

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E  
DERIVADOS

**Laura Ribeiro Costa**

**Espectrometria no Infravermelho Médio e PLS-DA aplicados na classificação de leites  
UHT submetidos à hidrólise enzimática: Um estudo exploratório**

**Juiz de Fora**

**2019**

**Laura Ribeiro Costa**

**Espectrometria no Infravermelho Médio e PLS-DA aplicados na classificação de leites UHT submetidos à hidrólise enzimática: Um estudo exploratório**

Trabalho apresentado ao curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

**Juiz de Fora**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ribeiro Costa, Laura.

Infravermelho Médio em associação com Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais aplicado na classificação de leite UHT e leites submetidos à hidrólise enzimática: Um estudo exploratório / Laura Ribeiro Costa. -- 2019.

58 p.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2019.

1. PLS-DA. 2. FT-MIR. 3. Lactose. 4. Análise Discriminante. 5. UHT. I. Augusto Leal de Oliveira, Marcone, orient. II. Título.

**Espectrometria no infravermelho médio e PLS-DA aplicados na  
classificação de leites UHT submetidos à hidrólise enzimática  
da lactose: um estudo exploratório**

**LAURA RIBEIRO COSTA**

**ORIENTADOR (A): MARCONE AUGUSTO LEAL DE OLIVEIRA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 30/08/2019.

*Brenda Lee Simas Porto*

Profa. Dra. Brenda Lee Simas Porto  
Universidade Federal de Minas Gerais

*Carina de Almeida Bastos*

Profa. Dra. Carina de Almeida Bastos  
Faculdade do Sudeste Mineiro- FACSUM

*Paula Rocha Chellini*

Profa. Dra. Paula Rocha Chellini  
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Marcone Augusto Leal de Oliveira*

Prof. Dr. Marcône Augusto Leal de Oliveira  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho a meu querido marido Luís, pelo amor e compreensão incondicional, às minhas filhas Lara e Laís que são o motivo de minhas lutas e razão da minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me levado em seu colo poderoso, por este caminho de pedras que percorri, por iluminar meus momentos obscuros, por me dar clareza de pensamentos para aprender a cada dia.

À minha mãe Clélia que está no céu e me fez esta guerreira.

Ao meu eterno amor Luís, que foi minha fortaleza, meu apoio, meu parceiro, nossa vida juntos é meu orgulho e está expressa neste trabalho.

Às minhas filhas Lara e Laís, que estiveram comigo todo o tempo, assistiram aula, dormiram no colo enquanto fazia trabalho, dormiram cedo para que eu pudesse estudar vocês merecem toda minha gratidão, é por vocês a minha luta e é para vocês a minha vitória.

A minha parceira e amiga Ana que foi meu apoio em todos os momentos, sem você não chegaria até aqui.

A minha cunhada Isabel e ao cunhado Jucely, por estarem presentes sempre e as minhas sobrinhas queridas Carol e Duda. A minha querida amiga Neiva e amigo Altamir, pelo carinho.

A minha tia Marize que sempre me apoiou com palavras de carinho e fé, não tenho palavras para expressar minha gratidão.

Ao meu orientador, Marcone, pelas palavras de apoio e pela confiança de me entender nos momentos mais difíceis.

Aos amigos, Lucas, Leandra e Renata pela grande ajuda na execução deste trabalho.

A todos os professores e funcionários da UFJF e Embrapa, que tiveram sua cota de contribuição na finalização deste trabalho.

Enfim, a todos que estiveram comigo nesta caminhada e contribuíram para finalização deste trabalho, minha gratidão e muito obrigada.

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado. “Roberto Shinyashiki”.

## RESUMO

Há um claro aumento na porcentagem de novas bebidas e produtos alimentícios, disponíveis ao consumidor, que se posicionam “zero lactose, ou com redução de lactose”, no Brasil, nos últimos anos. Entretanto o aumento da produção demanda rigoroso controle dos teores informados nas embalagens de produtos lácteos, uma vez que tal controle tem implicações diretas na saúde de indivíduos com intolerância à lactose. Dentro deste contexto, esta dissertação teve como proposta investigativa a aplicação do infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-MIR) em associação com análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), como método, rápido, preciso, e exato, para diferenciar leites hidrolisados disponíveis ao consumidor. Foram utilizadas seis marcas de leite UHT regular e zero lactose adquiridos no mercado local. *A priori* a etapa de análise no FT-MIR, a amostra foi submetida à homogeneização e estabilização da temperatura, tendo sido necessária apenas uma alíquota de 1,0  $\mu\text{L}$  para a medida, que foi gotejada sobre o cristal de ATR, as varreduras realizadas dentro da janela espectral de 350 à 4500 número de onda onde procuramos encontrar as ligações químicas referentes ao estiramento (-OH). Foram utilizadas três variáveis latentes. Foram utilizadas seis marcas de leites UHT sendo que uma de cada grupo, no total de 12 amostras em três repetições. Os resultados obtidos através do FT-MIR/PLS-DA conseguiram discriminar e classificar leites regulares de zero lactose de maneira eficaz e eficiente.

Palavras chave: Hidrolise Enzimática, FT-MIR, Análise Discriminante, PLS-DA,  
Leite UHT, Lactose.

## ABSTRACT

There is a clear increase in the percentage of new beverages and food products available to consumers that are positioned “zero lactose or reduced lactose” in Brazil in recent years. However, increased production demands strict control of the reported contents of dairy packaging, since such control has direct implications for the health of individuals with lactose intolerance. Within this context, this dissertation had as its investigative proposal the application of Fourier transform medium infrared (FT-MIR) in association with partial least squares Discriminant analysis (PLS-DA), as a fast, exact and accurate method to differentiate hydrolyzed milks available to the consumer. Six brands of regular UHT and zero lactose milk purchased from the local market were used. A principle prior to experience the FT-MIR analysis step, the sample was subjected to temperature homogenization and stabilization, requiring only a 1.0  $\mu\text{L}$  aliquot for the measurement, which was dripped on the ATR crystal, the scans performed inside from the spectral window of 350 to 4500 $\text{cm}^{-1}$  wavelength where we seek to find the chemical bonds referring to the stretch (-OH). Three latent variables were used. Six brands of UHT milk were used, one from each group, totaling 12 samples in three replicates. The results obtained through FT-MIR / PLS-DA was able to discriminate and classify regular zero lactose milks effectively and efficiently.

Key-words: Enzymatic Hydrolysis, FT-MIR, Discriminant Analysis, PLS-DA, UHT Milk, Lactose.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Formas alfa ( $\alpha$ ) da molécula de lactose presentes no leite.....	19
Figura 2 – Formas beta ( $\beta$ ) da molécula de lactose presentes no leite.....	19
Figura 3 – Hidrólise da lactose pela $\beta$ -galactosidase.....	22
Figura 4 – Espectro eletromagnético.....	31
Figura 5 – Modos de vibração.....	32
Figura 6 – Esquema do acessório ATR.....	35
Figura 7 – Esquema da matriz.....	36
Figura 8 – Espectros das amostras de leites UHT de 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .....	41
Figura 9 – Espectros das amostras de leites zero lactose de 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .....	41
Figura 10 – Espectros das amostras selecionadas para o experimento, compreendendo a região 3600-950 $\text{cm}^{-1}$ .....	41

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Composição média do leite (g/100g) das principais raças bovinas leiteiras.....	17
Tabela 2 – Informações do rótulo dos produtos com baixos teores de lactose.....	21
Tabela 3 – Modelagem das amostras - PLS-DA .....	47

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – PLS-DA com dados espectrais brutos LV1 x LV2.....	42
Gráfico 2 – PLS-DA com dados espectrais brutos LV1 x LV3.....	42
Gráfico 3 – PLS-DA com dados espectrais centrados na média LV1 x LV2.....	43
Gráfico 4 – PLS-DA com dados espectrais centrados na média LV1 x LV3.....	44
Gráfico 5 – PLS-DA com dados espectrais centrados na média LV2 x LV3.....	44
Gráfico 6 – PCA com dados espectrais brutos PC1 x PC2.....	45
Gráfico 7 – PCA com dados espectrais centrados na média PC1 x PC2.....	45
Gráfico 8 – PCA com dados espectrais centrados na média PC1 x PC3.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais do inglês: <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATR	Reflexão total atenuada do inglês: <i>Attenuated Total Reflexion</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
FT	Transformada de Fourier do inglês: <i>Fourier Transformed</i>
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FIL	Federação Internacional de laticínios
GNPD	<i>Global New Products Database</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography.</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LV	Variável latente do inglês: <i>level variable</i>
MIR	Infravermelho Médio do inglês: <i>Medium Infrared.</i>
NIR	Infravermelho Próximo do inglês: <i>Near infrared</i>
OMA of AOAC	Métodos oficiais de análise da AOAC do inglês; <i>Official Methods of Analysis of AOAC</i>
PCA	Análises dos componentes principais do inglês: <i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	Regressão dos mínimos quadrados parciais do inglês <i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SUS	Sistema Único de Saúde
SPM	Separação por Membrana
UHT	Ultrapasteurizado por tratamento térmico Especial do inglês: <i>Ultra Hight Temperature.</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	17
2.2 LACTOSE.....	18
2.3 LEGISLAÇÃO E ROTULAGEM.....	20
2.4 RÓTULOS ADEQUADOS ATÉ 2019.....	20
2.5 MÉTODOS PARA ELIMINAÇÃO DA LACTOSE.....	21
2.6 IMPLICAÇÕES NA SAÚDE HUMANA.....	25
<b>2.6.1 Fisiopatologia</b> .....	26
<b>2.6.2 Diagnóstico</b> .....	26
2.7 MÉTODOS DE ANÁLISE.....	28
<b>2.7.1 Espectroscopia Óptica</b> .....	29
<b>2.7.2 Técnica de Espectroscopia Infravermelho</b> .....	30
<b>2.7.3 Princípios da Espectroscopia no Infravermelho</b> .....	30
<b>2.7.4 Aplicações da Espectroscopia no Infravermelho</b> .....	33
<b>2.7.5 ATR</b> .....	34
2.8 QUIMIOMETRIA.....	35
<b>2.8.1 PCA</b> .....	36
<b>2.8.2 PLS-DA</b> .....	37
<b>2.8.3 Variáveis Latentes</b> .....	39
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
3.1 AMOSTRAS DE LEITE.....	40
3.2 PROCEDIMENTO.....	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>6 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial cresce a uma taxa de 83 milhões de pessoas por ano. Assim, em 2050, o planeta abrigará cerca de 9,6 bilhões de habitantes, com a necessidade do aumento da disponibilidade de produtos alimentares que supram as carências nutricionais dos indivíduos (ONU, 2019). Diante desta perspectiva, a segurança alimentar, a produção sustentável e a busca do alimento seguro são desafios para o futuro (ONU, 2019).

Neste contexto o leite é considerado um alimento muito rico em nutrientes e está presente em todas as espécies de animais mamíferos. Desde o nascimento do ser humano, o leite apresenta-se quase indissociável de sua alimentação. A melhoria na qualidade de vida do ser humano é ressaltada pela vital necessidade de se ter alimentos saudáveis. O leite se torna de fundamental importância para o organismo humano, por conta de ter em sua constituição água, proteínas, cálcio, carboidratos, gordura, vitaminas e entre outros. O principal carboidrato do leite e consequentemente de outros produtos lácteos é a lactose, presente em todas as espécies de mamíferos (EMBRAPA, 2013).

A lactose é um açúcar presente no leite e é a fonte de energia mais importante durante o primeiro ano de vida dos mamíferos, pois fornece quase metade da necessidade energética total necessária para o desenvolvimento do organismo. É também de extrema importância para a indústria alimentícia, pois possui várias aplicações em produtos e processos produtivos, sendo necessária para elaboração de doces, confeitos, pães e recheios, etc., devido as suas propriedades funcionais, pois confere boa textura, cor e associação para água (RAMALHO et al., 2016).

A intolerância à lactose é definida como o conjunto de sintomas como dores abdominais, diarreia, flatulência, náuseas e vômitos após a ingestão da lactose. Quando sistêmicos, podem oferecer outros sintomas, conhecidos como secundários, que se caracterizam por dores de cabeça, dificuldades de concentração e redução de memória, dores musculares, arritmia cardíaca, úlceras bucais e reações alérgicas, como rinites, eczemas, sinusite e asma (DIETRICH, 2011).

Estudo aponta que a não persistência da lactase, ou intolerância à lactose, está presente em 65% da população mundial (INGRAM et al., 2009), e acomete em torno de 2 a 15% dos indivíduos descendentes de norte europeus, 60 a 80% dos negros e latinos e 80 a 100% dos índios americanos e asiáticos (SWAGERTY et al., 2002). No Brasil, um estudo mostrou que a prevalência de intolerância a lactose primária no adulto, em uma amostra de 567 indivíduos, foi de 57% nos brancos e mulatos, 80% nos negros e de 100% nos japoneses (MATTAR et

al., 2009). Considerando um consumo total de leite, iogurte e queijo em mais de 200 milhões de toneladas em 2011, produtos lácteos sem lactose representam uma oportunidade substancial para os fabricantes de laticínios (IFT, 2012).

Ocupando o quinto lugar mundial em produção leiteira, o Brasil produziu em 2018 24,4 bilhões de litros de leite (IBGE, 2019). No Brasil, as taxas de crescimento anual do consumo de leite nos últimos dez anos são superiores ao crescimento mundial: média 2,7% ao ano (EMBRAPA, 2019). Apesar disto o consumo médio da população brasileira ainda se encontra abaixo do recomendado pelo Ministério da Saúde e pela Organização Mundial da Saúde, que recomenda consumir cerca de 210 Litros de leite por ano por pessoa. No Brasil, porém, a produção de leite está inferior ao recomendado, com fornecimento de cerca de 166 Litros de leite/habitante/ano (EMBRAPA, 2019).

Embora os produtos lácteos zero lactose sejam atualmente um segmento de mercado, é claro que eles têm um potencial considerável em longo prazo. As oportunidades mais significativas estão em mercados com uma prevalência de intolerância à lactose e onde o consumo de produtos lácteos está aumentando, como a Ásia e a América Latina. (IFT, 2012). Em 2018, a quantia de leite em pó importada pela China foi de 801,4 mil toneladas, o que corresponde a 16% do mercado global. De fórmulas infantis, foram 324,5 mil toneladas (30% do mercado global), seguida de soro de leite, com 557,2 mil toneladas (29% do mercado), queijos, com 108,3 mil toneladas (4% do mercado) e leite UHT, com 673,3 mil toneladas (27%) (MILK POINT, 2019).

O brasileiro consome principalmente leite fresco e iogurte, enquanto a demanda por queijo e manteiga segue baixa. O consumo per capita de manteiga é de 0,4 quilos por ano, ante 1,6 quilos no Uruguai. Já o de queijo é de 3,8 quilos por habitante ao ano no Brasil, abaixo dos 10 quilos na Argentina e 26 na França (FEED&FOOD, 2019).

Há um claro aumento na porcentagem de novas bebidas e produtos alimentícios que se posicionam “sem, ou com redução de lactose”, no Brasil, nos últimos três anos. O banco global de dados de novos produtos da Mintel (GNPD-Global New Products Database) mostra que 5,9% dos lançamentos, em 2015, de comida e bebida, trouxeram informações na embalagem indicando quantidade reduzida, ou ausência, de lactose. Comparando com os anos anteriores, esse percentual foi de 3,8% em 2014 e 3,1%, em 2013 (MINTEL, 2016). Entretanto, o aumento da produção, demanda um rigoroso controle dos teores informados nas embalagens de produtos lácteos (MINTEL, 2016).

A regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), principalmente, à Lei 13.305/2016 que começou a vigorar em janeiro de 2017, é obrigatório

que os fabricantes informem a presença de lactose nos alimentos. Segundo as regras, a obrigatoriedade é válida para alimentos com mais de 100 mg de lactose para cada 100 g ou mL do produto. Assim, qualquer alimento que contenha lactose em quantidade acima de 0,1% deve trazer a expressão “Contém lactose” no rótulo.

A ANVISA publicou duas novas resoluções, a primeira é a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 135/2017 que inclui os alimentos para dietas com restrição de lactose no regulamento de alimentos para fins especiais. A segunda é a RDC 136/2017, que define como as informações de lactose devem ser colocadas no rótulo, independentemente do tipo de alimento. Onde foram estabelecidos limites máximos de lactose. A legislação internacional estabelece o limite de 0,5% de lactose para que os produtos possam ser considerados e ou obter rótulo com zero lactose.

Os consumidores estão cada vez mais buscando, devido à moda das dietas restritivas a ingestão de alimentos “zero lactose” mesmo sem o diagnóstico de intolerância. Neste sentido, as indústrias visam atender as expectativas de mercado, dedicando-se em inserir em sua linha de produção alimentos delactosados, que além de saborosos tragam benefícios à saúde. As famílias são um importante mercado-alvo para produtos lácteos sem lactose, especialmente para pais que desejam que sua família se beneficie de nutrientes lácteos, mesmo que sejam intolerantes à lactose. Incentivar o consumo de laticínios é particularmente importante para lidar com as deficiências de cálcio e vitamina D (IFT, 2012).

Diante deste cenário positivo para a cadeia de lácteos e a perspectiva para os produtos delactosados, tem levado as indústrias a investir em novas tecnologias para retirada da lactose do leite. Em busca de diversificar a sua carta de produtos as indústrias vem buscando aumentar o número de produtos “zero lactose”. A presença ou ausência de lactose no leite bovino trouxe ao mercado leites, queijos, iogurtes e demais derivados, alimentos que compõem a dieta de grande parte da população com a característica de ser zero lactose ou teor reduzido de lactose. A ingestão de quantidades de lactose por pessoas intolerantes é uma ameaça à saúde do consumidor, principalmente a de crianças e idosos, faixa etária mais vulnerável a esses efeitos adversos.

Atualmente o método aprovado para análise de lactose é o método titulométrico de Lane-Eynon do Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento e da Secretaria de Vigilância Sanitária (MAPA/SVS) que é utilizado para leite e produtos lácteos, e determina açúcares redutores e não redutores, mas não contempla outros produtos que contenham lactose, e possui possibilidade de erro analítico que pode ser causado por impureza dos reagentes, limpeza inadequada, homogeneidade da amostra, capacitação e habilidade do

analista. As técnicas analíticas como a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), já são utilizadas com resultados eficientes, mas possui custo elevado de equipamentos e reagentes, necessita de muita manipulação da amostra além de ser um ensaio destrutivo e precisar de pessoal altamente capacitado. A análise por Infravermelho utiliza volumes pequenos de amostra e vêm trazer rapidez, sensibilidade e ensaios não destrutivos. Já a Eletroforese Capilar vem contribuir com uma metodologia analítica que além da sensibilidade proporciona excelente separação utiliza volumes pequenos de amostra.

Existe a necessidade de se encontrar um método que seja, rápido, sensível, barato, e que possa ser utilizado para amostras diversas, como leites e que possa ser utilizado com exatidão e precisão para determinação da lactose na indústria e classificação dos leites.

A detecção periódica de resíduos de lactose está prevista na legislação brasileira, entretanto, o método é demorado e utilizado para determinação de açúcares totais. Não está disponível um método de detecção seguro, rápido e sistematizável capaz de indicar a presença desses resíduos ainda no processo de triagem. A aplicação de técnicas de Espectroscopia de Absorção no Infravermelho destaca-se como potencial ferramenta analítica, pois fornecem resultados rápidos, quantitativos e confiáveis, utilizando pouquíssima amostra não demandando nenhum pré-tratamento das mesmas.

Classificamos os leites em regulares e zero lactose utilizando as técnicas de Espectroscopia óptica de Infravermelho assessorado por PLS-DA, com base nos limites previstos na legislação. Como o objetivo criar uma modelagem que consiga classificar e detectar possíveis falhas no processo de produção e teores de lactose acima do registrado nas embalagens.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE

O leite sob o ponto de vista legal é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2002). É considerado o mais nobre dos alimentos, pois sua composição é rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas, garantindo proteção imunológica e maior fonte de cálcio absorvível ao homem, seja ele criança, jovem ou adulto. Além do seu elevado valor nutritivo, oferece elementos anticarcinogênicos presentes na sua gordura, como o ácido linoléico conjugado, ácido butírico,  $\beta$ -caroteno, vitamina A e D (MÜLLER, 2002 apud TREVISAN, 2008).

O leite é uma dispersão aquosa complexa que contém diversas substâncias como gordura no estado emulsificado (pequenos glóbulos), proteínas no estado coloidal (micelas de caseínas de 50 a 500 nm), ou dispersas no estado molecular (proteínas do soro) e, compostos orgânicos e inorgânicos solubilizados, como sais, lactose, vitaminas hidrossolúveis e substâncias nitrogenadas não proteicas (FOX, 1998). Mais de 100.000 espécies de moléculas diferentes são encontradas no leite. No entanto, sua composição pode ser simplificada nos componentes: gordura, proteína, lactose, sais minerais e sólidos totais (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição média do leite (g/100g) das principais raças bovinas leiteiras.

Raça	Gordura	Proteína	Lactose	Sólidos totais	Sais minerais
Holandesa	3,62	3,27	4,86	12,30	0,68
Pardo Suíço	4,08	3,57	5,04	13,30	0,73
Jersey	5,16	3,83	4,94	14,54	0,70
Guernsey	5,03	3,82	4,91	14,40	0,74
Ayrshire	4,07	3,47	4,69	12,83	0,68
Zebu(Bos indicus)	4,70	3,20	4,90	13,50	0,70

Fonte: Adaptado WALSTRA et.al, 2005

As proteínas do leite contêm todos os aminoácidos essenciais necessários para a dieta humana e essa é uma das principais razões que torna o leite, o alimento mais completo à disposição do homem (FOX, 2009).

## 2.2 LACTOSE

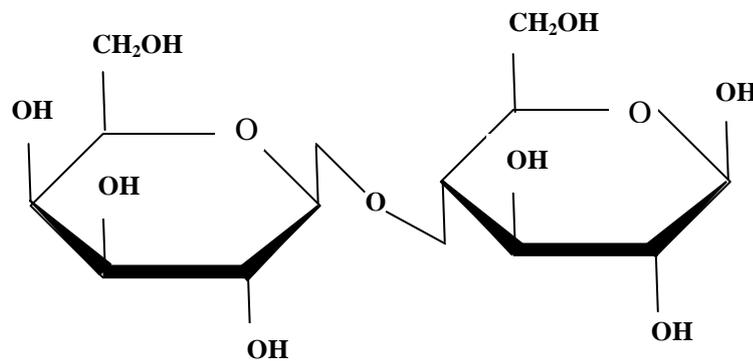
A lactose é o principal açúcar presente no leite de mamíferos. Quando alimentos contendo lactose são ingeridos, este açúcar é processado pela enzima lactase e transformada em glicose e galactose. Na maioria das pessoas, a atividade da enzima lactase diminui após o desmame e leva as pessoas a se tornarem menos tolerante à lactose com o passar dos anos. A prevalência e a idade de manifestação da intolerância à lactose variam, consideravelmente, conforme o grupo étnico. Na Europa, por exemplo, sua prevalência vai de 4% na Dinamarca e Irlanda a 56% na Itália (BRASIL, 2017a).

A lactose está totalmente em solução verdadeira na fase aquosa do leite, representando aproximadamente a metade dos sólidos não gordurosos e contribuindo para o valor energético do leite, pois cerca de 30% das calorias fornecidas pelo leite são devidos à lactose (quatro calorias por grama). Pequenas quantidades de outros carboidratos são encontradas no leite, parcialmente ligados à fosfatos, lipídeos e ou proteínas e parcialmente livres, como por exemplo, os monossacarídeos glicose e galactose a uma concentração de aproximadamente 10 mg/L e os oligossacarídeos a aproximadamente 100 mg/L (RENNER, 2001 apud VINHAL, 1983).

A concentração de lactose no leite varia de 4,8 a 5,2%, e as moléculas encontram-se na forma mono-hidratada. Outros carboidratos, como a glicose, frutose, glicosaminas, galactosaminas e alguns oligossacarídeos, estão presentes em quantidades traço no leite. A molécula de lactose é opticamente ativa e pode ser encontrada nas formas  $\alpha$  e  $\beta$ , de acordo com a posição da hidroxila (-OH) do carbono número 1 da glicose (Figura 1). A mudança de posição faz com que o ângulo de desvio da luz polarizada da forma  $\alpha$  seja  $+89,4^\circ$  e o da forma  $\beta$ , seja  $+35^\circ$  (Figura 2). Do ponto de vista funcional, há diferenças entre as duas formas da molécula com relação à solubilidade, tamanho e forma dos cristais, capacidade edulcorante e higroscopicidade ou grau de hidratação (FOX, 1998).

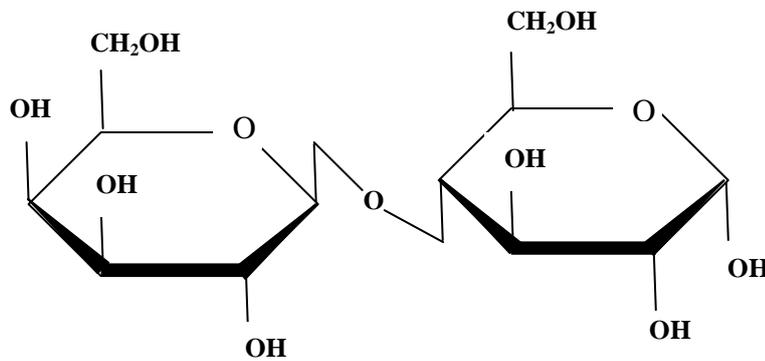
Geralmente,  $\alpha$ -lactose cristaliza como hidrato, contendo quantidades equimolares de lactose e água, sendo seus cristais bastante duros e não higroscópicos. A temperatura ambiente a  $\beta$ -lactose anidra se dissolve mais rapidamente que o hidrato de  $\alpha$ -lactose e sua solubilidade é aproximadamente dez vezes maior, sendo seus cristais menores, mas com uma maior área superficial (WALSTRA & JENNESS, 1984).

Figura 1 - Forma alfa ( $\alpha$ ) de lactose presente no leite.



Fonte: Elaborada pela autora adaptado (GÄNZLE, HAAZE E JELEN, 2008)

Figura 2 - Forma beta ( $\beta$ ) da lactose presente no leite.



Fonte: Elaborada pela autora adaptado (GÄNZLE, HAAZE E JELEN, 2008)

Dentre os métodos para análise de lactose temos: Lane-Eynon, Cloramina-T, e a espectroscopia. Também podemos citar as metodologias descritas pela Federação Internacional de lácteos (International Dairy Federatio – IDF) para análise de lactose é através de Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e também pela medida de absorção na região do ultravioleta em 340 nm (MENDES, 2011).

### 2.3 LEGISLAÇÃO E ROTULAGEM

São duas as resoluções da ANVISA, a primeira é a RDC 135/2017 que inclui os alimentos para dietas com restrição de lactose no regulamento de alimentos para fins especiais. A segunda é a resolução RDC 136/2017 que define como as informações de lactose devem ser colocadas no rótulo, independentemente do tipo de alimento. Pela nova regra, os fabricantes são obrigados a informar a presença de lactose nos alimentos. Isso vale para alimentos com mais de 100 mg de lactose para cada 100 g ou mL do produto. Ou seja, qualquer alimento que contenha lactose em quantidade acima de 0,1% deverá trazer a expressão “Contém lactose” em seu rótulo (BRASIL, 2017a, 2017b).

Esse limite está baseado em referências técnicas e na experiência de países que adotam a rotulagem de lactose há mais tempo, como Alemanha e Hungria. O limite de 100 miligramas é entendido como seguro para as pessoas com intolerância à lactose. De acordo com avaliação da ANVISA, a rede de laboratórios disponível no Brasil tem capacidade para avaliar a presença de lactose nesses níveis. Os fabricantes de alimentos poderão também empregar a expressão “baixo teor de lactose” ou “baixo em lactose” nos casos em que a quantidade de lactose estiver entre 100 mg e 1 g por 100 g ou mililitros, que correspondem 0,1 a 1,0% do alimento pronto conforme instruções do fabricante. Com as novas regras, o mercado brasileiro de alimentos terá três tipos de rotulagem para a lactose: “zero lactose“, “baixo teor”, ou “contém lactose”. (BRASIL, 2017b).

### 2.4 RÓTULOS ADEQUADOS ATÉ 2019

Em até 24 meses todos os alimentos disponíveis no mercado deverão atender a nova regra. Este prazo foi definido com base no tempo que a indústria e seus fornecedores precisam para adequação e também para esgotarem os estoques atualmente existentes. Apenas os estabelecimentos que preparam os alimentos, sejam eles sem embalagens ou embalados no próprio ponto de venda a pedido do consumidor, não estão obrigados a informarem sobre o conteúdo de lactose (BRASIL, 2017b). Seguindo os teores permitidos para o enquadramento dos produtos com teores reduzidos de lactose, temos a (Tabela 2), onde encontramos as quantidades de lactose e as frases que deveram constar no rótulo.

Tabela 2 - Informações do rótulo dos produtos com baixos teores de lactose.

<b>Quantidade de lactose</b>	<b>Frase no rótulo</b>
Igual ou menor 100 mg/100g ou mL	Zero Lactose, Isento de Lactose, 0% Lactose, Sem Lactose ou Não Contém Lactose
De 100mg até 1g/100g ou mL	Baixo Teor de Lactose ou Baixo em Lactose
Igual ou acima de 100mg/100g ou mL	Contém Lactose

Fonte: (BRASIL, 2017b)

## 2.5 MÉTODOS PARA ELIMINAÇÃO DA LACTOSE

A presença ou ausência da lactose nos produtos lácteos, além do aspecto nutricional, é destacada em inúmeros trabalhos, a influência no processo produtivo dos queijos, tais como, o estudo de Karahadian & Lindsay (1987) que verificaram a contribuição da lactose no desenvolvimento e alterações da textura de queijos Brie, e o de estudos do efeito da lactose, isoladamente ou em interação com o cloreto de sódio, sobre a coloração e propriedades reológicas dos queijos, que são o comportamento viscoelástico dos queijos (KOMBILA & LACROIX, 1991).

A hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos, porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em suas composições. Essa operação oferece certas vantagens tecnológicas, na medida em que diminui os riscos de cristalização nos derivados lácteos e aumenta o poder adoçante. Existem dois métodos principais para a hidrólise da lactose: o método químico e o método enzimático (LONGO, 2006).

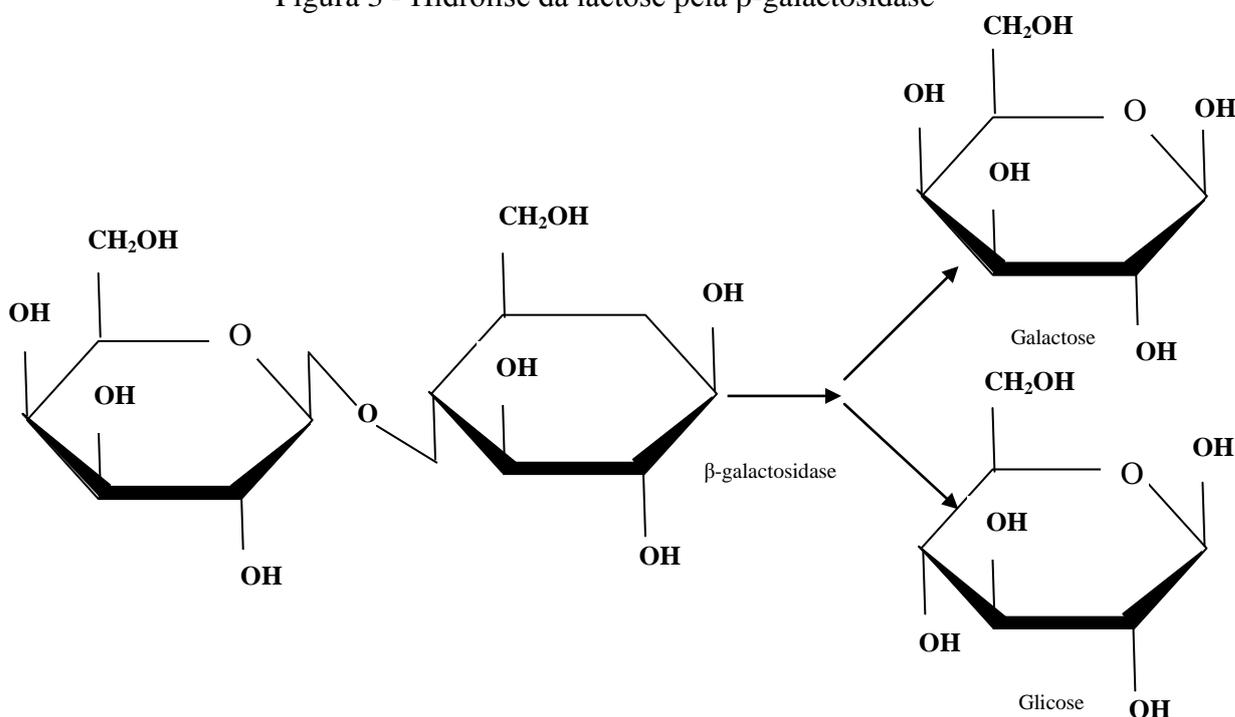
O método químico não é utilizado na indústria de alimentos, pois depende de altas temperaturas e utilização de ácidos muito fortes. Consequentemente, problemas tecnológicos são fáceis de ocorrer, como desnaturação de proteínas, alteração de cor e sabor nos alimentos. A hidrólise pelo método enzimático é catalisada pela enzima lactase ( $\beta$ -galactosidase). A vantagem desse método reside no fato de que a reação processa-se à temperatura relativamente baixa, numa faixa que pode variar de 4°C a 40°C, sendo a temperatura ótima de 30°C a 40°C, permitindo uma maior economia energética, além de não se formarem produtos colaterais (LONGO, 2006). Isto diminui não só a possibilidade de alteração dos compostos termosensíveis, como diminuem também os efeitos da corrosão do meio sobre equipamentos e

a formação de subprodutos indesejáveis (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY E OLLIS, 1986).

A hidrólise enzimática da lactose do leite pode seguir dois caminhos: no primeiro, o leite cru passa pelo processo de esterilização (UHT – 141°C/5 segundos) e, depois do resfriamento, adiciona-se a lactase, e o leite é colocado em embalagem asséptica. A hidrólise da lactose ocorre no interior da embalagem. No segundo, o leite cru passa por uma pasteurização (72°C/15 segundos), e após o resfriamento, a lactase é adicionada. A hidrólise dá-se dentro de tanques de armazenamento; assim que termina esse processo, realizam-se a esterilização e o envase asséptico. No caso de necessidade de controle do grau de hidrólise da lactose, recomenda-se o uso da técnica de crioscopia (LONGO, 2006).

A hidrólise enzimática (Figura 3) é um dos métodos mais interessantes para a redução do teor de lactose no leite e nos seus derivados. Este processo é conhecido e utilizado em escala industrial. Nele a enzima  $\beta$ -galactosidase, na forma livre ou imobilizada, hidrolisa a ligação  $\beta(1-4)$  da molécula de lactose, dando origem aos monômeros, glicose e galactose. (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985).

Figura 3 - Hidrólise da lactose pela  $\beta$ -galactosidase



Fonte: Elaborado pela autora adaptado (GEKAS e LOPES-LEIVA, 1985)

A hidrólise da lactose em glicose e galactose por  $\beta$ -galactosidase (Figura 3) é preferível à hidrólise ácida por ocorrer em condições mais brandas de temperatura e pH e o produtos obtidos, preservarem as suas propriedades (HATZINIKOLAOU et al., 2005). Este é

um importante processo na indústria de alimentos, pois proporciona uma melhora nas características tecnológicas e sensoriais de produtos lácteos, conferindo a estes o maior poder adoçante e maior solubilidade, além de produzir produtos economicamente mais atrativos e adequados à alimentação de indivíduos intolerantes à lactose (JURADO et al., 2002).

O processo de ultrafiltração é outra maneira eficaz de separar lactose e minerais, aumentando os níveis de proteínas e propiciando aumento significativo de rendimento por retenção de soroproteínas e aumento de umidade do queijo. (VAN DENDER, 1995).

A ultrafiltração consiste na concentração seletiva, em membranas especiais, dos componentes macromoleculares do leite (proteínas e gorduras, principalmente), levando à obtenção de um retentado que contém todas as proteínas solúveis do leite inicial. De modo geral, a ultrafiltração permite uma retenção maior, no retentado, da gordura do leite e das proteínas solúveis do soro de alto valor nutritivo e em seu estado nativo. Por sua vez, a diafiltração, que pode ser contínua ou descontínua, consiste na introdução de água no retentado em ponto apropriado durante a ultrafiltração. A diafiltração é usada para aumentar o fluxo do processo, pois dilui os componentes do retentado e a camada gel polarizada, que promove a retenção parcial de lactose (VAN DENDER, 1995). Aplicando-se uma pressão em um fluido que passe por um sistema de ultrafiltração, os componentes maiores que o tamanho do poro ficam retidos e concentrados, formando o retentado, que no sistema contínuo é coletado no final da membrana. Por sua vez os componentes menores atravessam a membrana semipermeável e são coletados em uma saída separada (BOSCHI, 2006).

Alguns métodos são indicados para a redução de lactose do leite com destaque para o tratamento com  $\beta$ -galactosidase, a ultrafiltração, a fermentação por bactérias lácticas e a produção de queijos (dessora e acidificação, principalmente). Os dois primeiros métodos citados, isto é, a hidrólise da lactose por lactase e a ultrafiltração são os que produzem maiores reduções nos teores deste açúcar. A ultrafiltração quando associada à lavagem do concentrado (diafiltração), promove reduções mais significativas da lactose. O leite hidrolisado ou ultrafiltrado e diafiltrado é, então, utilizado na fabricação de produtos lácteos com menores teores de lactose do que seus correspondentes tradicionais (FOX & MCSWEENEY, 1998).

Outra dificuldade na fabricação de produtos isentos ou com baixo teor de lactose são as consequências causadas pelo tratamento térmico. Sabe-se que a aplicação de processos térmicos são necessários e objetivam principalmente em oferecer ao consumidor alimentos microbiologicamente estáveis e seguros, porém a intensidade e o tempo prolongado de exposição ao calor reduzem a qualidade das características nutricionais e sensoriais do

produto (SILVA, 2000). A hidrólise da lactose em glicose e galactose além de conferir sabor adocicado aos derivados lácteos (SHENDURSE; KHEDKAR, 2016), aumenta consideravelmente a concentração de açúcares redutores, que com o efeito do tratamento térmico podem levar à formação dos produtos da reação de Maillard (TROISE et al., 2016). Por isso a ação do calor tem maior impacto aos produtos zero lactose, como problemas de escurecimento, sabor cozido e redução do valor nutricional (HOSHINO et al., 2009).

A filtração por membranas é rotineiramente utilizada para inúmeras aplicações dentro da indústria de laticínios, tornando-se uma parte importante do processo produtivo. O processo de separação em baixas temperaturas, sem mudança de fase, faz da filtração por membranas, em muitas aplicações, uma solução muito mais econômica que métodos convencionais, tais como filtração a vácuo ou filtros-prensas (GEA, 2012).

De acordo com Tondello (1989 apud Eckenfelder, 2011), o processo de separação por membranas (SPM) é baseado em mecanismos físicos, não envolvendo processos químicos, biológicos ou trocas térmicas. Refere-se apenas à separação dos componentes de uma mistura pela rejeição daqueles que não possuem tamanho para atravessar os poros da membrana, e a eficiência desse tipo de filtração depende inteiramente da diferença de tamanho entre o poro e a partícula a ser removida.

Dentre as alternativas da filtração por membranas, destaca-se a nanofiltração, que é um processo de filtração entre ultrafiltração e osmose reversa que proporciona separações altamente específicas de componentes com baixo peso molecular, tais como açúcares de minerais dissolvidos e sais (GEA, 2012).

Segundo Scott e Hughes (1996), a morfologia da membrana e a natureza do material que constitui são algumas das características que definem o tipo de aplicação e a eficiência da separação. Há muitos processos com membranas, baseados em diferentes princípios ou mecanismos de separação, que fracionam espécies de distintos tamanhos que variam desde partículas até mesmo em nível molecular. A força motriz que rege o movimento depende das características da membrana, e, em geral, são aplicados gradientes de pressão, concentração, temperatura ou potencial elétrico para gerar o movimento das espécies químicas envolvidas através da membrana (MULDER, 1991).

Existe também um método de separação cromatográfico para eliminar a lactose do leite, desenvolvido pela empresa finlandesa de laticínios Valio, maior do gênero na Finlândia, e a nível mundial oferece a maior variedade de produtos com baixo teor de lactose ou sem lactose. Com esse processo pode-se obter uma solução sem lactose, contendo de proteínas lácteas e seus sais. O leite sem lactose (e sem carboidratos) não apresenta o gosto doce do

leite hidrolisado, o que pode agradar alguns consumidores, mas por outro lado este leite possui apenas 40% do valor energético do leite normal (68 calorias) (INSUMOS, 2010).

## 2.6 IMPLICAÇÕES NA SAÚDE HUMANA

A intolerância alimentar constitui-se em manifestação adversa ao alimento não relacionada a mecanismos imunológicos. É causada por alimentos que contêm substâncias tóxicas ou farmacológicas, contaminantes químicos ou bacterianos, que provocam reações idiossincráticas, como as causadas por aditivos, ou, ainda, por deficiências enzimáticas, como a intolerância à lactose. A diminuição ou ausência da enzima lactase-florizina hidrolase, mais conhecida como lactase, pode ser primária (defeito congênito) ou secundária (depleção enzimática). Entre as causas de deficiência primária, situam-se a alactasia (ou deficiência congênita da lactase), extremamente rara, e a hipolactasia primária do tipo adulto (também conhecida como deficiência ontogênica da lactase), mais frequente, com prevalência mundial variando de 5%, em populações do nordeste da Europa, em até 100%, nos países da Ásia e Oriente Médio. No Brasil, estimativas demonstram que a prevalência pode chegar a 60%. Na deficiência ontogênica da lactase, ocorre a redução de cerca de 90% nos níveis da lactase por meio do controle genético ao longo da vida. (NOGUEIRA et al., 2016, p.239).

Por apresentarem sintomas muito parecidos, há confusão acerca do diagnóstico de intolerância à lactose e alergia ao leite de vaca. Quando falamos em intolerância à lactose, estamos nos referindo ao açúcar no leite. No caso da alergia, é a proteína do leite que está relacionada. É por isso que alergia a lactose não existe, pois a lactose é um carboidrato enquanto a alergia está relacionada à proteína do leite. É muito raro intolerância à lactose em crianças em fase de aleitamento. No entanto, o quadro é mais comum quando a criança enfrenta outra doença, a exemplo da diarreia crônica ou desnutrição (para que o organismo produza a lactase, são necessárias proteínas e outros nutrientes). Essas situações podem levar à intolerância à lactose, mas de forma secundária. Já no adulto, a intolerância à lactose é mais frequente. (CARNEIRO-SAMPAIO et al., 2016, p.94).

Ele pode nem saber que é intolerante, mas sabe que se tomar muito leite se sentirá mal. Então, por mecanismo de defesa, ele consome pouco ou não consome leite e passa a vida toda sem saber que tem o problema. O termo, portanto, também é relativo à quantidade de enzima que o indivíduo produz (CARNEIRO-SAMPAIO et al., 2016, p.95).

Na atualidade, a alergia alimentar acomete 6% das crianças e 3 a 4% dos adultos no mundo todo. O leite é o alérgeno campeão, comprometendo dos 2,5% das crianças nos primeiros três anos de vida. Os pacientes podem apresentar vários tipos de reações clínicas, como choque anafilático com risco de morte, urticária, inchaço na boca, diarreia, vômitos entre outros. (CARNEIRO-SAMPAIO et al., 2016, p.96),

Os principais sintomas da intolerância são abdominais, como dor e distensão, flatulência, diarreia, náusea, vômitos ou constipação, como resultado da má digestão de lactose. A intolerância é diferente das alergias. Neste último caso as reações do organismo podem ser mais graves e o limite de ingestão não tem como ser definido. (ANVISA, 2017c).

A deficiência congênita da lactase é uma condição grave, de herança autossômica recessiva, que se não diagnosticada precocemente, pode levar a óbito. Clinicamente a criança apresenta diarreia já nos primeiros dias de vida, com comprometimento do ganho ponderal e acidose metabólica. A acidose metabólica é caracterizada por redução do pH sanguíneo como resultado do acúmulo de ácidos não voláteis ou perda de bicarbonato sérico, cuja resolução acontece com a retirada da lactose da dieta. Essa condição predomina na população finlandesa. (NOGUEIRA, 2016, p.240).

A intolerância secundária à lactose é a mais comum das formas adquiridas de intolerância aos hidratos de carbono, em razão da produção mais superficial desta enzima na membrana microvilositária. A sua concentração diminui em situações que cursam com lesão da borda em escova da mucosa ou que aumente significativamente o trânsito intestinal, como nas enterites infecciosas, giardíase, super crescimento bacteriano, doença célica, doença inflamatória intestinal (especialmente doença de Crohn) e enterites induzidas por drogas e radiação. (NOGUEIRA et al., 2016, p.240).

### **2.6.1 Fisiopatologia**

A enzima lactase, encontrada principalmente no jejuno, hidrolisa a lactose em glicose e galactose, que são absorvidas pela mucosa intestinal. A lactose, não sendo hidrolisada, não é absorvida no intestino delgado e acumula-se na luz intestinal, com formação de um gradiente osmótico que induz a passagem de água e eletrólitos. Os açúcares não absorvidos e o acúmulo de fluidos e eletrólitos no lúmen acarreta aumento do peristaltismo e a passagem desses produtos para o intestino grosso. As bactérias fermentam os hidratos de carbono resultando em ácidos graxos de cadeia curta (Ácido acético, Ácido butírico, Ácido propiônico e outros), gases ( $H_2$ ,  $CO_2$  e metano), que por sua vez ultrapassam a capacidade colônica de resgate, determinam a diminuição do pH e aumento da carga osmótica. Todos esses fatores podem ocasionar diarreia com grande quantidade de líquidos e alta carga osmótica, com evacuações explosivas e fezes ácidas (pH fecal diminuído) (NOGUEIRA et al., 2016, p.240).

### **2.6.2 Diagnóstico**

Apesar das manifestações clínicas, a correlação entre o relato de intolerância à lactose pelos pacientes e o diagnóstico é pobre. Assim, não se recomenda o início de uma dieta de exclusão de leite baseada em sintomas apenas. (USAI-SATTA, 2012).

A dosagem de lactase na mucosa duodenal, é realizada em um fragmento colhido por endoscopia, tem sensibilidade de 95% e especificidade de 100%, porém é um exame invasivo.

Pode-se os medir indiretamente a capacidade de digestão de lactose. No teste oral, o paciente ingere uma quantidade fixa de lactose e a glicemia é dosada antes e depois da ingestão. O indivíduo que é capaz de metabolizar a lactose apresenta um incremento de 20 mg/dL na glicemia. Este teste é realizado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (SANTOS,2015).

Além de dosar a glicemia, é possível medir o Hidrogênio ( $H_2$ ) no ar expirado após a sobrecarga oral, pois, pela fermentação da lactose pelas bactérias colônicas, há produção de  $H_2$ , que é absorvido no intestino e parcialmente eliminado pelos pulmões e o teste de acidez nas fezes que mede o pH fecal. e um novo método vem sendo empregado, que é a detecção genética da intolerância à lactose ou hipolactasia primária (BEM et al., 2013; SANTOS,2015).

## 2.7 MÉTODOS DE ANÁLISE

Atualmente o método aprovado para análise de lactose é o método titulométrico de Lane-Eynon Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento e da Secretaria de Vigilância Sanitária (MAPA/SVS) que é utilizado para leite e produtos lácteos, e determina açúcares redutores e não redutores. Possui possibilidade de erro analítico, que pode ser causado por: impureza dos reagentes, limpeza inadequada, homogeneidade da amostra, capacitação e habilidade do analista (BRASIL, 2013).

Já a análise por crioscopia é um método rápido, e por isso muito utilizado em laticínios para determinar o grau de hidrólise da lactose (PROZYN, 2010). É uma forma indireta de quantificar a lactose, essa técnica permite apenas verificar a intensidade da reação de hidrólise da lactose, através da depressão do ponto de congelamento do leite (TONETTI, 2015). O índice crioscópico do leite está diretamente ligado a quantidade de sólidos solúveis presentes na solução, definido principalmente pela concentração em solução de lactose e cloretos (TRONCO 2010). A hidrólise da lactose acarreta em um aumento da concentração de açúcares redutores no leite, aumentando a concentração dos componentes solúveis, por isso o índice crioscópico é reduzido (MONTIPÓ, 1992 apud TREVISAN, 2008).

Dentre as técnicas analíticas de separação, a HPLC Cromatografia líquida de Alta Eficiência é a mais usada devido à grande variedade de combinações entre FM e FE; possuindo alta sensibilidade, fácil adaptação em determinações quantitativas acuradas, adequação a separações de espécies não-voláteis ou termicamente instáveis, ampla aplicabilidade a substâncias como proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, aminoácidos, carboidratos, terpenóides, pesticidas dentre outras (SKOOG et al., 2017; SNYDER et al., 2010). Um método mais simples, rápido e preciso empregando HPLC é descrito na literatura (DIONEX, 2013). Mas possuem custo elevado de equipamentos e reagentes além de necessitar de pessoal treinado. A complexidade da matriz do leite exige que se realize um *clean-up* na fase do preparo da amostra, visando evitar danos à coluna cromatográfica (ACQUARO et al., 2013).

A eletroforese capilar (em inglês, CE – *capillary electrophoresis*), é um método de separação baseado na diferença de velocidade de migração de espécies carregadas em uma solução-tampão através do qual tenha sido aplicado um campo elétrico de corrente contínua. Uma característica particular de eletroforese é a sua habilidade de separar macromoléculas carregadas de interesse da indústria biotecnológica e de pesquisas em biologia e bioquímica (SKOOG, 2017). Faz separações com alta resolução e alta velocidade, em volumes de

amostra excepcionalmente pequenos (0,1 a 10nL). Adicionalmente, na saída do capilar, as espécies separadas são eluídas para detectores que oferecem respostas com alta precisão (SKOOG, 2017).

A Eletroforese Capilar vem contribuir com uma metodologia analítica que além da sensibilidade proporciona excelente separação e utiliza volumes pequenos de amostra. As vantagens do CE para a separação incluem alto poder de resolução, desenvolvimento simples e rápido de métodos, tempo de análise relativamente curto, baixo consumo de solvente, amostra (HANCU et al., 2015).

Espectros da região MIR são comumente utilizados para identificação estrutural de compostos orgânicos, uma vez que as bandas de absorção são causadas pelas vibrações fundamentais de grupos funcionais específicos. Em contrapartida, podem também terem aplicações na análise quantitativa, já que as intensidades das bandas são proporcionais à concentração de seus respectivos grupos funcionais (RODRIGUEZ-SAONA; ALLENDORF, 2011) As vantagens deste tipo de equipamento são devido principalmente à maior potência de radiação que atinge o detector, diminuindo assim a intensidade dos ruídos. Além disso, todos os elementos atingem o detector simultaneamente, tornando possível a obtenção de espectros em poucos segundos. Outra vantagem é que os espectros gerados têm maior poder de resolução (discriminação da menor diferença entre dois números de onda) e reprodutibilidade, permitindo análise de dados complexos. A análise por Infravermelho também utiliza volumes pequenos de amostra e vem trazer rapidez, sensibilidade e ensaios não destrutivos (SKOOG, 2017).

### **2.7.1 Espectroscopia Ótica**

O fenômeno da espectroscopia começou quando Isaac Newton, em 1672, observou na parede de um ambiente escuro, a imagem refletida de bandas coloridas originárias da luz do sol que atravessava o orifício na parede e incidia diretamente em um prisma de vidro. Colocou uma lente entre o prisma e a parede, percebeu que as cores da imagem refletidas na parede tinham sua área de superfície aumentada. Em seguida, um novo prisma foi colocado entre a parede e o vidro e constatou que se a dispersão da luz fosse cumulativa, a imagem das cores aumentava, e se as dispersões fossem opostas formava-se a luz branca. A este conjunto de bandas coloridas deu-se o nome espectro (COSTA, 2003).

A espectroscopia óptica investiga a interação entre a matéria e a radiação, é usada para analisar compostos químicos, identificando quais elementos diferentes compõem a matéria.

Sua finalidade primordial consiste na determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares. As transições entre os estados energéticos dependem do valor da energia da radiação eletromagnética, originando assim diversos métodos espectroscópicos. A espectroscopia vibracional divide-se em duas grandes classes de técnicas: a espectroscopia de absorção no infravermelho e espectroscopia Raman (SATHYANARAYANA, 2015).

### **2.7.2 Técnica de Espectroscopia Infravermelho**

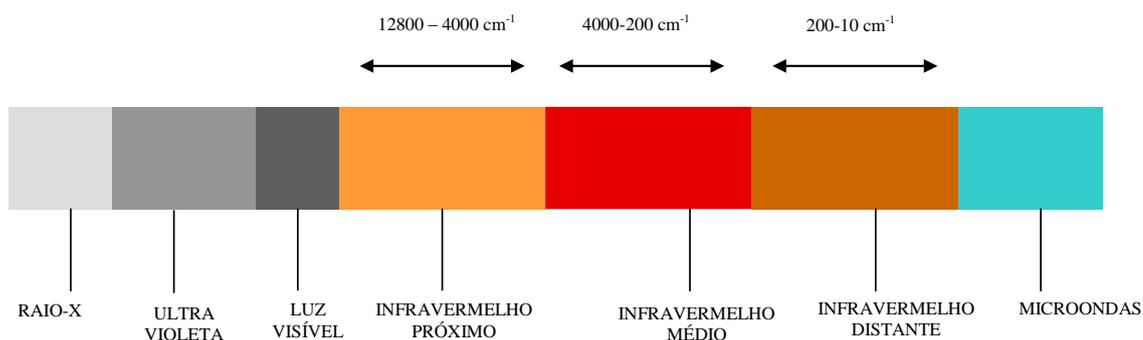
A princípio, as restrições tecnológicas impossibilitavam uma utilização mais profunda da técnica de espectroscopia no infravermelho. Diante disso, os primeiros trabalhos limitavam-se ao estudo de poucas espécies químicas. Assim, o infravermelho médio era utilizado inicialmente na caracterização de bandas de absorção de grupos orgânicos, por exemplo (BURNS et al., 2001).

Foi no período da segunda guerra mundial que a espectroscopia no infravermelho teve sua primeira aplicação industrial, como monitoramento da qualidade e controle da produção na indústria petroquímica. O estudo quantitativo utilizando a região do infravermelho se desenvolveu a partir da década de 70 com o desenvolvimento de equipamentos ópticos e mecânicos mais precisos e a evolução da informática, abrindo espaço para novas aplicações (BURNS et al., 2001).

### **2.7.3 Princípios da Espectroscopia no Infravermelho**

A região espectral do infravermelho está limitada pelas micro-ondas e pelo visível, é subdividida em Infravermelho próximo, na faixa de  $12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , médio na faixa de  $4000-200 \text{ cm}^{-1}$  e distante  $200-10 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 4). A energia da radiação Infravermelha é insuficiente para gerar transições eletrônicas, já que tal faixa de comprimento de onda não possui energia suficiente para tanto (SKOOG, 2017).

Figura 4 - Espectro eletromagnético



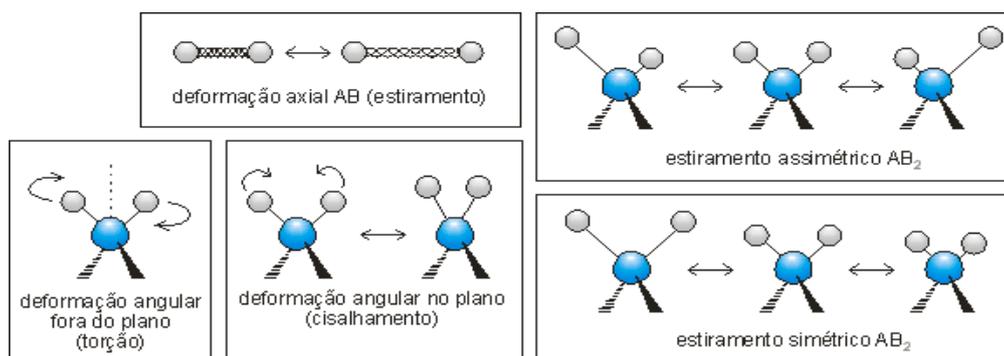
Fonte: Elaborado pela autora adaptado ([www.fe.up.pt](http://www.fe.up.pt))

Considerando uma molécula simples, a distribuição de cargas ao redor dessa molécula não é simétrica, estando concentrada nos átomos mais polares. O momento dipolar é definido como a diferença da carga distribuída entre os átomos e a distância entre eles (SILVERSTEIN,2012). Ao vibrar, as moléculas geram uma variação regular no seu momento dipolar, o que ocasiona o surgimento de um campo elétrico alternado que interage com o campo elétrico oscilante associado à radiação infravermelha (SILVERSTEIN,2012).

Ao vibrar, as moléculas geram uma variação regular no seu momento dipolar, o que ocasiona o surgimento de um campo elétrico alternado que interage com o campo elétrico oscilante associado à radiação infravermelha. Quando a frequência da radiação coincide exatamente com a frequência vibracional natural da molécula, ocorre uma transferência de energia. Nessas circunstâncias, o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de seus movimentos (SKOOG, 2017).

É necessária apenas uma pequena quantidade de energia para causar uma mudança de nível rotacional molecular, da ordem de  $100\text{ cm}^{-1}$ . Um gás fornece espectro no infravermelho normalmente como uma série de linhas igualmente espaçadas, isso porque há vários estados rotacionais de energia para cada estado vibracional. Em líquidos e sólidos, devido rotação de cada molécula estar bastante restrita, as linhas discretas vibracionais/rotacionais originam bandas vibracionais alargadas (SKOOG, 2017).

Figura 5 - Modos de vibração de moléculas diatômicas e triatômicas



Fonte: (MANCINE, 2019)

As vibrações moleculares (Figura 5) podem ser classificadas em deformações axiais (ou de estiramento) e deformações angulares (ou dobramento) e podem ser simétricas e assimétricas. As vibrações de estiramento são oscilações na direção radial aos núcleos, e as deformações angulares envolvem mudanças dos ângulos entre o plano que contém a ligação e um plano adotado como referência (LARKIN, 2017).

As vibrações de deformação angular são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações e podem acontecer no plano ou fora do plano da molécula, são de quatro tipos: tesoura (do inglês *scissoring*), balanço (do inglês *rocking*), sacudido (do inglês *wagging*) e torção (do inglês *twisting*). Além dos tipos de vibrações citados, interações ou acoplamentos de vibrações são permitidos (LARKIN, 2017).

As vibrações acontecem de forma isolada em uma molécula, e podem ser representadas por um modelo mecânico simples, capaz de fornecer interpretação fenomenológica, conhecido como oscilador harmônico. Constitui-se este da aproximação das características da vibração de estiramento às de um modelo mecânico representado por duas massas ligadas entre si por uma mola. As frequências fundamentais de quaisquer dois átomos ligados podem ser calculadas assumindo que a energia segue o este modelo, por sua vez sujeito à Lei de Hooke (SKOOG, 2017).

Em uma molécula as massas representam os átomos e a ligação química entre eles representam a mola. Uma perturbação de uma das massas ao longo do eixo da mola resulta em uma vibração conhecida como movimento harmônico simples e a força restauradora é proporcional ao deslocamento das massas, sua tendência é restaurar as massas para sua posição original. A frequência ( $\nu$ ) de oscilação é dada pela equação (1):

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k/\mu} \quad (1)$$

onde:  $\nu$ , frequência da vibração; k, constante de força da ligação;  $\mu$ , massa dos dois átomos definida pela equação (2):

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2)$$

O cálculo das frequências fundamentais de moléculas diatômicas simples pode ser estimado com resultados próximos aos valores médios encontrados para o estiramento de uma ligação entre dois átomos que constituem uma molécula poliatômica. As limitações deste modelo apresentam-se ao tratar moléculas constituídas de muitos átomos, possuindo um grande número de centros de vibração, ou moléculas apresentando interações entre vários centros, a variedade de vibrações possíveis dá origem a espectros na região do infravermelho cuja interpretação torna-se árdua demais (SKOOG, 2017).

Para partículas de dimensões atômicas o modelo do oscilador harmônico falha em uma descrição completa, deve-se lançar mão da mecânica quântica que por sua vez o considerou com adaptações para desenvolvimento teórico próprio. Os osciladores mecânicos-quânticos possuem energias discretas apenas, cuja regra de seleção é uma mudança de número quântico de dimensão da unidade. Como consequência os níveis vibracionais são igualmente espaçados, uma única banda de absorção deveria ser observada para determinada vibração molecular. Qualitativamente pode-se recorrer às curvas de forma anarmônica, pois a curva harmônica e a anarmônica são semelhantes para pequenas variações em torno do centro de massa (LARKIN, 2017).

#### 2.7.4 Aplicações da Espectroscopia no Infravermelho

Atualmente, a Espectroscopia de Infravermelho Médio (FT/MIR) é um método certificado para análise de leite para fins de pagamento no setor de lácteos pela ISO 9622: 1999 AOAC - Associação de Químicos Analíticos Oficiais e FIL - Federação Internacional de Laticínios. As vibrações fundamentais no espectro infravermelho estão associadas a diferentes grupos químicos, que se correlacionam diretamente com a gordura, proteína e lactose (CASADIO et al., 2010).

A região espectral do infravermelho está limitada pelas micro-ondas e pelo visível, é subdividida em Infravermelho próximo na faixa de 12800 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ , médio na faixa de 4000-200  $\text{cm}^{-1}$  e distante 200-10  $\text{cm}^{-1}$ . A larga utilização da espectroscopia de infravermelho como ferramenta analítica deve-se também ao fato de que as análises não geram subprodutos

tóxicos, a preparação de amostras não é complexa e estas não são destruídas no processo. Atendendo à demanda de métodos analíticos rápidos e limpos (LARKIN, 2017).

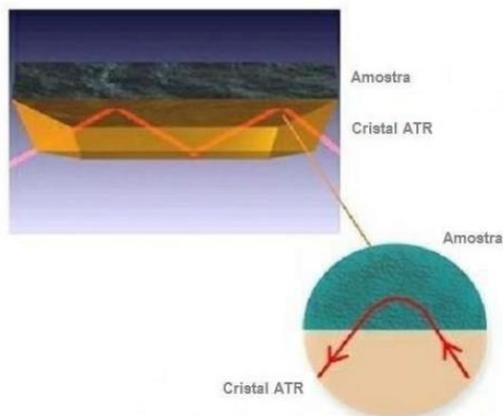
Grande parte das aplicações do MIR concentra-se na identificação de compostos orgânicos. Na faixa espectral conhecida como impressão digital da molécula (1200 a 700  $\text{cm}^{-1}$ ) presente na região do MIR, pequenas alterações na estrutura de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição dos picos de absorção do espectro. Desta maneira a identificação de compostos pode ser realizada pela comparação do seu espectro Infravermelho médio, com bancos de dados existentes (LARKIN, 2017).

A observação técnica do espectro gerado pelos equipamentos de FT-IR proporciona, por si só, a descoberta dos grupamentos químicos que compõem a amostra (SVEČNJAK, L. et al., 2017). Adicionalmente, alia-se a análise por FT-IR à análise multivariada de dados, tornando possível a construção de modelos quimiométricos para a predição de uma propriedade em determinado alimento (SIVAM A. S. et al., 2011; HU Y. et al., 2016).

### **2.7.5 ATR**

O alto índice de refração do elemento de Reflexão Total Atenuada - ATR é adequado para obtenção de espectros de excelente qualidade para maior parte das substâncias, com grau de penetração da radiação na amostra em torno de 1-2 $\mu\text{m}$ . A dureza e a estabilidade química do diamante permitem a obtenção direta de espectros de substâncias na fase líquida com bom contato entre amostra e cristal. Esta técnica tem por princípio o fato de que quando um feixe de radiação passa do cristal de ATR para a amostra, onde há diferença de índices de refração, ocorre uma reflexão. A radiação penetrante na amostra é conhecida como onda evanescente, esquematizada na Figura 6. A fração do feixe que é refletida aumenta de acordo com o aumento do ângulo de incidência, até o ponto que se atinge determinado ângulo crítico ( $\alpha$ ), ocorrendo neste ponto a reflexão completa da radiação incidente (SILVERSTEIN, 2012).

Figura 6 - Esquema de acessório ATR.



Fonte: Adaptado de Bruker Optics (2014)

## 2.8 QUIMIOMETRIA

É uma área de pesquisa que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para, planejar, avaliar, interpretar e extrair o máximo de informação de dados analíticos resultantes de espectros, cromatogramas, eletroferogramas, voltamogramas (ou sinais de outros métodos eletroquímicos), e amostras para as quais as concentrações de diversos constituintes químicos ou outras propriedades tenham sido medidas e selecionar condições ótimas de medidas e experimentos.

A quimiometria não é uma disciplina da matemática, mas sim da química, isto é, os problemas que ela se propõe a resolver são de interesse e originados na química, ainda que as ferramentas de trabalho provenham principalmente da matemática, estatística e computação (FERREIRA, et al.,1999).

Os pioneiros deste estudo foram Prof. Bruce Kowalski (Univ. Washington/Seattle/EUA) Prof. Svante Wold (Univ. Umea/Suécia) nos anos 70.

Segundo Brereton 2003, a calibração envolve a conexão de um (ou mais) conjuntos de variáveis juntas. Geralmente um set (muitas vezes chamado de "bloco") é uma série de medições físicas, como alguns espectros ou descritores moleculares e o outro contém um ou mais parâmetros, como as concentrações de vários compostos ou atividades biológicas. Podemos prever a concentração de um composto num espectro de uma mistura ou as propriedades de um material seus parâmetros estruturais. Calibração multivariada tem sido historicamente a principal base da quimiometria. No entanto, há um grande número de diversas escolas de pensamento, principalmente sobre o histórico das pessoas e o software

com o qual estão familiarizados. Muitos pacotes estatísticos tradicionais não contêm o algoritmo PLS. O software quimiométrico é baseado em torno deste método. PLS é um dos mais divulgados algoritmos para calibração multivariada que tem sido amplamente defendido por muitos quimiometria. Existem vários pacotes comerciais no mercado que executam a calibração PLS e resultam em uma variedade de estatísticas. Cada tipo de espectroscopia tem seus próprios recursos e problemas, tanto softwares foram desenvolvidos para lidar com situações que podem não ser necessariamente aplicáveis a outras técnicas (Brereton, 2003, tradução nossa).

Os espectros, um para cada amostra, são organizados numa matriz,  $X$  ( $n \times m$ ) (Figura 7), de variáveis independentes, onde cada linha representa uma amostra e contém as respostas medidas para a mesma. (FERREIRA et al., 1999).

Figura 7 - Esquema da matriz

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1m} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{nm} \end{bmatrix}$$

Fonte: (FERREIRA et. al, 1999)

O processo geral de calibração consiste de duas etapas:

MODELAGEM, que estabelece uma relação matemática entre  $X$  e  $Y$  no conjunto de calibração.

VALIDAÇÃO, que otimiza a relação no sentido de uma melhor descrição do analito(s) de interesse (FERREIRA et al., 1999).

### 2.8.1 PCA

A base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados é o PCA Análise por Componentes Principais (Principal Component Analysis), que consiste na utilização da matriz de dados como ferramenta com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de "fatores". Constrói-se um novo sistema de eixos (denominados rotineiramente de fatores, componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores) para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões (FERREIRA et al., 1999).

Há diversos métodos para se realizar a análise estatística multivariada dentre os quais está a Análise por Componentes Principais – PCA (SANTOS et al., 2012). Esta é

principalmente utilizada pela sua capacidade de compressão dos dados em função da existência de correlação entre diversas variáveis medidas. O PCA é um tipo de análise exploratória de dados que visa extrair o máximo de informações de uma tabela com muitas variáveis, convertendo-a em gráficos informatizados, a partir da combinação linear das variáveis originais. Assim, pode-se dizer que o PCA tenta agrupar aquelas variáveis que estão altamente correlacionados (SIMAS, 2005).

## 2.8.2 PLS-DA

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais - PLS-DA é um método de classificação linear que combina as propriedades de regressão de mínimos quadrados parciais com o poder de discriminação, uma técnica de classificação. PLS-DA baseia-se na regressão PLS algoritmo (PLS1 ao lidar com uma variável Y dependente e PLS2 na presença de várias variáveis Y dependentes), que procura variáveis latentes com uma covariância máxima com as Variáveis Y. A principal vantagem do PLS-DA é que as informações relevantes fontes de variabilidade de dados, são modeladas pelo chamado Variáveis Latentes (LVs), que são combinações lineares das variáveis originais consequentemente, permite a visualização gráfica e compreensão dos diferentes padrões e relações de dados por LV pontuações e cargas. As cargas são os coeficientes das variáveis nas combinações lineares que determinam os LVs e, portanto, eles podem ser interpretados como a influência de cada variável em cada LV, enquanto as pontuações representam as coordenadas das amostras no LV hiperespaço de projeção. Ao lidar com PLS-DA, o vetor de classe (contendo a participação de amostras nas classes G) é transformada em matriz fictícia Y, com n linhas (amostras) e colunas G (a classe em formação). Cada entrada Y representa a participação de a i-ésima amostra da g-ésima classe expressa com um código binário (1 ou 0). Portanto, o vetor de classe n-dimensional é transformado em uma matriz Y binária constituída por n linhas e G colunas (BALLABIO E CONSONNI, 2013).

O PLS-DA é aplicado neste trabalho com o objetivo de correlacionar os dados espectroscópicos infravermelhos (matriz X) com os dados de composição (matriz Y), construindo um modelo para classificação que permita a previsão de componentes desejados a partir de um espectro medido (FERRARINI, 2004).

Outro método de regressão que utiliza a modelagem de componentes principais é o PLS, o que só é justificável se tais concentrações tiverem valores confiáveis. O primeiro fator,

neste caso chamado de variável latente, descreve a direção de máxima variância que também se correlaciona com a concentração (FERREIRA et al., 1999).

No PLS, a calibração envolve a correlação dos dados na matriz espectral X com os dados na matriz de concentração (ou propriedades) Y. As matrizes X e Y são reduzidas a apenas alguns fatores usando todas as informações disponíveis (FERRARINI, 2004).

Segundo Brereton 2003, a abordagem mais difundida é frequentemente chamada de PLS1. Embora existam algoritmos, os princípios gerais são razoavelmente simples. Em vez de modelar as variáveis x, dois conjuntos de modelos são obtidos da seguinte forma:

$$X = T.P + E$$

$$c = T.q + f$$

Onde q tem analogias para um vetor loadings, embora não seja normalizado. O produto de T e P aproxima-se do espectro dados e o produto de T e q para as concentrações verdadeiras; o elo comum é T. (FERREIRA et al., 1999).

Uma característica importante do PLS é que é possível obter uma pontuação de matriz que é comum a ambas as concentrações (c) e medições (x). Note que T e P para PLS são diferentes de T & P obtidos no PCA e conjuntos únicos de pontuações e cargas são obtidos para cada composto no conjunto de dados. (FERREIRA et al., 1999). Portanto, existem 10 compostos de interesse, haverá 10 conjuntos de T, P e q. Embora as pontuações sejam ortogonais (como na PCA), as cargas não são (o que é uma diferença importante para a PCA) e, além disso, a não são normalizados, então a soma dos quadrados de cada vetor não é igual a um. A calibração cruzada é uma metodologia utilizada para a escolha do número de componentes principais baseada na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Um dos métodos mais simples é criar uma matriz de dados única e longa a partir do original tensor de três vias (FERREIRA et al., 1999).

### 2.8.3 Variáveis Latentes

Quando um modelo PLS-DA é calibrado, uma questão importante é a seleção do número ideal de variáveis latentes (LVs), que geralmente é realizado com base em procedimentos de validação cruzada. Isso deve permitir a otimização da complexidade de o modelo multivariado com base na capacidade preditiva do modelo em si. A validação cruzada geralmente é realizada dividindo-se amostras em grupos de validação cruzada (também conhecidos como cancelamento de grupos). Cada grupo de validação cruzada é removido do conjunto de treinamento, um de cada vez. O modelo é calibrado com as amostras de treinamento restantes que depois são usadas para prever amostras do grupo de validação cruzada (BALLABIO E CONSONNI, 2013).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises espectrais de infravermelho médio foram realizadas em um espectrômetro da marca BRUKER<sup>®</sup>, modelo Vertex 70 com detector RT-DLaTGS e ótica BKr pertencente ao Laboratório de Espectroscopia dos Materiais - LEM, localizado no departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os dados foram analisados nos softwares Excel, OriginPro 2015 e Matlab R2012.

#### 3.1 AMOSTRAS DE LEITE

Foram selecionadas seis marcas comerciais nacionais de leite UHT, sendo destas: uma amostra de leite UHT integral e cinco amostras de leite UHT desnatados com teor regular de lactose, seis amostras de leites UHT com zero lactose, totalizando doze amostras analisadas. As amostras de leite receberam a seguinte codificação: 1 a 6 para cada; marca, 1 para regular e 2 para zero lactose e 1 a 3 para cada repetição, ficando como por exemplo: 1.1.3 , marca 1 , regular 1, repetição 3.

#### 3.2 PROCEDIMENTO

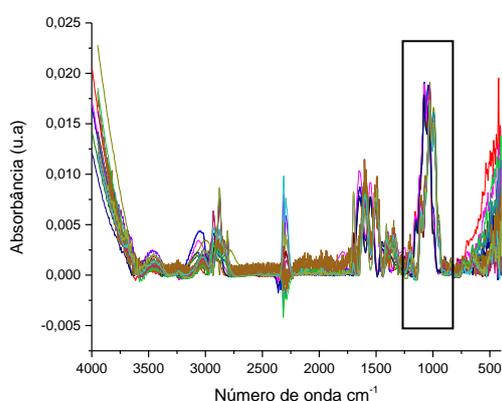
As amostras foram homogeneizadas, e retirados 100 mL para balão volumétrico até a estabilização à temperatura ambiente. A primeira leitura foi realizada com água para redução dos ruídos e para traçar uma linha de base referente a água. Para análise foram coletados 1 $\mu$ L com micropipeta em 3 repetições. A cada leitura foi realizada limpeza com álcool isopropílico.

O parâmetro de obtenção dos espectros foi com 32 varreduras em volume fixo de 1  $\mu$ L, e com resolução 4  $\text{cm}^{-1}$ , na faixa de trabalho na janela espectral de 4500 a 350  $\text{cm}^{-1}$  número de onda com módulo ATR - Reflectância Total Atenuada de diamante.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

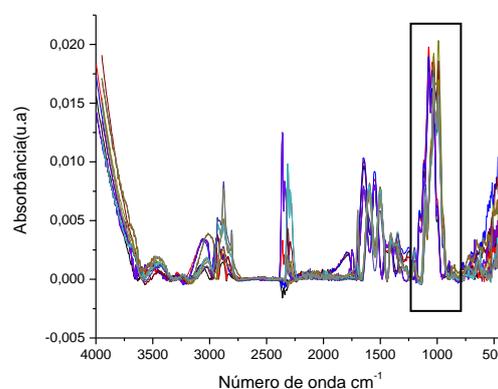
As análises se iniciaram traçando espectros de todas as amostras regulares (Figura 8) e amostras de leites com zero lactose (Figura 9). Ao plotar os espectros obtidos das triplicatas dos leites regulares e zero lactose foi possível observar comportamentos diferenciados nas amostras. A região  $1060\text{ cm}^{-1}$  e  $1080\text{ cm}^{-1}$  ambos com estiramento -OH, comum em lactose (SKOOG, 2017).

Figura 8 - Espectros das amostras de leites regulares de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$



Fonte: Elaborada pela autora

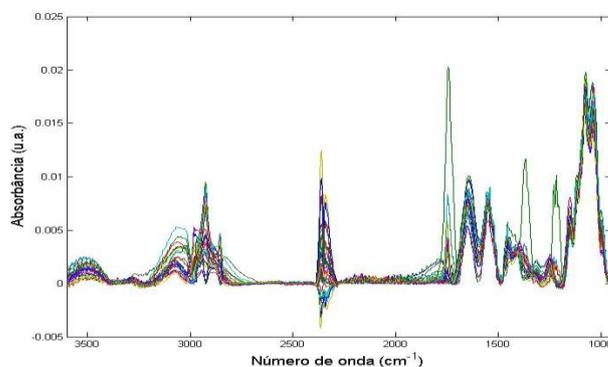
Figura 9 - Espectros das amostras de leites zero lactose de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$



Fonte: Elaborada pela autora

O pré-processamento dos dados foi feito com a varredura de  $3600\text{ a }950\text{ cm}^{-1}$ , pois com a faixa mais alargada não foram obtidos bons resultados. Na (Figura 10) estão representados os espectros de todas as amostras selecionadas para o experimento o espectro discrepante dos demais se refere à amostra 6.1-1.

Figura 10 - FT-MIR de todas as amostras  $3600\text{ a }950\text{ cm}^{-1}$

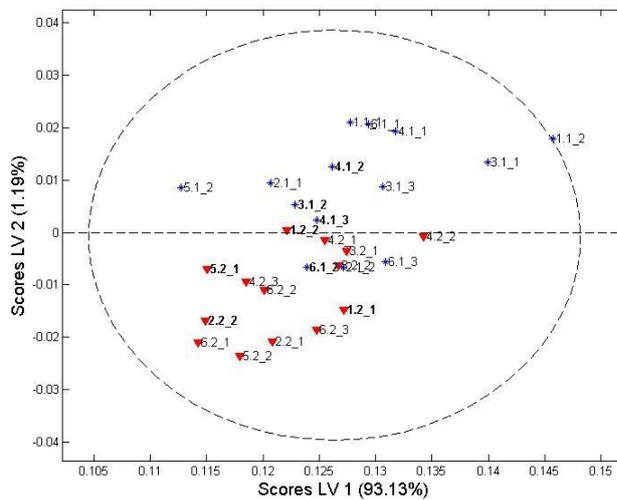


Fonte: Elaborada pela autora

As análises foram baseadas nas informações de teores de lactose fornecidas pelos fabricantes. Foram utilizados 28 espectros das repetições. Foi construída uma matriz *Kennard-Stone* 70/30, ou seja 70% das amostras para calibração e 30% de previsão onde cada linha representa um espectro e cada coluna representa um número de onda. Foram definidas três variáveis latentes, LV1, LV2 e LV3 para análises dos dados.

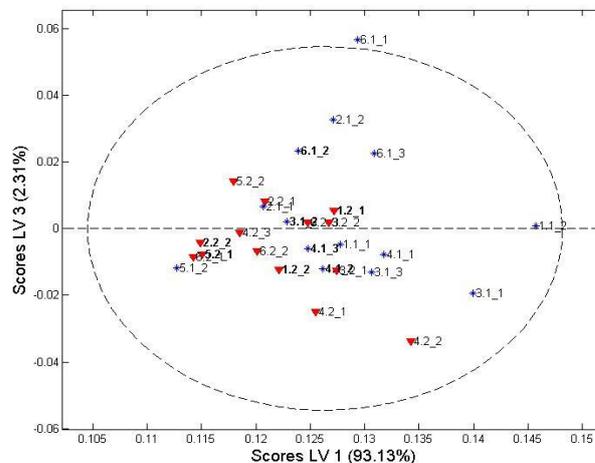
Os Gráficos 1 e 2 tratam-se das análises PLS-DA com dados brutos, as amostras preditas no modelo se apresentam dentro do conjunto de calibração que corresponde a 95% de confiança, que é o que se espera. Mas não houve uma boa separação dos dados, neste caso um pré processamento nos dados originais se mostrou necessário.

Gráfico 1 - PLS-DA com dados espectrais brutos LV1xLV2



Fonte: Elaborada pela autora

Gráfico 2 - PLS-DA com dados espectrais brutos LV1xLV3

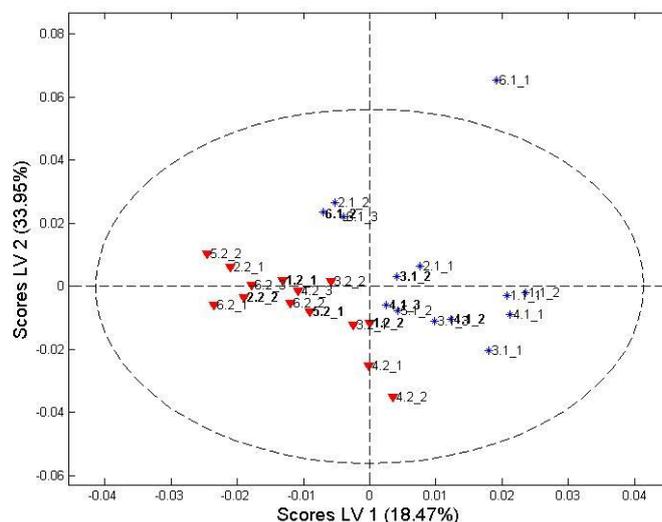


Fonte: Elaborada pela autora

O número de variáveis utilizado foi de 1375. Logo a matriz original possui  $Y=(28 \times 1375)$ , centrando os dados na média, com utilização de 3 variáveis latentes. Onde 70% foram utilizadas para calibração e 30% para previsão. A amostra 20 (5.1-1) foi retirada devido ao espectro muito ruidoso. Foi definida uma centróide e foi medida a distância euclidiana que separa os dados.

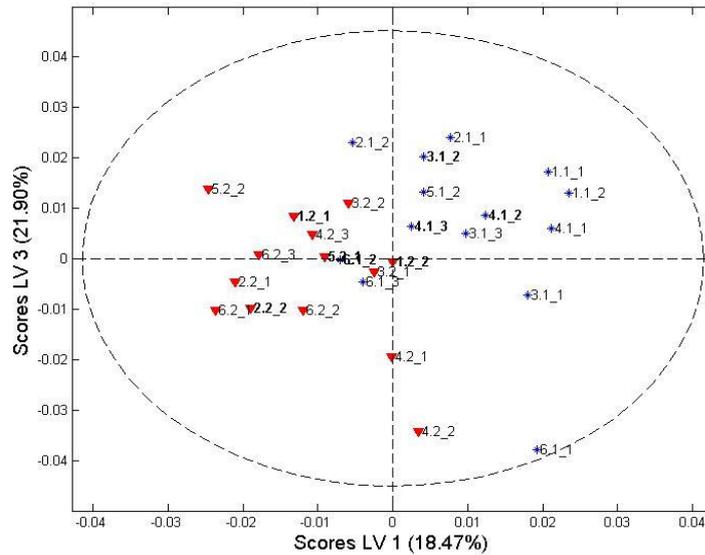
Os gráficos são do tipo triplo *score* onde cada ponto representa uma amostra, os dados ficaram dentro dos 95% de confiança e apenas o ponto 6.1-1 pode ser chamado de *outlier*, o que não foi importante por ser apenas uma amostra. A detecção de "*outliers*" é tão importante quanto à determinação do número de componentes principais que serão empregadas no modelo. Os Gráficos 1 e 2 dizem respeito à modelagem sem pré-processamento dos espectros, ou seja com dados brutos, enquanto que os Gráficos 3, 4 e 5 os dados foram centrados na média. Note que para esse segundo conjunto de gráficos, a LV1 apresentou uma variância explicada menor 18,47% que LV2 33,95%, enquanto que no primeiro conjunto de gráficos com dados brutos isso não ocorreu, apresentando LV1 93,13% e LV2 1,18%. A amostra 6.1-1 encontra-se fora do limite de confiança de 95%, o que pode denotar algum erro na realização da leitura da amostra no equipamento.

Gráfico 3 - PLS-DA com dados espectrais centrados na média LV1xLV2



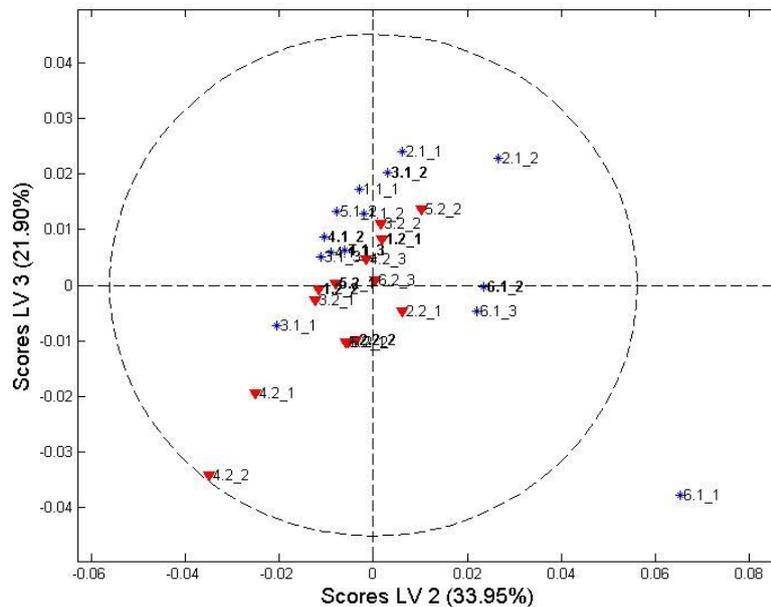
Fonte: Elaborada pela autora

Gráfico 4 - PLS-DA com dados espectrais centrados na média LV1xLV3



Fonte: Elaborada pela autora

Gráfico 5 - PLS-DA com dados espectrais centrados na média LV2xLV3

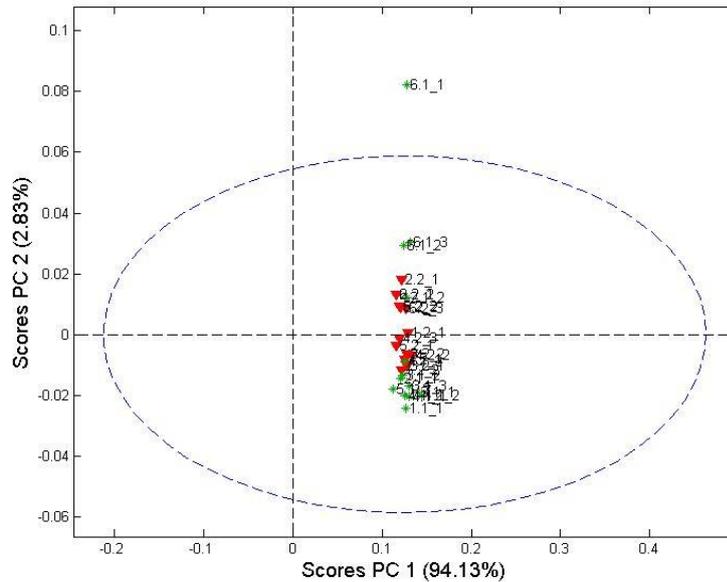


Fonte: Elaborada pela autora

Foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA) com o objetivo de se ter uma idéia do número de componentes principais necessários para descrever o conjunto de dados. No Gráfico 6 foi utilizado o PCA com espectros brutos e não foi obtida uma boa separação dos dados, já nos Gráficos 7 e 8 foram utilizados PCA dos espectros centrados na média, onde também não foi obtida uma boa distinção das amostras. Somente para visualização foi atribuído 1 para amostras com teor de lactose regular (cor azul) e 0 para

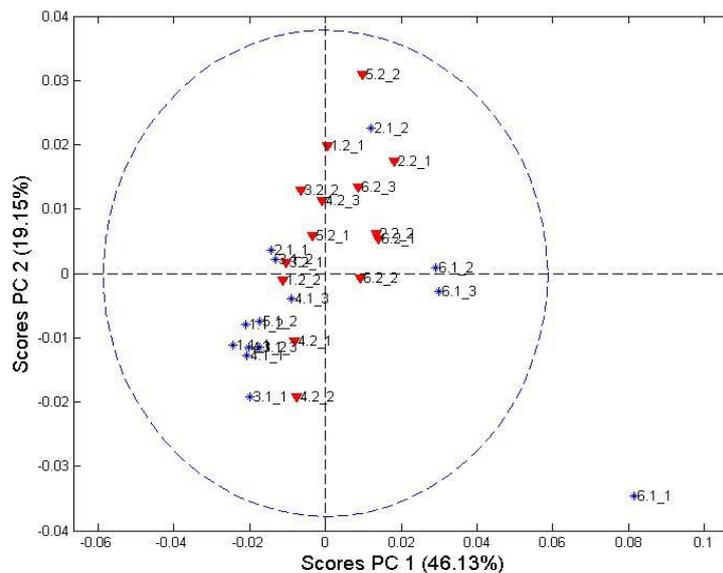
amostras com zero lactose (cor vermelha). É importante ressaltar que essa abordagem é diferente da PLS-DA, portanto não houve um treinamento e teste do modelo. A PCA foi feita somente com os espectros de todas as amostras. Nos três gráficos a amostras 6.1-1 apresentou-se como *outleir*.

Gráfico 6 - PCA com dados espectrais brutos PC1 x PC2



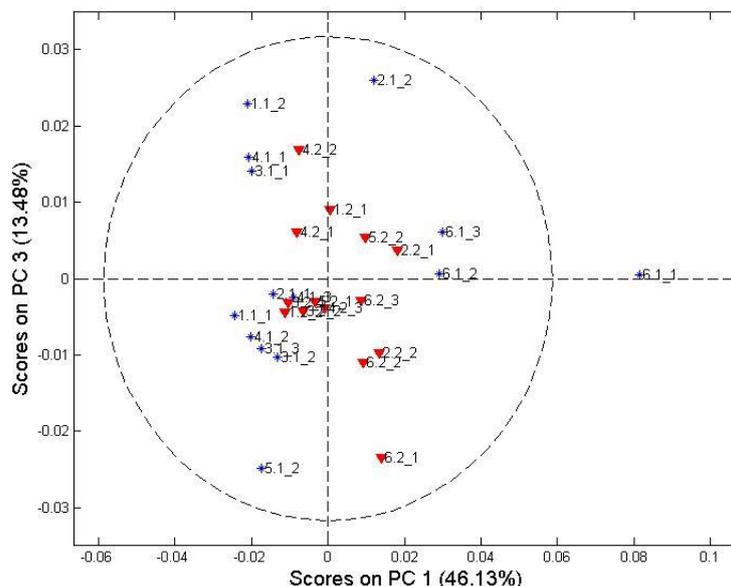
Fonte: Elaborada pela autora

Gráfico 7 - PCA com dados espectrais centrado na média PC1 x PC2



Fonte: Elaborada pela autora

Gráfico 8 - PCA com dados espectrais centrado na média PC1 x PC3



Fonte: Elaborada pela autora

Antes da aplicação do modelo construído, o mesmo deve ser validado com o objetivo de testar a sua capacidade preditiva; sem esta etapa não há sentido em prosseguir. A validação consiste em testar o modelo prevendo concentrações de amostras (de preferência não usadas na sua construção), para estabelecer se ele de fato irá refletir o comportamento do analito de interesse. Durante a etapa de validação dois fatores devem ser considerados:

- 1 - O número de fatores  $k$  a ser utilizado no modelo (número de componentes principais ou número de variáveis latentes).
- 2 - Detecção de "outliers" (amostras anômalas). (FERREIRA et al., 1999).

No PLS-DA atribuindo 1 para amostras com teor de lactose regular (cor azul) e 0 para amostras com zero lactose. O conjunto amostral foi separado em dados de treinamento e teste empregando o algoritmo *Kennard-Stone* (70/30). Os espectros foram centrados na média.

Na Tabela 3 foi feita a modelagem das amostras, foi realizada a calibração com 20 espectros, foram utilizadas as amostras de previsão e uma vez que se tem o coeficiente de regressão da calibração, então o modelo está apto a previsão. Foi realizada a leitura de previsão onde nas amostras 1.2-1, 1.2-2, 2.2-2, 5.2-1, foram identificados com 0, como zero lactose, e as amostras 3.1-2, 4.1-2, 4.1-3, 6.1-2, após treinamento foram identificadas como regulares.

Tabela 3 - Modelagem das amostras

PLS-DA			
Calibração	Atribuição do modelo	Previsão	Atribuição do modelo
1.1_1	1	1.2_1	0
1.1_2	1	1.2_2	0
2.1_1	1	2.2_2	0
2.1_2	1	3.1_2	1
2.2_1	0	4.1_2	1
3.1_1	1	4.1_3	1
3.1_3	1	5.2_1	0
3.2_1	0	6.1_2	1
3.2_2	0		
4.1_1	1		
4.2_1	0		
4.2_2	0		
4.2_3	0		
5.1_2	1		
5.2_2	0		
6.1_1	1		
6.1_3	1		
6.2_1	0		
6.2_2	0		
6.2_3	0		

Fonte: Elaborada pela autora

Na Tabela 3 foi utilizada validação cruzada que é uma metodologia utilizada para a escolha do número de componentes principais baseada na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Esta avaliação é feita pela comparação das previsões das concentrações previamente conhecidas, e em resumo consiste do seguinte:

1 – Foram removidas uma ou mais amostras do conjunto de calibração e construído o modelo.

2 – Foi utilizado o novo modelo para prever os dados removidos.

Foi realizada validação interna ou cruzada somente com dados de calibração das duas matrizes X e Y, chamada de *leave on out*, onde tiramos uma amostra para modelagem, com esta amostra fizemos um treinamento interno, retornando-a para o conjunto e logo após com todas as outras amostras.

De acordo com o modelo foi possível demonstrar que a PLS-DA foi capaz de identificar leites UHT com teores regulares de lactose e zero lactose.

## 5 CONCLUSÃO

Ao utilizarmos o FT-MIR assessorado por PLS-DA, foi possível demonstrar com o modelo que a PLS-DA foi capaz de diferenciar leites regulares e zero lactose.

A PLS-DA/FT-MIR pode ser utilizado para determinar a presença ou ausência de lactose em leite.

Em uma análise de leite com 0,1% de lactose (limite entre zero e baixo teor), o método será capaz de identificar caso seja calibrado com a concentração de lactose realizada por outro método, como foram utilizadas as concentrações fornecidas pelos fabricantes o mesmo pode ser realizado com outras concentrações.

As etapas de construção desse modelo, que consistiu do pré-processamento nos dados de origem, escolha adequada do tipo de pré-processamento, a validação do modelo, com escolha dos componentes principais, a leitura dos *scores* no modelo validado, proporcionou o estabelecimento de um modelo de previsão que poderá ser utilizado para previsão de um número maior de dados. Esses resultados mostram o grande potencial das técnicas quimiométricas combinadas com espectroscopia. E se tornam uma ferramenta poderosa para classificação dos leites UHT regulares e zero lactose. A partir disso, vê-se grande potencial ao aliar a espectroscopia no infravermelho e ferramentas multivariadas de uma forma rápida e segura para atuar no controle de qualidade do leite que é uma matriz complexa.

## **6 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS**

Nesta pesquisa foi possível verificar a aplicabilidade da espectroscopia de infravermelho assistido por PLS-DA na classificação de leites regulares e zero lactose. Como sugestões para trabalhos futuros podemos citar:

- Ampliar o número de amostras através de uma ampla faixa de concentração de lactose através de planejamento experimental, com o objetivo de demonstrar a sensibilidade da detecção pela técnica da espectroscopia assessorada por PLS-DA.
- Submeter esta dissertação na forma de artigo científico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ. Mercado nacional de lácteos. 2014. Disponível em: < <http://www.abiq.com.br> >. Acesso em: 14/06/2018.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 14724 – Requisitos gerais para formatação de trabalhos acadêmicos. 2011.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. McGraw-Hill Science, 2nd Edition, 1986.

BALLABIO, D. AND CONSONNI, V. Classification Tools in Chemistry. Part 1: Linear Models. PLS-DA. **Analytical Methods**, 5, 3790-3798, 2013.  
<https://doi.org/10.1039/c3ay40582f>

BRERETON, G. RICHARD. Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. . University of Bristol, UK. 2003.

BIGGS, D.A.; JOHNSON, G.; SJAUNJA, L.O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infra-red absorption. In: Monograph on rapid indirect methods for measurement of the major components of milk. Bull. **Int. Dairy Fed.**, n.208, p.21-29, 1987.

BRASIL. **Lei Nº 13.305, de 4 de Julho de 2016**. Acrescenta art. 19-A ao Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, que "institui normas básicas sobre alimentos", para dispor sobre a rotulagem de alimentos que contenham lactose. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 5 de julho de 2016. Ed 127, Seção 1, p 1.

BRASIL(a), ANVISA/MS. RESOLUÇÃO - **RDC Nº 135, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017**. Altera a Portaria SVS/MS nº 29, 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. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 9 de fevereiro de 2017. Ed 29, Seção 1, p 44.

BRASIL(b), ANVISA/MS. RESOLUÇÃO - **RDC Nº 136, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017**. Estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 9 de fevereiro de 2017. Ed 29, Seção 1, p 44.

BRASIL(c), ANVISA/MS. **Rotulagem de lactose garante a informação ao consumidor**. De 31 de janeiro 2017. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/rotulagem-de-lactose-garante-informacao-ao-consumidor/219201?p\\_p\\_auth=jDR8ca0x&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp\\_p\\_auth%3DjDR8ca0x%26p\\_p\\_id%3D101\\_INSTANCE\\_E\\_FXrpx9qY7FbU%26p\\_p\\_lifecycle%3D0%26p\\_p\\_state%3Dnormal%26p\\_p\\_mode%3Dview%26p\\_p\\_col\\_id%3D\\_118\\_INSTANCE\\_dKu0997DQuKh\\_\\_column-1%26p\\_p\\_col\\_col\\_count%3D1](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/rotulagem-de-lactose-garante-informacao-ao-consumidor/219201?p_p_auth=jDR8ca0x&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3DjDR8ca0x%26p_p_id%3D101_INSTANCE_E_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3D_118_INSTANCE_dKu0997DQuKh__column-1%26p_p_col_col_count%3D1).

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento e da Secretaria de Vigilância de Vigilância Sanitária. **Nova legislação comentada de produtos lácteos**. Brasília: DF, 2002.237p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento e da Secretaria de Vigilância de Vigilância Sanitária. Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS Laboratório de Produtos de Origem Animal. **Método de Ensaio: Determinação de glicídios redutores em lactose pelo Método de Lane-Eynon em Leite**. 2013.

BRITO M.A.V.P.; COSTA, F.F.; BRITO, J. R. F. Aspectos Associados à Qualidade do Leite: Composição, Saúde do Úbere e Resíduos Químicos. In: Pinto, C. L. O; Piccolo, M. P; Brito, M.A. V. P; Martins, M. L; Macêdo, C. S; Fariña, L. O.. (Org.). **Qualidade Microbiológica do leite Cru**. 1ed.Viçosa: Epamig, 2013, v. 1, p. 57-94.

BRONS, C.; OLIEMAN, C, 1983. Study of the high performance liquid chromatography separation of reducing sugars applied to the determination of lactose in milk, **J. Chromato.**, 259, 79,1983.

BRUKER OPTICS. Introduction to FT-IR spectroscopy - OPUS Spectroscopic Software . [S.l.]: Bruker Optik GmbH. , 2014

BOSCHI, J.R. *Concentração e purificação das proteínas do soro do queijo por ultrafiltração*. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre 2006.96 p.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of Near-Infrared Analysis**. New York: Marcel Dekker, 2001.

CARNEIRO-SAMPAIO, M.; MOURA, S.P.M.B.; LANZOULO, J. **ABC da saúde Infantojuvenil**. Barueri. SP. Ed. Manole, p. 94-96, 2016.

CASADIO, Ylenia S et al. Evaluation of a Mid-Infrared Analyzer for the Determination of the Macronutrient Composition of Human Milk. **J Hum Lact** v. 26, p. 376–383 , 2010.

COSTA, A. M. A. Para que serve a espectroscopia? **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, n. 88, p. 72-77, 2003.

DIETRICH, J. M. Intolerância a lactose, um nicho de mercado a ser explorado. **Revista Leite 2011**. Disponível em: < <http://globalfood.com.br/site/site/arquivos/intolerancia%20a%20lactose%20por%20Jaime>>. Acesso em: 14/06/2018.

EMIL W. C., BENOIT I. **Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy**, Second Edition. CRC Press, 2014, ISBN 1420084143, 9781420084146.

EMBRAPA. **Anuário do Leite 2019**.

Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198698/1/Anuario-LEITE-2019.pdf>>.

FEED & FOOD (2019). O Brasil tem enorme potencial no setor lácteo. Disponível em:<<http://www.feedfood.com.br/en/noticias/6/brasil-tem-enorme-potencial-no-setor-lacteo>>. Acesso em :31/10/2019.

FERRARINI, Hair. Determinação de teores nutricionais do milho por Espectroscopia no Infravermelho e Calibração Multivariada. Universidade Federal do Paraná, 2004.

FERREIRA, C.Marcia; ANTUNES, M.Alexandre; MELGO, S.Marisa; VOLPE, L.O.Pedro. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Rev. Química Nova** v.22 n.5 São Paulo set./out. 1999.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1ª edição. Thomson Science: Londres, Inglaterra. 2009. 478p.

GÄANZLE, G.M.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystalization, Hidrolysis an Value-added Derivatives. **International Dairy Journal Elsevier**. Canadá, p. 685-694, 2008.

GEA FILTRATION. Filtração por membranas. Catálogo de exposição, 2012. Disponível em:< [http://www.geafiltration.com/filtration\\_library/membrane\\_filtration\\_Portuguese.pdf](http://www.geafiltration.com/filtration_library/membrane_filtration_Portuguese.pdf)>. Acesso em: 14/06/18.

GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of Lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**. V.20, p. 2-12, 1985.

HANCU,G.; PAPP, L.A.; RUSU, A. Chiral Separation of the Enantiomers of Omeprazole and Pantoprazole by Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* (2015) 78:279–284. DOI 10.1007/s10337-014-2827-1

HATZINIKOLAOU, D. G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A. D.; CHRITAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Modeling of the Simultaneous Hidrolysis-Ultrafiltration Whey Permeate by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**. V.24, p. 161-172, 2005.

HILGENBERG, M.; CANTERI, M.H.G; HASS, D. Implantação de Metodologia de Rotina de Uso de Polarímetro. Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica. Campus Ponta Grossa Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UFPR, 2012.

HU, Yaxi et al. Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, 202, 254-261, 2016;

HOSHINO, L.K.O. et al. Estudo da hidrólise na obtenção de leite lactose hidrolisado microfiltrado e avaliação de parâmetros físico-químicos para determinação da sua vida útil. In: Congresso interinstitucional de iniciação científica, 2009, Campinas. **Anais eletrônicos**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2009/Artigos/RE0901015.pdf>> Acesso em: 12/04/2018.

IBGE. **Quantidade de leite cru, resfriado ou não, adquirido (Mil Litros), 1º trimestre 1997 - 2º trimestre 2019**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?=&t=series-historicas>>.

INGRAM, CJE; MULCARE, CA; ITAN, Y; THOMAS, MG; SWALLOW, DM. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. **Hum Genet** 2009; 124(6):579-591.

INSUMOS. Intolerância à lacteos com baixo teor de lactose. São Paulo: Ed.Insumos. Disponível em: <[www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes\\_materiais143.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes_materiais143.pdf)>

IFT - INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS (2012). Lactose-free dairy market shows growth potential. Disponível em: <<http://www.ift.org/food-technology/daily-news/2012/august/02/lactose-.aspx>>. Acesso em: 19/05/18.

Investigação e diagnóstico de intolerância a lactose. In: FLEURY MEDICINA E SAÚDE. Disponível em: <<http://www.fleury.com.br/medicos/educacao-medica/artigos/Pages/investigacao-e-diagnostico-de-intolerancia-a-lactose.aspx>>. Acesso em: 04/07/18.

JIMIDAR, M. et al. Comparison of capillary zone electrophoresis with high-performance liquid chromatography for the determination of additives in foodstuffs. **Journal of Chromatography**, v. 636, n. 1, p. 179-186, 1993. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80070-O](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(93)80070-O)

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J.M. A New Kinetic Model Proposed for Enzymatic Hidrolysis os Lactose by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial technology**. v. 31, p. 300-309, 2002.

KARAHADIAN, C.; LINDSAY, R. C. Integrated roles of lactose, ammonia, and calcium in texture development of mold surface-ripened cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 5, p. 909-918, 1987.

KARDEL, G.; FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M.L. Lactase na indústria de laticínios : parte 1. “**Revista do instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**”. Juiz de Fora, v. 50, n. 294, p.15-17, 1995.

KINKARTZ, S. Crescimento populacional e o desafio da alimentação. Laboratório de Demografia e Estudos Populacionais – UFJF. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/ladem/2012/02/28/crescimento-populacional-e-o-desafio-da-alimenação-por-sabine-kinkartz/>>. Acesso em: 15/06/2018.

KOMBILA-MOUNDOUNGA, E.; LACROIX, C. Effet des combinaisons de chlorure de sodium, de lactose et de glycérol sur les caractéristiques rhéologiques et la couleur des fromages fondus à tartiner. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 24, n.5, p.239-251, 1991.

KOWALSKI, P. et al. Comparative Evaluation of CE and HPLC for Determination of Cotinine in Human Urine. **Chromatographia**, v. 66, n. 5-6, p. 357-361, 2007. <http://dx.doi.org/10.1365/s10337007-0331-6>.

KOWALSKI, P.; PLENIS, A. Comparison of HPLC and CE methods for the determination of cetirizine dihydrochloride in human plasma samples. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 9, p. 903-911, 2007. PMID:17443836. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.818>

LARKIN, P. *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier, 2017, ISBN 0128042095, 9780128042090

LATMIRAL, L.; ARMATA, F.; GENONI, M. G.; AND PIKOVSKI, I.; KIM, M. S. Probing anharmonicity of a quantum oscillator in an optomechanical cavity. **Phys. Rev. A**, vol. 93, may 2016.

LEE, BEE-LAN; ONG, CHOON-NAM. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by highperformance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 881 (2000) 439–447.

MENDES, T.O. *Espectroscopia FT-MIR e calibração multivariada para determinação simultânea dos teores de gordura, proteínas e lactose e adulterações por adição de água na amostra de leite*. 2011. (Dissertação de Mestrado) Pós-graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG , 2011.

MANCINI, S.D. *Materiais e Reciclagem: Ensaio de Materiais*. UNESP . Sorocaba – SP .03/2019. Disponível em: <<https://www.sorocaba.unesp.br/Home/Graduacao/Engenharia/Ambiental/SandroD.Mancini/7---ensaios.pdf>>. Acesso em: 08/10/2019.

MANOEL, R.V.G. *Desenvolvimento de métodos para determinação de cátions inorgânicos em leites, nitrito e nitrato em alface e histaminas em peixes utilizando eletroforese capilar*. 2011. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

MATTAR, R.; MONTEIRO, M.S.; VILLARES, C.A.; SANTOS, A.F.; SILVA, J.M.K., CARRILHO, F.J. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. **Nutrition Journal** 2009; 8:46.

MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M.J.K. **VOGEL: Análise Química Quantitativa**. Ed. LTC, 6ª ed. 2002.

MILKPOINT (2018). Produção de leite deve crescer 2,5% em 2018. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/producao-de-leite-deve-crescer-25-em-2018-206554/>>. Acesso em: 15/06/18.

MILKPOINT(2019). China deve aumentar importações em 8,8 bilhões/litros/ano de 2018 à 2028 diz especialista. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/china-deve-aumentar-importacoes-em-88-bilhoes-de-litrosano-de-2018-a-2028-diz-especialista-215452>>. Acesso em: 31/10/2019.

MINTEL. Cresce lançamento de produtos sem lactose no Brasil. Disponível em:<<http://brasil.mintel.com/blog/noticias-mercado-alimentos-bebidas/cresce-lancamento-de-produtos-sem-lactose-no-brasil>>. Acesso em: 14/06/18.

MONTES, A.M.L. *Optimización de técnicas espectrométricas y separativas para la identificación de material colorante en patrimonio cultural*. 2015. Tese (Doutorado em Química)-Universidade de Granada,Espanha.

MONTIPÓ,R.B. *Determinação do ponto de congelamento do leite bovino in natura da bacia leiteira de Santa Maria-RS*. 1992. 244f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1992.

MOREIRA, K.M.M. et al. Produção de Doce de leite com teor reduzido de lactose por  $\beta$ -Galactosidase.**Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambientais**. v.7, p. 375-382, 2009.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1991.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais do II Sul - Leite**. Maringá: UEM, 2002.p 206-217.

NEVES, L.N.O. *Desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para avaliação de indicadores de tratamento térmico em leite UHT*. (Dissertação de Mestrado) Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. 2015.

NOGUEIRA, A.C.A; MELO,E.D. **Nutrologia Pediátrica Prática Baseada em Evidências**. Barueri,SP: Ed. Manole,2016.

ONU - ORGANIZAÇÃO DA NAÇÕES UNIDAS – BRASIL.  
Disponível:<<https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-chegar-a-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu/>>.Acesso:24/10/2019.

PEREIRA, F.D.; FURLAN, S.A. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). **Revista Saúde e Ambiente** 2004; 1(5):24-30.

PERKIN ELMER. The Analysis of Lactose in Milk and Cheese Products by HPLC.  
Disponível em: <[www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)>. Acesso: 11/06/18.

PROZYN. Produtos com baixa lactose. **Informação técnica**, 2010.

QUEIROZ, S.C.N.; JARDIM, I.C.S.F. Eletroforese Capilar. **Chem keys** - Liberdade para aprender.Disponível em: < [www.ufjf.br/baccan](http://www.ufjf.br/baccan)> . Acesso em 16/06/18.

RAMALHO,M.E.O.; et al. Intolerância a Lactose e o Processamento dos Produtos Zero Lactose. Faculdade de Tecnologia de Taquaritinga – São Paulo – Brasil. 119-133p.[2016?].

REIS, J.C.; MORAIS, M.B.de and FAGUNDES-NETO, U. Teste do H<sub>2</sub> no ar expirado na avaliação de absorção de lactose e sobre crescimento bacteriano no intestino delgado de escolares. **Arq. Gastroenterol.** [online]. 1999, vol.36, n.4, pp.169-176. ISSN 0004-2803. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-28031999000400003>

RENNER, E. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**. Germany: W. G. Mott, University of Glessen Munich, 1983. p 1-450.

RESENDE M.F.; MATOS, M.A.C. Determinação de galactose, glicose e lactose em leite por HPLC. NUPIS – Núcleo de Pesquisa em Instrumentação e Separação Analíticas, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG. 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 2010.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; ALLENDORF, M.E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. **Annual Review of Food Science and Technology** v. 2, n. 1, p. 467–483, 2011.1941-1413.

RODRIGUES, D.H.daS.; OLIVEIRA, A.C. Avaliação de uma proposta contextualizada sobre o ensino de polarimetria nos cursos de farmácia e engenharia de alimentos, na Universidade Federal do Ceará Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici. **Quím. Nova** vol.32 no.1 São Paulo 2009.

SANTOS, P. M. et al. Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para teste de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica** v. 28, n. 4, p. 398–409, 2012.

SANTOS, J. Detecção e seguimento de objectos com base em imagens infravermelhas: uma análise experimental. Disponível em: < <https://paginas.fe.up.pt/~ee05094/diss/infra.html> > . Acesso em: 07/11/2019.

SANTOS, K.W.P.; ZANUSSO, J.G. Análise da Prevalência de Portadores De Intolerância à Lactose por Exames Laboratoriais Em Maringá-PR. **REVISTA UNINGÁ**, [S.l.], v. 45, n. 1, set. 2015. ISSN 2318-0579. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/1239>>. Acesso em: 21 out. 2019.

SATHYANARAYANA, D. N. **Vibrational Spectroscopy: Theory and Applications**. New Age International, 2015 ISBN 8122415172, 9788122415179.

SIMAS, R. C. Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia de infravermelho próximo. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 325p.

SVEČNJAK, LIDIJA ET AL. Characterization of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) nectar-to-honey transformation pathway using FTIR-ATR spectroscopy. **Food Chemistry**, 232, 286-294, 2017.

SIVAM, A. S. et al. Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols. **Food Research International**, 50, 2, 574-585, 2013;

SILVEIRA, T.M.L. FONSECA, L.M. CANÇADO, S.V. FERRAZ, V. Comparação entre os métodos de referência e a análise eletrônica na determinação da composição do leite bovino. Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal Escola de Veterinária da UFMG. Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal Escola de Veterinária da UFMG.

SCOTT, K.; HUGHES, R. **Industrial membrane separation technology**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 305 p.

SHENDURSE, A.M.; KHEDKAR, C.D. Lactose, **In Encyclopedia of Food and Health**, p. 509-516, 2016.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2012.

SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. Cengage Learning, 2017, ISBN 1305577213, 9781305577213.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3th Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010. 957

SOMBRA, L.L. et al. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 5, p. 989-994, 2005. PMid:15620524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2004.08.026>

SOUZA, P.B. et al. Uma abordagem sobre a determinação de atividade antioxidante e fenóis totais por FT-IR e quimiometria em alimentos. **Revista Jovens Pesquisadores**, Santa Cruz do Sul, v.8, n. 1, p. 17-25, jul. 2018. ISSN 2237-048X. doi:<https://doi.org/10.17058/rjp.v8i1.11848>. Disponível em: <<https://online.unisc.br/seer/index.php/jovenspesquisadores/article/view/11848/7434>>. Acesso em: 07 nov. 2019.

**Standard Methods for the examination of Dairy Products**, Ed. Alpha, 17 edition, 2004.

SHINYASHIKI, R. Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado. Disponível em: <[https://www.pensador.com/autor/roberto\\_shinyashiki/](https://www.pensador.com/autor/roberto_shinyashiki/)>.

SWAGERTY, DL; WALLING, AD; KLEIN, RM. Lactose Intolerance. **Am Fam Physician** 2002; 65(9):1845-1851.

TAVARES, M. F. M. "Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar", **Quím. Nova**, 1997, 20: 493- 511.

TONDELLO, T. F. *Recuperação por osmose inversa de águas residuais geradas na produção de leite condensado*. 2011. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

TONETTI, D. *Leite semi-desnatado ultrapasteurizado com teor reduzido de lactose através do método enzimático*. 2015. 35p. (Monografia de Especialização em Gestão da Qualidade na Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná.

TOZETTO ,A.; DEMIATE, I.M.; NAGATA, N. Análise exploratória de adoçantes de mesa via espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise por componentes principais (ACP). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(4): 723-728, out.-dez. 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n4/08.pdf> > . Acesso: 04/07/18.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4. Ed. Santa Maria: UFSM, 1997. 195 p.

TREVISAN, A. P. *Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise em leite pasteurizado*. 2008. 60f. (Dissertação) Mestrado em Ciência e tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

TROISE, A.D. et al. Evolution of protein bound Maillard reaction end-products and free Amadori compounds in low lactose milk in presence of fructosamine oxidase I. **Food Chemistry**, v. 212, p. 722-729, 2016.

USAI-SATTA, P; SCARPA, M; OPPIA, F; CABRAS, F. Lactose malabsorption and intolerance: a systematic review on the diagnostic value of gastrointestinal symptoms and self-reported milk intolerance. **World J Gastrointest Pharmacol Ther**. 2012 Jun 6;3(3):29-33.

VAN DENDER, A.G.F. *Colaboração ao estudo do uso de ultrafiltração de leite na fabricação de queijo Minas Frescal*. 1995. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas,SP.

VINHAL, E.F. *Hidrólise da lactose no leite por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis**. 2001.100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG.

VAZ, F.A.S. ; OLIVEIRA, C.L.M.; OLIVEIRA, M.A.L. Fundamentos de eletroforese capilar: Uma abordagem por animações. **Química Nova**, 01 maio 2015, Vol.38(5), pp.732-737.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1984. 423 p.

WALSTRA, P., WALSTRA, P., WOUTERS, J., GEURTS, T. **Dairy Science and Technology**, 2ª Ed. Vol 1. Boca Raton: CRC Press, 2005.