156	0,030	2,0	5,3
Queijos	0,01	0,02	0,184	0,006	3,1	5,2

s = estimativa de desvio padrão, CV = coeficiente de variação

Ensaio de recuperação

Para avaliar a exatidão do método, os testes de adição e recuperação foram realizados nas matrizes: manteiga, nata, requeijão, cottage, queijo minas, queijo mussarela, queijo prato e queijo parmesão em três níveis de concentração. Para avaliar a exatidão do método foi utilizada a equação 3 abaixo. A recuperação foi calculada segundo a equação 4. Resultados detalhados nas Tabelas 2 a 6, as amostras foram fortificadas com quantidades conhecidas de lactose em triplicata



$$t_{ob} = \frac{|100 - \bar{X}|}{CV} \times \sqrt{n} \quad (3)$$

$$Recuperação (\%) = \frac{[C_1 - C_2]}{C_3} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

\bar{X} : recuperação média

CV: coeficiente de variação

C₁: concentração do analito na amostra fortificada

C₂: concentração do analito na amostra não fortificada

C₃: concentração do analito adicionado à amostra fortificada

Tabela 2. Padrão de lactose adicionado na matriz manteiga e padrão recuperado

Padrão adicionado (mg/L)	Padrão recuperado (mg/L)			Média (mg/L)	s	CV (%)	CV Max (%)	Recuperação (%)
27,2852	26,7588	24,7347	26,1897	25,8944	1,04	4	7	94,90
35,7306	33,1040	33,1325	32,9584	33,0650	0,09	0	7	92,54
43,8797	46,5252	42,9729	43,2132	44,2371	1,99	4	6	100,81
Recuperação Média =								96,09
s =								4,26
CV (%) =								4

s = estimativa de desvio padrão, CV = coeficiente de variação

$$t_{ob} = \frac{[100 - 96,09]}{4} \times \sqrt{3} \rightarrow t_{ob} = 1,691 \rightarrow t_{ob} < t_{tab(95,2)} \rightarrow \text{O método tem a exatidão requerida.}$$

Tabela 3. Padrão de lactose adicionado na matriz nata e padrão recuperado

Padrão adicionado (mg/L)	Padrão recuperado (mg/L)			Média (mg/L)	s	CV (%)	CV Max (%)	Recuperação (%)
60,0274	58,8889	60,0238	58,0745	58,9957	0,98	2	6	98,28
80,0365	80,4151	80,1346	78,8463	79,7986	0,84	1	6	99,70
100,0457	98,6568	100,4117	100,2690	99,7792	0,97	1	6	99,73
Recuperação Média =								99,24
s =								0,83
CV (%) =								1

s = estimativa de desvio padrão, CV = coeficiente de variação



$$t_{ob} = \frac{[100 - 99,24]}{1} \times \sqrt{3} \rightarrow t_{ob} = 1,315 \rightarrow t_{ob} < t_{tab(95,2)} \rightarrow \text{O método tem a exatidão requerida.}$$

Tabela 4. Padrão de lactose adicionado na matriz requeijão e padrão recuperado

Padrão adicionado (mg/L)	Padrão recuperado (mg/L)			Média (mg/L)	s	CV (%)	CV Max (%)	Recuperação (%)
22,0309	23,8294	23,9634	21,8279	23,2069	1,20	5	7	105,34
35,0492	36,3152	32,0608	36,8386	35,0715	2,62	7	7	100,06
48,5682	48,3519	50,6291	52,9393	50,6401	2,29	5	6	104,27
Recuperação Média =								103,22
s =								2,79
CV (%) =								3

s = estimativa de desvio padrão, CV = coeficiente de variação

$$t_{ob} = \frac{[100 - 103,22]}{3} \times \sqrt{3} \rightarrow t_{ob} = 1,857 \rightarrow t_{ob} < t_{tab(95,2)} \rightarrow \text{O método tem a exatidão requerida.}$$

Tabela 5. Padrão de lactose adicionado na matriz cottage e padrão recuperado

Padrão adicionado (mg/L)	Padrão recuperado (mg/L)			Média (mg/L)	s	CV (%)	CV Max (%)	Recuperação (%)
39,4655	38,6299	39,6943	35,7469	38,0237	2,04	5	7	96,35
59,9714	68,3873	63,2166	65,5336	65,7125	2,59	4	6	109,57
79,4068	86,7349	88,7721	86,4023	87,3031	1,28	1	6	109,94
Recuperação Média =								105,29
s =								7,75
CV (%) =								7

s = estimativa de desvio padrão, CV = coeficiente de variação

$$t_{ob} = \frac{[100 - 105,29]}{7} \times \sqrt{3} \rightarrow t_{ob} = 1,309 \rightarrow t_{ob} < t_{tab(95,2)} \rightarrow \text{O método tem a exatidão requerida.}$$



Tabela 6. Padrão de lactose adicionado na matriz queijo e padrão recuperado

Padrão adicionado (mg/L)	Padrão recuperado (mg/L)		Média (mg/L)	s	CV (%)	CV Max (%)	Recuperação (%)	
39,7670	37,1921	35,7818	34,3728	35,7822	1,41	4	7	89,98
60,4297	58,0369	58,2596	57,6512	57,9825	0,31	1	6	95,95
80,0135	84,5166	80,7060	87,4141	84,2122	3,36	4	6	105,25
Recuperação Média =							97,06	
s =							7,69	
CV (%) =							8	

s = estimativa de desvio padrão, CV = coeficiente de variação

$$t_{ob} = \frac{[100 - 97,06]}{8} \times \sqrt{3} \rightarrow t_{ob} = 0,636 \rightarrow t_{ob} < t_{tab(95,2)} \rightarrow \text{O método tem a exatidão requerida.}$$

Para todas as amostras validadas o t_{ob} foi menor que o $t_{tab(95,8)}$ ($t_{ob} < t_{tab(95,8)} 4,303$), mostrando que o método apresentou exatidão requerida para todas as matrizes avaliadas.

4. CONCLUSÃO

O método utilizando HPLC-ELSD para a determinação de lactose em amostras “zero lactose” mostrou ser simples, apresentando recuperação adequada para as matrizes avaliadas (manteiga, nata, requeijão, cottage, queijo mussarela, queijo prato, queijo minas e queijo parmesão). Os parâmetros avaliados na validação: linearidade, repetibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão confirmam a viabilidade de aplicação do método para análises de rotina de lactose em amostras com baixo teor de lactose, suprimindo uma exigência recente da legislação nacional ANVISA.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica concedida e ao CCQA-ITAL pelo suporte financeiro para a realização do trabalho.



6. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde - **ANVISA**. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 135, de 8 de Fevereiro de 2017. Diário Oficial da União, Brasília, DF, nº 29, de 9 de fevereiro de 2017.
- BURGNER, E.; FEINBERG, M. Determination of mono and disaccharides in foods by interlaboratory study: Quantitation of Bias components for liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 443-464, 1992.
- DOQ-CGCRE-008, Orientação sobre validação de métodos analíticos, **INMETRO**, revisão 06, 2017.
- LAKKA, N. S.; REDDAMONI, S. Y. Development and validation of RP-HPLC RID method for lactose monohydrate in solid dosage forms. **International Journal of Biopharmaceutics**. Hyderabad, p. 13-18. 2014.
- MA, C.; SUN, Z.; CHEN, C.; ZHANG, L.; ZHU, S. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. **Food Chemistry**, v. 145, p.784-788, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.135>.
- MUIR, J. G., ROSE, R., ROSELLA, O., LIELS, K., BARRETT, J. S., SHEPHERD, S. J., GIBSON, P. R.. Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 554-565, 2009.
- QUATTROCCHI, O. A., ANDRIZZI, S. A., LABA, R. F. **Introducción a la HPLC aplicación y práctica**. Buenos Aires. Artes Prácticas Farro S.A. p. 301-328, 1992.
- XINMIN, W.; RUILI, Z.; ZHIHUA, L.; YUANHONG, W. TINGFU, J. Determination of glucosamine and lactose in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography. **Journal Of Food Composition And Analysis**. Qingdao, p. 255-258, out. 2007.