

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Leandra Natália de Oliveira Neves

Determinação dos isômeros lactulose e lactose em leite UHT para a avaliação dos processos térmico e hidrólise enzimática por eletroforese capilar de zona com detecção no ultravioleta

Juiz de Fora
2020

Leandra Natália de Oliveira Neves

Determinação dos isômeros lactulose e lactose em leite UHT para a avaliação dos processos térmico e hidrólise enzimática por eletroforese capilar de zona com detecção no ultravioleta

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2020

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

de Oliveira Neves, Leandra Natália.

Determinação dos isômeros lactulose e lactose em leite UHT para a avaliação dos processos térmico e hidrólise enzimática por eletroforese capilar de zona com detecção no ultravioleta / Leandra Natália de Oliveira Neves. -- 2020.

140 p.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

1. Lactulose. 2. Lactose hidrolisada. 3. Leite UHT. 4. Tratamento térmico. 5. Eletroforese capilar. I. Leal de Oliveira, Marccone Augusto, orient. II. Título.

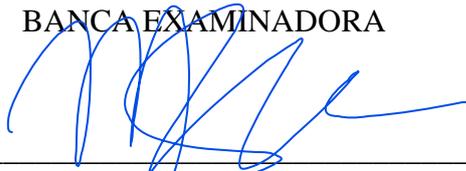
Leandra Natália de Oliveira Neves

Determinação dos isômeros lactulose e lactose em leite UHT para a avaliação dos processos térmico e hidrólise enzimática por eletroforese capilar de zona com detecção no ultravioleta

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Aprovada em 13 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Heitor Daguer

MAPA - Laboratório Nacional Agropecuário



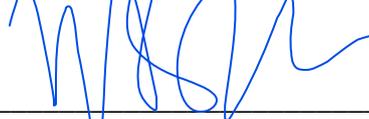
Profa. Dra. Isis Rodrigues Toledo Renhe

Instituto de Laticínios Cândido Tostes - EPAMIG



Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Fabiano Freire Costa

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esta tese àqueles que fazem do Leite o seu sustento e a sua paixão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar e me dar forças para continuar mesmo quando eu pensava que não era mais possível.

Aos meus pais, Valmir e Maria José, pelo amor, ensinamentos, e dedicação diários. Por terem me proporcionado seguir essa longa formação acadêmica diante de tantos esforços e dificuldades. Um “muito obrigada” nunca será suficiente para retribuí-los. Amo vocês!

À minha irmã, Vanessa, que mesmo de tão longe se faz presente e que me inspira desde sempre. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos e pelos felizes momentos.

A todos os meus familiares, que sempre torceram por mim, por serem meu porto seguro. Em especial, à minha avó Francisca (*in memoriam*) pelas orações e carinho incondicional. Você faz muita falta todos os dias. À minha Tia Maria, pelo apoio desde que eu me entendo por gente. Ao meu Tio Chico, pelos inúmeros e inesquecíveis momentos felizes, brincadeiras e ensinamentos.

Ao meu esposo, Arthur, por todo apoio durante esses longos quatro anos regados a fins de semana no laboratório, por me entender e me motivar nos momentos difíceis e por me lembrar de que existe vida lá fora. Seu companheirismo foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Juntos, somos mais fortes!

Aos meus sogros, Regina e João, pelas conversas descontraídas, por me receberem sempre com um sorriso no rosto e uma taça de vinho na mão, pelo apoio e carinho. Vocês são especiais!

À Rachel e Messias, por confiarem em mim e abrirem literalmente a casa de vocês em Juiz de Fora, facilitando meu deslocamento diário e viabilizando ter o meu primeiro e tão sonhado cantinho.

Aos meus poucos e bons amigos que a UFJF me deu: Cássia Cardoso, Júlia Valério, Larissa Lavorato, Lucas Duarte, Michelle Nascimento e Tatiana Gomes (em ordem alfabética) pela companhia sempre agradável, pelos ótimos papos, conselhos, cafés e incontáveis *happy hours*. Sou mais feliz simplesmente por ter a amizade de vocês. Obrigada por fazerem parte da minha vida, sinto a falta de vocês todos os dias!

Aos novos amigos que o Rio me presenteou, Ingrid e Hermés, vocês são simplesmente sensacionais! Ingrid, sua luz me inspira e alegra os meus dias. Obrigada por todo apoio, incentivo e palavras de sabedoria que vocês compartilham comigo. Vocês tornaram meus dias melhores nos momentos mais difíceis. Sou grata pelo Universo ter me ofertado tão feliz encontro.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Marcone A. L. de Oliveira, pelo incentivo e motivação para que eu ingressasse no Doutorado mesmo sabendo de todas as minhas limitações temporais para uma dedicação exclusiva. Obrigada por acreditar no meu potencial e apoiar minhas decisões, ainda que elas parecessem loucas. Por se preocupar comigo não somente como orientanda, mas como Ser Humano. Sou muito grata pelos conselhos científicos e pessoais que me fizeram crescer e abrir minha mente a novas ideias. Pelas longas conversas ao telefone e pelas reuniões no fim das sextas-feiras que se estendiam noite a fora. Por me perguntar se eu estava feliz antes de cobrar qualquer eventual resultado. A sua amizade e apoio foram fundamentais nesse processo e tenho certeza que não teria pessoa melhor para cumprir esse papel de orientador. O meu “muito obrigada” por tudo!

Ao Prof. Dr. Humberto Hungaro, do Laboratório de Análise de Alimentos e Águas da Faculdade de Farmácia – UFJF, por me acolher e disponibilizar toda a estrutura do laboratório para as análises por crioscopia. Obrigada pela cordialidade e atenção.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos e Águas da Faculdade de Farmácia – UFJF, por viabilizarem a execução das análises. E em especial, à bolsista Clara, pela gentileza e disponibilidade em me acompanhar efetivamente nas análises crioscópicas.

À empresa Globalfood por ceder a enzima β -galactosidase utilizada nos ensaios de hidrólise enzimática. Em especial, aos representantes técnicos Cláudio Costa e Henrique Guimarães, por todo suporte técnico prestado.

A todos os colegas do Grupo de Química Analítica e Quimiometria da UFJF, com os quais tive o prazer de trabalhar, vocês foram essenciais para meu crescimento. Em especial, à Tatiane Lima, pelas considerações sempre oportunas, receitas maravilhosas e companhia nas análises de fim de semana.

A todos do Departamento de Nutrição da UFJF, por contribuírem para meu crescimento profissional ao longo dos oito anos que trabalhamos juntos. Em especial, aos queridos Fernando Bretas, João Pablo, Kácia Mateus, Vanessa Almeida, Marisa Batista, Fabiana Almeida, Elaine Toledo e Marina Lelis, pelos momentos de descontração e inúmeros cafés da manhã. À Prof.^a Dr.^a Arlete de Paula, pela companhia pós-expediente, pelos conselhos e carinho. À Prof.^a Dr.^a Céphora Sabarense, pelos desafios e ótimas discussões científicas. À prof.^a Dr.^a Cristiane Oliveira (*in memoriam*) pela disponibilização do laboratório de Análise Instrumental para liofilização das amostras de leite, e principalmente pelas risadas e por dividir comigo os incontáveis cafés “feitos a quatro mãos”. Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca, pela parceria em trabalhos e por disponibilizar a estrutura do Laboratório de Composição e Valor Nutricional dos Alimentos para as análises de HMF e WPNI.

A todos os professores e funcionários da Escola de Química da UFRJ, que me acolheram carinhosamente de braços abertos. Em especial, à minha chefia imediata, querida Prof.^a Dr.^a Erika Nunes, por todo apoio e por viabilizar de forma tão gentil e atenciosa a continuação do meu Doutorado na UFJF. E aos meus novos amigos e colegas de trabalho, Rafael Conceição e Juliana Torres, pela parceria e pelo ambiente descontraído.

Às minhas eternas professoras e amigas, Dr.^a Vanessa Aglaê e Dr.^a Elisângela Miguel, por contribuírem para minha formação na área do Leite, por serem as primeiras a me mostrarem o caminho científico e plantarem em mim a sementinha da pesquisa aplicada. E, acima de tudo, obrigada pelas risadas, conselhos, carinho e amizade.

A todos os professores do Departamento de Química – UFJF, por contribuírem para minha formação acadêmica e profissional. Em especial, ao Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa, pelos ensinamentos durante os anos de Iniciação Científica e por sempre me incentivar.

Às secretárias da pós-graduação do Departamento de Química – UFJF, Maristela e Mariana, que sempre me auxiliaram com presteza e muita atenção.

Aos membros da minha banca de qualificação, Prof.^a Dr.^a Maria Auxiliadora Matos, Prof.^a Dr.^a Céphora Sabarense e Dr. Marco Antônio Gama, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições para a versão final desta tese.

Aos projetos do Programa Nacional de Pós Doutorado (PNPD/CAPES), referência 23071022702/2018-43, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), referências 303355/2017-4 e 424032/2018-0, do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica (INCTBio), referências FAPESP 2014/50867-3 e CNPq 465389/2014-7, da Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), referências CT-INFRA 01/2013-REF 0633/13), e da Rede Mineira de Química, referência CEX.RED-00010-14, pelo financiamento de todo material necessário para realização de experimentos e manutenção dos equipamentos do laboratório do Grupo de Química Analítica e Quimiometria.

Ao subir uma montanha, você jamais retornará o mesmo. E o que te faz diferente não é alcançar o topo em si, o que te torna diferente é o caminho. (**Próprio autor, 2020**).

RESUMO

O leite UHT (do inglês, *ultra-high temperature*) é o principal representante comercial da categoria de lácteos isentos de lactose, frequentemente denominados “hidrolisados”. A viabilização de um método analítico para monitorar o processo térmico UHT e de hidrólise da lactose torna-se necessário tanto para a indústria, pois permite padronização e redução de custos, bem como para os órgãos fiscalizadores, para verificar a adequação do produto à legislação vigente. Esta tese teve como objetivo principal aperfeiçoar e aplicar o método por eletroforese capilar de zona com detecção indireta no ultravioleta (CZE-UV) em leite UHT convencional (teor regular de lactose – REG) e hidrolisado (lactose hidrolisada – LH) para monitorar ambos os processamentos térmico e de hidrólise enzimática da lactose mediante a determinação dos isômeros lactulose e lactose, respectivamente. Para isso, a otimização de parâmetros instrumentais como pressão de injeção, tensão aplicada e temperatura, assim como diferentes preparos de amostra com agentes ácidos e orgânicos foram avaliados. Limites de quantificação de $9,4 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ e $0,024 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ para lactulose e lactose, respectivamente, variabilidade intralaboratorial de 0,83 a 3,60 % e faixa de recuperação entre 86 e 102 % foram obtidos. O aprimoramento do preparo da amostra empregando-se o ácido tricloroacético e o ajuste dos parâmetros instrumentais permitiram obter uma corrida eletroforética de 12 minutos. A determinação dos isômeros foi alcançada em 116 minutos utilizando quantificação por adição de padrão com único incremento. Paralelamente, os indicadores térmicos 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) e índice de nitrogênio de soroproteína não desnaturada (WPNI) também foram avaliados. A redução do teor de lactose por hidrólise enzimática não influenciou o comportamento do índice de WPNI, demonstrando que o mesmo pode ser utilizado como indicador térmico para as matrizes REG e LH. O leite LH apresentou índice HMF significativamente maior, podendo ser utilizado para distinguir o tipo de matriz (teores médios de $13,1$ e $42,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para matriz REG e LH, respectivamente); enquanto seu teor de lactulose ($13,0 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$) foi menor que o encontrado para o leite REG ($35,6 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$). Não foram observadas diferenças significativas entre os métodos eletroforético e crioscópico utilizados no monitoramento de diferentes processos de hidrólise enzimática testados em escala laboratorial, embora se tenha observado maior sensibilidade do método CZE-UV. O aperfeiçoamento do método CZE-UV possibilitou a determinação dos isômeros lactulose e lactose. Portanto, este método pode ser aplicado para monitorar o processamento térmico UHT, principalmente de leite REG e como

ferramenta para fiscalização e avaliação do processo de hidrólise enzimática para produção de leite LH.

Palavras-chave: Lactulose. Lactose. Leite UHT. Tratamento térmico. Lactose hidrolisada. Lactase. Eletroforese capilar.

ABSTRACT

The UHT (ultra-high temperature) milk is the main product in the lactose-free dairy category, also known as “lactose-hydrolysed”. The feasibility of an analytical method for monitoring the UHT and lactose hydrolysis processes is necessary for both the industry, as it allows standardization and cost reduction, as well as for the regulatory agencies, to verify the adequacy of the product in the current legislation. The main goal of this thesis was to optimize and apply the capillary zone electrophoresis with indirect detection at ultraviolet region (CZE-UV) for conventional UHT (regular content of lactose – REG) and lactose-hydrolysed (LH) milk to monitoring the UHT process and the enzymatic hydrolysis of lactose by determining lactulose and lactose isomers, respectively. For this, the optimization of instrumental parameters such as injection pressure, applied tension and temperature, as well as different sample preparations using acidic and organic agents were done. Quantification limits of $9.4 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ and $0.024 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ for lactulose and lactose, respectively, intra-laboratory variability from 0.83 to 3.60% and recovery range between 86 and 102% were obtained. The improvement of sample preparation using trichloroacetic acid, as well as the adjustment of the instrumental parameters provided an electrophoretic run of 12 minutes. The determination of the isomers was achieved in 116 minutes using the single point standard addition quantification method. At the same time, the thermal indicators 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) and the Whey Protein Nitrogen Index (WPNI) were also assessed by spectrophotometry and turbidimetry, respectively. The low lactose content of LH milk did not influence the WPNI index profile, and it can be used as a thermal indicator for REG and LH matrices. The HMF index was significantly higher in LH milk, and can distinguish the type of matrix (13.1 and $41.1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, for REG and LH milk, respectively). LH samples showed lower lactulose levels than REG ones (13.0 and $35.6 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$, respectively). There were no differences between the electrophoretic and cryoscopic methods used to monitor in batch and aseptic hydrolysis processes, despite the CZE-UV method be more sensitive. The optimization of the CZE-UV method allowed determining the lactulose and lactose isomers. Therefore, this method can be applied to monitor the UHT thermal processing, mainly for REG milk, and as a tool for inspection and control of the enzymatic hydrolysis process for LH milk.

Keywords: Lactulose. Lactose. UHT milk. Thermal treatment. Lactose-hydrolysed. Lactase. Capillary electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura molecular dos anômeros α - e β -lactose	32
Figura 1.2 – Estrutura molecular da lactulose.....	37
Figura 1.3 – Isomerização da lactose em lactulose via transformação de Lobrey de Bruyn-Alberda van Ekenstein.....	38
Figura 1.4 – Sistema reacional evidenciando a formação de 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) durante reação de Maillard	41
Figura 1.5 – Reação simplificada de formação do complexo TBA-HMF	42
Figura 1.6 – Sistema de separação por eletroforese capilar de zona sob fluxo eletrosmótico normal evidenciando o estado inicial logo após injeção (a) e a formação das zonas distintas com migração diferencial dos analitos A, B, C e D mediante aplicação de campo elétrico (b). Onde: μ_{osm} é a mobilidade do fluxo eletrosmótico, μ_{eff} é a mobilidade efetiva e μ_{ap} é a mobilidade aparente. Os grupos silanóis ionizados (-SiO ⁻) da superfície interna do capilar também são mostrados em detalhe	45
Figura 1.7 – Sistema de separação dos ânions A e B por eletroforese capilar de zona com fluxo eletrosmótico e polaridade invertidos.....	48
Figura 1.8 – Curva característica do índice crioscópico do leite	49
Figura 2.1 – Etapas experimentais do método de extração aplicado para análise eletroforética de lactose e lactulose em leite UHT convencional	54
Figura 2.2 – Perfis de separação eletroforética obtidos para quantificação de lactulose (A) e lactose (diluição 1:50) (B) em leite UHT convencional da marca M_02. Picos: (1) lactulose e (3) lactose. Linha cheia refere-se ao sinal do extrato da amostra (S ₁) e linha tracejada ao sinal do extrato da amostra + padrão do analito (S ₂)	59
Figura 3.1 – Etapas experimentais dos métodos de extração avaliados para análise eletroforética de leite UHT convencional e hidrolisado	69
Figura 3.2 – Estudo da mobilidade efetiva (μ_{eff}) para lactulose (1), glicose (2), lactose (3) e galactose (4), indicando a ordem de migração dos analitos ao longo da faixa de pH e; gráfico A obtido experimentalmente para solução de padrões a 1 mg mL ⁻¹ em pH \geq 12,5.....	73

Figura 3.3 – Perfis eletroforéticos de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) submetidos aos ensaios CE_10 (A) e CE_12 (B). Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose	75
Figura 3.4 – Perfis eletroforéticos de amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) submetidas aos métodos de extração E_1 (I), E_2 (II), E_3 (III), E_4 (IV), E_5 (V) e E_6 (VI). Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose	76
Figura 3.5 – Comparativo dos métodos HPLC-RID e CZE-UV enfatizando o tempo gasto nas etapas de preparo de amostra, separação e quantificação para uma amostra de leite UHT analisada em duplicatas autênticas (REP 1 e REP 2).....	79
Figura 3.6 – Perfis eletroforéticos obtidos na quantificação de lactulose (A) e lactose (B) em amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) da marca M_3. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose. Linha cheia refere-se ao sinal analítico do extrato da amostra e linha tracejada ao sinal do extrato + padrão do analito a ser quantificado	81
Figura 4.1 – Representação gráfica da distribuição das amostras de leite UHT com teor regular de lactose (REG) e lactose hidrolisada (LH) considerando o teor de lactose quantificado e os marcadores térmicos: (a) índice de HMF total, (b) índice de WPNI e (c) teor de lactulose	96
Figura 5.1 – Etapas experimentais para simulação de processo de hidrólise enzimática antes (Ensaio 1) e após (Ensaio 2) o tratamento térmico UHT	104
Figura 5.2 – Evolução gráfica para hidrólise enzimática da lactose detectada pelos métodos por crioscopia (x) e CZE-UV (●) durante Ensaio 1 (hidrólise por batelada – incubação a 8 °C) (a) e Ensaio 2 (hidrólise asséptica – incubação a 40 °C) (b).....	110
Figura 5.3 – Perfis eletroforéticos de leite submetido aos processos de hidrólise por batelada - Ensaio 1 (a) e asséptica - Ensaio 2 (b) monitorados ao longo do tempo t_i (sendo $i = 0, 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180$ e 240 min). Picos (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose ^a	112
Figura 6.1 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_1 a M_3. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose	129

- Figura 6.2 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_4 a M_7. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato a amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose 130
- Figura 6.3 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_8 a M_11. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose 131
- Figura 6.4 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_12 a M_15. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose 132
- Figura 6.5 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_16 e M_17. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose 133
- Figura 6.6 – Perfis eletroforéticos obtidos para leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) submetidos aos ensaios CE_01 a CE_08 para otimização dos parâmetros instrumentais via planejamento Box-Behnken 3³. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose 134
- Figura 6.7 – Perfis eletroforéticos obtidos para leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) submetidos aos ensaios CE_09 a CE_15 para otimização dos parâmetros instrumentais via planejamento Box-Behnken 3³. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose 135
- Figura 6.8 – Eletroferogramas obtidos na quantificação de lactulose (A) e lactose (B) nas amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) das marcas M_1 e M_2. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose 136
- Figura 6.9 – Eletroferogramas obtidos na quantificação de lactulose (A) e lactose (B) nas amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) das marcas M_3 e M_4. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose 137

Figura 6.10 – Eletroferogramas obtidos na quantificação de lactulose (A) e lactose (B) nas amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) das marcas M_5 e M_6. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose 138

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Codificação e quantidade de amostras coletadas para as marcas de leite UHT convencional desnatado selecionadas.....	52
Tabela 2.2 – Tempos de migração (t_m), em min, para lactulose, lactose e fluxo eletrosmótico (EOF) obtidos nas determinações dos isômeros lactose e lactulose por CZE-UV	60
Tabela 2.3 – Testes estatísticos para avaliação do efeito da diluição dos extratos das amostras de leite nos tempos de migração (t_m) da lactose e do fluxo eletrosmótico (EOF)	61
Tabela 2.4 – Resultado quantitativo para os teores de lactulose e lactose das amostras de leite UHT convencional, e seus respectivos valores de slope (k) ^a	62
Tabela 2.5 – Avaliação da sensibilidade, precisão e recuperação para determinação de lactose e lactulose em leite UHT convencional por CZE-UV	64
Tabela 3.1 – Matriz do planejamento experimental Box-Behnken 3 ³ para ajuste dos parâmetros instrumentais e análise eletroforética de leite UHT convencional e hidrolisado ^a	74
Tabela 3.2 – Tempos de migração (t_m), em min, da lactulose, lactose e fluxo eletrosmótico (EOF) obtidos para todas as marcas de leite UHT selecionadas..	82
Tabela 3.3 – Avaliação do efeito do tipo de matriz e da diluição dos extratos das amostras nos tempos de migração (t_m) dos analitos e do fluxo eletrosmótico (EOF).....	83
Tabela 3.4 – Teor médio de lactulose e lactose, e seus respectivos valores de coeficiente de variação (CV) e slope (k), para as amostras de leite UHT convencional e hidrolisado ^a	84
Tabela 3.5 – Sensibilidade e precisão do método CZE-UV para determinação de lactose e lactulose em leite UHT convencional e hidrolisado ^a	87
Tabela 3.6 – Índices de recuperação do método CZE-UV utilizado para determinação de lactose e lactulose em leite UHT	88
Tabela 4.1 – Parâmetros e pressupostos estatísticos dos modelos propostos para o índice de nitrogênio de soroproteína não desnaturada (WPNI) e 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF).....	94
Tabela 4.2 – Resultado quantitativo para os indicadores térmicos avaliados em leite UHT convencional e hidrolisado	95

Tabela 5.1 – Influência da etapa de inativação enzimática no teor de lactose e no ponto de congelamento do leite (PC)	106
Tabela 5.2 – Ponto de congelamento (PC), em °H, teor de lactose, em g 100 mL ⁻¹ ; e nível de hidrólise, em %, monitorados ao longo dos Ensaio 1 e 2. Testes estatísticos comparativos também são apresentados ^a	108

LISTA DE ABREVEATURA E SIGLAS

aC	Antes de Cristo
ADPI	<i>American Dairy Products Institute</i> (do inglês)
AGE	Produtos de glicação avançada (do inglês, <i>Advanced Glycation End Products</i>)
ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>Analysis Of Variance</i>)
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (do inglês)
BGE	Eletrólito (do inglês, <i>Background electrolyte</i>)
BSA	Proteína do soro bovino (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CV	Coefficiente de variação
CV ⁺	Coefficiente de variação intramarca
CZE	Eletroforese Capilar de Zona (do inglês, <i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
CZE-UV	CZE com detecção na região do ultravioleta (do inglês, <i>ultraviolet region detection</i>)
DAD	Detector com Arranjo de Diodos (do inglês, <i>Diode Array Detector</i>)
DPC	Depressão do ponto de congelamento
DRI	Ingestão Dietética de Referência (do inglês, <i>Dietary Reference Intakes</i>)
EFSA	<i>European Food Safety Agency</i> (do inglês)
EOF	Fluxo eletrosmótico (do inglês, <i>Electroosmotic Flow</i>)
FAJ	Falta de ajuste
FC	Fator de concentração
FD	Fator de diluição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (do inglês)
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i> (do inglês)
HMF	5-hidroxi metil-2-furaldeído
HPAEC-PAD	<i>High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i> (do inglês)

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPLC-RID	HPLC com detecção por índice de refração (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detection</i>)
i.d.	Diâmetro interno do capilar (do inglês, <i>inner diameter</i>)
ic	Intervalo de confiança
IDF	Federação Internacional Laticínios (do inglês, <i>International Dairy Federation</i>)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (do inglês)
<i>k</i>	Estimador de Proporcionalidade, <i>Slope</i> ou Inclinação da Reta
LA	Reação de transformação de Lobrey de Bruyn-Alberda van Ekenstein
L_E	Comprimento efetivo do capilar (do inglês, <i>effective length</i>)
LH	Leite com lactose hidrolisada (de acordo com a rotulagem)
LOD	Limite de detecção (do inglês, <i>Limit Of Detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês, <i>Limit Of Quantification</i>)
L_T	Comprimento total do capilar (do inglês, <i>total length</i>)
n.a.	Não se aplica
n.d.	Não detectado
n.q.	Não quantificado
NLU	<i>Neutral Lactase Units</i> (do inglês)
o.d.	Diâmetro externo do capilar (do inglês, <i>outer diameter</i>)
PC	Ponto de congelamento
PDC	Ácido 2,6-piridinodicarboxílico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
REG	Leite com teor regular de lactose (de acordo com a rotulagem)
sd	Desvio-padrão (do inglês, <i>standard deviation</i>)
SIG	Significância
SPSA	Adição de padrão por um incremento (do inglês, <i>Single Point Standard Addition</i>)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
t_m	Tempo de migração

TSP	Capilar de sílica fundida recoberto externamente com poliimida
UAT	Ultra-alta temperatura
UHT	<i>Ultra High Temperature</i> (do inglês)
UV-Vis	Ultravioleta-visível
WPN	Nitrogênio de soroproteína (do inglês, <i>Whey Protein Nitrogen</i>)
WPNI	Índice de Nitrogênio de Soroproteína Não Desnaturada (do inglês, <i>Whey Protein Nitrogen Index</i>)
α -la	α -lactoalbumina
β -lg	β -lactoglobulina

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

mg	Miligrama
g	Gramma
mL	Mililitro
%	Porcentagem
°C	Graus Celcius
°H	Graus Hortvet
°	Graus
L	Litro
min	Minuto
s	Segundo
μmol	Micromol
nm	Nanômetro
μ _{osm}	Mobilidade eletrosmótica
μ _{eff}	Mobilidade efetiva (do inglês, <i>effective mobility</i>)
μ _{ap}	Mobilidade aparente
μ _{ep}	Mobilidade eletroforética (do inglês, <i>electrophoretic mobility</i>)
pK _a	Constante de dissociação ácida
NaOH	Hidróxido de sódio
mmol	Milimol
m/v	Massa por volume
μm	Micrômetro
cm	Centímetro
kV	Quilovolt
mbar	Milibar (pressão)
Hz	Hertz
h	Hora
S ₁	Sinal analítico da amostra
S ₂	Sinal analítico da amostra adicionada de padrão (amostra + padrão)
μL	Microlitro
mAU	<i>Mili-Area Unit</i> (do inglês)
Δt _m	Deslocamento do tempo de migração

H_0	Hipótese nula
H_a	Hipótese alternativa
g	Força g ou Força centrífuga relativa
v/v	Volume por volume
\approx	Aproximadamente igual a
$w_{1/2}$	Largura do pico à meia altura
R_s	Resolução de picos adjacentes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	26
1.1	OBJETIVOS.....	29
1.1.1	Objetivos Específicos	29
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	29
1.2.1	Leite	30
1.2.1.1	<i>Aspectos físico-químicos</i>	30
1.2.1.2	<i>Lactose</i>	31
1.2.2	Leite Hidrolisado	34
1.2.3	Processamento Térmico do Leite	35
1.2.3.1	<i>Leite UHT</i>	35
1.2.3.2	<i>Indicadores de tratamento térmico</i>	36
1.2.4	Principais Técnicas Analíticas – Conceitos básicos	44
1.2.4.1	<i>Eletroforese capilar</i>	44
1.2.4.2	<i>Crioscopia</i>	48
2	DETERMINAÇÃO DE LACTULOSE E LACTOSE EM LEITE UHT CONVENCIONAL POR CZE-UV	51
2.1	INTRODUÇÃO.....	51
2.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	51
2.2.1	Reagentes e Soluções	51
2.2.2	Amostras	52
2.2.3	Instrumental e Condições Eletroforéticas	53
2.2.4	Parâmetros Instrumentais e Preparo da Amostra	53
2.2.5	Quantificação Utilizando Método de Adição de Padrão com Um Incremento (SPSA)	55
2.2.5.1	<i>Quantificação da lactulose</i>	55
2.2.5.2	<i>Quantificação da lactose</i>	55
2.2.6	Avaliação das Figuras de Mérito para o Método CZE-UV	57
2.2.7	Análises Estatísticas	57
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
2.3.1	Quantificação dos Teores de Lactose e Lactulose em Leite UHT Convencional	58
2.3.2	Avaliação das Figuras de Mérito para o Método CZE-UV	63

2.4	CONCLUSÃO.....	64
2.5	PUBLICAÇÕES.....	65
3	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CZE-UV PARA ANÁLISE DE LACTOSE E LACTULOSE EM LEITE UHT CONVENCIONAL E HIDROLISADO	66
3.1	INTRODUÇÃO.....	66
3.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	66
3.2.1	Reagentes e Amostras	66
3.2.2	Condições Experimentais Pré-definidas.....	67
3.2.3	Ajuste dos Parâmetros Instrumentais	67
3.2.4	Métodos de Preparo da Amostra	68
3.2.5	Quantificação Utilizando Método por Adição de Padrão com Um Incremento (SPSA).....	69
3.2.6	Avaliação das Figuras de Mérito para o Método CZE-UV	70
3.2.7	Análises Estatísticas	71
3.2.7.1	<i>Determinações de lactulose (sem diluição do extrato)</i>	71
3.2.7.2	<i>Determinações de lactose (com diluição do extrato).....</i>	72
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.3.1	Ajuste dos Parâmetros Instrumentais	73
3.3.2	Estudo dos Métodos de Preparo da Amostra	76
3.3.2.1	<i>Comparativo entre os métodos oficiais ISO e o método CZE-UV</i>	77
3.3.3	Quantificação dos Teores de Lactulose e Lactose em Amostras Comerciais de Leite UHT Convencional e Hidrolisado	81
3.3.4	Avaliação das Figuras de Mérito para o Método CZE-UV	87
3.4	CONCLUSÃO.....	88
3.5	PUBLICAÇÕES.....	89
4	INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE NOS INDICADORES TÉRMICOS UTILIZADOS PARA CONTROLE DE LEITE UHT.....	90
4.1	INTRODUÇÃO.....	90
4.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	90
4.2.1	Reagentes e Amostras	90
4.2.2	Instrumental.....	91
4.2.3	Metodologias Analíticas	91

4.2.3.1	<i>Avaliação dos modelos estatísticos</i>	91
4.2.3.2	<i>Quantificação dos indicadores</i>	92
4.2.4	Análises Estatísticas	92
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
4.3.1	Avaliação dos Modelos Estatísticos para os Indicadores HMF e WPNI	93
4.3.2	Quantificação dos Indicadores de Tratamento Térmico	94
4.3.2.1	<i>Índice de HMF</i>	95
4.3.2.2	<i>Índice de WPNI</i>	98
4.3.2.3	<i>Lactulose</i>	99
4.4	CONCLUSÃO.....	100
4.5	PUBLICAÇÕES.....	101
5	MONITORAMENTO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE LEITES “ZERO LACTOSE” – UM COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS POR CRIOSCOPIA E CZE-UV	102
5.1	INTRODUÇÃO.....	102
5.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	102
5.2.1	Reagentes e Amostras	103
5.2.2	Instrumental e Metodologias	103
5.2.3	Simulação dos Processos de Hidrólise Enzimática da Lactose	103
5.2.4	Cálculo do Nível de Hidrólise Enzimática da Lactose	105
5.2.5	Análises Estatísticas	106
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
5.4	CONCLUSÃO.....	114
5.5	PUBLICAÇÕES.....	115
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	116
	REFERÊNCIAS	118
	APÊNDICE A – PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LACTULOSE E LACTOSE EM LEITE UHT CONVENCIONAL	129
	APÊNDICE B – PERFIS ELETROFORÉTICOS OBTIDOS NA ETAPA DE OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DO MÉTODO CZE-UV	134

APÊNDICE C – PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LACTULOSE E LACTOSE EM LEITE UHT CONVENCIONAL E HIDROLISADO	136
--	------------

1 INTRODUÇÃO GERAL

O leite é considerado um alimento rico em macro e micronutrientes como gordura, proteínas e carboidratos e, vitaminas e minerais, respectivamente. Esse alimento se destaca não somente por sua diversidade de nutrientes, mas também pela interação e biodisponibilidade existente entre eles (SWAISGOOD, 2008).

O consumo de leite de vaca por humanos, assim como de outros mamíferos como búfalas, cabras e ovelhas, remonta a Antiguidade com evidência de domesticação desses animais por volta de 2000 aC (WOLF; BRAY; POPKIN, 2008). Atualmente, o Guia Alimentar Brasileiro descreve o consumo de leite e derivados como parte de uma dieta balanceada e saudável, destacando-o como alimento fonte de cálcio (BRASIL, 2014). A Organização Mundial da Saúde sugere uma Ingestão Dietética de Referência (DRI – do inglês, *Dietary Reference Intakes*) média de 1000 mg/dia de cálcio para adultos entre 19 e 51 anos (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012). Considerando um teor médio de 117 mg 100 g⁻¹ desse micronutriente no leite de vaca (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006a), o consumo de apenas um copo de leite (200 mL) é capaz de fornecer 23 % da DRI para o indivíduo adulto.

Nos últimos 10 anos, a influência benéfica da ingestão de leite e leite fermentado tem sido objeto de estudo de inúmeros pesquisadores, os quais verificam a ação desses produtos na redução da ocorrência de doenças cardiovasculares (BHUPATHI et al., 2020; GUO et al., 2017), obesidade (KRATZ; BAARS; GUYENET, 2013; WANG; WU; ZHANG, 2016), diabetes *mellitus* tipo 2 (ALVAREZ-BUENO et al., 2019; AUNE et al., 2013) e síndrome metabólica (KIM, 2013; MCGREGOR; POPPITT, 2013). No entanto, os efeitos dos produtos lácteos com alto e baixo teor de gordura ainda são controversos e necessitam de investigação mais aprofundada (HUTH; PARK, 2012; WILLETT; LUDWIG, 2020).

Economicamente, a Índia lidera o *ranking* de maior produtor de leite do mundo enquanto o Brasil ocupa o quinto lugar, atrás da União Europeia, Estados Unidos e Paquistão (FAO, 2020). A produção mundial de leite de vaca atingiu 81 % de todo mercado leiteiro em 2018, considerando os leites de búfala, cabra, ovelha e camela, e apresenta uma previsão de crescimento de 1,7 % ao ano até 2028, despontando das outras principais comódites agropecuárias (OECD/FAO, 2019). No cenário nacional, o setor de lácteos é o segundo seguimento mais importante da indústria de alimentos, ficando atrás apenas do departamento de carnes e derivados, conforme os últimos dados coletados (SIQUEIRA, 2019). Nesse

contexto, atualmente o leite UHT (do inglês, *ultra high temperature*), ou leite Longa Vida, representa um terço do volume total do leite processado no Brasil, sendo o produto lácteo mais consumido no país (EMBRAPA, 2019).

Recentemente tem-se observado uma significativa mudança no estilo de vida da população ao redor de todo o mundo, caracterizada pela busca por melhor qualidade de vida e diretamente relacionada ao aumento da prática de atividade física e consumo de produtos considerados mais saudáveis. Esse novo perfil comportamental em expansão impulsiona o mercado de orgânicos e de produtos especiais como, por exemplo, os produtos livres de glúten, lactose e/ou gorduras *trans*. Paralelo a essa realidade, observa-se a grande incidência de indivíduos que expressam algum grau de intolerância à lactose e que sentem grande desconforto ao ingerir produtos lácteos (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019). Diante deste panorama, o setor lácteo tem apostado no desenvolvimento de produtos com redução ou exclusão total de lactose, categoria na qual o leite UHT se mantém em destaque como o produto de maior produção, pois pode ser consumido diretamente ou utilizado em diferentes preparações culinárias (EMBRAPA, 2019).

Considerando a importância ímpar do leite UHT no mercado nacional, esforços são necessários para que haja um controle do processamento térmico, visando à manutenção das características físicas, químicas e nutricionais, bem como do processo de redução ou exclusão da lactose, objetivando garantir o atendimento à legislação vigente.

No que tange ao monitoramento do tratamento térmico, compostos químicos modificados ou gerados pela ação do calor, denominados indicadores térmicos, são frequentemente utilizados como parâmetro de classificação do tipo de processamento térmico e auxiliam na estimativa da severidade do aquecimento (FEINBERG et al., 2006). Ademais, os indicadores configuram importante papel na identificação da ocorrência de superexposição do produto ao calor, contribuindo para a padronização do processo e manutenção da qualidade física, sensorial e nutricional do produto, embora ainda não haja limites legais estabelecidos. Uma grande variedade de métodos para determinação de diferentes indicadores térmicos encontra-se disponível na literatura (MESHRAM; SHAKEEL; SHAIKH, 2018), no entanto, procedimentos laboriosos inviabilizam sua aplicação como métodos de rotina. Tem-se observado uma expansão da aplicação da eletroforese capilar de zona (CZE - do inglês, *capillary zone electrophoresis*) devido ao seu baixo consumo de solventes orgânicos, pequeno volume amostral, baixa geração de resíduos e uso de coluna capilar, encontrando-se em acordo com os princípios da química verde (MARTÍNEZ MONTERO et al., 2004). Em um estudo prévio, otimizamos um método analítico para determinação do indicador térmico

lactulose em leite UHT utilizando eletroforese capilar de zona com detecção indireta na região do ultravioleta (CZE-UV – do inglês, *capillary zone electrophoresis under indirect detection*) (NEVES, 2015), baseado em estudo proposto por Soga e Serwe (2000).

Quanto ao monitoramento do processo de produção dos lácteos isentos ou reduzidos de lactose (também conhecidos como “produtos hidrolisados”), os métodos oficiais atualmente disponíveis para quantificação da lactose, como por exemplo, métodos enzimáticos e cromatografia a líquido, não apresentam sensibilidade para quantificação da lactose residual nos limites legais estabelecidos para essa nova classe de produto (TRANI et al., 2017). Embora haja a necessidade do desenvolvimento de métodos ou da otimização de técnicas já existentes para quantificação de lactose em leites hidrolisados, poucos métodos analíticos aplicáveis a esse grupo de produtos são abordados na literatura (CHURAKOVA et al., 2019) e em sua maioria são inviáveis para aplicação na rotina de controle e monitoramento. Portanto, torna-se extremamente importante e necessário viabilizar métodos com sensibilidade e especificidade suficiente para os setores produtivo e de regulação, a fim de corroborar com o controle de qualidade, padronização dos produtos e garantia de segurança do consumidor.

Nesse contexto, a disponibilização de um método analítico para avaliação tanto do processamento térmico quanto do processo de redução da lactose apresenta caráter inovador e se torna bastante interessante sendo, portanto, o foco principal desta tese. Para o monitoramento do tratamento térmico UHT, a lactulose foi o composto selecionado, enquanto o processo de redução da lactose foi avaliado pela quantificação do residual de lactose. O método CZE-UV previamente otimizado por Neves (2015) para matriz láctea foi selecionado para a determinação dos compostos lactulose e lactose devido tamanha versatilidade. Como principais desafios, temos a similaridade química dos carboidratos lactulose e lactose, isômeros funcionais, e a discrepância em suas concentrações de ocorrência considerando as diferentes matrizes lácteas a serem abordadas, sendo elas: leite convencional (com teor regular de lactose) e leite hidrolisado (com teor reduzido de lactose).

Paralelamente, abordamos também a avaliação dos indicadores térmicos 5-hidroxi metil-2-furaldeído (HMF) e o índice de nitrogênio de soroproteína não desnaturada (WPNI – do inglês, *whey protein nitrogen index*) em leite convencional e hidrolisado, empregando-se métodos clássicos por espectrofotometria e turbidimetria, respectivamente. Por fim, um estudo comparativo entre a CZE-UV e a crioscopia também foi realizado, com o método crioscópico sendo a abordagem clássica atualmente utilizada no monitoramento do processo de hidrólise da lactose para a fabricação de leites hidrolisados.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo central do trabalho foi aperfeiçoar e aplicar o método por CZE-UV em leite UHT convencional e hidrolisado para a avaliação dos processamentos térmico e hidrólise enzimática da lactose mediante a determinação dos isômeros lactulose e lactose, respectivamente.

1.1.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desta tese serão tratados em seções separadas de acordo com a cronologia de execução e são caracterizados pelas seguintes etapas:

- a) avaliar aplicação do método eletroforético para determinação dos isômeros lactulose e lactose em leite UHT convencional e validar o método para quantificação de lactose;
- b) otimizar o método proposto por CZE-UV para determinação de lactulose e lactose em diferentes matrizes de leite UHT (convencional e hidrolisado);
- c) avaliar o comportamento dos indicadores térmicos HMF e WPNI em leite UHT hidrolisado, utilizando métodos clássicos por espectrofotometria e turbidimetria, respectivamente;
- d) aplicar o método eletroforético proposto no monitoramento de dois principais processos de hidrólise enzimática (asséptica e por batelada), industrialmente utilizados para produção de leites com teor reduzido de lactose e compará-lo com o método crioscópico usual.

A abordagem dos objetivos específicos em seções distintas se deu visando facilitar o entendimento do leitor visto que cada etapa contou com estudos distintos para otimização do método eletroforético e aplicação para determinação de diferentes analitos (lactose e lactulose) em diferentes matrizes amostrais (leite convencional e leite hidrolisado).

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção abordamos alguns tópicos relevantes para contextualização dos aspectos físico-químicos e de processamento do leite UHT, juntamente com os métodos atualmente disponíveis para determinação de lactose e dos indicadores térmicos: lactulose, HMF e WPNI.

Além disso, também descrevemos os conceitos básicos das principais técnicas analíticas utilizadas no presente trabalho.

1.2.1 Leite

O leite é uma dispersão coloidal complexa contendo glóbulos de gordura, proteínas do soro e micelas de caseína em uma solução aquosa de lactose, minerais e alguns outros compostos minoritários. O leite de vaca apresenta uma composição química média de 87 % de água e 13 % de sólidos totais subdivididos em: 4,6 % de lactose, 3,3 % de proteínas com 2,6 % relativos às caseínas, 4,0 % de gordura e 1,1 % de sais. Vitaminas também estão presentes, ainda que em pequenas quantidades, como a riboflavina, o ácido ascórbico e as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) associadas aos glóbulos de gordura (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006b).

1.2.1.1 Aspectos físico-químicos

As propriedades físicas e químicas do leite dependem de fatores estruturais e composicionais intrínsecos à sua biossíntese, bem como de fatores extrínsecos como temperatura e tratamentos pós-ordenha. A medição de algumas dessas propriedades como, por exemplo, acidez titulável, pH, densidade, viscosidade e ponto de congelamento permite avaliar a qualidade do leite e monitorar algumas etapas de processamento (MCCARTHY; SINGH, 2009; SHIPE, 1959).

O ponto de congelamento (ou índice crioscópico) do leite é uma propriedade associada à concentração dos sólidos solúveis presentes em sua composição e baseia-se na lei de Raoult, a qual estabelece que a adição de um soluto solúvel não volátil a qualquer solvente gera a diminuição do ponto de congelamento da solução. Lactose, sais de cloreto e outros constituintes solúveis em água (como cálcio, potássio, magnésio, lactato, fosfato e citrato) são os principais responsáveis pelo índice crioscópico do leite com uma contribuição de 55, 25 e 20 %, respectivamente, nessa propriedade física. Enquanto gordura e proteínas não apresentam efeito mensurável no índice crioscópico do leite (MCCARTHY; SINGH, 2009).

Uma das principais características do ponto de congelamento do leite é sua estreita faixa de variabilidade, devido ao eficiente equilíbrio osmótico existente entre o leite e o sangue do animal durante todo o período de lactação. No entanto, por apresentar relação direta com o sangue, o ponto de congelamento pode ser influenciado por fatores ambientais de manejo e raça, incluindo estágio de lactação, incidência de mastite subclínica, nutrição e aporte de água animal, condições climáticas, além de aspectos regionais e sazonais (HENNO

et al., 2008; ZAGORSKA; CIPROVICA, 2013). Variações de -0,512 a -0,550 °C do índice crioscópico para o leite bovino (ou, em graus Hortvet (°H), de -0,530 a -0,569 °H) são reportadas na literatura (MCCARTHY; SINGH, 2009). Por outro lado, de acordo com a legislação brasileira, o ponto de congelamento do leite cru refrigerado deve apresentar-se entre -0,512 e -0,536 °C (ou de -0,530 a -0,555 °H) (BRASIL, 2018a).

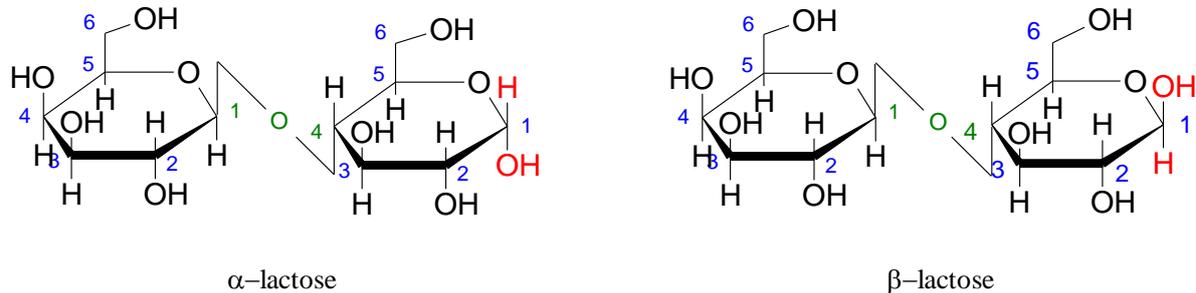
1.2.1.2 Lactose

O teor de lactose do leite de vaca pode variar de 3,8 a 5,3 % dependendo da raça do animal, período de lactação e manejo, e é uma das principais fontes de energia rápida, sendo responsável por fornecer 30 % do valor calórico do leite (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006b). Do ponto de vista nutricional, o leite pode ser considerado o único alimento fonte de lactose, visto que é o principal alimento na natureza que fornece tal carboidrato. Além de fornecer energia, a lactose auxilia nos processos de absorção de cálcio, magnésio, fósforo e na utilização da vitamina D (FOX, 2009).

1.2.1.2.1 Características químicas

A lactose (O-β-D-galactopiranosil-(1→4)-α-D-glicopiranosose) é um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma molécula de galactose unidas por uma ligação glicosídica entre o carbono 1 da galactose e o carbono 4 da glicose, denominada ligação β-1,4 (átomos em verde na Figura 1.1). Assim como outros açúcares redutores quando em meio aquoso, a lactose existe em equilíbrio com sua forma de cadeia aberta e com a estrutura em anel (piranose). A formação da estrutura hemiacetal, via ciclização, cria um novo centro quiral que pode existir como dois isômeros (anômeros): α ou β (Figura 1.1). Em meio aquoso, os anômeros podem se interconverter mediante abertura da cadeia e retorno para a fase cíclica, num processo conhecido como mutarrotação (FOX, 2009). Os anômeros α e β apresentam propriedades físicas diferentes, sendo as principais a rotação específica do plano de luz polarizada (+ 89° e + 35° para α- e β-lactose, respectivamente) e a solubilidade (70 e 500 g L⁻¹ para α- e β-lactose, respectivamente). Essa grande variação de solubilidade entre os anômeros pode ocasionar problemas relacionados à maior propensão à cristalização da fração de α-lactose podendo ocasionar, por exemplo, uma textura indesejável em produtos concentrados como leite condensado e redução da solubilidade em leite em pó (TAN, 2009).

Figura 1.1 – Estrutura molecular dos anômeros α - e β -lactose



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Átomos externos ao anel piranosídico e ligados diretamente ao carbono anomérico encontram-se destacados em vermelho. Átomos envolvidos na ligação glicosídica estão destacados em verde.

A lactose apresenta aspectos tecnológicos importantes para a indústria láctea, como por exemplo, ser fonte de carbono para bactérias ácido-láticas promovendo o sabor característico de produtos fermentados como o iogurte, e participar efetivamente da reação de Maillard, devido à sua característica de açúcar redutor, fornecendo características físicas e sensoriais desejáveis a produtos como o doce de leite. Ademais, esse dissacarídeo também é amplamente utilizado na indústria farmacêutica, como veículo de fármacos, e na indústria panificadora como ingrediente (PATERSON, 2009).

1.2.1.2.2 Problemas nutricionais associados à lactose

O metabolismo da lactose baseia-se inicialmente em sua hidrólise enzimática pela ação da β -galactosidase (conhecida como lactase) presente nas microvilosidades da parede intestinal. A enzima atua sob a ligação glicosídica do dissacarídeo liberando resíduos de glicose e galactose, os quais serão efetivamente absorvidos pelo intestino delgado e metabolizados gerando energia (MISSELWITZ et al., 2013). A atividade enzimática da lactase tende a diminuir significativamente após o desmame, porém, em humanos observa-se a manutenção dessa atividade enzimática em diferentes níveis (PARKER; WATSON, 2017). Por exemplo, os indivíduos podem expressar a deficiência de produção da lactase após efetivo desmame (conhecidos como “lactase não persistente” - grupo caracterizado por indivíduos que perdem a capacidade de produção de lactase durante sua vida, desenvolvendo a chamada hipolactasia primária) ou podem apresentar ausência de sua produção ao longo de toda sua vida (indivíduos que nascem com ausência de produção de lactase - condição extremamente rara, conhecida como alactasia congênita). Aqueles indivíduos que mantêm uma boa digestão de lactose ao longo de sua vida são denominados “lactase persistentes”. Os níveis de lactase

também podem sofrer redução mediante ocorrência de danos na parede intestinal causados por doenças gastrointestinais, gerando a hipolactasia secundária, comumente reversível (PARKER; WATSON, 2017).

Nos últimos 20 anos, pesquisadores demonstraram que a taxa de não persistência da lactase tende a variar de acordo com características genéticas associadas à etnia, de forma que os países asiáticos exibem uma taxa de intolerância de quase 100 %, ao passo que países da América do Sul e África apresentam mais de 50 % de incidência de intolerância à lactose; por outro lado, menos de 20 % dos norte-americanos e europeus apresentam essa anomalia (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008; MISSELWITZ et al., 2013). A estimativa recente reportada por alguns autores é de que aproximadamente 70 % da população mundial apresente algum grau de intolerância à lactose com desenvolvimento de sintomas gastrointestinais como diarreia, dor abdominal e gases (FORSGÅRD, 2019; PARKER; WATSON, 2017).

Alternativas tecnológicas para redução do teor de lactose do leite e de seus derivados têm sido desenvolvidas, baseando-se na remoção física da lactose (por meio de membranas ou métodos cromatográficos) ou na hidrólise da molécula (por via ácida ou enzimática). No setor alimentício, a hidrólise enzimática é o principal método utilizado para a produção de leites com teor reduzido de lactose através da adição de β -galactosidase. Esse processo pode ser conduzido utilizando um biorreator contendo lactase imobilizada em resina, no qual a enzima pode ser recuperada e reutilizada; ou através da adição de lactase solúvel e livre ao leite seguida por incubação do sistema. O processo envolvendo adição da enzima livre é o mais usado atualmente para produção de leites para consumo direto (como o leite UHT), pois apresenta melhor viabilidade econômica dentre as possibilidades industriais disponíveis (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012).

A enzima utilizada no processo industrial de hidrólise da lactose pode ser isolada de diferentes fontes como micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras), animais e plantas. Os micro-organismos são as principais fontes de extração devido à maior viabilidade econômica, mas necessitam de um certificado de segurança alimentar (GRAS – do inglês, *Generally Recognized as Safe*). As características físico-químicas da enzima, como pH e temperatura ótimos, estão atreladas ao tipo de micro-organismo de origem (DEKKER, 2016). Nesse sentido, a levedura *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) torna-se a principal fonte de lactase para produção de leite para consumo direto, pois apresenta uma faixa ótima de pH entre 6,0 e 7,0 enquadrando-se no pH médio desse tipo de produto (HORNER et al., 2011).

1.2.2 Leite Hidrolisado

Dentre os produtos isentos ou reduzidos de lactose atualmente disponíveis, destacam-se os leites fluídos para consumo direto, também conhecidos como “leites hidrolisados” por serem submetidos ao processo de hidrólise enzimática.

Na indústria, a etapa de hidrólise enzimática pode ser executada por meio de duas principais rotas de processamento: por batelada ou em condições assépticas. No processo por batelada, a enzima é adicionada ao leite pasteurizado em um tanque de estocagem mantido refrigerado (geralmente entre 4 – 8 °C), com homogeneização lenta e constante. Nesse processo, a degradação da lactose é constantemente monitorada ao longo do período de incubação até que o nível de hidrólise desejado seja alcançado. A hidrólise asséptica, por sua vez, é utilizada somente para leites submetidos ao tratamento térmico UHT. Esse processo é caracterizado pela adição de lactase estéril ao leite durante a etapa de envase asséptico. Dessa forma, a hidrólise da lactose ocorre dentro da embalagem do produto durante o período de quarentena (aproximadamente 3 dias) e à temperatura ambiente. O monitoramento da degradação da lactose é realizado por amostragem representativa do lote, após o período de quarentena, a fim de confirmar a redução do conteúdo de lactose no produto final. É importante destacar que ao adotar o processo de hidrólise asséptica, a enzima adicionada é considerada ingrediente e, portanto, deve ser mencionada como tal no rótulo do produto. Já no processo por batelada, como a lactase é inativada durante o tratamento térmico, a legislação não prevê sua inclusão como ingrediente na rotulagem do produto final (DEKKER; KOENDERS; BRUINS, 2019).

A Agência de Segurança Alimentar Europeia (EFSA – do inglês, *European Food Safety Agency*) e a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil estabelecem uma concentração máxima de lactose de 0,1 g 100 mL⁻¹ para que o produto receba a classificação “isento de lactose” ou similar (BRASIL, 2017; EFSA, 2010). A ANVISA determina ainda uma faixa de concentração de lactose variando de 0,1 a 1,0 g 100 mL⁻¹ para produtos classificados como “baixo teor de lactose” ou “lactose reduzida”. Por outro lado, a Agência Federal de Segurança Alimentar dos Estados Unidos (FDA - do inglês, *Food and Drug Administration*) propõe que produtos com a classificação “isento de lactose” não podem conter esse dissacarídeo em sua composição, devendo haver sua exclusão completa do alimento (FDA, 2009).

Desde o início dos anos 2010 verifica-se o uso de técnicas como a cromatografia gasosa (IDDA et al., 2016), cromatografia líquida (ERICH; ANZMANN; FISCHER, 2012;

GARBALLO-RUBIO et al., 2017), cromatografia de troca iônica (VAN SCHEPPINGEN et al., 2017), ressonância magnética nuclear (MONAKHOVA et al., 2012) e ainda o uso de biosensores (CONZUELO et al., 2010) na tentativa de fornecer métodos analíticos com níveis de detecção capazes de serem aplicados em produtos lácteos hidrolisados. No Brasil, as indústrias tem utilizado a metodologia por crioscopia para estimar o nível de hidrólise alcançado devido à praticidade e ao baixo custo da técnica.

1.2.3 Processamento Térmico do Leite

O tratamento térmico em alimentos objetiva a eliminação total dos micro-organismos patogênicos e a redução, ou eliminação, da carga bacteriana deterioradora (não patogênica) inicial, podendo ocorrer variação da taxa de redução de acordo com o tipo de processamento utilizado. A classificação dos tratamentos térmicos adotados pelo setor lácteo geralmente é baseada na taxa de mortalidade dos micro-organismos e na inativação enzimática, dentre os quais se destacam a pasteurização (lenta: 63-65 °C/30 min, rápida: 72 – 75 °C/15-20 s ou ultra pasteurização: 85 °C/20 s) e a esterilização (por batelada: 110 – 115 °C/30 min, ou por fluxo contínuo: 130 – 145 °C/2 – 4 s) (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006c). O sistema de esterilização contínuo é conhecido como sistema ultra-alta temperatura (UAT) ou em inglês, UHT.

1.2.3.1 Leite UHT

No Brasil, o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UAT ou UHT, estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, define leite UHT como “leite homogeneizado submetido à temperatura entre 130 – 150 °C durante 2 a 4 segundos, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas” (BRASIL, 1997).

Tradicionalmente, o processamento UHT é caracterizado pelas etapas de pré-aquecimento, aquecimento, esterilização, resfriamento e envase asséptico (DATTA et al., 2002). As combinações de tempo e temperatura utilizadas na etapa de esterilização são selecionadas objetivando a inativação do *Bacillus stearothermophilus* (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006c) e podem ser executadas empregando-se diferentes tipos de trocador de calor, os quais irão definir efetivamente o tipo de processamento UHT (direto ou indireto). O processamento UHT indireto é caracterizado pelo uso de trocadores de calor

tubulares ou a placas, no qual o meio de aquecimento (água ou vapor) e o produto não entram em contato físico direto. No sistema UHT direto, o produto é misturado ao meio de aquecimento (vapor sanitário) por injeção de vapor (vapor injetado diretamente no produto por bico de injeção) ou por infusão de vapor (produto é introduzido numa câmara de vapor) (SILVA, 2004). Em ambos os sistemas UHT as etapas de pré-aquecimento e resfriamento final são realizadas em trocador de calor indireto, sendo que no processo direto o produto é resfriado instantaneamente em câmara de vácuo, seguido de resfriamento adicional indireto até atingir a temperatura de envase.

A aplicação do tratamento térmico UHT ao leite proporciona como principais vantagens, quando comparado ao tradicional processo de pasteurização, transporte e armazenamento a temperatura ambiente além de um período de comercialização mais extenso (podendo apresentar até 6 meses de validade). No entanto, uma superexposição do produto ao aquecimento pode intensificar modificações químicas e físicas comprometendo seu valor nutricional e sua estabilidade física durante o período de comercialização. Portanto, a disponibilização de recursos analíticos para monitorar a intensidade do tratamento térmico torna-se essencial para padronização do produto e manutenção de sua integridade física, química e nutricional.

1.2.3.2 Indicadores de tratamento térmico

Os indicadores de tratamento térmico podem ser do Tipo 1, quando se trata de compostos modificados pela ação do calor, relacionados a reações de desnaturação e inativação de substâncias termossensíveis; ou do Tipo 2, relacionados a novos compostos formados durante o processamento, como produtos da reação de Maillard e lactulose (ELLIOTT et al., 2003).

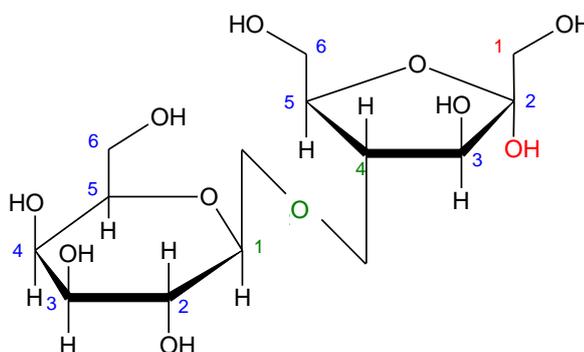
Embora ainda não exista legislação vigente para os indicadores térmicos, a Federação Internacional de Laticínios (IDF – do inglês, *International Dairy Federation*) sugere o uso da lactulose e da β -lactoglobulina (β -lg) para o monitoramento do processamento térmico de lácteos (ELLIOTT et al., 2005). No entanto, outros indicadores como a furosina e o HMF, ambos associados à reação de Maillard também são amplamente estudados e utilizados para inferir sobre a severidade do tratamento térmico (BIGNARDI; CAVAZZA; CORRADINI, 2012; ERBERSDOBLER; SOMOZA, 2007; FERRER et al., 2000; MORALES; ROMERO; JIMÉNEZ-PÉREZ, 2000; MORTIER et al., 2000) e sobre as condições de estocagem do produto (CATTANEO; MASOTTI; PELLEGRINO, 2008; SUNDS et al., 2018). Além dos

produtos da reação de Maillard, o índice de WPNI é frequente utilizado para monitorar o tratamento térmico como alternativa à determinação da β -lg, principalmente em lácteos desidratados (MORTIER et al., 2000).

1.2.3.2.1 Lactulose

A lactulose é um dissacarídeo formado por uma molécula de galactose e uma molécula de frutose unidas entre si por meio de uma ligação glicosídica β -1,4, cuja estrutura molecular é denominada O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-frutofuranose e pode ser verificada na Figura 1.2.

Figura 1.2 – Estrutura molecular da lactulose



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Átomos externos ao anel furanosídico e ligados diretamente ao carbono anomérico encontram-se destacados em vermelho. Átomos envolvidos na ligação glicosídica estão destacados em verde.

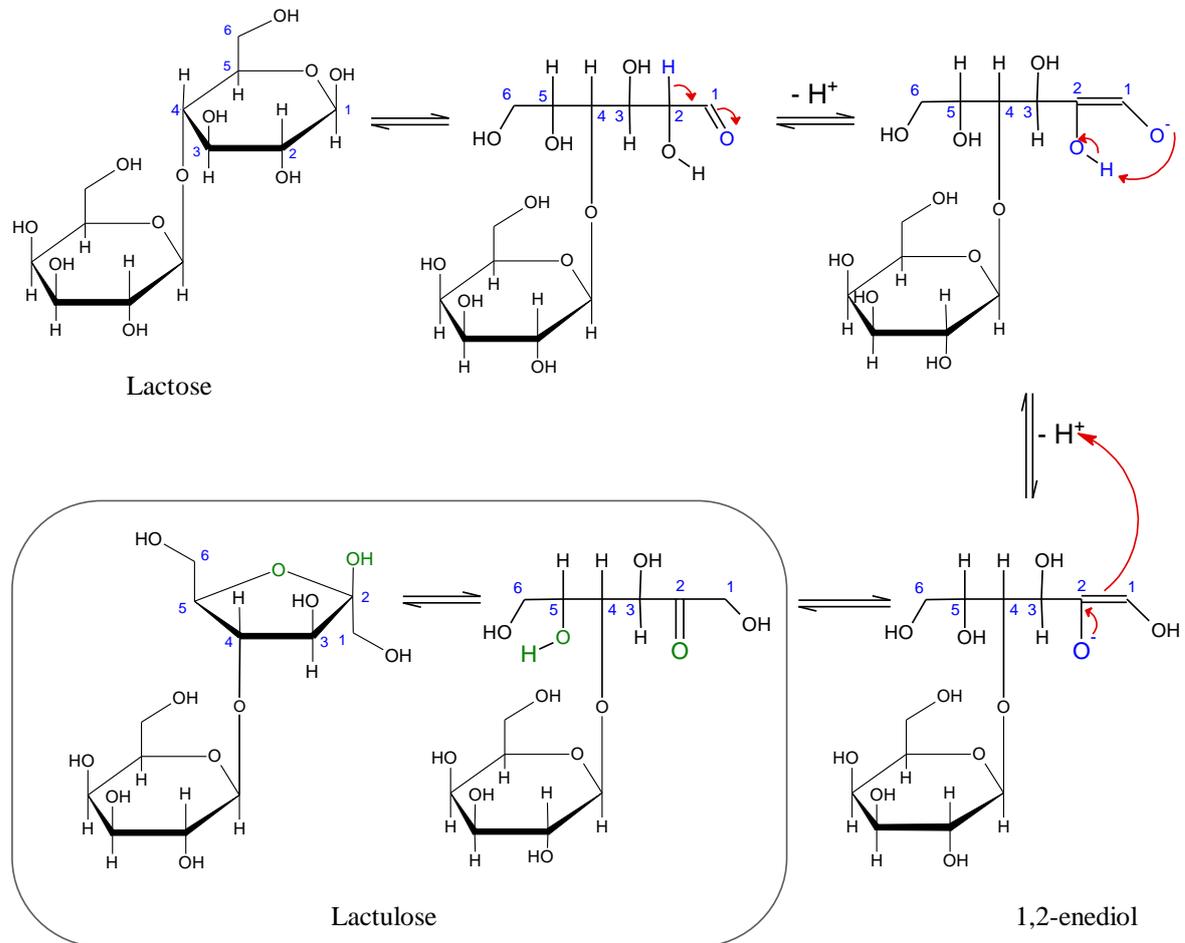
A ligação glicosídica presente na lactulose não é capaz de ser hidrolisada pelas enzimas digestivas da maioria dos mamíferos e, portanto, se apresenta intacta no intestino delgado. Como resultado, a lactulose é fermentada no intestino grosso por inúmeras bactérias (principalmente do gênero *Bifidobacteria* sp.) reduzindo o tempo de trânsito intestinal dentre outros benefícios (PANESAR; KUMARI, 2011).

A lactulose é um isômero da lactose, cuja reação de isomerização ocorre via epimerização no carbono 2 do resíduo de glicose, seguida por sua transformação em frutose. Esse processo tem sido estudado desde a década de 1930 e, segundo Adachi e Patton (1961), o mesmo se dá preferencialmente via transformação de Lobrey de Bruyn-Alberda van Ekenstein (ou transformação de LA). A reação é caracterizada pelo rearranjo do resíduo de glicose com modificação do grupo funcional de aldeído para cetona, via formação de 1,2-

enediol (AIDER; HALLEUX, 2007; BERG, 1993), caracterizando uma isomeria de função, como mostrado na Figura 1.3.

Figura 1.3 – Isomerização da lactose em lactulose via transformação de Lobrey de Bruyn-

Alberda van Ekenstein



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Átomos em azul participam efetivamente da isomerização, átomos em verde participam da etapa de ciclização do açúcar.

Durante o processamento térmico do leite as reações do tipo LA são favorecidas em decorrência do aumento do pH do meio, devido à presença de grupos amino livres provenientes de aminoácidos e também de alguns sais (BERG, 1993; OLANO; CALVO, 1989). Dentre as principais vantagens em se utilizar a lactulose como indicador térmico tem-se o fato desse dissacarídeo não ocorrer naturalmente no leite, sendo formado apenas quando o produto é submetido ao calor (CHÁVEZ-SERVÍN; CASTELLOTE; LÓPEZ-SABATER, 2004; DE BLOCK et al., 1996), além de se manter estável após o processamento térmico, principalmente quando os produtos são estocados entre 20 – 25 °C (DATTA et al., 2002;

ELLIOTT et al., 2003, 2005). Entretanto, alguns pesquisadores evidenciaram relativa modificação da concentração desse indicador térmico dependendo das condições de estocagem do produto e do tipo de processamento UHT adotado (CATTANEO; MASOTTI; ROSI, 2008; FEINBERG et al., 2006).

De acordo com a Comissão Europeia e a IDF, o processamento UHT pode gerar um conteúdo de lactulose variando de 10 a 60 mg 100 mL⁻¹, dependendo do tipo de processamento (se direto ou indireto), enquanto o processo de esterilização tradicional por batelada fornece concentrações acima de 60 mg 100 mL⁻¹ (ELLIOTT et al., 2005; O'BRIEN, 2009). Diversos autores destacam a lactulose como um dos principais indicadores capaz de realizar tal distinção entre sistemas UHT (CATTANEO; MASOTTI; PELLEGRINO, 2008; ELLIOTT et al., 2005; LAN et al., 2010; MARCONI et al., 2004; MORALES; ROMERO; JIMÉNEZ-PÉREZ, 2000).

O maior desafio analítico para a determinação de lactulose em leite é a presença de seu isômero funcional, lactose, em grandes concentrações comparadas à sua concentração produzida durante o aquecimento (média de 4500 mg de lactose e faixa de 10 a 60 mg lactulose para cada 100 mL de produto). Atualmente, a lactulose pode ser determinada através de dois métodos de referência da *International Organization of Standardization* (ISO): o método por cromatografia líquida com detecção por índice de refração (HPLC-RID – do inglês, *high performance liquid chromatography with refractive index detection*) (ISO / IDF, 2007) e o método enzimático com detecção espectrofotométrica (ISO / IDF, 2004).

Além dos métodos de referência, diferentes metodologias encontram-se disponíveis na literatura para determinação da lactulose como, por exemplo, métodos enzimáticos otimizados com detecção por biosensor eletroquímico (MOSCONE et al., 1999), espectrofotométricos (AMINE et al., 2000; MARCONI et al., 2004) ou ainda via monitoramento do pH do meio (LUZZANA et al., 2003). No entanto, os métodos cromatográficos ainda despontam como principais meios para determinação da lactulose em leite tratado termicamente (RITOTA et al., 2017). A cromatografia líquida é uma das técnicas mais utilizadas e modificadas, comumente empregando sistemas de detecção por índice de refração, visto que os carboidratos não possuem grupos cromóforos capazes de absorver energia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (CHÁVEZ-SERVÍN; CASTELLOTE; LÓPEZ-SABATER, 2004; MANZI; PIZZOFRERATO, 2013; MORALES; ROMERO; JIMÉNEZ-PÉREZ, 2000; NEVES et al., 2017; SILVEIRA et al., 2015). Ademais, o uso de detectores por espalhamento de luz evaporativo (SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING; MICHEL; HINRICHS, 2011) e da cromatografia de troca iônica (CATALDI; ANGELOTTI; BUFO, 1999; VAN RIEL;

OLIEMAN, 1991) também são reportados. Alguns autores propõem ainda a cromatografia a gás como alternativa para quantificação de lactulose em leite (MONTILLA; MORENO; OLANO, 2005; VALERO et al., 2000), entretanto, apesar de apresentar boa sensibilidade, as longas etapas de derivatização inviabilizam seu uso como técnica de rotina.

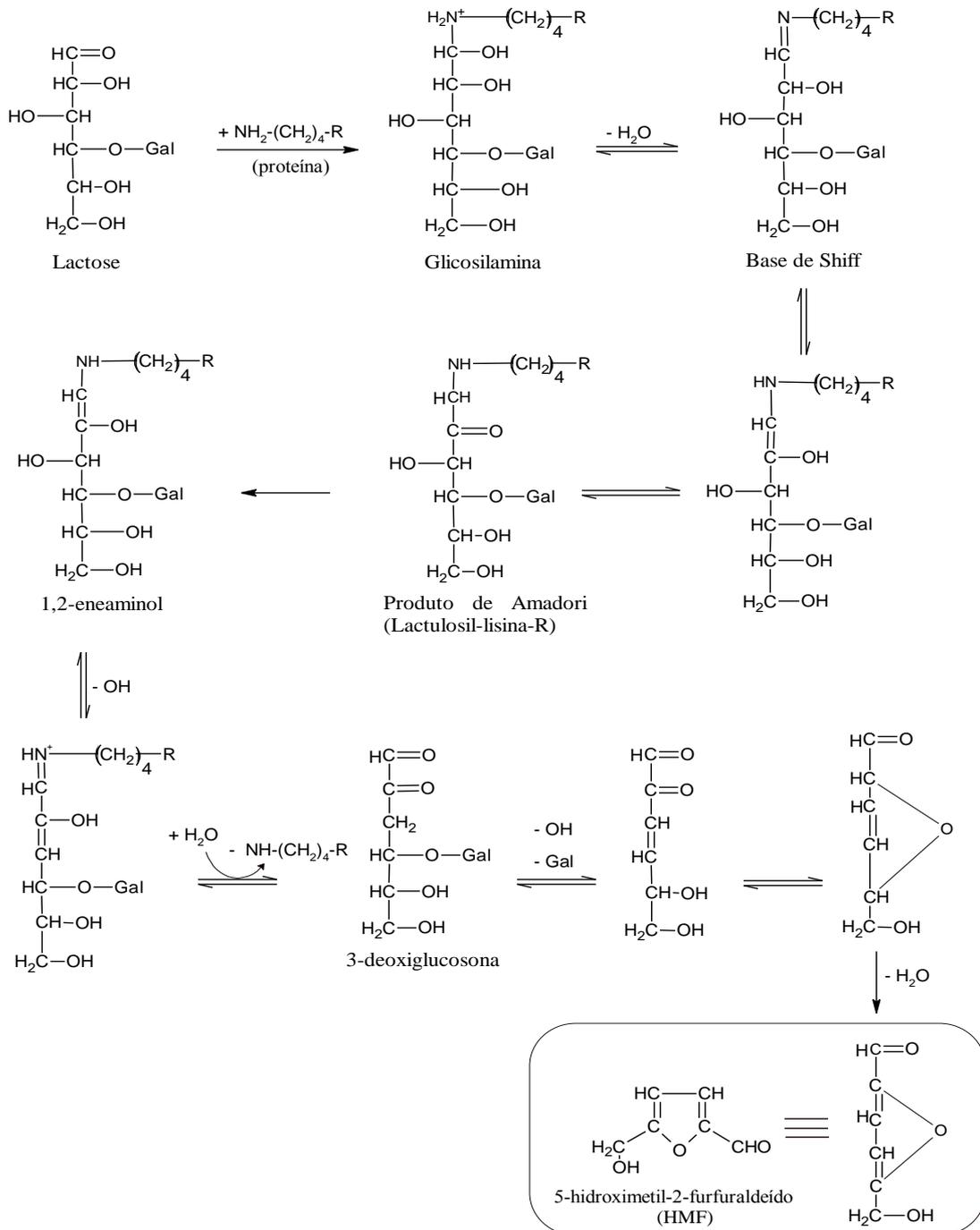
A eletroforese capilar pode ser utilizada como uma técnica alternativa de separação para a determinação de carboidratos em diferentes matrizes alimentícias (MANTOVANI et al., 2018). Porém, a existência de trabalhos na literatura com a aplicação dessa técnica em matriz láctea é escassa, principalmente quanto à determinação de lactulose. Soga e Serwe (2000) apresentaram um método empregando CZE-UV para separação de carboidratos em diferentes alimentos e bebidas. No entanto, a determinação de lactulose em matriz láctea não foi demonstrada, embora o método tenha demonstrado boa separação dos isômeros lactose e lactulose em uma mistura de 28 padrões de carboidratos.

1.2.3.2.2 5-Hidroximetil-2-furfuraldeído

O 5-hidroximetilfurfural ou 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) é um composto químico intermediário da reação de Maillard a qual dependente de fatores como atividade de água, pH, temperatura e tempo de exposição do produto ao calor (O'BRIEN, 2009). Nesse sentido, pode-se inferir que a formação de HMF no alimento tratado termicamente está diretamente relacionada à carga de calor aplicada e, portanto, é frequentemente utilizado como indicador térmico em matrizes lácteas (MORALES, 2008).

A reação de Maillard é uma reação de escurecimento não-enzimático que ocorre em alimentos submetidos a processamentos com temperaturas superiores a 40 °C e cuja composição química é caracterizada pela presença de grupos amino reativos, açúcares redutores e pH entre 6 – 8 (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006c). De acordo com Berg (1993), a reação de Maillard pode ser dividida basicamente em três estágios: inicial, intermediário e avançado. O estágio inicial é caracterizado pela reação de condensação entre o grupo carbonila do açúcar redutor e o grupo amino da proteína, em que resíduos de lisina e arginina são as principais fontes de grupos amino reativos, culminando na formação de intermediários relativamente estáveis, denominados produtos de Amadori. Ao se prolongar o aquecimento ou durante armazenamento do produto acima de 40 °C, inicia-se o estágio intermediário, com a formação de HMF (Figura 1.4).

Figura 1.4 – Sistema reacional evidenciando a formação de 5-hidroxi-metil-2-furaldeído (HMF) durante reação de Maillard



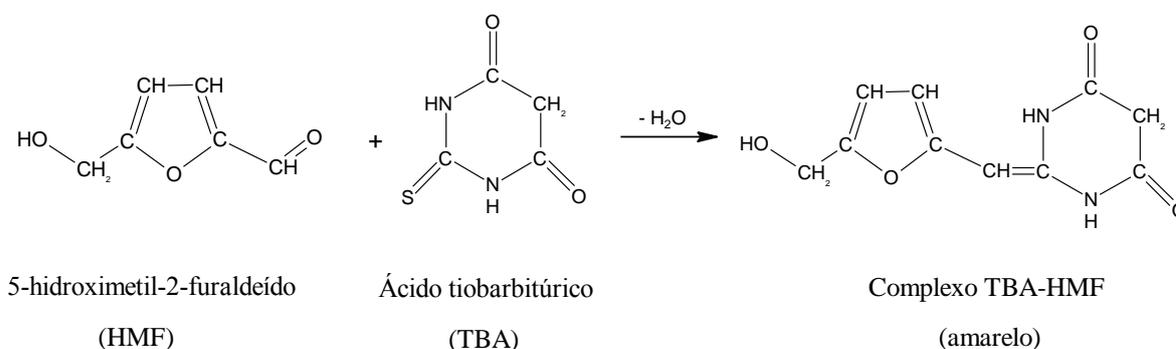
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Compostos α -dicarbonílicos altamente reativos também são formados da etapa intermediária da reação de Maillard e são capazes de interagir com cadeias laterais de peptídeos formando os produtos de glicação avançada (AGE – do inglês, *advanced glycation end products*) (AKILLIOĞLU; GÖKMEN, 2019), cujo acúmulo no organismo humano pode

ocasionar inúmeros processos fisiopatológicos associados às doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, diabetes *mellitus* tipo 2, doença renal crônica e síndrome metabólica (BASTOS; GUGLIUCCI, 2015; DEL CASTILLO et al., 2020; GARAY-SEVILLA et al., 2020; INAN-EROGLU; AYZAZ; BUYUKTUNCER, 2020).

A ausência de HMF em leite cru e sua formação durante o processamento térmico o torna um importante marcador da fase intermediária da reação de Maillard, permitindo inferir sobre a severidade do tratamento térmico aplicado, embora ocorra em concentrações bem inferiores à lactulose (na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$) (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006c). Alguns métodos disponíveis na literatura para a determinação do HMF em matriz láctea contam com o uso de técnicas analíticas como a espectrofotometria (KEENEY; BASSETTE, 1958), a cromatografia líquida (ALBALÁ-HURTADO et al., 1997; F. J. MORALES, C. ROMERO, 1992) e a eletroforese capilar (CHEN; YAN, 2009; MORALES; JIMÉNEZ-PÉREZ, 2001). Dentre eles, o primeiro método analítico aplicado a matrizes lácteas foi desenvolvido por Keeney e Bassette (1958) considerando a reação do HMF com o ácido tiobarbitúrico (TBA – do inglês, *thiobarbituric acid*) para formação de um composto amarelo (Figura 1.5), com absorvância em 443 nm.

Figura 1.5 – Reação simplificada de formação do complexo TBA-HMF



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Embora presente limitações devido à baixa estabilidade do complexo HMF-TBA formado e a baixa especificidade do TBA, visto que o mesmo também é capaz de reagir com outros compostos aldeídicos presentes no leite (F. J. MORALES, C. ROMERO, 1992), esse método continua sendo uma ferramenta de baixo custo utilizada pela indústria para o controle de qualidade de produtos lácteos aquecidos (RITOTA et al., 2017).

Analiticamente, uma distinção do conteúdo de HMF medido é realizada de acordo com o tipo de preparo amostral utilizado. Dessa forma, o termo “HMF livre” refere-se ao

conteúdo de HMF formado até o momento da análise, enquanto o termo “HMF total” é utilizado quando se deseja estimar todo o potencial de formação de HMF do alimento, se comportando como um somatório entre o HMF formado a partir de seus precursores presentes no meio e o HMF livre já formado. Nesse caso, para determinação do índice de HMF total a amostra é submetida a uma etapa inicial de fervura em meio ácido (geralmente ácido oxálico) (KEENEY; BASSETTE, 1958; MORALES, 2008).

1.2.3.2.3 Índice de nitrogênio de soroproteína não desnaturada (WPNI)

O processo de desnaturação proteica é definido como qualquer alteração não covalente como, por exemplo, o rompimento de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas; e subsequente destruição das estruturas terciárias e/ou secundárias (DEETH, 2020). As soroproteínas do leite variam em sua susceptibilidade à desnaturação pela ação do calor, sendo as imunoglobulinas as mais sensíveis ao aquecimento, seguidas pela albumina do soro bovino (BSA – do inglês, *bovine serum albumin*), a β -lg e α -lactoalbumina (α -la) (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006b).

Durante o processamento UHT, a desnaturação da β -lg é a que mais se destaca quantitativamente, embora também haja desnaturação da fração α -la, e em muitos casos pode estar associada à ocorrência de sedimentação durante estocagem do produto (ANEMA, 2020; GAUR; SCHALK; ANEMA, 2018). Além disso, produtos submetidos ao processamento UHT direto apresentam valores menores de desnaturação quando comparados aos produtos processados por sistema UHT indireto (ELLIOTT et al., 2003, 2005; MORALES; ROMERO; JIMÉNEZ-PÉREZ, 2000).

Um método alternativo e bastante utilizado até os dias atuais para separação das caseínas e soroproteínas, e subsequente avaliação da extensão da desnaturação, é caracterizado pela saturação do meio com sal (denominada precipitação por *salting-out*). O índice de WPNI é capaz de estimar a extensão da desnaturação de soroproteína e foi um dos parâmetros mais importantes desenvolvido por Harland e Ashworth (1945) para avaliar a adequação de leite em pó em aplicações para a indústria panificadora e caracterizá-lo de acordo com o tipo de tratamento térmico adotado.

O método proposto por Harland e Ashworth (1945) é caracterizado pela precipitação das caseínas e as soroproteínas desnaturadas através da saturação do leite com cloreto de sódio, e consequente separação das soroproteínas nativas ou não desnaturadas remanescentes no sobrenadante. Originalmente, a medição do índice WPNI é realizada pela diluição e ajuste

de pH do sobrenadante a fim de produzir turbidez, com o nível de turbidez sendo proporcional à concentração de soroproteínas nativas no leite. O resultado é então expresso em mg WPN mg^{-1} ou mL^{-1} de leite (MORTIER et al., 2000). Em contrapartida, pesquisadores relatam a aplicação de metodologias por HPLC-UV (FEINBERG et al., 2006; LAN et al., 2010) e eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa (JONES; TIER; WILKINS, 1998) para avaliar o conteúdo e a estrutura das frações proteicas, principalmente β -lg, em lácteos tratados termicamente. No entanto, destaca-se que esses métodos apresentam baixa frequência analítica, alto custo e exigem mão de obra qualificada, quando comparados ao método turbidimétrico descrito.

1.2.4 Principais Técnicas Analíticas – Conceitos básicos

No presente trabalho, a eletroforese capilar é a principal técnica a ser abordada, objetivando sua aplicação na análise dos carboidratos lactose e lactulose. Destaca-se ainda a crioscopia, técnica amplamente utilizada pelo setor lácteo para controle de qualidade da matéria-prima e de processo. A seguir, algumas características e conceitos básicos dessas duas técnicas são apresentados.

1.2.4.1 Eletroforese capilar

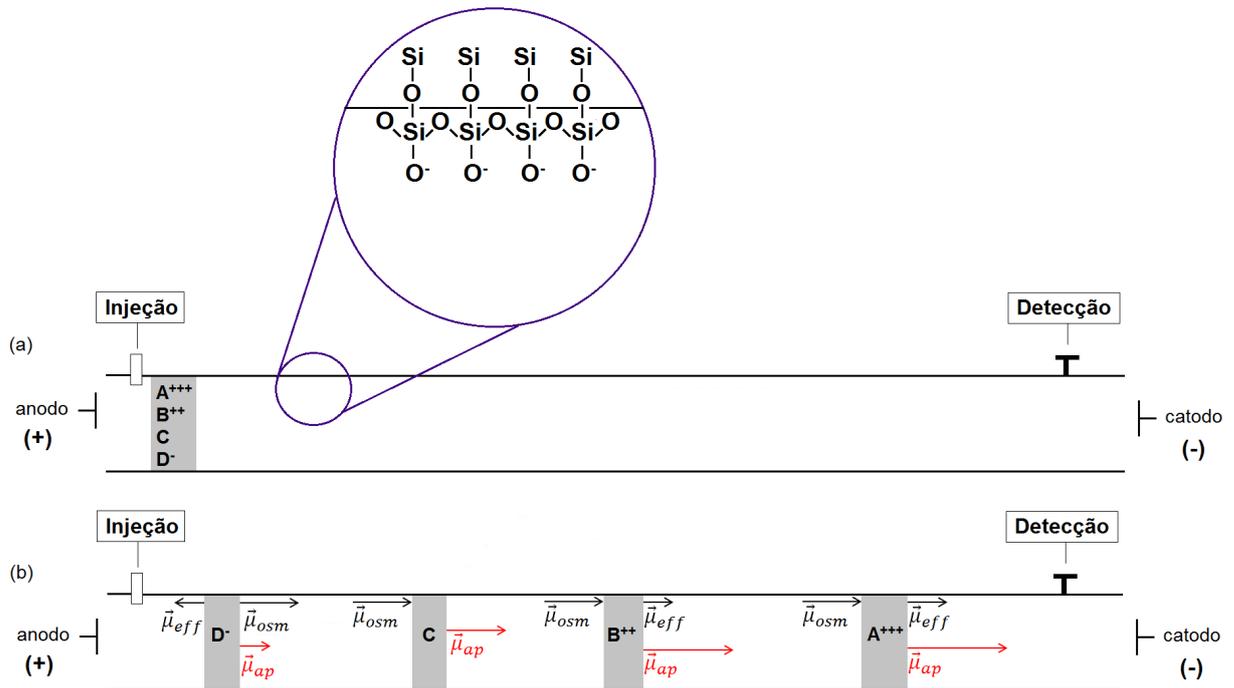
A eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos neutros, íons solvatados ou espécies ionizáveis mediante aplicação de um campo elétrico a uma coluna capilar, normalmente de sílica fundida revestida com material polimérico a fim de conferir melhores propriedades mecânicas, contendo em seu interior uma solução de eletrólito, normalmente tamponada (VAZ; DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2015).

A superfície interna do capilar de sílica fundida contém vários grupos silanóis ($-\text{SiOH}$) de caráter ácido e ioníveis quando em contato com o eletrólito aquoso, proporcionando uma superfície interna negativamente carregada (Figura 1.6). Esse fenômeno gera a formação de uma dupla camada elétrica que se torna difusa à medida que a mesma se afasta da superfície do capilar até se igualar à concentração dos íons do eletrólito. Dessa forma, quando o campo elétrico é aplicado há um movimento unilateral de cátions solvatados da camada difusa em direção ao eletrodo de carga oposta (catodo), os quais são capazes de transportar moléculas de água, gerando um fluxo do eletrólito como um todo, conhecido como fluxo eletrosmótico (EOF – do inglês, *electroosmotic flow*). O EOF apresenta um perfil radial que está intimamente relacionado à alta eficiência de separação da técnica, comparado aos perfis

parabólicos característicos de fluxos induzidos por pressão utilizados nas técnicas cromatográficas. Assim, todos os solutos são expostos à mesma velocidade do fluxo, independente de sua posição radial, reduzindo o alargamento de banda (TAVARES, 1996).

Um dos modos mais comuns em eletroforese capilar é denominado eletroforese capilar de zona (CZE), ou eletroforese capilar em solução livre, em que a concentração do eletrólito é constante em toda a região de separação com os componentes iônicos distintos se separando em zonas (Figura 1.6) (TAVARES, 1997).

Figura 1.6 – Sistema de separação por eletroforese capilar de zona sob fluxo eletrosmótico normal evidenciando o estado inicial logo após injeção (a) e a formação das zonas distintas com migração diferencial dos analitos A, B, C e D mediante aplicação de campo elétrico (b). Onde: μ_{osm} é a mobilidade do fluxo eletrosmótico, μ_{eff} é a mobilidade efetiva e μ_{ap} é a mobilidade aparente. Os grupos silanóis ionizados ($-SiO^-$) da superfície interna do capilar também são mostrados em detalhe



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A migração dos analitos A, B, C e D ocorre conforme suas respectivas mobilidades aparentes (μ_{ap}). A μ_{ap} é caracterizada pela mobilidade exibida por um analito considerando sua mobilidade efetiva (μ_{eff}) e a mobilidade do fluxo eletrosmótico (mobilidade eletrosmótica

- μ_{osm}). Matematicamente, a μ_{ap} é dada pela soma vetorial da μ_{eff} e da μ_{osm} (TAVARES, 1996) e pode ser observada na Figura 1.6.

Um dado íon apresenta uma mobilidade eletroforética (μ_{ep}) em função da força elétrica que o mesmo sofre e da força de fricção gerada pela sua passagem pelo meio, podendo ser definida como:

$$\mu_{ep} = (|z_j| e) / 6\pi \eta r \quad (1.1)$$

Onde: z é o número de cargas elementares do íon, e é a carga elementar, r é o raio iônico efetivo e η , a viscosidade do meio.

Considerando a Equação 1.1, é possível observar que a mobilidade do composto está intimamente relacionada com a carga e o raio da espécie iônica, bem como com a viscosidade do meio. Dessa forma, podemos inferir que íons menores e mais carregados, possuem mobilidades mais elevadas. Para espécies que se comportam como ácidos ou bases fracas, a mobilidade eletroforética passa a ser chamada de mobilidade efetiva (μ_{eff}). Dessa forma, qualquer substância presente em solução com diferentes formas j , relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base, mediante a aplicação de um campo elétrico irá migrar como um soluto único cuja mobilidade efetiva pode ser expressa como o somatório das mobilidades eletroforéticas de todas as espécies j (Equação 1.2) (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012):

$$\mu_{eff} = \sum (\mu_{ep} \cdot \alpha_i)_j \quad (1.2)$$

Onde: α_i é a fração molar ou função de distribuição da espécie j e μ_{ep} é a mobilidade eletroforética da espécie j .

Como a fração molar depende da magnitude das constantes de dissociação do analito, a μ_{eff} depende indiretamente do pH do meio, e portanto, a escolha do pH do eletrólito de corrida (BGE – do inglês, *background electrolyte*) torna-se um importante fator a ser estudado para que se encontre a condição mais propícia de separação das substâncias de interesse, ou seja, a faixa de pH onde as diferenças entre μ_{eff} de cada substância são maximizadas.

1.2.4.1.1 Análise de carboidratos por CZE-UV

Os carboidratos são compostos que, no geral, não absorvem luz acima de 200 nm. Embora haja à disposição uma variedade de compostos para uso em etapas de derivatização, as quais visam fornecer um grupo cromóforo e carga aos carboidratos; inúmeras desvantagens são frequentemente associadas ao procedimento, principalmente relacionadas à reatividade dos agentes derivatizantes (LEE; LIN, 1996). Além disso, as etapas de derivatização são

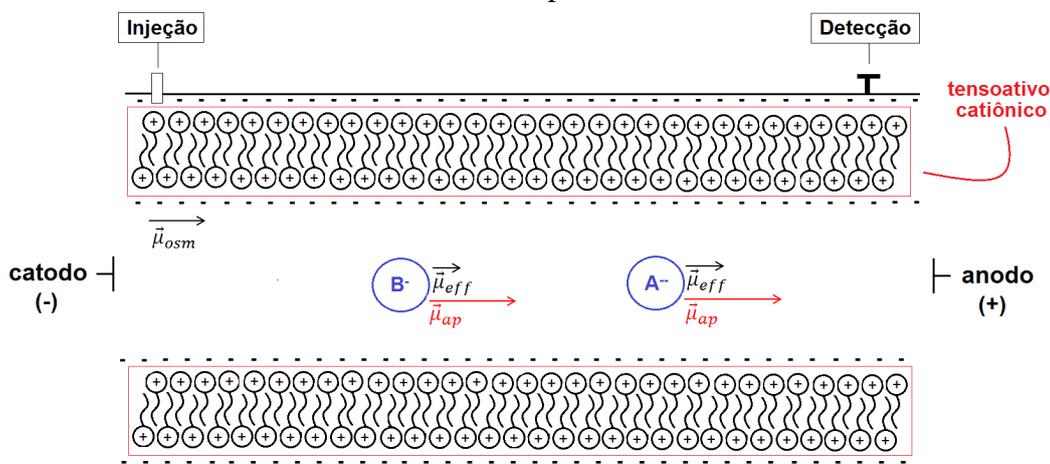
longas e podem apresentar elevado custo, inviabilizando o uso do método como ferramenta de rotina.

Como alternativa, tem-se o uso da detecção indireta, que consiste na adição do agente cromóforo (de caráter aniônico para análises de carboidratos) ao BGE gerando um sinal de fundo elevado. Dessa forma, quando a zona carregada com o analito atinge o detector uma queda do sinal de absorção é observada, registrando picos negativos. A inversão da polaridade do detector permite que o sinal seja registrado como picos positivos, a qual é realizada mantendo-se como referência um comprimento de onda em que o cromóforo exibe maior absorvidade (JAGER; TAVARES, 2001).

Outra característica a ser considerada na análise de carboidratos por CZE é que a grande maioria desses compostos possuem elevadas constantes de dissociação ($pK_a \geq 12$), não apresentando carga em pH próximo da neutralidade. Nesse contexto, a análise por CZE se torna possível somente em presença de solução alcalina forte, gerando ionização do grupo hidroxila e proporcionando a análise desses compostos sob a forma de ânions (MANTOVANI et al., 2018).

Para análise de ânions, a situação ideal é caracterizada pelo o uso de tensoativos catiônicos no eletrólito, associado à aplicação de polaridade negativa no lado da injeção do sistema – denominado sistema com polaridade invertida – (anodo próximo à detecção e catodo próximo à injeção). Nesse caso, os tensoativos agem como modificadores dinâmicos da superfície interna do capilar (TAVARES, 1997). Há um processo dinâmico de adsorção da cabeça polar do tensoativo catiônico na parede interna do capilar, seguida pela interação entre as cadeias hidrocarbonadas por forças de London, gerando uma estrutura bidimensional (semi-micelas) na superfície. A dupla camada elétrica constituída de ânions é então formada na interface superfície-solução que, sob ação do campo elétrico aplicado, sofre migração em direção ao anodo, caracterizando o fluxo eletrosmótico invertido (fluindo do catodo para o anodo) (Figura 1.7).

Figura 1.7 – Sistema de separação dos ânions A e B por eletroforese capilar de zona com fluxo eletrosmótico e polaridade invertidos



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

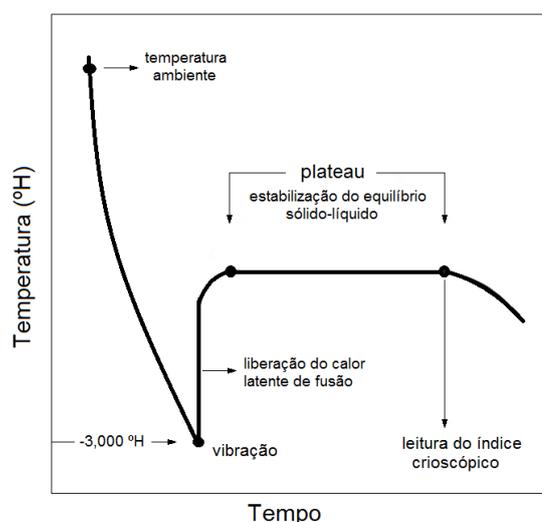
1.2.4.2 Crioscopia

A diminuição do ponto de congelamento, conhecido por abaixamento crioscópico, é verificada à medida que se aumenta a concentração de partículas solúveis não voláteis na solução. Esse fenômeno é classificado como uma propriedade coligativa, a qual depende somente do número de partículas do soluto presente no meio. As propriedades coligativas são propriedades físicas que ocorrem quando há uma redução do potencial químico do solvente como resultado da adição do soluto. A diminuição do potencial químico é causada pelo aumento da entropia (entropia da solução é maior que a entropia do solvente puro) gerando, conseqüentemente, uma redução da pressão de vapor do solvente na solução. Dessa forma, há uma oposição do líquido ao congelamento e à vaporização, deslocando o equilíbrio líquido-vapor para temperaturas maiores (aumentando o ponto de ebulição do solvente) enquanto o equilíbrio sólido-líquido ocorre em temperaturas menores (reduzindo o ponto de congelamento) (ATKINS; PAULA, 2012).

Em 1921, Julius Hortvet foi o pioneiro na utilização do índice crioscópico como propriedade analítica para detecção de fraude por adição de água, baseando-se no fato do ponto de congelamento do leite estar diretamente atrelado à quantidade de sólidos solúveis presentes e, portanto, eventual diluição desses constituintes solúveis acarretaria no aumento do ponto de congelamento, aproximando-o de zero (ponto de congelamento da água) (SHIPE, 1959).

A técnica desenvolvida por Hortvet, denominada crioscopia, é caracterizada por um rápido super-resfriamento de uma alíquota de leite seguida da aplicação de vibração mecânica intensa, gerando cristalização imediata da amostra. O desequilíbrio térmico gerado pela vibração faz com que a amostra libere calor latente de fusão até que o equilíbrio sólido-líquido seja estabelecido, correspondendo ao ponto de congelamento do leite ou índice crioscópico dado, tradicionalmente, em graus Hortvet ($^{\circ}\text{H}$). A curva característica do índice crioscópico do leite pode ser observada na Figura 1.8.

Figura 1.8 – Curva característica do índice crioscópico do leite



Fonte: Adaptada de Bechi (2003).

1.2.4.2.1 Estimativa da hidrólise da lactose por crioscopia

Já no início da década de 1980, o índice crioscópico do leite também foi utilizado como ferramenta para o controle da hidrólise enzimática da lactose durante o processo de fabricação de leites com teor reduzido de lactose. De acordo com Nijpels et al. (1980), ao se atingir a hidrólise completa do conteúdo de lactose, uma redução de aproximadamente $-0,273^{\circ}\text{C}$ no ponto de congelamento do leite é esperada, gerando um decaimento do índice crioscópico médio de $-0,540^{\circ}\text{C}$ para $-0,813^{\circ}\text{C}$.

Embora Colinas et al. (2006) demonstraram haver uma boa correlação entre a crioscopia e métodos clássicos como os enzimáticos e a polarimetria, alguns fatores limitantes como o desenvolvimento de acidez mediante ação de bactérias ácido-láticas e a formação de oligossacarídeos reduzem a confiabilidade do método crioscópico (CHEN; FRANK; LOEWENSTEIN, 1981; NIJPELS et al., 1980). Porém, a crioscopia continua sendo utilizada

pelas indústrias processadoras como ferramenta analítica para estimar o nível de hidrólise da lactose por ser rápida, apresentar baixo custo e não necessitar de mão de obra especializada.

2 DETERMINAÇÃO DE LACTULOSE E LACTOSE EM LEITE UHT CONVENCIONAL POR CZE-UV

Nesta seção serão abordados os ensaios experimentais, resultados e discussões relativos à avaliação da aplicabilidade do método otimizado por Neves (2015) na determinação de ambos os isômeros lactose e lactulose em amostras de leite UHT convencional.

2.1 INTRODUÇÃO

Soga e Serwe (2000) desenvolveram um método eletroforético utilizando detecção indireta na região do ultravioleta (CZE-UV) para determinação de inúmeros carboidratos em diferentes matrizes alimentares. Em estudo prévio, otimizamos e aplicamos o método eletroforético baseado no trabalho de Soga e Serwe para determinação de lactulose em leite UHT convencional (com teor regular de lactose) (NEVES, 2015).

Visando atender ao foco principal desta tese, o qual versa pela disponibilização de método eletroforético capaz de ser aplicado na quantificação de ambos os isômeros lactose e lactulose, o objetivo desta seção foi verificar o desempenho do método CZE-UV proposto por Neves (2015) na determinação de lactulose e lactose em um conjunto amostral de leite UHT convencional e avaliar as figuras de mérito: sensibilidade, precisão e recuperação para lactose.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

Nesta seção serão descritos todos os reagentes, amostras e instrumental utilizados, assim como a metodologia de quantificação adotada e as figuras de mérito avaliadas.

2.2.1 Reagentes e Soluções

Água deionizada foi obtida em sistema de osmose reversa (Milipore, Bedford, MA, EUA). Padrões de lactose e lactulose foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), além do ácido 2,6-piridinodicarboxílico (PDC), o qual desempenha o papel de cromóforo aniônico ($pK_{a1} = 2,17$ e $pK_{a2} = 4,97$), e do tensoativo catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Hidróxido de sódio (NaOH) e os reagentes utilizados no preparo das amostras: acetato de zinco biidratado, ácido acético glacial, hexacianoferrato de potássio e etanol, todos grau analítico, foram comprados da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Soluções estoque individuais para cada padrão de carboidrato foram preparadas em água deionizada na concentração de 1 g 100 mL⁻¹ e estocadas a 4 °C. Uma solução estoque contendo PDC e NaOH na concentração de 100 mmol L⁻¹ e 250 mmol L⁻¹, respectivamente foi preparada e mantida sob refrigeração a 4 °C. Além disso, soluções estoque de CTAB a 10 mmol L⁻¹ e de NaOH a 1 mol L⁻¹ também foram preparadas e estocadas a temperatura ambiente (\approx 25 °C).

2.2.2 Amostras

Amostras de dezessete marcas comerciais de leite UHT convencional desnatado (máx. 0,5 % m/v gordura) foram coletadas nas principais regiões leiteiras do Brasil (Sul, Sudeste e Centro-Oeste) em suas embalagens originais, hermeticamente fechadas contendo 1 L e analisadas em duplicatas autênticas. Algumas marcas tiveram mais de uma amostra (de diferentes lotes) coletada a fim de se estimar possíveis variações do processamento térmico adotado pela mesma marca, sendo codificadas como M_x*, M_x** ou M_x*** de acordo com o número de amostras coletadas: se uma, duas ou três amostras, respectivamente, onde x é o número da marca e varia de 01 a 17 (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Codificação e quantidade de amostras coletadas para as marcas de leite UHT convencional desnatado selecionadas

Código da marca	Amostras coletadas
M_01**	2
M_02***	3
M_03*	1
M_04*	1
M_05**	2
M_06**	2
M_07***	3
M_08**	2
M_09*	1
M_10**	2
M_11**	2
M_12*	1
M_13**	2
M_14*	1
M_15*	1
M_16**	2
M_17**	2
Total	30

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

2.2.3 Instrumental e Condições Eletroforéticas

Os experimentos foram realizados utilizando equipamento de eletroforese capilar Agilent modelo 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com um detector por arranjo de diodos (DAD - do inglês, *Diode Array Detector*) e *software* para controle, aquisição, armazenamento e tratamento de dados (HP ChemStation, Ver. B.04.03).

A composição do BGE previamente otimizada por Neves (2015) consistiu em uma mistura padrão de PDC e NaOH a 20 mmol L^{-1} e 50 mmol L^{-1} , respectivamente, e CTAB a $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, objetivando-se atingir um pH acima de 12,50, sem a necessidade de grandes ajustes finais do pH. A verificação do pH foi realizada através de fitas indicativas pois, por se tratar de um pH bastante elevado o pHmetro não fornece uma leitura estável devido à elevada concentração de íons de sódio (erro alcalino). A detecção indireta dos carboidratos foi realizada via monitoramento do sinal analítico em 350 nm, mantendo-se como referência o sinal analítico em 275 nm. Dessa forma, os sinais dos picos negativos em 350 nm associados à detecção indireta são registrados como sinais de picos positivos em 275 nm.

Capilares de sílica fundida recobertos externamente com poliimida e apresentando $375 \mu\text{m}$ de diâmetro externo (o.d.) e $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno (i.d.) (TSP 075150, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) foram utilizados em todos os ensaios do presente trabalho. O comprimento total (L_T) e comprimento efetivo (L_E) foram, respectivamente, 58,5 cm e 50,0 cm, considerando a posição da cela de detecção a uma distância de 8,5 cm da extremidade do capilar.

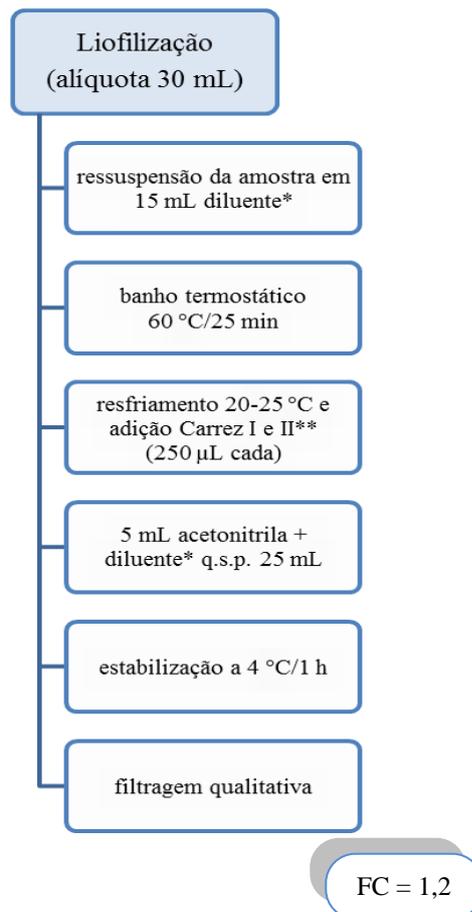
Para o condicionamento inicial dos capilares e consequente ativação dos grupos silanóis, realizou-se a passagem (*flush*) de uma solução de NaOH a 1 mol L^{-1} por 40 min, seguido por água deionizada e BGE durante 30 min cada. Para capilares previamente ativados, o condicionamento inicial de trabalho contou com *flush* sequencial de solução NaOH 1 mol L^{-1} , água deionizada e BGE por 15 min cada. O condicionamento entre as corridas eletroforéticas descrito por Neves (2015) foi modificado: passando-se a utilizar um *flush* de NaOH 1 mol L^{-1} durante 3 min, seguido de água deionizada e BGE por 2 min cada, ao invés de apenas um *flush* de água deionizada por 2 min. A alteração do condicionamento entre corridas objetivou a redução da aderência de material na parede do capilar. Após as injeções diárias, o capilar era submetido a um *flush* de limpeza com NaOH 1 mol L^{-1} e água deionizada por 15 min cada e mantido preenchido com água deionizada até o próximo uso.

2.2.4 Parâmetros Instrumentais e Preparo da Amostra

Os parâmetros instrumentais otimizados por Neves (2015): tensão aplicada (-15 kV), pressão e tempo de injeção no modo hidrodinâmico (10 mbar por 1 s), temperatura do cartucho (20 °C) e frequência de aquisição (2,5 Hz) foram mantidos e empregados em todos os ensaios realizados nesta seção do trabalho.

Inicialmente todas as amostras de leite UHT coletadas foram submetidas ao processo de liofilização (alíquota de 30 mL) objetivando concentrar a lactulose no meio antes de submetê-las ao processo de extração, o qual geralmente implica em uma diluição dos constituintes do meio. A liofilização foi realizada em liofilizador de bancada (Liobrás®, SP-Brasil) a -50 °C e 89 mbar. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de extração utilizando-se soluções clarificadoras Carrez I e II, conforme protocolo otimizado por Neves (2015) e evidenciado na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Etapas experimentais do método de extração aplicado para análise eletroforética de lactose e lactulose em leite UHT convencional



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

* solução etanol 95 % v/v e água deionizada (1:1). ** Carrez I (21,9 % acetato de zinco e 3 % ácido acético glacial), Carrez II (10,6 % hexacianoferrato de potássio). q.s.p.: “quantidade suficiente para”. FC: fator de concentração do método.

Os extratos obtidos foram filtrados em filtro de membrana 0,45 μm (RC45/13) Macherey-Nagel® (Bethlehem, PA, USA) antes de serem injetados no equipamento CE.

2.2.5 Quantificação Utilizando Método de Adição de Padrão com Um Incremento (SPSA)

Por se tratar de amostras que apresentam alta complexidade de matriz, com variações naturais em sua composição de acordo com período de lactação, clima e manejo do gado, o uso de um sistema de quantificação por adição de padrão se torna mais adequado. No entanto, o método de quantificação por adição de padrão tradicional é um processo laborioso e muitas vezes inviável para análise de rotina. Nesse contexto, uma alternativa é o uso do método de adição de padrão por um incremento ou único ponto (SPSA - do inglês, *single point standard addition*), o qual utiliza apenas duas injeções: amostra e amostra adicionada de padrão (amostra + padrão), obtendo-se Sinal 1 (S_1) e Sinal 2 (S_2), respectivamente para posterior cálculo da concentração do analito (CARDONE; PALERMO, 1980).

Mediante tal realidade, os protocolos para quantificação via SPSA encontram-se descritos nos subitens a seguir.

2.2.5.1 Quantificação da lactulose

- a) Obtenção do sinal da amostra (S_1): transferiu-se 920 μL do extrato da amostra (V_x) para um tubo de microcentrífuga seguido por adição de 80 μL de água deionizada, totalizando um volume final de 1000 μL (V_f). Procedeu-se na homogeneização do sistema em agitador tipo vortex por 10 s e transferência de uma alíquota de 500 μL para um reservatório de injeção para leitura do sinal;
- b) Obtenção do sinal da amostra + padrão (S_2): transferiu-se 920 μL do extrato da amostra (V_x) para um tubo de microcentrífuga seguido por adição de 80 μL de padrão de lactulose (V_s) de concentração conhecida ($C_s = 1 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$), totalizando um volume de 1000 μL (V_f). A solução foi homogeneizada em agitador tipo vortex por 10 s e uma alíquota de 500 μL foi transferida para um reservatório de injeção para leitura do sinal.

2.2.5.2 Quantificação da lactose

Como as amostras de leite UHT convencional apresentam elevada concentração de lactose, uma diluição em meio aquoso do extrato na ordem de 50 vezes foi necessária para a

quantificação desse dissacarídeo, a fim de se obter um perfil eletroforético adequado com boa definição de pico do analito.

- a) Obtenção do sinal da amostra (S_1): transferiu-se 84 μL do extrato diluído da amostra (V_x) para um reservatório de injeção com volume final de 100 μL (V_f), seguida da adição de 16 μL de água deionizada.
- b) Obtenção do sinal da amostra + padrão (S_2): transferiu-se 84 μL do extrato diluído da amostra (V_x) para um reservatório de injeção com volume final de 100 μL (V_f), seguida da adição 16 μL (V_s) do padrão de lactose a 1 g 100 mL^{-1} (C_s).

Todos os reservatórios foram homogeneizados em agitador tipo vortex por 10 s antes da injeção.

O cálculo da concentração dos analitos utilizando o método de quantificação SPSA foi realizado mediante uso da Equação 2.1, aplicando-se posteriormente os devidos fatores para ajuste final da concentração relativa à amostra de leite. Dessa forma, para a lactulose considerou-se a concentração gerada pela liofilização e a diluição intrínseca ao método de extração, resultando em um fator de concentração (FC) final de 1,2. Enquanto que para a quantificação da lactose, além do FC relacionado ao processo de liofilização prévia da amostra e extração, empregou-se o fator de diluição (FD) dos extratos obtidos (FD = 50).

$$C_x = \left[S_1 C_s V_s \right] / \left[(S_2 - S_1) V_x \right] \quad (2.1)$$

Onde C_x é a concentração do analito na amostra injetada ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ou $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$, se lactulose ou lactose, respectivamente), S_1 é o sinal analítico obtido para amostra (mAU), S_2 é o sinal analítico obtido para amostra + padrão (mAU), C_s é a concentração do padrão utilizado ($\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ou $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$, se lactulose ou lactose, respectivamente), V_s é o volume do padrão utilizado (μL), V_x é o volume do extrato da amostra utilizado na etapa de quantificação (μL).

Considerando o procedimento de quantificação SPSA, é importante destacar ainda que o volume de padrão adicionado (V_s) deve ser pequeno em relação ao volume de amostra (V_x), de modo que o efeito de diluição proveniente da adição do padrão na matriz da amostra seja insignificante. Neste caso, assume-se que o estimador de proporcionalidade, inclinação da reta, ou slope (k), é constante para a matriz avaliada (CARDONE; PALERMO, 1980). O cálculo de k , dado pela Equação 2.2, onde V_f é o volume final da solução de amostra preparada para a etapa de quantificação (em μL), permite verificar experimentalmente se esse fator permanece com baixa variabilidade, o que justifica o uso da quantificação pelo método SPSA e atesta que a quantificação não é influenciada pelo efeito de matriz.

$$k = \left[(S_2 - S_1) V_f \right] / C_s V_s \quad (2.2)$$

2.2.6 Avaliação das Figuras de Mérito para o Método CZE-UV

As figuras de mérito: sensibilidade, estimada através do cálculo dos limites de detecção (LOD – do inglês, *limit of detection*) e quantificação (LOQ – do inglês, *limit of quantification*), precisão intralaboratorial e exatidão realizadas por teste de repetitividade e teste de recuperação, respectivamente, foram avaliadas.

Apesar da sensibilidade de métodos de separação comumente ser estimada pelo cálculo dos LOD e LOQ via determinação da relação sinal-ruído (FARIA; DE SOUZA; DE OLIVEIRA, 2008), a medição do ruído não é trivial e muitas vezes pode se tornar subjetiva. Na tentativa de reduzir possíveis erros na inferência de tais limites, três diferentes regiões da linha base do eletroferograma próximas aos picos de interesse foram selecionadas, obtendo-se então um valor médio representativo para o analito na matriz de interesse. Para o cálculo do LOD e LOQ, de acordo com as Equações 2.3 e 2.4, considerou-se 5 das 17 marcas, escolhidas aleatoriamente

$$LOD = \left[3 \, sd_{ruído} \, C_x \right] / \left[H_{máx} - H_{mín} \right] \quad (2.3)$$

$$LOQ = \left[10 \, sd_{ruído} \, C_x \right] / \left[H_{máx} - H_{mín} \right] \quad (2.4)$$

Onde: $sd_{ruído}$ é o desvio-padrão do ruído presente na linha de base do eletroferograma (mAU), C_x é a concentração do analito na amostra ($mg \, 100 \, mL^{-1}$ ou $g \, 100 \, mL^{-1}$), $H_{máx}$ é a altura máxima do pico do analito (mAU), $H_{mín}$ é a altura mínima do pico do analito (mAU).

Para a precisão intralaboratorial, o teste de repetitividade foi realizado utilizando seis réplicas autênticas de uma mesma amostra de leite UHT injetadas no mesmo dia de trabalho, de acordo com recomendações da ANVISA (RIBANI et al., 2004)

A recuperação foi avaliada apenas para a lactose, visto que o método já teve a recuperação da lactulose avaliada por Neves (2015). Como a concentração de lactose em leite de vaca convencional é elevada, os níveis de fortificação utilizados consideraram 10, 20 e 30 % do valor médio de ocorrência do analito na amostra (RIBANI et al., 2004), os quais foram avaliados em quadruplicatas autênticas.

2.2.7 Análises Estatísticas

Todo o tratamento estatístico dos dados, incluindo testes de hipótese, estatística descritiva e testes comparativos, foi realizado empregando-se o *software* Excel® 14.0 ver. (Microsoft Office, 2010).

O efeito da diluição do extrato amostral foi avaliado com o propósito de verificar se as variações do t_m da lactose são estatisticamente significativas e se o deslocamento observado do t_m (Δt_m) do analito é similar ao deslocamento que ocorre com o EOF. Como pressuposto obrigatório para aplicação de estatística paramétrica, realizou-se o teste de normalidade por Shapiro-Wilk para a diferença dos pares comparados. Os testes de hipótese testados encontram-se descritos abaixo, onde: H_0 é a hipótese nula a ser testada, H_a é a hipótese alternativa, *s/ dil.* é o extrato sem diluição e *c/ dil.* é o extrato com diluição.

Hipótese 1

$$H_0: t_m \text{ lactose } s/ \text{ dil.} = t_m \text{ lactose } c/ \text{ dil.}$$

$$H_a: t_m \text{ lactose } s/ \text{ dil.} \neq t_m \text{ lactose } c/ \text{ dil.}$$

Hipótese 2

$$H_0: t_m \text{ EOF } s/ \text{ dil} = t_m \text{ EOF } c/ \text{ dil.}$$

$$H_a: t_m \text{ EOF } s/ \text{ dil} \neq t_m \text{ EOF } c/ \text{ dil.}$$

Hipótese 3

$$H_0: \Delta t_m \text{ lactose} = \Delta t_m \text{ EOF}$$

$$H_a: \Delta t_m \text{ lactose} \neq \Delta t_m \text{ EOF}$$

Neste caso, o Δt_m foi calculado conforme Equação 2.5:

$$\Delta t_m^i = t_m^i \text{ Sem Diluição} - t_m^i \text{ Com Diluição} \quad (2.5)$$

Onde: i é a lactose ou o EOF.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

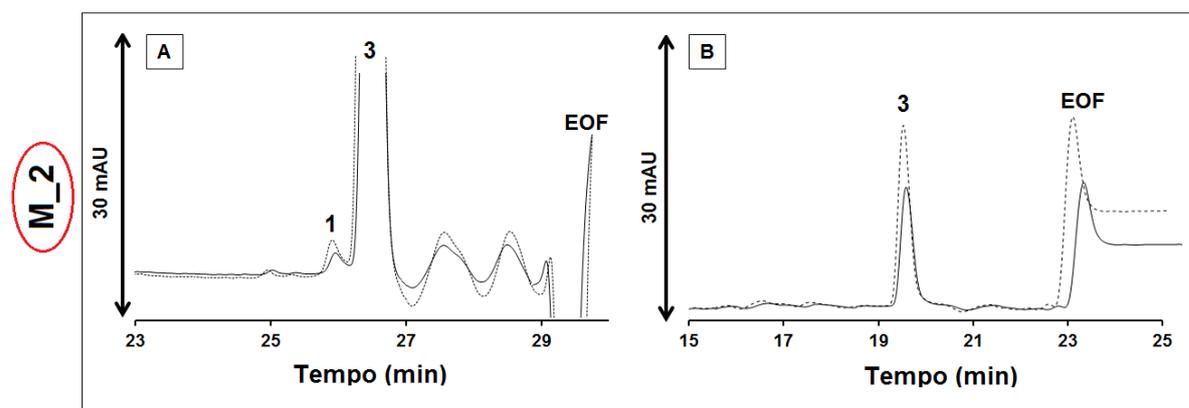
Os resultados quantitativos e testes estatísticos utilizados para avaliação dos dados encontram-se dispostos nesta seção, assim como as figuras de mérito utilizadas para avaliação do método CZE-UV.

2.3.1 Quantificação dos Teores de Lactose e Lactulose em Leite UHT Convencional

A diluição dos extratos das amostras para quantificação do teor de lactose implicou na quantificação dos isômeros em corridas eletroforéticas distintas. Perfis eletroforéticos semelhantes foram obtidos para todas as marcas selecionadas. Na Figura 2.2 podemos observar os eletroferogramas da marca M_02, escolhida aleatoriamente, onde o gráfico A

representa o perfil obtido na etapa de quantificação da lactulose e o gráfico B representa o perfil eletroforético para a quantificação da lactose (considerando o extrato da amostra diluído 1:50).

Figura 2.2 – Perfis de separação eletroforética obtidos para quantificação de lactulose (A) e lactose (diluição 1:50) (B) em leite UHT convencional da marca M_02. Picos: (1) lactulose e (3) lactose. Linha cheia refere-se ao sinal do extrato da amostra (S₁) e linha tracejada ao sinal do extrato da amostra + padrão do analito (S₂)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Condições experimentais: extração amostra (método Carrez), parâmetros eletroforéticos: injeção (10 mbar/1 s), tensão (-15 kV), temperatura (20 °C), detecção (350 nm, referência em 275 nm), capilar (TSP 75 µm i.d., 50,0 cm L_E).

Ao comparar os gráficos A e B é possível identificar um deslocamento do sinal analítico muito provavelmente relacionado ao efeito da diluição do sistema, visto que este comportamento se manteve presente em todas as amostras analisadas, podendo ser observado no Apêndice A.

Os tempos de migração (t_m) médios dos analitos e do EOF de cada marca são apresentados na Tabela 2.2, para as determinações de ambos os isômeros. É válido destacar que nas determinações de lactose o pico referente ao seu isômero, lactulose, não é observado visto que os extratos encontram-se diluídos. O menor desvio relativo dos t_m da lactose e do EOF nas determinações de lactose, ao se comparar com os desvios encontrados nas determinações de lactulose (CV t_m lactose: de 13,19 % para 4,17 % e CV t_m EOF: de 12,49 % para 4,49 %, respectivamente) pode estar vinculado ao processo de diluição. Ao diluir a amostra tem-se uma conseqüente redução da massa injetada no capilar e, portanto, as interferências causadas pelas diferentes marcas tendem a ser menores. Além disso, a diluição

gera um abaixamento da viscosidade do meio com consequente aumento da velocidade do EOF (TAVARES, 1996), justificando os menores t_m obtidos nas determinações de lactose.

Tabela 2.2 – Tempos de migração (t_m), em min, para lactulose, lactose e fluxo eletrosmótico (EOF) obtidos nas determinações dos isômeros lactose e lactulose por CZE-UV

Marca	Determinações de Lactulose*			Determinações de Lactose**	
	t_m Lactulose	t_m Lactose	t_m EOF	t_m Lactose	t_m EOF
M_01	20,92	21,46	32,76	18,92	24,83
M_02	26,15	26,68	29,49	19,74	23,05
M_03	25,94	26,33	29,32	19,56	25,03
M_04	27,10	28,32	32,60	19,81	24,92
M_05	19,08	19,81	23,66	19,08	25,45
M_06	22,45	23,23	27,67	19,23	24,92
M_07	20,90	21,79	25,42	17,91	23,89
M_08	24,02	24,41	29,32	18,85	24,44
M_09	17,12	17,65	24,44	19,96	25,46
M_10	18,15	18,77	22,04	19,14	24,73
M_11	19,12	20,98	25,00	19,10	25,63
M_12	24,59	25,72	30,35	19,30	24,68
M_13	19,74	20,52	25,20	18,88	24,53
M_14	24,90	25,33	29,17	20,09	25,98
M_15	21,33	23,33	35,00	18,40	24,28
M_16	22,71	23,91	28,35	19,02	25,53
M_17	19,63	20,47	29,77	21,62	28,45
Média ^a	21,99	22,86	28,21	19,33	25,05
CV (%) ^a	13,82	13,19	12,49	4,17	4,49

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

* sem diluição do extrato de amostra, ** com diluição do extrato. ^a n = 17. CV: coeficiente de variação.

As hipóteses propostas para os t_m (Hipóteses 1 e 2) foram avaliadas por estatística paramétrica empregando-se o teste t pareado já que um comportamento normal foi observado para as diferenças dos pares comparados (teste Shapiro-Wilk (n = 17, $\alpha = 0,05$): p-valor = 0,738 e 0,944 para Hipóteses 1 e 2, respectivamente). O Δt_m (Hipótese 3) foi avaliado por estatística não paramétrica utilizando o teste de Wilcoxon pareado, uma vez que as diferenças entre os deslocamentos da lactose e do EOF não apresentaram perfil normal (teste Shapiro-Wilk: p-valor < 0,05). Os valores dos testes estatísticos encontram-se dispostos na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Testes estatísticos para avaliação do efeito da diluição dos extratos das amostras de leite nos tempos de migração (t_m) da lactose e do fluxo eletrosmótico (EOF)

Parâmetro avaliado	Teste estatístico	p-valor (n = 17, $\alpha = 0,05$)
t_m lactose	t pareado	< 0,05
t_m EOF	t pareado	< 0,05
Δt_m	Wilcoxon pareado	0,263

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Δt_m : deslocamento dos t_m .

Diante dos dados apresentados na Tabela 2.3, verifica-se que o t_m da lactose no extrato sem diluição difere do seu t_m quando o extrato diluído encontra-se diluído (p-valor < 0,05). Este mesmo comportamento foi verificado para o EOF. Por outro lado, podemos observar que o deslocamento do pico da lactose não difere estatisticamente do deslocamento do EOF (p-valor > 0,05 pelo teste de Wilcoxon pareado). Ou seja, a lactose e o EOF deslocam de forma similar quando a amostra é submetida ao processo de diluição.

Mediante tal comportamento podemos destacar duas importantes características para as determinações eletroforéticas em matrizes lácteas: a primeira diz respeito ao deslocamento do tempo de migração entre as marcas, provavelmente relacionado às diferenças intrínsecas na matriz (evidenciado na Tabela 2.2, CV de 12,5 a 13,8 %) e, a segunda refere-se à comprovação da importância de se utilizar um sistema de quantificação em que a matriz seja considerada (como a quantificação pelo método SPSA) para que eventuais modificações no sinal analítico não comprometam a quantificação do mesmo.

Os teores de lactulose e lactose das 17 marcas de leite UHT selecionadas, codificadas como M_x^* , M_x^{**} ou M_x^{***} de acordo com o número de amostras coletadas: se uma, duas ou três, respectivamente (com x variando de 01 a 17) encontram-se na Tabela 2.4 em que podemos observar uma ampla faixa de concentração para teor de lactulose (12,81 a 69,17 mg 100 mL⁻¹). Este desvio relativo de aproximadamente 45 % pode estar relacionado a diferenças no tratamento térmico UHT, como tipo de processamento adotado (direto ou indireto) ou binômio tempo/temperatura utilizado. Teores médios de lactulose de 14,4 e 40,0 mg 100 mL⁻¹ (FEINBERG et al., 2006) e, 29,8 e 60,6 mg 100 mL⁻¹ (CATTANEO; MASOTTI; ROSI, 2008) para leite submetido ao processamento UHT direto e indireto, respectivamente, foram detectados utilizando o método oficial por HPLC-RID e corroboram com a hipótese sobre o uso de diferentes tipos de processamento UHT no processamento das marcas comerciais avaliadas.

Tabela 2.4 – Resultado quantitativo para os teores de lactulose e lactose das amostras de leite UHT convencional, e seus respectivos valores de slope (k)^a

Marca	Lactulose			Lactose		
	(mg 100 mL ⁻¹)	CV (%)	k (mAU mL mg ⁻¹)	(g 100 mL ⁻¹)	CV (%)	k (mAU mL mg ⁻¹)
M_01**	12,81	2,34	1,91	3,94	7,17	27,30
M_02***	56,92	48,44	1,38	4,50	8,94	31,98
M_03*	35,99	2,11	1,57	4,41	5,41	30,51
M_04*	39,54	4,98	1,46	4,19	8,31	42,80
M_05**	39,36	48,51	1,50	4,33	3,76	22,81
M_06**	32,32	33,60	1,76	3,94	12,36	29,72
M_07***	69,17	17,93	1,68	4,71	3,76	32,20
M_08**	21,91	1,34	1,14	4,52	17,82	38,17
M_09*	32,78	3,92	1,79	3,96	15,98	49,82
M_10**	57,62	18,62	1,46	4,32	12,14	31,94
M_11**	66,51	12,87	1,91	4,99	2,48	35,98
M_12*	31,28	3,18	1,93	4,52	11,20	37,65
M_13**	52,96	3,19	1,52	4,68	6,89	37,93
M_14*	56,90	5,96	1,85	4,06	2,91	43,94
M_15*	35,85	0,80	1,15	4,53	5,00	25,75
M_16**	27,31	33,35	1,29	4,59	8,83	38,39
M_17**	67,15	22,30	1,43	4,75	2,19	44,18
N = 60^b	45,52	44,94	1,55	4,45	9,22	34,93
			CV (%) = 12,26			CV (%) = 8,33

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

^a Número de amostras coletadas e analisadas em duplicatas autênticas, onde: *marca com 01 amostra coletada ($n = 2$); **marca com 02 amostras coletadas ($n = 4$) e *** marca com 03 amostras coletadas ($n = 6$). CV: coeficiente de variação. ^b valores médio, CV e k considerando todas as observações ($N = 60$).

Apesar do teor médio geral apresentado (45,52 mg 100 mL⁻¹) estar de acordo com os limites sugeridos pela IDF para leite submetido ao processo térmico UHT (10 – 60 mg 100 mL⁻¹), podemos observar que pelo menos três marcas (M_07, M_11 e M_17) apresentaram teor de lactulose médio acima do limite máximo indicado (60 mg 100 mL⁻¹), indicando uma possível superexposição térmica dessas amostras. Sabe-se que aquecimento excessivo pode induzir perdas nutricionais no leite devido ao bloqueio de resíduos de lisina (FRIEDMAN, 1996) e perda de estabilidade durante a vida de prateleira do produto, podendo resultar em sedimentação de frações proteicas (GAUR; SCHALK; ANEMA, 2018).

Dentre as 11 marcas comerciais de leite UHT com duas ou três amostras coletadas, sete (M_02, M_05, M_06, M_07, M_10, M_11 e M_16) apresentaram teor de lactulose com desvios relativos entre 17 e 49 %. Tamanha discrepância permite supor sobre a falta de padronização no tratamento térmico adotado por essas marcas. Sabe-se que o teor de lactulose formado durante o processamento térmico está intimamente relacionado ao teor de lactose e à exposição do produto ao calor. Portanto, a variabilidade do teor de lactose (CV de 2 a 12 %)

não é capaz de justificar os elevados desvios obtidos para seu isômero, lactulose; sugerindo a ocorrência de variações do processamento térmico adotado pelas marcas M_x** e M_x***.

Ao considerar as marcas com apenas uma amostra coletada (M_x*) um CV abaixo de 6 % entre as duplicatas autênticas é encontrado, indicando que método CZE-UV apresenta boa reprodutibilidade e corrobora com a inferência sobre a variabilidade do tratamento térmico adotado pelas marcas M_x** e M_x***.

Quanto ao conteúdo de lactose, as marcas apresentaram um valor médio de 4,45 g 100 mL⁻¹ e CV de 9 %, estando em consonância com os teores de 3,8 a 5,3 g 100 mL⁻¹ para leite de vaca reportados na literatura (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006b). Três marcas que tiveram apenas uma amostra coletada (M₀₄, M₀₉ e M₁₂) apresentaram elevados valores de CV: 8,31 %, 15,98 % e 11,20 %, respectivamente; possivelmente relacionado à necessidade alguns ajustes do método visando melhorar sua reprodutibilidade na determinação do teor desse dissacarídeo. Podemos observar ainda na Tabela 2.4 que o CV médio de *k* obtido nas determinações de lactose foi menor comparado ao obtido para lactulose (8,33 % e 12,26 %, respectivamente). De acordo com Ribani et al. (2004), a eficiência de quantificação dos métodos analíticos varia em função da concentração da substância no meio, sendo que na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração, o que corrobora com o comportamento dos CV de *k*.

É importante destacar ainda a redução do CV de *k* para a determinação de lactulose, de 22,90 % para 12,3%, quando comparado ao trabalho desenvolvido por Neves (2015). Essa redução pode estar associada às modificações realizadas no *flush* entre as corridas eletroforéticas, que reduzem a ocorrência de resíduos de amostra aderidos à parede do capilar, consequentemente minimizando as possíveis interferências no sinal analítico.

2.3.2 Avaliação das Figuras de Mérito para o Método CZE-UV

O método proposto apresentou boa sensibilidade para quantificação dos isômeros, uma vez que os valores obtidos para LOD e LOQ da lactulose e lactose (Tabela 2.5) estão abaixo da faixa esperada para esses carboidratos em leite de vaca convencional submetido ao processamento UHT. Ademais, um ligeiro ganho de sensibilidade e precisão do método para quantificação da lactulose foi observado ao comparar tais parâmetros com os resultados obtidos por Neves (2015) (LOQ de 7,99 mg 100 mL⁻¹ e CV_{precisão} de 5,27 %), estando em consonância com a redução do CV de *k* mencionada anteriormente.

Tabela 2.5 – Avaliação da sensibilidade, precisão e recuperação para determinação de lactose e lactulose em leite UHT convencional por CZE-UV

		Lactulose (mg 100 mL ⁻¹)	Lactose (g 100 mL ⁻¹)	Recuperação da lactose	
				Níveis (g 100 mL ⁻¹)	% Recuperação ^a
Sensibilidade	LOD ^b	1,88 (±0,13)	0,025 (±0,001)	0,50	96,5 (±1,5)
	LOQ ^b	6,25 (±0,43)	0,083 (±0,003)		
Precisão	Média ^c	52,96 (±1,69)	4,71 (±0,18)	1,00	102,2 (±2,6)
	CV (%)	3,19	3,82	1,50	100,0 (±1,3)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Desvio-padrão entre parênteses: ^a n = 4, ^b n = 15, ^c n = 6. CV: coeficiente de variação.

De acordo com as diretrizes estabelecidas pela AOAC International (2002), analitos cuja concentração encontra-se entre 10 e 100 mg 100 mL⁻¹ (faixa de ocorrência da lactulose em produtos submetidos ao processamento UHT) podem apresentar um desvio relativo entre 3 e 4 % para o teste de precisão. Neste caso, verifica-se que o método CZE-UV está em acordo com os limites estabelecidos para determinação de lactulose, apresentando um CV de 3,19 % para o indicador térmico. Por outro lado, analitos com concentrações acima de 1 g 100 mL⁻¹ no produto final, como é o caso da lactose em leite de vaca convencional, a AOAC (2002) estabelece um desvio relativo de 1,5 a 2,0 % para precisão. Neste caso, podemos verificar que o CV encontrado para a lactose foi de 3,82 %, estando acima do recomendado. Portanto, esforços precisam ser feitos para que a repetitividade do método quanto à determinação de lactose seja aperfeiçoada.

Considerando a faixa de recuperação obtida por Neves (2015) para lactulose (98 a 102%), uma faixa similar foi alcançada para a lactose (96 a 102 %) a qual está em conformidade com os níveis de recuperação previstos no guia de validação da AOAC International (2002) (recuperação de 95 a 102 % para analitos cuja concentração encontra-se acima de 1 g 100 mL⁻¹ até 10 g 100 mL⁻¹ na matriz).

2.4 CONCLUSÃO

O método CZE-UV proposto por Neves (2015) para quantificação de lactulose em leite UHT convencional foi avaliado quanto à sua aplicação para quantificação de ambos os isômeros lactose e lactulose. A quantificação dos isômeros foi possível considerando injeções distintas devido à necessidade de diluição da amostra para determinação do teor de lactose. Um ganho de sensibilidade e precisão para lactulose foi observado mediante aplicação de *flush* de hidróxido de sódio, água e BGE entre corridas. Quanto à quantificação da lactose,

embora a sensibilidade e os níveis recuperação sejam aceitáveis, esforços precisam ser feitos para que a precisão do método seja aperfeiçoada. Ademais, futuras otimizações devem ser trabalhadas objetivando reduzir o tempo de preparo de amostra, principalmente quanto à etapa de liofilização prévia, sendo um importante limitador para aplicação do método como ferramenta de rotina.

2.5 PUBLICAÇÕES

NEVES, L. N. O. et al. Lactulose determination in UHT milk by CZE-UV with undirect detection. **Food Chemistry**, v. 258, p. 337–342, 2018.

NEVES, L. N. DE O.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Determination of lactose and lactulose isomers in UHT milk by CZE-UV. **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, p. 108766, 2020.

3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CZE-UV PARA ANÁLISE DE LACTOSE E LACTULOSE EM LEITE UHT CONVENCIONAL E HIDROLISADO

Nesta seção serão abordados os estudos realizados para otimização do método eletroforético utilizado na seção 2 para que o mesmo seja aplicado na determinação dos isômeros lactose e lactulose em diferentes matrizes lácteas.

3.1 INTRODUÇÃO

Diante da expansão do setor de lácteos hidrolisados no cenário nacional e internacional, órgãos reguladores estabelecem limites de lactose residual para classificação e identificação desses produtos de modo a assegurar sua qualidade e a veracidade das informações dispostas no rótulo. Portanto, a disponibilização de métodos analíticos para a determinação dos baixos teores de lactose esperados nessa nova classe de produtos lácteos torna-se essencial e desperta o interesse tanto da indústria quanto de entidades fiscalizadoras.

Portanto, o objetivo desta etapa do projeto foi aperfeiçoar o método CZE-UV para quantificar lactose e lactulose em amostras de leite UHT com matrizes bem distintas quanto ao teor de lactose (leite convencional e leite hidrolisado). Para isso, a otimização do método contou com reajuste de parâmetros instrumentais e avaliação de métodos de preparo de amostras visando obter um método aplicável a ambas as matrizes convencional e hidrolisada.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

Ao se trabalhar com produtos lácteos com lactose hidrolisada novos interferentes surgem no sistema visto que resíduos de glicose e galactose são liberados no meio e estarão presentes no extrato amostral, juntamente com a lactulose formada durante o tratamento térmico e lactose residual e, portanto, novos testes de parâmetros eletroforéticos foram executados na tentativa de reduzir o tempo de corrida e otimizar a separação dos analitos. Os reagentes, amostras, instrumental e metodologias encontram-se descritos nos subitens a seguir.

3.2.1 Reagentes e Amostras

Os reagentes utilizados são os mesmos listados no item 2.2.1 da Seção 2 (p. 51). Adicionalmente, padrões de glicose e galactose foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Ácido tricloroacético (TCA), acetato de zinco, ácido fosfotúrgico e etanol 99%

v/v foram comprados da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), todos em grau analítico. Soluções padrões de lactose, lactulose, glicose e galactose foram preparadas na concentração de 1 g 100 mL⁻¹ e estocadas a 4 °C.

Seis marcas comerciais (codificadas de M_1 a M_6) que fornecem tanto leite UHT com teor regular de lactose quanto leite UHT com lactose hidrolisada foram selecionadas.

Uma amostra de cada tipo de leite foi coletada para cada uma das seis marcas selecionadas, obtendo:

- a) 06 amostras de leite UHT semidesnatado¹ com lactose hidrolisada, considerando a descrição “zero lactose” ou “*lactose free*” no rótulo do produto.
- b) 06 amostras de leite UHT semidesnatado¹ convencional (com teor regular de lactose).

As amostras convencionais foram identificadas no presente estudo como “REG”, enquanto àquelas com lactose hidrolisada receberam a identificação “LH”. Todas as amostras estavam dentro do período de validade, em embalagens herméticas de 1 L, e foram analisadas em duplicas autênticas.

3.2.2 Condições Experimentais Pré-definidas

Algumas condições experimentais da Seção 2 também foram utilizadas nesta seção, aqui brevemente resumidas: equipamento (Agilent modelo 7100 CE - Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), composição do BGE de trabalho: (20 mmol L⁻¹ PDC, 50 mmol L⁻¹ NaOH e 0,5 mmol L⁻¹ CTAB, pH final \geq 12,5), frequência de aquisição de dados (2,5 Hz), comprimento de onda monitorado (350 nm, com referência em 275 nm), capilares (TSP com 75 μ m (i.d.), 58,5 cm (L_T) e 50,0 cm (L_E) – TSP 075150, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), e acondicionamento entre as corridas eletroforéticas (*flush* de NaOH 1 mol L⁻¹ por 3 min, seguido por água deionizada e BGE durante 2 min cada).

3.2.3 Ajuste dos Parâmetros Instrumentais

Ao se trabalhar com leite UHT hidrolisado, resíduos de glicose e galactose liberados no meio estarão presentes no extrato da amostra juntamente com a lactulose e lactose residual. Por essa razão, o ajuste dos parâmetros instrumentais torna-se necessário visando obter a melhor separação possível dos carboidratos presentes no meio. Um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken 3³ (três fatores em três níveis) com triplicata no ponto central foi utilizado, considerando como fatores: pressão de injeção (X₁), tensão aplicada (X₂) e temperatura do cartucho (X₃), nos níveis: baixo (-1), médio (0) e alto (+1). Dessa forma, temos: pressão de

¹ com teor de gordura entre 0,6 e 2,9 % m/v.

injeção (10, 15 e 20 mbar), tensão aplicada (-15, -17 e -20 kV) e temperatura (20, 22 e 25 °C), mantendo-se o tempo da injeção hidrodinâmica em 2 segundos em todos os experimentos.

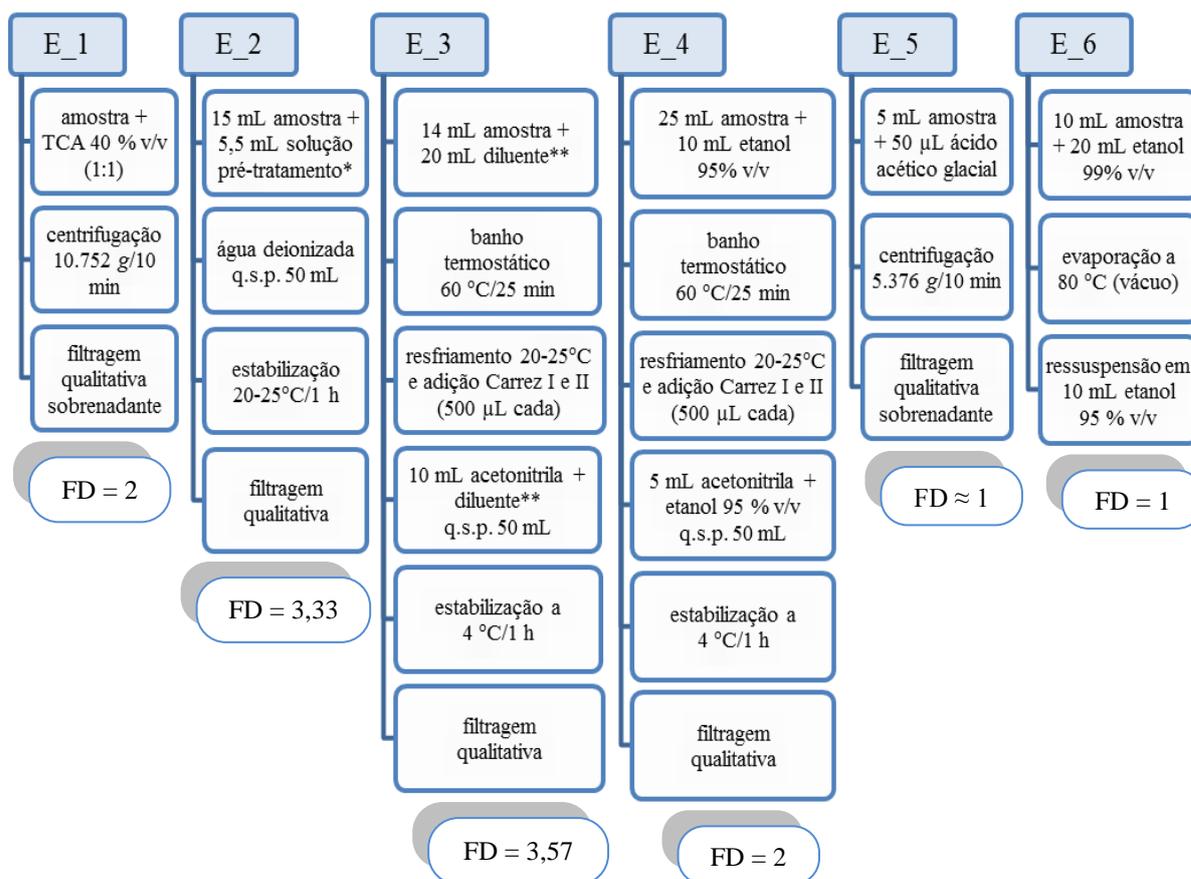
Os ensaios foram realizados em matriz REG e LH considerando uma amostra de cada, selecionadas de forma aleatória dentro do conjunto de amostras coletadas, sendo submetidas ao mesmo processo de extração utilizado na Seção 2 (método de clarificação Carrez I e II, conforme descrito na Figura 2.1, p. 55). Foram realizados 15 experimentos para cada matriz láctea, com os ensaios 13, 14 e 15 sendo equivalentes à triplicata no ponto central.

3.2.4 Métodos de Preparo da Amostra

Considerando os principais métodos de tratamento de amostras para leite fluído reportados na literatura, tem-se o uso de TCA, ácido acético glacial e ácido fosfotungstico como os agentes ácidos mais comuns para precipitação de proteínas e obtenção de sobrenadante límpido para determinação de compostos solúveis, como carboidratos e sais. A precipitação proteica por ação ácida baseia-se na redução do pH do meio até o ponto isoelétrico das proteínas, havendo assim uma neutralização da carga líquida total da molécula e conseqüentemente aglomeração. Eventuais glóbulos de gordura presentes no meio são carregados juntamente com a malha proteica formada (ADHIKARI; SAHAI; MATHUR, 1991; MEINHART et al., 2011). Alguns estudos abordam também o uso de solventes orgânicos como o etanol e a acetona agentes precipitantes, devido à menor solubilidade das proteínas em meio orgânico visto que a constante dielétrica dos solventes orgânicos é menor que a da água, fazendo com que a interação proteína-proteína seja mais efetiva (ACQUARO JUNIOR et al., 2013; CHÁVEZ-SERVÍN; CASTELLOTE; LÓPEZ-SABATER, 2004).

Considerando o exposto, seis métodos de tratamento, preparo ou extração de amostra usualmente utilizados em matriz láctea foram avaliados buscando-se uma condição ótima para redução de interferentes, principalmente gorduras e proteínas, aplicável à análise eletroforética de ambas as matrizes lácteas (REG e LH). Além disso, objetivou-se melhorar a frequência analítica do método CZE-UV mediante exclusão da etapa de liofilização prévia da amostra (empregada na Seção 2), na tentativa de viabilizar sua utilização em análises de rotina. As principais etapas para cada método avaliado podem ser observadas na Figura 3.1.

Figura 3.1 – Etapas experimentais dos métodos de extração avaliados para análise eletroforética de leite UHT convencional e hidrolisado



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

* solução pré-tratamento (9,1 % de acetato de zinco, 5,7 % de ácido fosfotúngstico, 5,8 % de ácido acético glacial). ** solução etanol 95 % v/v e água deionizada (1:1). q.s.p.: “quantidade suficiente para”. FD: fator de diluição do método. Referência dos métodos: E_1: adaptado de Adhikari et al. (1991) E_2: ISO / IDF (2007), E_3: Chávez-Sérvin et al. (2004), E_4: adaptado de Chávez-Sérvin et al. (2004), E_5: Meinhart et al. (2011), E_6: Acquaro Junior et al. (2013).

Os métodos testados foram codificados de E_1 a E_6 (com E_3 sendo o método previamente utilizado na Seção 2). Todos os métodos selecionados foram aplicados concomitantemente em matriz REG e LH considerando uma amostra de cada, selecionadas aleatoriamente dentro do conjunto de amostras coletadas. Os extratos obtidos foram filtrados em filtro de membrana 0,45 µm (RC45/13) Macherey-Nagel® (Bethlehem, PA, USA) antes de serem injetados no equipamento.

3.2.5 Quantificação Utilizando Método por Adição de Padrão com Um Incremento (SPSA)

Para quantificação de lactose, os extratos das amostras REG foram previamente diluídos com água deionizada na proporção 1:5 (extrato de amostra – volume final) enquanto os extratos LH sofreram diluição na proporção 1:2 (extrato – volume final). Para quantificação da lactulose, a diluição prévia dos extratos amostrais REG e LH não foi necessária.

O preparo dos reservatórios de injeção, tanto para quantificação do teor de lactose quanto para o teor de lactulose foi executado da seguinte forma:

- a) obtenção do sinal da amostra (S_1): transferiu-se 84 μL de extrato da amostra (diluído ou não, dependendo do analito a ser analisado) para um reservatório de injeção de capacidade de 100 μL , com posterior adição de 16 μL de água deionizada;
- b) obtenção do sinal da amostra + padrão (S_2): transferiu-se 84 μL de extrato da amostra (diluído ou não, dependendo do analito a ser analisado) para um reservatório de capacidade de 100 μL seguida da adição de 16 μL de solução do padrão (lactose ou lactulose) a 1 g 100 mL^{-1} .

Antes de efetuar as injeções, todos os reservatórios foram homogeneizados em agitador tipo vortex durante 10 s. Os cálculos das concentrações de lactose e lactulose (C_x , em que x é o analito de interesse) foram conduzidos através da Equação 2.1 (p. 56), a qual considera o sinal analítico obtido para a amostra (S_1), o sinal obtido para amostra + padrão (S_2), o volume da alíquota de amostra utilizado (V_x , nesse caso, 84 μL), a concentração do padrão adicionado (C_s , de 1 g 100 mL^{-1}) e o volume de padrão adicionado (V_s , 16 μL).

Ao final do cálculo, todas as concentrações foram ajustadas quanto ao fator de diluição proveniente do método de extração e da etapa de diluição do extrato, quando necessário.

3.2.6 Avaliação das Figuras de Mérito para o Método CZE-UV

As figuras de mérito: sensibilidade, precisão intralaboratorial e exatidão foram avaliadas nesta etapa do projeto através do cálculo do LOD e LOQ, repetitividade e teste de recuperação, respectivamente.

Para o cálculo do LOD e LOQ, foram consideradas três regiões da linha de base próximas aos picos de interesse e as Equações 2.3 e 2.4 (p. 57). Neste caso, os limites para lactulose foram calculados para as matrizes lácteas REG e LH, com um total de 30 observações (6 amostras REG e 4 amostras LH, pois duas amostras de matriz LH apresentaram teor de lactulose abaixo do limite de quantificação do método). Já os limites da

lactose foram avaliados apenas nas amostras LH, tendo em vista os menores teores desse dissacarídeo nessa matriz, totalizando 18 observações.

A repetitividade foi realizada mediante análise de uma amostra REG e de uma amostra LH, escolhidas aleatoriamente, considerando seis réplicas autênticas para cada, analisadas em um mesmo dia de trabalho (RIBANI et al., 2004).

O teste de recuperação considerou três níveis de adição: 1,0, 1,5 e 2,0 vezes o limite permitido para lactose ($0,1\text{g } 100\text{ mL}^{-1}$) ou sugerido para lactulose ($60\text{ mg } 100\text{ mL}^{-1}$) (AOAC INTERNATIONAL, 2002).

3.2.7 Análises Estatísticas

Todo o tratamento estatístico dos dados, incluindo testes de hipótese, estatística descritiva e testes comparativos, foi realizado empregando-se o *software* Excel® 14.0 ver. (Microsoft Office, 2010).

O efeito do tipo de matriz na mobilidade dos analitos e do EOF foi avaliado visando confirmar se as variações ocorridas nos t_m são estatisticamente significativas e se o deslocamento do t_m (Δt_m) do analito entre as matrizes é similar ao deslocamento que ocorre com o EOF. As hipóteses testadas consideraram:

- a) avaliação do t_m e Δt_m da lactulose e EOF nas determinações de lactulose (sem diluição do extrato da amostra) e,
- b) avaliação do t_m e Δt_m da lactose e EOF obtidos nas determinações de lactose (com diluição do extrato da amostra).

3.2.7.1 Determinações de lactulose (sem diluição do extrato)

Hipótese 1

$$H_0: t_m \text{ lactulose}_{\text{REG}} = t_m \text{ lactulose}_{\text{LH}}$$

$$H_a: t_m \text{ lactulose}_{\text{REG}} \neq t_m \text{ lactulose}_{\text{LH}}$$

Hipótese 2

$$H_0: t_m \text{ EOF}_{\text{REG}} = t_m \text{ EOF}_{\text{LH}}$$

$$H_a: t_m \text{ EOF}_{\text{REG}} \neq t_m \text{ EOF}_{\text{LH}}$$

Hipótese 3

$$H_0: \Delta t_m \text{ lactulose} = \Delta t_m \text{ EOF}$$

$$H_a: \Delta t_m \text{ lactulose} \neq \Delta t_m \text{ EOF}$$

3.2.7.2 Determinações de lactose (com diluição do extrato)

Hipótese 1

$$H_0: t_m \text{ lactose}_{\text{REG}} = t_m \text{ lactose}_{\text{LH}}$$

$$H_a: t_m \text{ lactose}_{\text{REG}} \neq t_m \text{ lactose}_{\text{LH}}$$

Hipótese 2

$$H_0: t_m \text{ EOF}_{\text{REG}} = t_m \text{ EOF}_{\text{LH}}$$

$$H_a: t_m \text{ EOF}_{\text{REG}} \neq t_m \text{ EOF}_{\text{LH}}$$

Hipótese 3

$$H_0: \Delta t_m \text{ lactose} = \Delta t_m \text{ EOF}$$

$$H_a: \Delta t_m \text{ lactose} \neq \Delta t_m \text{ EOF}$$

Sendo o Δt_m calculado pela aplicação da Equação 3.1 abaixo:

$$\Delta t_m^i = t_m^i \text{ REG} - t_m^i \text{ LH} \quad (3.1)$$

Onde: i é o analito (lactose ou lactulose) ou o EOF.

O efeito da etapa de diluição nos t_m também foi estudado para a lactose e o EOF na matriz REG, assim como realizado na Seção 2 (subitem 2.2.7 p. 57). Os testes de hipótese testados encontram-se descritos abaixo:

Hipótese 1

$$H_0: t_m \text{ lactose}_{\text{REG s/ dil.}} = t_m \text{ lactose}_{\text{REG c/ dil.}}$$

$$H_a: t_m \text{ lactose}_{\text{REG s/ dil.}} \neq t_m \text{ lactose}_{\text{REG c/ dil.}}$$

Hipótese 2

$$H_0: t_m \text{ EOF}_{\text{REG s/ dil.}} = t_m \text{ EOF}_{\text{LH c/ dil.}}$$

$$H_a: t_m \text{ EOF}_{\text{REG s/ dil.}} \neq t_m \text{ EOF}_{\text{LH c/ dil.}}$$

Hipótese 3

$$H_0: \Delta t_m \text{ lactose} = \Delta t_m \text{ EOF}$$

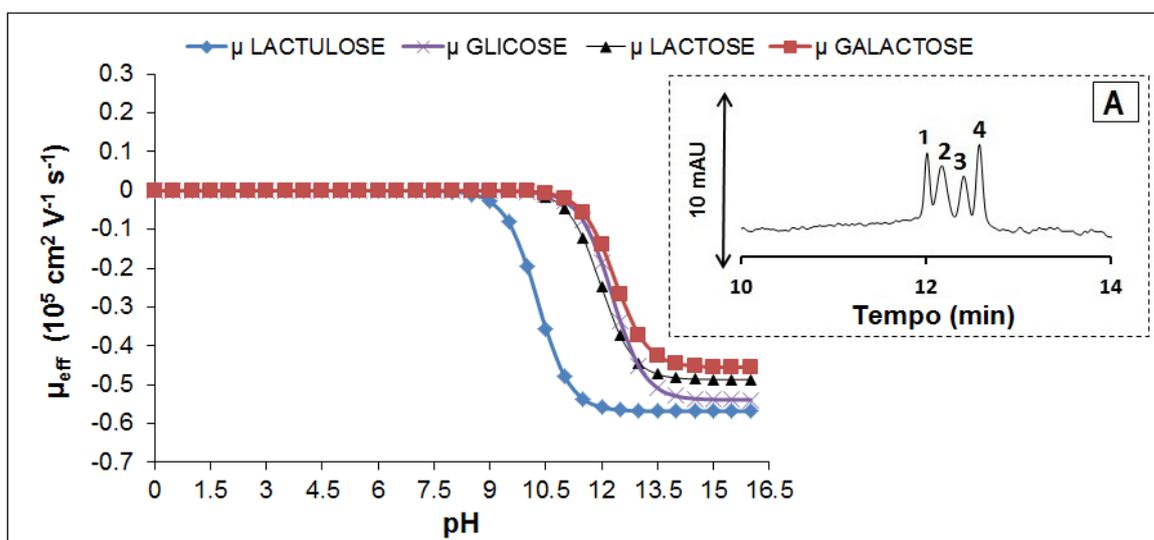
$$H_a: \Delta t_m \text{ lactose} \neq \Delta t_m \text{ EOF}$$

Δt_m calculado considerando Equação 2.5 (p.58).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um estudo da mobilidade efetiva (μ_{eff}), Figura 3.2, foi realizado considerando o pKa dos monossacarídeos glicose (12,28) e galactose (12,35) e dos dissacarídeos lactose (11,98) e lactulose (10,28), e considerando os parâmetros instrumentais utilizados na Seção 2. A ordem de migração dada pelo estudo da μ_{eff} dos analitos foi comprovada ao se injetar uma mistura de padrões, seguida de injeções com incremento de cada analito. A ordem de migração experimental dos referidos açúcares é mostrada no gráfico A (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Estudo da mobilidade efetiva (μ_{eff}) para lactulose (1), glicose (2), lactose (3) e galactose (4), indicando a ordem de migração dos analitos ao longo da faixa de pH e; gráfico A obtido experimentalmente para solução de padrões a 1 mg mL^{-1} em $\text{pH} \geq 12,5$



Fonte: Adaptado de de Oliveira Neves e Leal de Oliveira (2020).

Parâmetros eletroforéticos: injeção (10 mbar 2 s), tensão (-15 kV), temperatura (20 °C), frequência (2,5 Hz), detecção (350 nm, referência em 275 nm), capilar (TSP 75 μm i.d., 50,0 cm L_E).

3.3.1 Ajuste dos Parâmetros Instrumentais

Para o planejamento fatorial Box-Behnken 3^3 , a razão entre a resolução (R_s) do par de picos de interesse, de acordo com o tipo de matriz avaliado, e o tempo de migração do último analito (t_{mf}) foi utilizada como resposta (R), conforme Equação 3.2:

$$R(\text{min}^{-1}) = (R_s / t_{mf}) \quad (3.2)$$

A resposta monitorada foi projetada para fornecer uma boa resolução de pico entre os pares de analitos: lactulose-lactose (na matriz REG) e glicose-galactose (na matriz LH), com menor tempo de corrida eletroforética. É importante destacar que nos produtos lácteos LH os carboidratos majoritários são glicose e galactose e, portanto, uma boa separação desses

monossacarídeos (picos 2 e 4, respectivamente) é mandatória, pois a lactose (pico 3) apresenta μ_{eff} intermediária a estes monossacarídeos. Os ensaios que forneceram a maior resposta foram avaliados quanto ao perfil eletroforético objetivando selecionar a condição mais adequada para aplicação em ambas as amostras REG e LH. A matriz de contrastes e as respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Matriz do planejamento experimental Box-Behnken 3^3 para ajuste dos parâmetros instrumentais e análise eletroforética de leite UHT convencional e hidrolisado^a

Ensaio	Efeitos			R (min^{-1})	
	X ₁	X ₂	X ₃	REG	LH
CE_01	-1	-1	0	0,007	0,075
CE_02	+1	-1	0	0,066	0,056
CE_03	-1	+1	0	0,091	0,085
CE_04	+1	+1	0	0,074	0,080
CE_05	-1	0	-1	0,078	0,068
CE_06	+1	0	-1	0,009	0,083
CE_07	-1	0	+1	0,009	0,078
CE_08	+1	0	+1	0,062	0,086
CE_09	0	-1	-1	0,059	0,070
CE_10	0	+1	-1	0,094*	0,105*
CE_11	0	-1	+1	0,046	0,076
CE_12	0	+1	+1	0,088	0,105*
CE_13	0	0	0	0,078	0,076
CE_14	0	0	0	0,079	0,076
CE_15	0	0	0	0,079	0,077

Fonte: Adaptado de de Oliveira Neves e Leal de Oliveira (2020).

a De acordo com o rótulo do produto, sendo REG: matriz convencional, ou com teor regular de lactose, e LH: matriz com lactose hidrolisada. Matriz de efeitos e níveis, sendo:

X1: Pressão de injeção (mbar): (-1) 10, (0) 15, (1) 20;

X2: tensão aplicada (kV): (-1) -15, (0) -17, (1) -20;

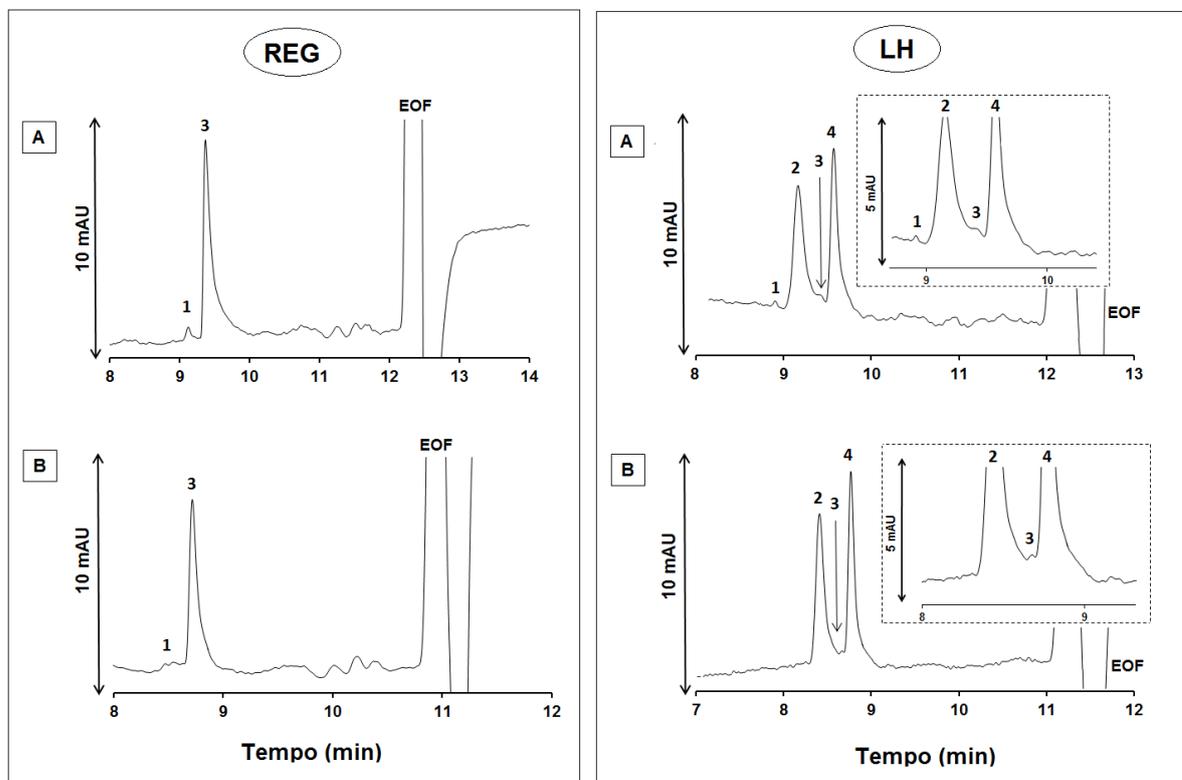
X3: temperatura do cartucho (°C): (-1) 20, (0) 22, (1) 25.

* maior valor.

É possível observar que o valor mais alto para a resposta da matriz REG foi obtido pela combinação de parâmetros do ensaio CE_10 ($R(\text{min}^{-1}) = 0,94$), enquanto dois ensaios (CE_10 e CE_12) forneceram valores idênticos ($R(\text{min}^{-1}) = 0,105$) para a matriz LH (os valores encontram-se destacados com um asterisco na Tabela 3.1).

Os ensaios CE_10 e CE_12 diferem entre si somente quanto à temperatura do cartucho (20 °C e 25 °C, respectivamente), cujos perfis eletroforéticos encontram-se dispostos na Figura 3.3. Os perfis eletroforéticos obtidos em todos os ensaios do planejamento fatorial encontram-se dispostos no Apêndice B.

Figura 3.3 – Perfis eletroforéticos de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) submetidos aos ensaios CE_10 (A) e CE_12 (B). Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose



Fonte: Adaptado de Oliveira Neves e Leal de Oliveira (2020).

Parâmetros instrumentais: CE_10 (15 mbar/2 s, -20 kV, 20 °C), CE_12 (15 mbar/2 s, -20 kV, 25 °C). *Condições experimentais:* extração da amostra (método de clarificação com Carrez I e II), frequência (2,5 Hz), detecção (350 nm, referência em 275 nm), capilar (TSP 75 μ m i.d., 50,0 cm L_E). EOF: fluxo eletrosmótico.

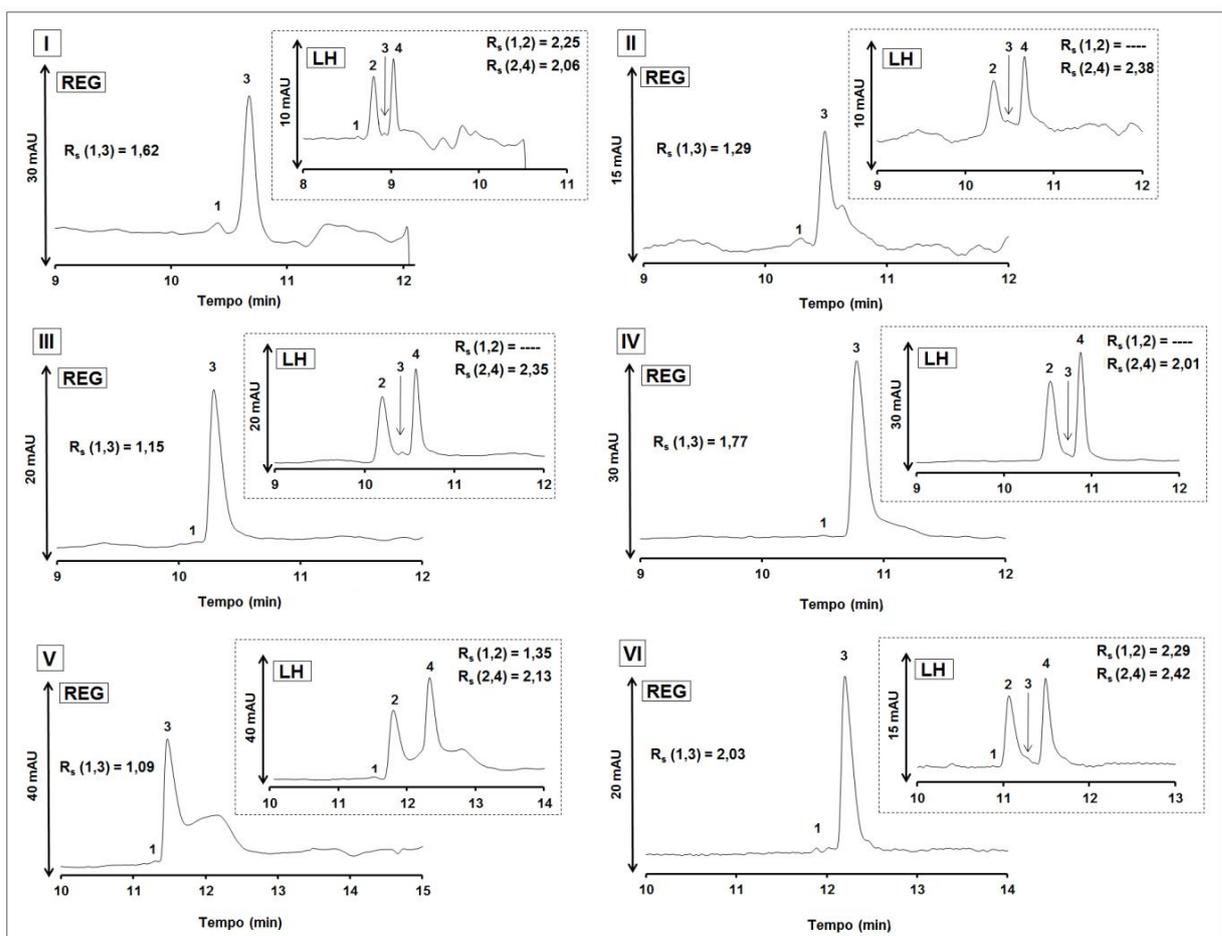
Ao comparar os eletroferogramas A e B de cada matriz podemos observar o efeito do aumento da temperatura na redução do tempo de migração e o consequente comprometimento da identificação do pico de lactulose (pico 1) das amostras REG e LH. Tais alterações no perfil eletroforético podem ser atribuídas ao abaixamento da viscosidade do meio ocasionado pelo aumento da temperatura, provocando aumento da velocidade do EOF, o que pode gerar problemas de comigração caso os analitos apresentem mobilidades muito próximas (TAVARES, 1997). O efeito da temperatura na separação do par de picos lactulose-lactose da amostra REG pode ser observado numericamente pela redução da resposta calculada, de 0,094 no ensaio CE_10 para 0,088 no ensaio CE_12 (Tabela 3.1). Contudo, para a amostra LH, a redução do tempo de migração e da resolução dos picos glicose-galactose, causada pelo aumento da temperatura do cartucho em CE_12, coincidentemente gerou uma razão igual à obtida para o ensaio CE_10 (0,105). Por esse motivo a avaliação dos dados numéricos deve

sempre estar associada a uma análise detalhada do perfil eletroforético dos ensaios com respostas similares. Diante desses achados, conclui-se que o ensaio CE_10 fornece as condições mais adequadas para identificação e quantificação dos analitos sendo aplicável à ambas as matrizes lácteas REG e LH.

3.3.2 Estudo dos Métodos de Preparo da Amostra

Os eletroferogramas obtidos considerando os métodos de extração de E_1 a E_6 encontram-se representados na Figura 3.4, os valores de resolução dos pares de pico foram calculados considerando a largura do pico à meia altura ($w_{1/2}$) através do *software* Chromophoreasy (v.15.09.08) (VAZ et al., 2016).

Figura 3.4 – Perfis eletroforéticos de amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) submetidas aos métodos de extração E_1 (I), E_2 (II), E_3 (III), E_4 (IV), E_5 (V) e E_6 (VI). Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose



Fonte: Adaptado de de Oliveira Neves e Leal de Oliveira (2020).

Parâmetros eletroforéticos: ensaio CE_10: injeção (15 mbar/2 s), tensão (-20 kV), temperatura (20 °C), frequência (2,5 Hz), detecção (350 nm, referência em 257 nm), capilar (TSP 75 μ m i.d., 50,0 cm L_E).

Podemos verificar que os perfis eletroforéticos dos métodos E_2 e E_5 (gráficos II e V) apresentam linhas de base instáveis e ombros, associados à ineficácia dos procedimentos de extração, que podem comprometer a quantificação dos analitos. Considerando os demais métodos com perfis razoavelmente estáveis na região de interesse, observa-se que ao utilizar os métodos E_3 e E_4 (gráficos III e IV) não foi possível a identificação do pico de lactulose (pico 1) da amostra LH, embora uma boa resolução do par glicose-galactose tenha sido obtida ($R_{s(2,4)} > 2,0$). O fato de não ser possível identificar todos os analitos em ambas as matrizes lácteas (REG e LH) inviabiliza a seleção do método, pois deseja-se encontrar um método aplicável tanto em leites convencionais quanto em leites hidrolisados.

Quanto aos métodos E_1 e E_6 (gráficos I e VI), verifica-se boa resolução dos pares de interesse ($R_s > 1,5$) para as matrizes REG e LH. Porém, por apresentar uma etapa envolvendo evaporação do solvente, o método E_6 demanda intenso controle para que não ocorra degradação da lactose por aquecimento, o que poderia comprometer a quantificação de seu isômero, lactulose. Embora tenha apresentado resoluções ligeiramente mais elevadas que o método E_1, o método E_6 foi desconsiderado, necessitando de maiores estudos para uma aplicação confiável. Diante desses resultados, o método E_1 foi selecionado, pois possibilitou o preparo de amostras de leite UHT REG e LH com a determinação eletroforética dos isômeros lactulose e lactose.

3.3.2.1 Comparativo entre os métodos oficiais ISO e o método CZE-UV

O método enzimático oficial é baseado na determinação espectrofotométrica da frutose potencialmente liberada pela ação da β -galactosidase durante a hidrólise da lactulose presente no leite. Apesar da possibilidade de analisar várias amostras simultaneamente, o método enzimático é caracterizado pelo uso de seis enzimas diferentes com um tempo total de análise de aproximadamente 13 h. A etapa de preparação da amostra além de demandar refinado controle de temperatura, necessita de longos períodos de incubação (ISO / IDF, 2004). O método oficial por HPLC-RID baseia-se na separação dos analitos empregando uma coluna de separação específica para carboidratos e uma pré-coluna. A etapa de preparo da amostra deste método (identificada e avaliada no presente estudo como ensaio E_2 – p. 69) é caracterizada pelo uso de inúmeros reagentes além de estabilização do sistema de extração por 1 h antes da injeção. No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios quanto à aplicação desse método para eletroforese capilar, conforme Figura 3.4 (p. 76). Além disso, deve-se atentar para um período de 1 h entre injeções de amostras consecutivas para

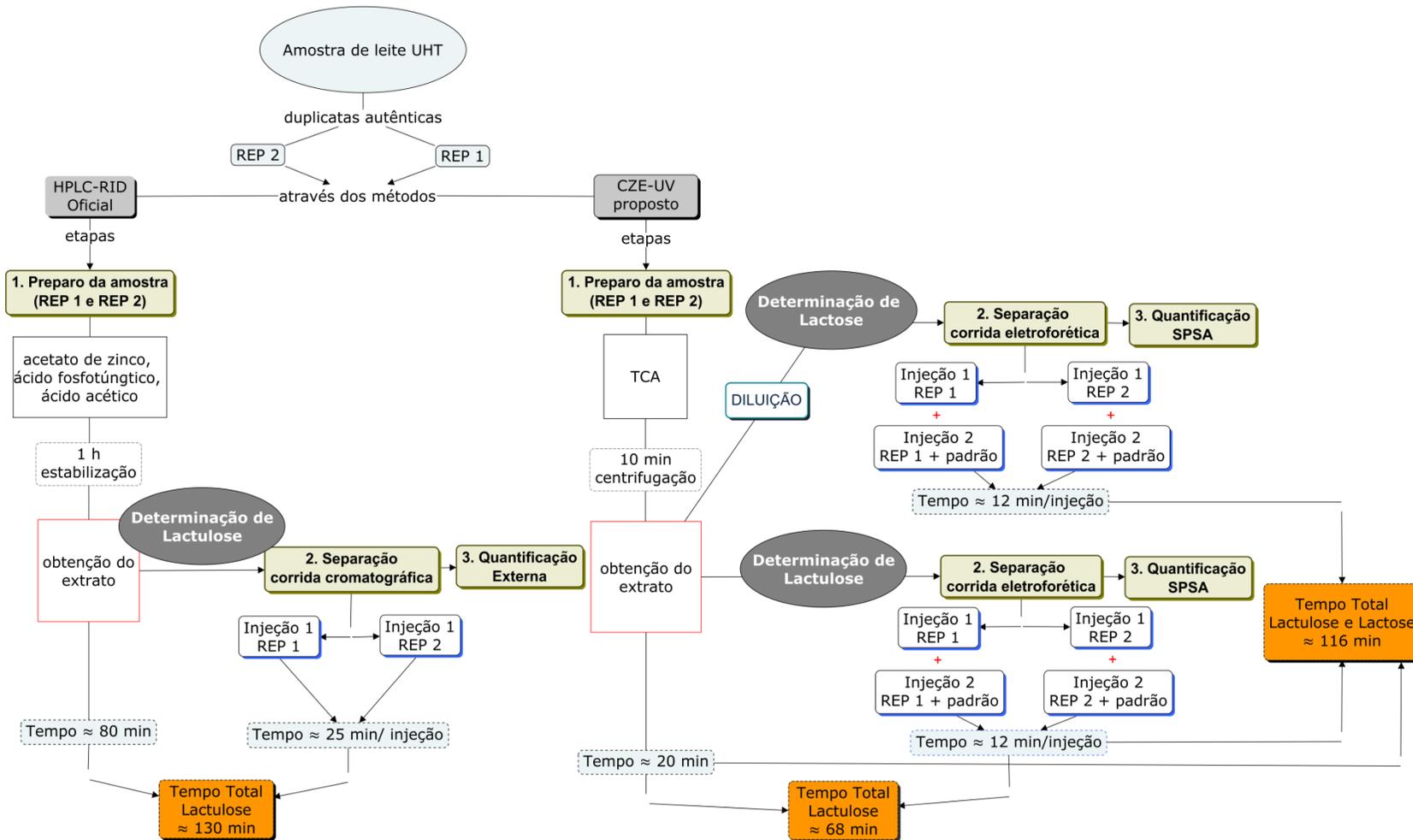
estabilização do sistema cromatográfico e garantia da limpeza da coluna, conforme previsto nas diretrizes do método oficial (ISO / IDF, 2007). Dessa forma, o longo tempo de execução exigido por esses métodos, além da necessidade de grandes quantidades de reagentes e o alto custo de enzimas são características que impactam negativamente a aplicação como métodos de rotina. É válido destacar que a aplicação desses métodos oficiais na quantificação de lactose em leite LH não é mencionada.

Para avaliar a frequência analítica, apenas os métodos de separação foram considerados, pois possuem etapas bem similares de execução caracterizadas por: preparo de amostra/injeção/quantificação. Embora seja possível o preparo de mais de uma amostra ao mesmo tempo por ambos os métodos E_1 (utilizado no método CZE-UV) e E_2 (utilizado no método de referência por HPLC-RID), a título comparativo, este estudo contemplou a análise de apenas uma amostra de leite UHT (em duplicata autêntica).

Um comparativo dos métodos pode ser observado na Figura 3.5 contendo uma estimativa do tempo médio gasto em cada etapa. Podemos observar que a etapa de preparo de amostra escolhida para o método eletroforético é mais rápida e de fácil execução, pois utiliza uma solução aquosa composta exclusivamente por TCA, seguida de centrifugação e filtração (ensaio E_1, descrito no subitem 3.2.4 - p. 68-66), apresentando um tempo médio de execução de ≈ 20 min. Enquanto a etapa de preparo do método HPLC-RID é realizada em aproximadamente 80 min (20 min de execução e 60 min de estabilização do sistema).

Quanto aos processos de separação, a corrida cromatográfica é realizada em 25 min, enquanto a corrida eletroforética requer aproximadamente 12 min. Dessa forma, o preparo da amostra e a corrida de separação do método oficial por HPLC-RID, o qual utiliza modelagem externa para quantificação, requer aproximadamente 130 min para quantificação do conteúdo de lactulose de uma amostra de leite (80 min para a etapa de preparo e 50 min de corrida cromatográfica, considerando duplicatas autênticas). Enquanto isso, o teor de lactulose é determinado em 68 min pelo método CZE-UV proposto (20 min para o preparo da amostra e 48 min de corrida eletroforética; assumindo-se duas injeções por réplica, uma vez que o método de quantificação usado é o SPSA).

Figura 3.5 – Comparativo dos métodos HPLC-RID e CZE-UV enfatizando o tempo gasto nas etapas de preparo de amostra, separação e quantificação para uma amostra de leite UHT analisada em duplicatas autênticas (REP 1 e REP 2)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Destaca-se ainda na Figura 3.5, a determinação do teor de lactose por CZE-UV utilizando-se o mesmo extrato obtido para análise de seu isômero. Dessa forma, uma amostra de leite tem suas concentrações de lactose e lactulose determinadas, em duplicatas autênticas, em aproximadamente 116 min (20 min para preparo da amostra, 48 min para as corridas eletroforéticas de lactulose, e finalmente, 48 min para as corridas eletroforéticas de lactose), empregando-se o mesmo capilar, eletrólito e procedimento de extração.

Diante do exposto, podemos afirmar que o método eletroforético proposto apresenta uma frequência analítica superior ao método oficial por HPLC-RID. Ademais, o tempo necessário para a construção do modelo de calibração externa do método oficial não foi considerado nos cálculos acima. A quantificação utilizando-se calibração externa pelo método dos mínimos quadrados ordinários não é recomendada para matrizes complexas como o leite, já que inúmeras variações podem ocorrer de amostra para amostra. Ao se utilizar o método de quantificação SPSA, eventuais variações no sinal monitorado decorrentes do efeito de matriz não irão afetar a quantificação do analito, pois irão ocorrer em ambas as injeções (*amostra* e *amostra + padrão*). O uso do método SPSA é recomendado e se justifica para os casos de análises de rotina de amostras complexas, nos quais a aplicação do método de adição de padrão convencional torna-se inviável devido ao número elevado de amostras e tempo gasto na quantificação.

É válido mencionar ainda o mérito do método CZE-UV quanto aos conceitos da Química Verde, considerando:

- a) a cada 16 injeções subsequentes efetua-se a troca do par de reservatórios de BGE dos eletrodos e dos reservatórios de BGE, NaOH e água deionizada utilizados para limpeza entre corridas, sendo que cada reservatório apresenta um volume de 0,5 mL.

Assim, temos um gasto de 1,5 mL de BGE, 0,5 mL de água deionizada e 0,5 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ cada 16 injeções.

- b) um total de 8 injeções é necessário para que 01 amostra de leite tenha seus conteúdos de lactose e lactulose determinados em duplicatas autênticas.

Portanto, temos que 02 amostras distintas de leite (16 injeções) podem ser avaliadas com o volume de BGE, água deionizada e NaOH supracitados.

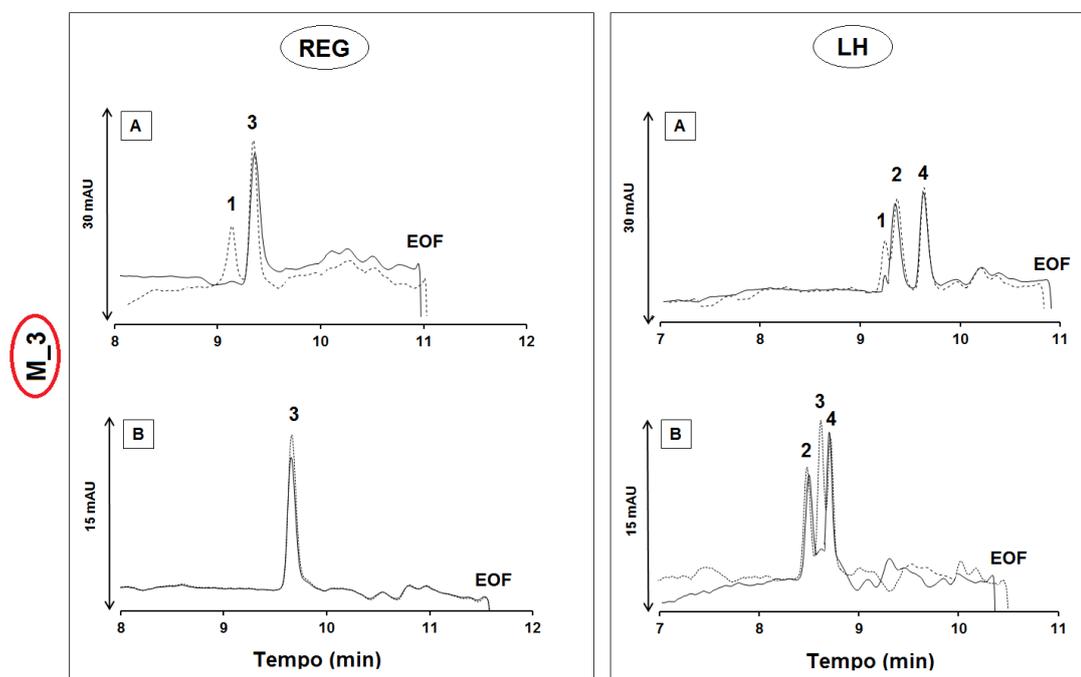
Logo, estima-se que o preparo diário de 30 mL de BGE, 10 mL de água deionizada e 10 mL de solução NaOH 1 mol L⁻¹ são necessários para quantificação de lactulose e lactose

em 38 amostras, em duplicatas autênticas, considerando ainda o acondicionamento inicial e final do capilar.

3.3.3 Quantificação dos Teores de Lactulose e Lactose em Amostras Comerciais de Leite UHT Convencional e Hidrolisado

Os eletroferogramas obtidos para as amostras REG e LH da marca M_3 são mostrados na Figura 3.6. Como a quantificação de cada isômero foi realizada separadamente, devido à etapa de diluição dos extratos para determinação da lactose, temos: gráfico A correspondendo aos sinais analíticos para quantificação da lactulose enquanto os sinais analíticos para a lactose são observados no gráfico B. Os perfis eletroforéticos obtidos para as demais marcas avaliadas encontram-se dispostos no Apêndice C.

Figura 3.6 – Perfis eletroforéticos obtidos na quantificação de lactulose (A) e lactose (B) em amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) da marca M_3. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose. Linha cheia refere-se ao sinal analítico do extrato da amostra e linha tracejada ao sinal do extrato + padrão do analito a ser quantificado



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Condições experimentais: preparo da amostra (método E_1: TCA 40% m/v), parâmetros eletroforéticos (ensaio CE_10: 15 mbar/ 2s, -20 kV e 20 °C), detecção (350 nm, referência em 275 nm), capilar (TSP 75 µm i.d., 50,0 cm L_E).

Ao comparar os gráficos A das amostras REG e LH podemos observar variações no t_m da lactulose (pico 1). Este comportamento também é observado para a lactose (pico 3) quando os gráficos B das amostras REG e LH são confrontados. Por outro lado, ao comparar os gráficos A e B da matriz REG é possível observar uma variação no t_m da lactose (pico 3), se assemelhando ao comportamento evidenciado anteriormente na Seção 2, quando o extrato da amostra foi diluído para determinação do teor desse carboidrato.

Os valores de t_m dos analitos e EOF estão dispostos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Tempos de migração (t_m), em min, da lactulose, lactose e fluxo eletrosmótico (EOF) obtidos para todas as marcas de leite UHT selecionadas

Matriz*	Marca	Determinações de Lactulose**			Determinações de Lactose***	
		t_m Lactulose	t_m Lactose	t_m EOF	t_m Lactose	t_m EOF
REG	M_1	9,75	9,98	10,94	10,06	11,82
	M_2	9,23	9,50	10,82	9,50	11,30
	M_3	9,13	9,40	10,96	9,65	11,56
	M_4	9,44	9,66	10,71	9,30	10,93
	M_5	9,53	9,73	10,65	9,08	10,98
	M_6	9,44	9,66	10,71	9,64	11,56
	Média ^a	9,42	9,66	10,80	9,54	11,36
CV (%) ^a	2,33	2,07	1,20	3,25	3,11	
LH	M_1	8,88	n.d.	10,60	8,73	10,44
	M_2	9,02	n.d.	10,62	8,65	10,34
	M_3	9,38	n.d.	10,83	8,64	10,37
	M_4	9,38	n.d.	10,88	8,65	10,36
	M_5	8,88	n.d.	10,59	8,65	10,36
	M_6	9,06	n.d.	10,69	8,75	10,43
	Média ^a	9,13	n.a.	10,70	8,68	10,38
CV (%) ^a	2,53	n.a.	1,17	0,58	0,40	

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

* De acordo com o rótulo do produto, sendo REG: matriz convencional, ou com teor regular de lactose, e LH: matriz com lactose hidrolisada. Extrato das amostras: **sem diluição e ***com diluição. ^a Valor médio e coeficiente de variação (CV) para $n = 6$. n.d.: pico não detectado. n.a.: não se aplica.

A avaliação do efeito de matriz e do efeito de diluição nos t_m e Δt_m dadas as hipóteses propostas no subitem 3.2.7 (p. 71) foi realizada por estatística paramétrica empregando-se o teste t pareado já que um comportamento com distribuição normal foi observado (teste Shapiro-Wilk: p -valor $> 0,05$) para todas as diferenças testadas. Os valores de t calculado encontram-se dispostos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Avaliação do efeito do tipo de matriz e da diluição dos extratos das amostras nos tempos de migração (t_m) dos analitos e do fluxo eletrosmótico (EOF)

		Teste t pareado ^a					
		Tipo de matriz				Diluição do extrato da amostra	
		Lactulose	EOF	Lactose	EOF	Lactose	EOF
$t_{\text{calculado}}$	t_m	2,14	1,39	6,85	7,37	0,87	5,09
	Δt_m	1,47		2,42		6,77	

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

^a $t_{\text{crítico}} (n = 6, \alpha = 0,05) = 2,57$. Δt_m : deslocamento do t_m .

De acordo com os dados apresentados, é possível notar que o tipo de matriz não influencia significativamente os t_m da lactulose e do EOF, assim como os deslocamentos dos mesmos entre as matrizes REG e LH ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ para t_m e Δt_m). Portanto, podemos afirmar que as variações do pico de lactulose e EOF observadas nos perfis eletroforéticos das amostras REG e LH não são estatisticamente significativas.

Por outro lado, verifica-se que os t_m da lactose e do EOF encontrados na matriz REG são estatisticamente diferentes de seus t_m quando em matriz LH ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$); o que pode estar relacionado à diferença de força iônica entre as matrizes (atrelada à presença dos açúcares glicose e galactose na matriz LH) havendo conseqüentemente uma variação da velocidade do EOF. No entanto, seus deslocamentos não diferem estatisticamente entre si ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$), ou seja, o deslocamento do t_m da lactose entre as matrizes REG e LH é similar ao observado para o t_m do EOF entre tais matrizes lácteas. Assim, o deslocamento desses t_m ocorre igualmente entre as matrizes, embora os t_m sejam significativamente influenciados pelo tipo de matriz. Este comportamento pode ser considerado um padrão de separação inerente às matrizes REG e LH devido às diferenças composicionais existentes entre elas.

Considerando os resultados para o efeito da diluição do extrato, nota-se que apenas o t_m da lactose não foi estatisticamente influenciado por esse processo ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$). O deslocamento apresentado pela lactose diferiu do deslocamento observado para o EOF, assim como os t_m do EOF ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$).

Quanto à quantificação dos teores de lactulose e lactose nas marcas selecionadas, os dados encontram-se dispostos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Teor médio de lactulose e lactose, e seus respectivos valores de coeficiente de variação (CV) e slope (k), para as amostras de leite UHT convencional e hidrolisado^a

Marca	Lactulose			Lactose			
	(mg 100mL ⁻¹)	CV (%)	k (mA UmL mg ⁻¹)	(g 100 mL ⁻¹)	CV (%)	k (mAU mL mg ⁻¹)	
REG	M_1	34,12	1,85	21,34	4,78	0,42	26,80
	M_2	20,13	0,03	24,17	4,80	0,08	24,74
	M_3	55,72	5,57	24,64	4,63	0,21	23,91
	M_4	36,44	0,45	23,08	4,70	0,46	25,77
	M_5	19,42	0,67	23,72	4,71	0,04	26,31
	M_6	47,73	2,03	23,66	4,80	0,15	26,58
	N = 12 ^b	35,59	40,83	23,44 CV (%) = 4,91	4,74	1,47	25,69 CV (%) = 4,44
LH	M_1	<i>n.q.</i>	<i>n.q.</i>	<i>n.q.</i>	0,1177	0,25	23,18
	M_2	9,68	0,37	24,30	0,0967	0,29	23,09
	M_3	12,36	6,47	24,25	0,1174	0,17	23,96
	M_4	19,65	1,13	26,64	0,1065	0,34	23,80
	M_5	<i>n.q.</i>	<i>n.q.</i>	<i>n.q.</i>	0,0964	0,17	20,61
	M_6	10,42	1,99	25,20	0,1071	0,14	23,47
	N = 12 ^b	13,03	34,99	25,10 CV (%) = 4,46	0,1070	8,41	23,02 CV (%) = 5,34

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

^aDe acordo com o rótulo do produto, sendo REG: matriz convencional, ou com teor regular de lactose, e LH: matriz com lactose hidrolisada. Valores médios para duplicatas autênticas (n = 2). ^bvalor médio e CV considerando todas as observações de cada matriz (N = 12). *n.q.*: não quantificado (abaixo do limite de quantificação).

Considerando a lactulose como indicador térmico, em estudos propostos por Cattaneo et al. (2008), Elliott et al. (2005), Feinberg et al. (2006) e Morales et al. (2000) foram encontrados valores médios de lactulose para leite submetido ao tratamento térmico UHT direto e indireto de (29,8 e 60,6), (12,5 e 46,6), (14,4 e 40,0) e (12,0 e 35,3) mg 100 mL⁻¹, respectivamente. Diante do comportamento relatado na literatura e analisando os teores de lactulose obtidos apenas para as amostras de leite REG (faixa de 19,42 a 55,72 mg 100 mL⁻¹), podemos observar que nossos resultados estão em acordo com os dados da literatura. Ademais, embora o tipo de processo UHT não tenha sido mencionado no rótulo dos produtos selecionados, a ampla faixa de concentração de lactulose encontrada nas amostras (CV de aproximadamente 41 %) pode estar associada às diferentes combinações de temperatura e tempo de exposição ao calor e à adoção de diferentes processos UHT (direto e indireto). No entanto, todas as marcas apresentaram níveis de lactulose dentro da faixa recomendada pela IDF (10 a 60 mg 100 mL⁻¹) para tratamento térmico UHT, o que nos leva a crer sobre a inexistência de aquecimento adicional ao processamento térmico. Por outro lado, as amostras LH apresentaram concentrações mais baixas de lactulose (variando de 9,68 a 19,65 mg 100

mL⁻¹), quando comparadas com suas respectivas amostras convencionais (REG M_i versus LH M_i, onde i = 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

É interessante notar que quando se analisa a concentração de lactulose em relação ao conteúdo de lactose do produto, temos que o teor de lactulose médio da matriz LH corresponde a aproximadamente 12 % do seu teor de lactose (13,03 mg 100 mL⁻¹ para 0,1070 g 100 mL⁻¹), enquanto na matriz REG, a lactulose representa 0,8 % do teor de lactose médio (35,59 mg L⁻¹ para 4,74 g 100 mL⁻¹). Messia et al. (2007) avaliaram 14 amostras comerciais de leite UHT LH quanto ao conteúdo de lactose, lactulose, glicose e galactose. Os autores encontraram um comportamento similar em três amostras com baixo teor de lactose (0,40, 0,30 e 0,30 g lactose 100 mL⁻¹ produto, respectivamente), cujas concentrações de lactulose eram de 40,1, 30,9 e 26,5 mg 100 mL⁻¹, respectivamente. Ou seja, percentuais de lactulose entre 8,8 e 10,3 % em relação ao teor de lactose. Os autores verificaram ainda elevados níveis de glicose e galactose nas amostras hidrolisadas, sendo um indicativo de que esses açúcares não haviam sido submetidos ao aquecimento e, portanto, não havendo degradação ou isomerização dos mesmos. Nesse contexto, os autores confirmaram que o processo de hidrólise enzimática foi realizado após o tratamento térmico e que o teor de lactulose identificado foi formado considerando a concentração regular de lactose, justificando o elevado % em relação ao teor de lactose do produto final. Ruiz-Matute et al. (2012) e Sakkas et al. (2014) também demonstraram baixos níveis de formação de lactulose em leites hidrolisados comparados a amostras de leites convencionais quando submetidos às mesmas condições de aquecimento, corroborando com os dados encontrados no presente trabalho.

Diante dos achados reportados na literatura e avaliando o perfil das amostras LH coletadas no presente trabalho, podemos destacar três fatores:

- a) elevado % de lactulose em relação ao teor de lactose do produto final encontrado nas amostras LH de todas as amostras selecionadas,
- b) ausência de mudanças significativas na coloração do produto final em comparação às amostras convencionais e,
- c) todas as amostras coletadas apresentavam a inclusão da enzima lactase na lista de ingredientes, conforme solicitação legal para os casos de produtos em que a enzima permanece ativa no produto final; ou seja, produtos hidrolisados pós-processamento térmico,

Esses fatores convergem quanto à adoção do processo de hidrólise asséptica pelas indústrias processadoras das marcas selecionadas.

Sabe-se que quando o produto é hidrolisado antes do tratamento térmico, a formação do isômero em quantidades apreciáveis é reduzida devido ao menor conteúdo de lactose disponível para isomerização por ação do calor. Por outro lado, caso a etapa de hidrólise ocorra após o aquecimento do leite, a lactulose formada também pode ser hidrolisada pela ação da β -galactosidase microbiana adicionada (MENDOZA; OLANO; VILLAMIEL, 2005; RUIZ-MATUTE et al., 2012). Dessa forma, em ambos os casos (hidrólise antes ou após o tratamento térmico) o uso da lactulose como indicador térmico torna-se inconclusivo, pois sua formação estará condicionada não apenas ao tempo e temperatura de exposição do produto ao calor, mas também ao nível de hidrólise da lactose alcançada e à atividade enzimática da β -galactosidase.

Quanto à quantificação da lactose nas amostras LH, podemos verificar uma concentração média de $0,1070 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ (Tabela 3.4), correspondendo a um nível de hidrólise de aproximadamente 97 %, assumindo um teor de $4,75 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ de lactose geralmente encontrada no leite de vaca. No Brasil, a ANVISA estabelece uma tolerância de $\pm 20 \%$ para o conteúdo dos ingredientes informados no rótulo do produto (BRASIL, 2003). Neste caso, entende-se que produtos lácteos classificados como “isentos de lactose” podem apresentar concentrações desse dissacarídeo variando de $0,08$ a $0,12 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$. Considerando o exposto, todas as marcas selecionadas estão de acordo com a classificação “isentos de lactose”. O CV médio de 8,5 % para o teor de lactose das marcas LH permite inferir sobre possíveis variações no processo de hidrólise, como atividade enzimática, temperatura e tempo de incubação; ou ainda, controle analítico ineficiente do processo. Tal hipótese é suportada pelo fato de que a lactose é o constituinte do leite de vaca que menos sofre modificações ao longo de todo período de lactação do animal (FOX; MCSWEENEY, 1998) e, portanto, a padronização dos fatores supracitados provavelmente resultaria em produtos com níveis de hidrólise similares. O teor médio de lactose encontrado para as amostras de leite UHT REG bem como o baixo CV encontrado ($4,74 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ e 1,5 %, respectivamente) confirmam o comportamento esperado desse dissacarídeo em leite convencional, evidenciando a baixa variabilidade do mesmo.

Os valores da inclinação, ou slope, (k) obtidos experimentalmente apresentaram desvios próximos a 5 % para ambos os isômeros considerando as matrizes REG e LH (Tabela 3.4). Além de enfatizar que o efeito da matriz aparentemente não influencia a sensibilidade do método, os baixos valores de CV de k indicam ainda um ganho de sensibilidade em comparação ao método usado no 2 ($CV_{\text{lactulose}} = 12,26$ e $CV_{\text{lactose}} = 8,33\%$ - conforme Tabela 2.4 p. 62).

3.3.4 Avaliação das Figuras de Mérito para o Método CZE-UV

Os valores obtidos para sensibilidade e precisão intralaboratorial dos isômeros encontram-se dispostos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Sensibilidade e precisão do método CZE-UV para determinação de lactose e lactulose em leite UHT convencional e hidrolisado^a

Figuras de mérito		Lactulose (mg 100 mL ⁻¹)	Lactose (g 100 mL ⁻¹)
Sensibilidade	LOD	2,81 (±0,63) ^b	0,007 (±0,001) ^c
	LOQ	9,36 (±2,11) ^b	0,024 (±0,004) ^c
Precisão ^d (matriz REG)	Repetitividade	19,65 (±0,22)	4,80 (±0,04)
	CV(%)	1,13	0,83
Precisão ^d (matriz LH)	Repetitividade	19,88 (±0,25)	0,111 (±0,004)
	CV (%)	2,56	3,60

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

^aDe acordo com o rótulo do produto, sendo REG: matriz convencional ou com teor regular de lactose, e LH: matriz com lactose hidrolisada. Desvio-padrão entre parênteses, sendo: ^bn = 30, ^cn = 18, ^dn = 6. CV é o coeficiente de variação.

Desvios relativos entre 3 e 4 % são considerados aceitáveis para analitos variando de 0,01 a 0,1 g 100 mL⁻¹ (AOAC INTERNATIONAL, 2002), faixa de ocorrência da lactulose (em ambas as matrizes REG e LH) e da lactose (na matriz LH). A precisão intralaboratorial da lactulose para as amostras REG e LH apresentou CV de 1,1% e 2,6%, respectivamente, enquanto o método exibiu um CV de 3,6 % para a lactose durante o ensaio de precisão considerando seis réplicas autênticas da amostra LH. Para analitos com concentrações acima de 1 g 100 mL⁻¹ no produto final, como é o caso da lactose em matriz REG, a AOAC prevê uma variação máxima entre 1,5 e 2,0 % para uma precisão aceitável (AOAC, 2002), obtendo-se CV = 0,83 % para o teor de lactose da matriz REG. Nesse caso, podemos inferir que a precisão do método encontra-se em níveis aceitáveis para os isômeros avaliados.

Considerando a faixa sugerida pela IDF de 10 a 60 mg 100 mL⁻¹ para o teor de lactulose em leite UHT, e o teor máximo de lactose de 0,1 g 100 mL⁻¹ para produtos classificados como isentos desse carboidrato, conforme a ANVISA (BRASIL, 2017); pode-se afirmar que os LOQ obtidos são satisfatórios para análise desses compostos em amostras de leite UHT REG e LH utilizando-se o método CZE-UV, visto que os valores obtidos (LOQ de 9,36 mg 100 mL⁻¹ para lactulose e de 0,024 g 100 mL⁻¹ para lactose) encontram-se abaixo dos limites a serem controlados. Além disso, analisando os limites de detecção dos métodos oficiais propostos pela IDF para quantificação de lactulose em leite, temos um LOD aproximado de 1,0 mg 100 mL⁻¹ para o método enzimático (DE BLOCK et al., 1996;

PEREDA et al., 2009), e de 4,0 mg 100 mL⁻¹ para o método por HPLC-RID (ELLIOTT et al., 2003). Considerando a necessidade de se ter um método para rotina, o longo tempo de execução do método enzimático o torna inviável apesar de seu baixo LOD. Por outro lado, obteve-se um LOD de 2,8 mg 100 mL⁻¹ para o método CZE-UV, sendo este menor que limite reportado para o método cromatográfico oficial, caracterizando-se como mais um ganho analítico para o método proposto frente ao método oficial por separação cromatográfica, além daqueles já discutidos no comparativo descrito no subitem 3.3.2.1 (p. 77).

Os níveis de recuperação do método CZE-UV encontram-se dispostos na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Índices de recuperação do método CZE-UV utilizado para determinação de lactose e lactulose em leite UHT

Lactulose*		Lactose**	
Nível de Fortificação (mg 100 mL ⁻¹)	% Recuperação ^a	Nível de Fortificação (g 100 mL ⁻¹)	% Recuperação ^a
60	86,25 (±1,25)	0,10	102,08 (±11,81)
90	101,04 (±1,91)	0,15	96,25 (±4,88)
120	98,54 (±4,03)	0,20	101,15 (±0,79)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

*teste realizado em matriz láctea com teor regular de lactose; ** teste realizado em matriz láctea com teor reduzido de lactose. ^a desvio-padrão entre parênteses, sendo n = 4.

De acordo com o guia para validação de métodos analíticos da AOAC International (2002), níveis de recuperação de 85 a 108 % são esperados para analitos em concentrações de 0,01 a 0,1 g 100 mL⁻¹, como é o caso da lactulose em matriz REG e da lactose em matriz LH. Podemos observar que o método proposto está em conformidade com os limites sugeridos para recuperação, com faixas de 86 a 101 % para a lactulose e de 96 a 102 % para seu isômero, lactose.

3.4 CONCLUSÃO

Foi possível quantificar os isômeros lactose e lactulose em leite convencional e hidrolisado utilizando o método CZE-UV otimizado. O ajuste dos parâmetros instrumentais e a otimização do processo de extração da amostra foram essenciais para adequação do método a ambas as matrizes REG e LH e para o aumento da frequência analítica. O fato do LOD e LOQ obtidos estarem abaixo dos limites críticos estabelecidos, ou sugeridos, corrobora para a aplicabilidade do método na determinação dos isômeros tanto em matriz convencional quanto em matriz hidrolisada. Uma efetiva melhora da sensibilidade do método, verificada através da redução da variabilidade de *k* para lactulose e lactose, além de uma precisão analítica

adequada para determinação da lactose, foram obtidas em comparação ao método utilizado na Seção 2.

Diante dos resultados obtidos nessa etapa do trabalho, podemos concluir que o método CZE-UV pode ser usado como ferramenta para obtenção de informações sobre a intensidade do processamento térmico aplicado ao leite convencional, através da determinação de lactulose; e para verificação do conteúdo de lactose, auxiliando na caracterização e classificação do produto de acordo com o conteúdo desse dissacarídeo. Dessa forma, o método apresenta aplicação tanto para a indústria, para o controle interno e maior padronização de produtos e processos; quanto para órgãos reguladores e fiscalizadores, os quais podem aplicá-lo na investigação do cumprimento das normas legais pré-estabelecidas.

3.5 PUBLICAÇÕES

DE OLIVEIRA NEVES, L. N.; LEAL DE OLIVEIRA, M. A. Quantification of lactose and lactulose in hydrolysed-lactose UHT milk using capillary zone electrophoresis. **International Dairy Journal**, v. 106, p. 104710, 2020.

4 INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE NOS INDICADORES TÉRMICOS UTILIZADOS PARA CONTROLE DE LEITE UHT

Nesta seção abordaremos o estudo da influência do processo de hidrólise da lactose, e consequentemente da diferente composição de carboidratos presentes no meio, nos indicadores térmicos HMF, WPNI e lactulose.

4.1 INTRODUÇÃO

As modificações físicas e químicas decorrentes do tratamento térmico podem ser intensificadas em produtos lácteos hidrolisados, devido à presença de carboidratos mais reativos em sua composição (MESSIA; CANDIGLIOTA; MARCONI, 2007). Assim sendo, o comportamento de alguns indicadores térmicos também pode ser influenciado por essa mudança na composição de carboidratos em decorrência do processo de hidrólise da lactose.

Considerando a importância de parâmetros eficazes para monitoramento da intensidade do tratamento térmico adotado em produtos lácteos, esta etapa teve como objetivo quantificar os índices de HMF total e WPNI, empregando-se os métodos clássicos comumente utilizados pelas indústrias, e o teor de lactulose, por CZE-UV, em leite UHT com teor regular e reduzido de lactose na tentativa de estimar a influência da etapa de hidrólise da lactose na ocorrência desses indicadores.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

Todos os reagentes, amostras e instrumental utilizados, assim como as análises estatísticas realizadas encontram-se descritos nesta subseção.

Para que a comparação entre as amostras REG e LH fosse possível neste trabalho, considerou-se o fato das empresas processadoras geralmente utilizarem o mesmo trocador de calor para processamento UHT de produtos convencionais e hidrolisados e, portanto, consideramos que as condições de aquecimento fornecidas por cada marca M_x para seus produtos REG e LH são semelhantes.

4.2.1 Reagentes e Amostras

Para a determinação do índice de WPNI, os reagentes cloreto de sódio e ácido clorídrico foram adquiridos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para

construção da modelagem estatística de predição, padrões de leite em pó submetidos a alto aquecimento e baixo aquecimento foram obtidos do *American Dairy Products Institute - ADPI* (Elmhurst, IL, USA).

Para a determinação do índice de HMF total, os reagentes TBA e ácido oxálico foram obtidos da Merck (Darmstadt, HE, Alemanha). O padrão de HMF usado na construção do modelo de predição foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O TCA utilizado na precipitação proteica foi comprado na vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todas as soluções de padrões e eventuais diluições foram preparadas com água deionizada obtida por sistema de osmose reversa (Millipore, Bedford, MA, EUA).

As amostras comerciais de leite UHT REG e LH, utilizadas nos ensaios da Seção 3, foram analisadas quanto ao índice de HMF e WPNI, em duplicatas autênticas.

4.2.2 Instrumental

As determinações dos índices de HMF e WPNI utilizando os métodos clássicos foram conduzidas em espectrofotômetro UV/Visível (ThermoScientific® Evolution 60S, Vantaa, Finlândia) monofeixe de largura de banda espectral de 1 nm, equipado com lâmpada xenônio e detector de fotodiodos.

4.2.3 Metodologias Analíticas

O índice de HMF foi determinado baseando-se na metodologia espectrofotométrica originalmente proposta por Keeney e Bassette (1958) enquanto o índice WPNI foi quantificado por método turbidimétrico inicialmente proposto por Kuramoto et al. (1958).

4.2.3.1 Avaliação dos modelos estatísticos

Ambos os métodos foram avaliados quanto à sua aplicação em matriz láctea em estudo prévio proposto por Neves, Silva e de Oliveira (2016) cujos modelos construídos para quantificação do índice de HMF e WPNI contavam com 7 níveis (1, 3, 6, 9, 12, 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), e 6 níveis (7,86, 6,41, 4,97,3,52, 2,08 e 0,63 mg WPN mL^{-1}), respectivamente. Por se tratar das mesmas condições instrumentais e reacionais de análise do referido estudo, dois níveis de cada modelo estatístico foram selecionados de forma aleatória e reavaliados em triplicatas autênticas, de modo a verificar o desempenho dos modelos e garantir a confiabilidade dos resultados quantitativos obtidos. Nesse caso, selecionou-se os níveis 3 (6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 5 (12 $\mu\text{mol L}^{-1}$) do modelo para índice de HMF, cujas soluções aquosas de HMF

nas referidas concentrações foram elaboradas e submetidas ao procedimento analítico com leitura da absorvância final em 443 nm. Já o índice de WPNI teve os níveis 2 e 5 selecionados, referindo-se aos teores de 6,41 e 2,08 mg WPN mL⁻¹, respectivamente. As soluções foram preparadas utilizando-se uma combinação de soluções de leite em pó padrão ADPI de alto e baixo aquecimento (NEVES; SILVA; DE OLIVEIRA, 2016), e posteriormente foram submetidas ao procedimento analítico previsto, com leitura da transmitância em 420 nm.

4.2.3.2 Quantificação dos indicadores

Como as amostras comerciais foram coletadas aleatoriamente, optou-se por quantificar apenas o índice de HMF total, o qual permite estimar o potencial total de formação desse indicador. Para sua determinação, adicionou-se ácido oxálico 0,3 mol L⁻¹ em todas as amostras de leite submetendo-as imediatamente à fervura em banho termostático por 1 h, seguido por precipitação proteica com TCA 40 % m/v. O sobrenadante foi coletado após centrifugação a 10.786 g por 10 min. Considerando que as amostras LH são mais susceptíveis à ocorrência da reação de Maillard devido à presença de carboidratos mais reativos em sua composição, concentrações de HMF mais elevadas nessa matriz são esperadas, quando comparada à matriz REG. Portanto, objetivando utilizar o mesmo modelo estatístico de predição para HMF em ambas as matrizes lácteas, as amostras LH foram submetidas à etapa de diluição com água deionizada na razão 1:5 (sobrenadante – volume final), fornecendo FD igual a 5. Os sobrenadantes das amostras REG não foram diluídos. Todos os sobrenadantes foram então submetidos à reação colorimétrica com TBA a 40 °C por 30 min e posterior leitura da absorvância em 443 nm.

Para determinação do índice de WPNI, todas as amostras foram submetidas à precipitação em meio salino (*salting-out*) e aquecimento a 37 °C durante 30 min, seguido por filtragem qualitativa e adição de solução salina saturada acidificada, com posterior leitura da transmitância em 420 nm.

Por ser um indicador térmico, a lactulose determinada por CZE-UV na Seção 3 deste trabalho foi utilizada para discussão desta etapa do projeto.

4.2.4 Análises Estatísticas

Os pressupostos estatísticos de normalidade, homocedasticidade, falta de ajuste e significância da regressão para os modelos de WPNI e HMF foram avaliados mediante uso do

software Microsoft Excel® 14.0 ver. (Microsoft Office, 2010), assim como a estatística descritiva e os testes comparativos.

O efeito que a hidrólise enzimática da lactose exerce na formação dos indicadores térmicos avaliados foi estimado mediante o teste de hipótese descrito abaixo:

$$H_0: [\text{Indicador}]_{\text{REG}} = [\text{Indicador}]_{\text{LH}}$$

$$H_a: [\text{Indicador}]_{\text{REG}} \neq [\text{Indicador}]_{\text{LH}}$$

Onde: [Indicador] é o teor ou índice do indicador térmico (HMF total, WPNI ou lactulose).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados quantitativos e testes estatísticos utilizados para avaliação dos indicadores térmicos HMF, WPNI e lactulose encontram-se dispostos nesta subseção.

4.3.1 Avaliação dos Modelos Estatísticos para os Indicadores HMF e WPNI

Os dados coletados quanto à absorvância dos níveis 3 e 5 do modelo de HMF e quanto à transmitância dos níveis 2 e 5 para o modelo de WPNI foram inseridos nos grupos de dados originalmente obtidos por Neves, Silva e de Oliveira (2016). Esses dois novos conjuntos de dados foram avaliados quanto aos pressupostos estatísticos de normalidade, homocedasticidade, falta de ajuste e significância de regressão.

O modelo original para índice de HMF contendo 7 níveis (no intervalo de 1 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi modificado após reavaliação dos níveis 3 e 5 pois, com a inserção desses novos dados o sistema apresentou falta de ajuste. Nesse caso, optou-se por excluir o nível 1 (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) uma vez que essa concentração dificilmente estaria presente nas amostras a serem avaliadas, podendo ser desconsiderada. Dessa forma, os pressupostos reavaliados, e expressos na Tabela 4.1, consideram os novos dados obtidos para os níveis 3 e 5 e a exclusão do nível 1, totalizando 6 níveis (3 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 18 observações.

Quanto ao modelo para o índice WPNI, os 6 níveis e 18 observações (variando de 7,86 a 0,63 mg WPN mL^{-1}) foram mantidos.

Tabela 4.1 – Parâmetros e pressupostos estatísticos dos modelos propostos para o índice de nitrogênio de soroproteína não desnaturada (WPNI) e 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF)

Parâmetro	WPNI ^a (mg WPN mL ⁻¹)	HMF ^b (μ mol L ⁻¹)
Slope	-4,41 (\pm 0,23)	0,00996 (\pm 0,0001)
Intercepto	93,92 (\pm 1,17)	0,00091 (\pm 0,0018)
FAJ ^c	0,30 (3,26)*	0,77 (3,26)*
SIG ^d	343 (4,49)*	4138 (4,49)*
R ² ajustado	0,95	0,99

Fonte: Adaptado de Neves e Oliveira (2020) (número da licença: 4893290983115).

Normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk): ^a p = 0,063; ^b p = 0,915. Homocedasticidade (teste de Cochran): ^aC_{calculado} = 0,11; ^bC_{calculado} = 0,21; C_{crítico} = 0,62. *valores críticos entre parênteses para: ^cFAJ (falta de ajuste): F_{crítico} (v₁=4, v₂=12); ^dSIG (significância): F_{crítico} (v₁=1, v₂=16). Sendo v₁: grau de liberdade do numerador (FAJ: m-p; SIG: p-1) e v₂: grau de liberdade do denominador (FAJ: n-m; SIG: n-p), onde p: número de parâmetros, m: número de níveis, n: número de observações. Intervalo de 95% de confiança.

A independência dos dados foi atendida com a execução aleatória das leituras (mediante sorteio casualizado) de todas as réplicas autênticas para ambos os modelos propostos. Os dois modelos apresentaram perfil normal e homocedástico na faixa de trabalho selecionada (p-valor > 0,05 e C_{calculado} < C_{crítico}, respectivamente). Além disso, verificou-se a inexistência de falta de ajuste dos modelos (F_{calculado} < F_{crítico}) e a elevada significância das regressões (F_{calculado} > F_{crítico}), possibilitando concluir que os modelos apresentam um grau significativo de predição dentro da faixa estabelecida.

4.3.2 Quantificação dos Indicadores de Tratamento Térmico

Os dados quantitativos para os marcadores térmicos de todas as amostras de leite UHT são reportados na Tabela 4.2.

A aplicabilidade da estatística paramétrica para comparação dos dados foi atestada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk (n = 6, α = 0,05) para as diferenças dos pares a serem comparados. Neste caso, as diferenças testadas apresentaram comportamento normal para todos os indicadores avaliados (p-valor = 0,509, 0,078 e 0,358 para HMF total, WPNI e lactulose, respectivamente). Dessa forma, o teste t pareado foi utilizado para comparação dos indicadores com os valores de t calculados também dispostos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultado quantitativo para os indicadores térmicos avaliados em leite UHT convencional e hidrolisado

Marca	Matriz ^a	Indicadores térmicos					
		HMF Total ^b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		WPNI ^b (mg WPN mL^{-1})		Lactulose ^c (mg 100 mL^{-1})	
		Média ($\pm\text{ic}$)	CV ⁺ (%)	Média ($\pm\text{ic}$)	CV ⁺ (%)	Média ($\pm\text{sd}$)	CV ⁺ (%)
M_1	REG	11,85($\pm 0,49$)	82,1	4,28($\pm 0,75$)	9,8	34,12($\pm 0,63$)	n.q.
	LH	44,68($\pm 1,22$)		4,92($\pm 0,75$)		n.q.	
M_2	REG	17,98($\pm 0,55$)	78,1	2,59($\pm 0,75$)	73,4	20,13($\pm 0,01$)	49,6
	LH	62,34($\pm 1,77$)		0,82($\pm 0,75$)		9,68($\pm 0,04$)	
M_3	REG	13,56($\pm 0,50$)	57,7	1,75($\pm 0,77$)	9,0	55,72($\pm 3,10$)	90,1
	LH	32,23($\pm 0,86$)		1,99($\pm 0,84$)		12,36($\pm 0,80$)	
M_4	REG	12,61($\pm 0,50$)	85,0	3,13($\pm 0,76$)	2,8	36,44($\pm 0,16$)	42,3
	LH	50,60($\pm 1,40$)		3,26($\pm 0,75$)		19,65($\pm 0,22$)	
M_5	REG	9,24($\pm 0,49$)	78,6	3,55($\pm 0,79$)	1,1	19,42($\pm 0,13$)	n.q.
	LH	32,38($\pm 0,86$)		3,61($\pm 0,79$)		n.q.	
M_6	REG	13,41($\pm 0,50$)	55,4	2,57($\pm 0,77$)	7,6	47,73($\pm 0,97$)	90,7
	LH	30,67($\pm 0,82$)		2,31($\pm 0,78$)		10,42($\pm 0,21$)	
N = 12 ^d	REG	13,11($\pm 2,86$)	74,3	2,98($\pm 0,88$)	4,0	35,59($\pm 14,53$)	65,6
	LH	42,15($\pm 12,74$)		2,82($\pm 1,43$)		13,03($\pm 4,56$)	
Efeito de matriz ^e		6,44*		0,47*		3,41**	

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

^a De acordo com o rótulo do produto, sendo REG: matriz convencional ou com teor regular de lactose, e LH: matriz com lactose hidrolisada. ^b intervalo de confiança calculado através dos parâmetros dos modelos. ^c desvio-padrão entre parênteses para duplicatas autênticas ($n = 2$). ^d valor médio considerando todas as observações de cada matriz ($N = 12$). ^e teste t pareado sendo: $*t_{\text{crítico}} (n = 6, \alpha = 0,05) = 2,57$, $**t_{\text{crítico}} (n = 4, \alpha = 0,05) = 3,18$. CV⁺: coeficiente de variação intramarca, considerando os teores nas amostras REG e LH de uma mesma marca. n.q.: não quantificado (abaixo do limite de quantificação).

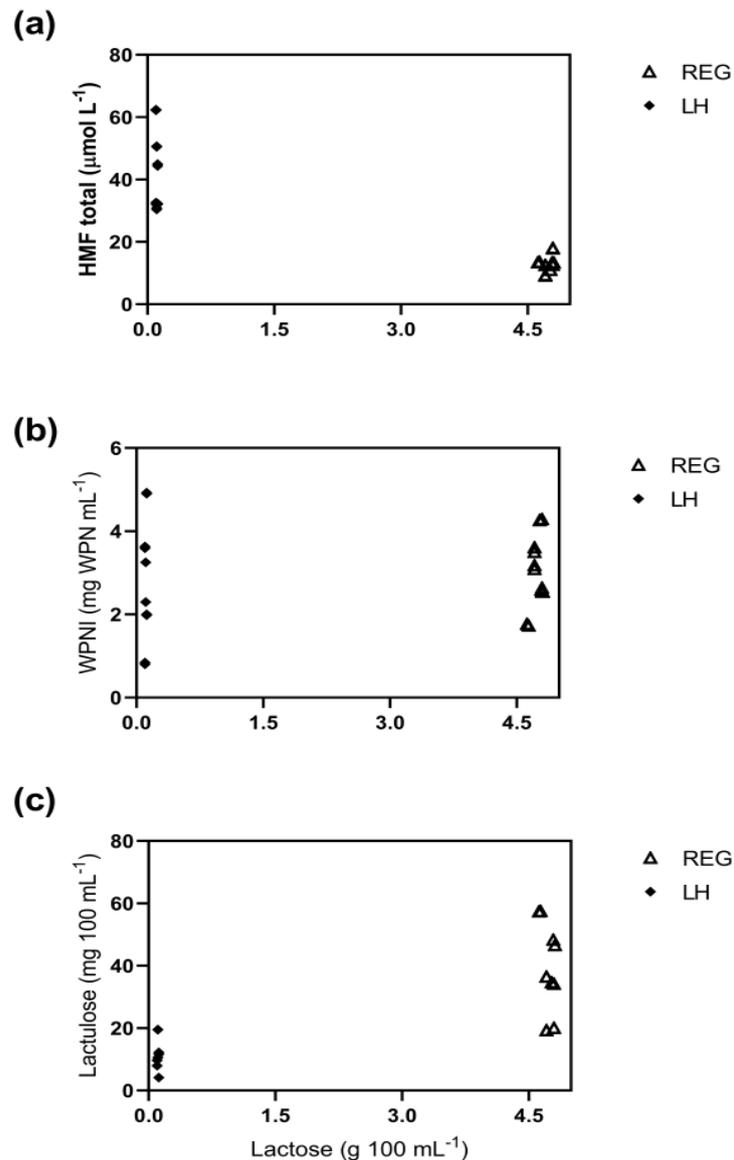
Adicionalmente, gráficos de dispersão foram construídos para melhor visualização da relação entre os marcadores térmicos e o teor de lactose no leite (Figura 4.1).

4.3.2.1 Índice de HMF

Os termos "potencial de HMF" e "índice de HMF" são amplamente utilizados na literatura quando a quantificação desse indicador se dá pelo uso de métodos espectrofotométricos, os quais apresentam menor especificidade e sensibilidade comparadas aos métodos cromatográficos, resultando geralmente em uma superestimação do teor real de HMF (MORALES, 2008). Em estudo proposto por Morales, Romero e Jimenez-Perez (1996), amostras de leite submetidas aos processamentos de pasteurização, UHT e esterilização apresentaram valores de 2,1, 8,1 e 17,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente pelo método espectrofotométrico, enquanto valores de 1,1, 5,2 e 12,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram encontrados quando o método por HPLC foi utilizado. Neste referido estudo, embora os autores tenham demonstrado a ocorrência de superestimação do índice de HMF pelo método

espectrofotométrico, foi possível diferenciar os diferentes tipos de tratamento térmico empregando-se ambos os métodos avaliados, assim como evidenciar experimentalmente o efeito da intensidade do tratamento térmico na formação de HMF.

Figura 4.1 – Representação gráfica da distribuição das amostras de leite UHT com teor regular de lactose (REG) e lactose hidrolisada (LH) considerando o teor de lactose quantificado e os marcadores térmicos: (a) índice de HMF total, (b) índice de WPNI e (c) teor de lactulose



Fonte: Adaptado de Neves e de Oliveira (2020) (número da licença: 4893290983115).

Quanto aos índices de HMF encontrados na literatura, Ferrer et al. (2000), utilizando HPLC-UV, verificaram valores de 4,71 e 25,20 μmol L⁻¹ para leites UHT convencional e com

baixo teor de lactose, respectivamente, correspondendo a uma variabilidade de aproximadamente 90 % desse indicador ao comparar tais matrizes. Variações superiores a 80 %, comparando amostras de leite UHT convencional e hidrolisado também foram reportadas por Neves et al. (2016) empregando o método espectrofotométrico com TBA.

No presente trabalho, uma faixa de variação de 55 a 85 % (com uma média de 74 %) no índice de HMF total foi observada mediante cálculo do CV intramarca (CV^+), conforme disposto na Tabela 4.2 (p. 95), o qual considera o teor do indicador na matriz REG e na matriz LH. Quanto ao teste t pareado, podemos concluir que o índice de HMF total das amostras de matriz REG difere do índice exibido pelas amostras LH ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ - Tabela 4.2). Ao considerar a representação gráfica dos valores de HMF total em relação ao conteúdo de lactose exibida na Figura 4.1, observamos a formação de dois grupos. O primeiro, caracterizado por amostras rotuladas como “sem lactose” ou similar cujos índices de HMF apresentaram-se acima de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e concentrações de lactose próximas a $0,1 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$. Enquanto o segundo grupo é composto por amostras com valores de HMF abaixo de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e conteúdo regular de lactose ($4,5 - 5,0 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$). Esses resultados estão em consonância com dados reportados na literatura, indicando que leites hidrolisados são mais susceptíveis às modificações físicas e químicas durante o processamento térmico e armazenamento quando comparados aos leites convencionais expostos às mesmas condições.

A extensão da reação de Maillard está relacionada não somente ao tempo e temperatura de exposição do produto ao calor, mas também à disponibilidade e nível de reatividade do substrato ali presente (O'BRIEN, 2009; SALTMARCH; LABUZA, 1982; SIKORSKI; POKORNY; DAMODARAN, 2008). Produtos lácteos hidrolisados podem apresentar diferentes teores dos carboidratos lactose, glicose e galactose em sua composição de acordo com o nível de hidrólise alcançado durante o processamento enzimático. As alterações físicas e químicas serão mais intensas caso o processo de hidrólise ocorra antes do tratamento térmico. Em produtos hidrolisados após aquecimento, a intensificação das modificações decorrentes da reação de Maillard dependerá principalmente das condições de estocagem, transporte e comercialização de tais produtos. Além disso, pesquisadores indicaram uma maior redução dos níveis de lisina disponível em produtos lácteos hidrolisados, quando comparados aos produtos com teor regular de lactose (BURVALL et al., 1977, 1978). Por esse motivo, alguns autores sugerem que a hidrólise enzimática da lactose seja realizada após o tratamento térmico do produto, reduzindo danos nutricionais e modificações físicas indesejáveis de cor e aroma no produto final (MENDOZA; OLANO; VILLAMIEL, 2005; MESSIA; CANDIGLIOTA; MARCONI, 2007).

O índice de HMF total para leite UHT convencional tende a apresentar valores abaixo de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$, podendo variar de 3,46 a $28,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ detectados por diferentes metodologias (ELLIOTT et al., 2003; FERRER et al., 2000; MORALES; JIMÉNEZ-PÉREZ, 1999; MORALES; ROMERO; JIMÉNEZ-PÉREZ, 2000; MORALES; ROMERO; JIMENEZ-PEREZ, 1996; NEVES; SILVA; DE OLIVEIRA, 2016). Portanto, é possível sugerir o uso desse indicador como um classificador de matriz láctea (REG ou LH). No entanto, quando se trata da avaliação de produtos já nas gôndolas dos supermercados, como é de prática em ações de órgãos fiscalizadores, esse composto não é o mais indicado para inferir sobre a severidade do tratamento térmico visto que as condições de estocagem, transporte e comercialização, e ainda o grau de hidrólise da lactose (no caso de leites LH), também influenciam sua formação.

Alternativamente, o HMF pode ser aplicado pelas indústrias processadoras como uma ferramenta de controle interno para predição de danos físicos em leites convencionais e hidrolisados, permitindo definir com maior segurança as condições mais adequadas quanto à temperatura de transporte, armazenamento e, principalmente, período de comercialização daquele produto. Por exemplo, produtos com elevados índices de HMF total podem ser destinados para rotas de distribuição e comercialização que apresentem temperaturas mais amenas ou de mais fácil controle, ou ainda, terem seu período de comercialização reduzido a fim de minimizar problemas relacionados às alterações físicas que inviabilizam o consumo do mesmo.

4.3.2.2 Índice de WPNI

De acordo com a classificação ADPI e considerando o teor médio geral exibido pelas matrizes REG e LH ($2,98$ e $2,82 \text{ mg WPN mL}^{-1}$, respectivamente, conforme Tabela 4.2 – p. 95), as amostras podem ser classificadas como “médio tratamento térmico” ($1,51 - 5,99 \text{ mg WPN mL}^{-1}$) (ADPI, 2009). Sabe-se que a baixa taxa de desnaturação de soroproteínas na superfície das micelas de caseína facilita a aglomeração das micelas ao longo do período de estocagem (GAUR; SCHALK; ANEMA, 2018) podendo acelerar o processo de sedimentação. Nesse sentido, o monitoramento do índice de WPNI pode auxiliar na estimativa da estabilidade proteica do produto final, a qual está diretamente associada ao desenvolvimento de problemas de sedimentação ao longo do seu período de comercialização. Portanto, supõe-se que índices médios de WPNI variando de $1,51$ a $5,99 \text{ mg WPN mL}^{-1}$ tendem a beneficiar a estabilidade de produtos de longa estocagem, como é o caso do leite UHT.

Baixos valores de WPNI ($< 1,51 \text{ mg WPN mL}^{-1}$) indicam alto grau de desestabilização proteica causada pela superexposição do produto ao aquecimento e recebem a classificação “alto aquecimento” (ADPI, 2009; SILVA, 2004). Apenas a amostra LH da M_2 recebeu tal classificação, exibindo um índice médio de $0,82 \text{ mg WPN mL}^{-1}$, indicando a ocorrência de um possível aquecimento adicional ao tratamento térmico UHT. Tal hipótese pode ser suportada ainda pelo fato da mesma amostra (LH M_2) apresentar o maior índice de HMF total ($62,34 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) dentre todas as amostras avaliadas, o que de fato sugere a possibilidade de superaquecimento.

Embora o índice de HMF total não seja o indicador térmico mais adequado para a avaliação da intensidade do tratamento térmico em matrizes LH, conforme discutido anteriormente, uma análise comparativa de diferentes marcadores se torna interessante visto que envolvem diferentes compostos que sofrem modificações mediante a ação do calor. Assim, um comportamento similar exibido por indicadores térmicos distintos de uma mesma amostra pode facilitar o diagnóstico sobre as condições de aquecimento a mesma (MORTIER et al., 2000).

O comportamento do índice de WPNI em relação ao teor de lactose, considerando as duplicatas das 12 amostras de leite UHT analisadas pode ser visualizado na Figura 4.1 (p. 96) (gráfico b). Verifica-se que tanto as amostras LH quanto as amostras REG dispersaram-se em uma faixa semelhante de WPNI. Conforme os resultados obtidos via teste t pareado ($t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ - Tabela 4.2), não há diferenças significativas entre os índices de WPNI das amostras convencionais e hidrolisadas. Destaca-se ainda o baixo valor de CV^+ médio (4 %), comparado aos demais indicadores avaliados. Portanto, de acordo com nossos resultados, podemos supor que o índice WPNI não é influenciado pelo teor de lactose presente no meio, e consequentemente, pelo processo de hidrólise da lactose.

É notório que tal comportamento inviabiliza o uso do índice de WPNI como ferramenta classificatória quanto ao tipo de matriz do produto (REG ou LH) já que ambas as matrizes apresentam índices de WPNI semelhantes. Por outro lado, o fato de não sofrer interferências diretas da concentração de lactose presente no meio, o índice de WPNI pode ser utilizado como uma valiosa ferramenta para inferências sobre a severidade do tratamento térmico de leite UHT com teor reduzido de lactose.

4.3.2.3 Lactulose

O teor de lactulose formado no leite relaciona-se não somente à temperatura e tempo de exposição do produto ao calor, mas também à quantidade de lactose disponível para a

reação de isomerização (RUIZ-MATUTE et al., 2012), justificando a alta variabilidade intramarca (42 a 91 %) observada na Tabela 4.2 (p. 95). Além disso, a capacidade que a β -galactosidase microbiana apresenta em hidrolisar ambos os dissacarídeos (lactose e lactulose) e variações decorrentes do processo hidrolítico como, por exemplo, concentração de enzima, tempo e temperatura de incubação e método de controle utilizado também corroboram para obtenção de um CV⁺ médio de 65 % do teor desse indicador. Portanto, supõe-se que o limiar clássico de lactulose indicado para leite UHT convencional não seja apropriado para os produtos hidrolisados submetidos ao mesmo processamento térmico. De acordo com o resultado obtido pelo teste t pareado, os níveis de lactulose das amostras de UHT REG e LH diferem estatisticamente entre si ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$), estando em consonância com os elevados valores de CV⁺ e alerta sobre a influência do processo de hidrólise da lactose na ocorrência do seu isômero.

A formação de um aglomerado representado pelas amostras LH, em níveis de lactulose abaixo de 20 mg 100 mL⁻¹, é observada na representação gráfica disposta na Figura 4.1 (p. 96 – gráfico c), enquanto teores mais elevados e mais dispersos desse indicador são exibidos pelas amostras REG. A princípio, este comportamento nos faz inferir sobre a possibilidade da lactulose ser utilizada como um agente classificador do tipo de matriz. No entanto, sabe-se que tanto leites hidrolisados quanto convencionais podem apresentar baixos níveis de lactulose (aproximadamente 10,0 mg 100 mL⁻¹) se forem submetidos a um processamento UHT brando como, por exemplo, em sistemas por infusão (ELLIOTT et al., 2005). Portanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de verificar o uso da lactulose como um classificador de matriz e como indicador térmico de leite hidrolisado.

4.4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados do presente estudo, foi possível identificar algumas peculiaridades do comportamento dos indicadores HMF total, WPNI e lactulose, considerando leites UHT convencional e hidrolisado. Verificou-se que os indicadores índice de HMF total e lactulose são influenciados pelo processo de hidrólise enzimática; porém, o índice de HMF pode ser utilizado como classificador de matriz láctea embora as condições de armazenamento devam ser consideradas. Quanto ao comportamento da lactulose, aparentemente esse isômero da lactose não é o mais adequado para avaliação do tratamento térmico em leite hidrolisado, embora seja um dos compostos mais indicados pela IDF para avaliação da severidade do tratamento térmico em matriz láctea.

Em contrapartida, o índice de WPNI, até então empregado para avaliação do tratamento térmico de lácteos desidratados, pode ser considerado o composto mais acertado dentre os avaliados para ser aplicado como indicador térmico em leite UHT hidrolisado.

4.5 PUBLICAÇÕES

NEVES, L. N. DE O.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Effects of enzymatic lactose hydrolysis on thermal markers in lactose-free UHT milk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 9, p. 3518–3524, 2020b.

5 MONITORAMENTO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE LEITES “ZERO LACTOSE” – UM COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS POR CRIOSCOPIA E CZE-UV

Nesta seção iremos abordar o estudo comparativo entre os métodos tradicional (crioscópico) e proposto (eletroforético) no monitoramento do processo de hidrólise enzimática.

5.1 INTRODUÇÃO

O processo de hidrólise enzimática da lactose é amplamente utilizado no setor lácteo não somente para suprir à demanda de uma parcela da população acometida pela hipolactasia em seus diferentes níveis, mas também para auxiliar na redução de problemas tecnológicos como cristalização em doces de leite e sorvetes, e na aceleração de processos bioquímicos relacionados à maturação de queijos duros (ANDRADE; BRANDÃO; ALVIM, 2004; KIM; LIM; KIM, 1997; MATTAR; MAZO, 2010).

Atualmente, o controle do processo de hidrólise utilizado na produção de leite UHT destinado a dietas com restrição de lactose é realizado de forma indireta por método crioscópico, baseando-se na determinação do ponto de congelamento do leite. Concomitante à expansão e a regulação dessa nova classe de produtos lácteos tem-se a necessidade de controlar de forma adequada e eficiente o processo de hidrólise da lactose visando garantir o cumprimento dos limites legais estabelecidos quanto ao residual desse dissacarídeo.

O estudo comparativo entre os métodos crioscópico e CZE-UV (otimizado na Seção 3) objetivou avaliar o desempenho desses métodos quanto ao monitoramento de dois principais processos industriais de hidrólise enzimática: asséptica (pós-tratamento térmico) e por batelada (pré-tratamento térmico), ambos simulados em escala laboratorial.

5.2 PARTE EXPERIMENTAL

Os reagentes, amostras e instrumental utilizados, assim como os processos de hidrólise enzimática simulados em escala laboratorial e testes estatísticos realizados encontram-se descritos nos subitens a seguir.

5.2.1 Reagentes e Amostras

A enzima utilizada foi a β -galactosidase derivada da levedura *K. lactis*, fornecida pela empresa Globalfood (São Paulo, SP, Brasil) comercialmente conhecida como Maxilact® L-5000 (Gist-Brocades, Holanda), com concentração de 5000 NLU g⁻¹ (cada grama do produto contém 5000 unidades de lactase neutra (NLU do inglês, *Neutral Lactase Units*). A enzima foi armazenada sob refrigeração a 4 °C, conforme recomendação do fornecedor. Soluções de calibração de cloreto de sódio a 0,8646 % m/v (-0,530 °H) e a 1,0155 % m/v (-0,621 °H), adquiridas da Tex Tech Brasil (Cataguases, MG, Brasil), e água deionizada (0,000 °H) foram utilizadas para calibração do crioscópio eletrônico. Os reagentes usados para o método CZE-UV estão descritos no subitem 3.2.1 (p. 66) da Seção 3. Os ensaios simulando os processos de hidrólise foram executados utilizando uma amostra comercial de leite UHT desnatado convencional (com teor regular de lactose) coletada de forma aleatória no mercado regional.

5.2.2 Instrumental e Metodologias

A determinação do ponto de congelamento das amostras ao longo do experimento contou com o uso de um crioscópio eletrônico digital microprocessado de bancada, modelo MK 540, da ITR Ltda (Esteio, RS, Brasil). A metodologia utilizada baseou-se no método oficial disposto na Instrução Normativa N° 30 (BRASIL, 2018b), cujo procedimento indica a calibração prévia do crioscópio eletrônico com as soluções salinas seguido de medição da amostra em pelo menos triplicatas autênticas, empregando-se uma alíquota de 2,5 mL para cada réplica.

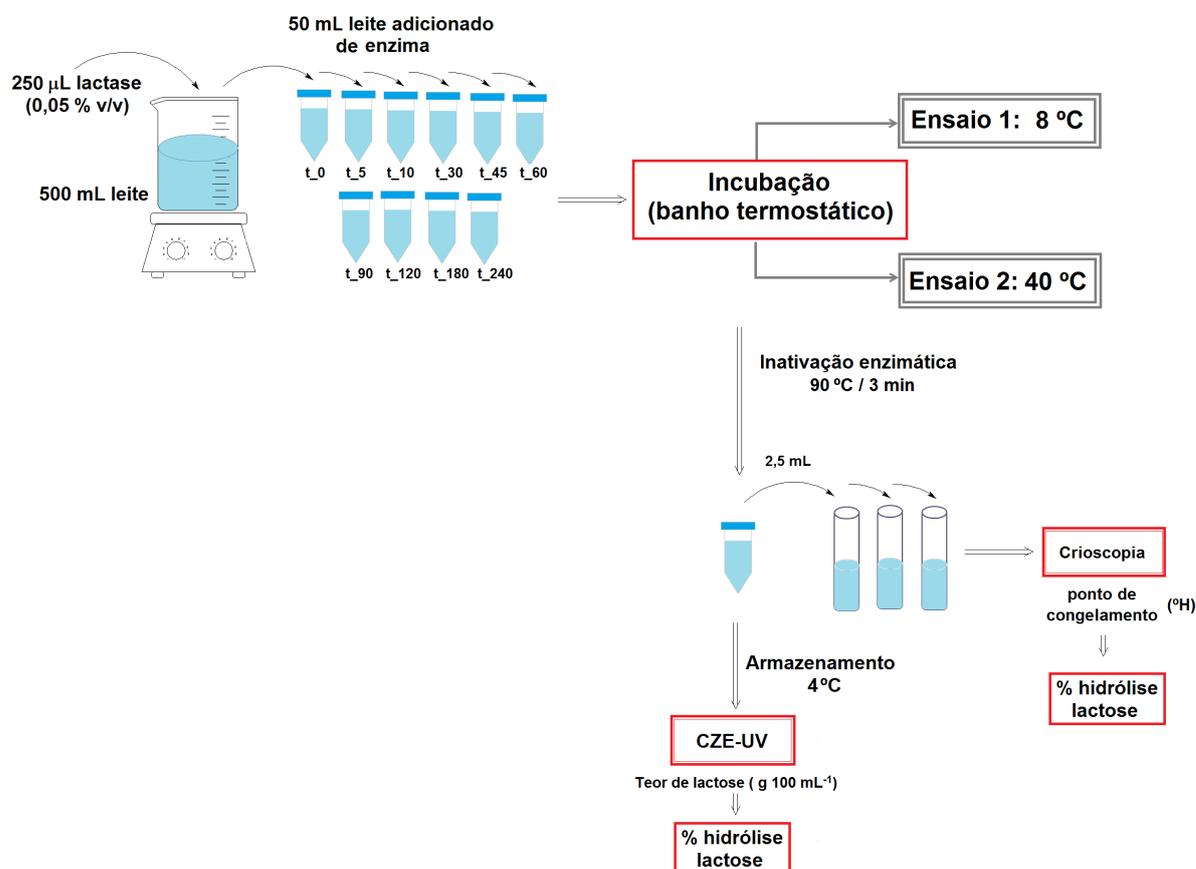
A determinação do teor de lactose foi realizada através do método eletroforético cujas condições analíticas e instrumentais foram otimizadas na Seção 3, sendo: extração da amostra (TCA 40 % m/v), capilar (TSP 75 μ m i.d., 50,0 cm L_E), injeção (15 mbar/ 2 s), tensão aplicada (-20 kV), temperatura (20 °C), frequência (2,5 Hz), detecção (350 nm e referência em 275 nm) e BGE (20 mmol L⁻¹ PDC, 50 mmol L⁻¹ NaOH, 0,05 mmol L⁻¹ CTAB; pH \geq 12,5).

5.2.3 Simulação dos Processos de Hidrólise Enzimática da Lactose

A fim de simular experimentalmente os processos industriais de hidrólise por batelada e hidrólise asséptica, dois ensaios foram realizados e identificados como Ensaio 1 e Ensaio 2, respectivamente.

As principais etapas experimentais são evidenciadas na Figura 5.1.

Figura 5.1 – Etapas experimentais para simulação de processo de hidrólise enzimática antes (Ensaio 1) e após (Ensaio 2) o tratamento térmico UHT



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

As seguintes etapas experimentais foram consideradas: para cada ensaio 250 µL (equivalente a 0,05 % v/v, conforme dosagem padrão recomendada pelo fornecedor) de β -galactosidase Maxilact® foram adicionados a 500 mL de leite UHT desnatado com teor regular de lactose, mantendo agitação magnética constante a baixa rotação por 30 s. Alíquotas de 50 mL do leite adicionado de enzima foram transferidas para tubos tipo Falcon identificados como: t_0 , t_5 , t_{10} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{90} , t_{120} , t_{180} e t_{240} , indicando o tempo (em minutos) que cada alíquota foi submetida a incubação em banho termostático ajustado para 8 °C (Ensaio 1) ou 40 °C (Ensaio 2). Após o período de incubação de cada tubo, realizou-se a inativação imediata da enzima em banho termostático a 90 °C por 3 min, seguido de banho de gelo para resfriamento imediato do sistema, evitando desenvolvimento de reações químicas decorrentes desse aquecimento (CARMINATTI, 2001). Em seguida, três alíquotas de 2,5 mL foram retiradas para leitura do ponto de congelamento em crioscópio eletrônico digital previamente calibrado (leitura em triplicata). A amostra restante do tubo Falcon foi

armazenada a 4 °C para quantificação do teor de lactose por CZE-UV. As amostras experimentais identificadas como t_0 foram submetidas à etapa de inativação enzimática imediatamente após a adição da enzima e alíquotagem. Os Ensaios 1 e 2 foram executados em duplicatas autênticas.

Experimentos controle foram realizados utilizando-se duas provas em branco: Branco A, referente a uma alíquota do leite UHT convencional utilizado no experimento sem tratamento adicional; e Branco B, caracterizado por uma alíquota do leite UHT convencional submetida a 90 °C por 3 min, conforme a etapa de inativação enzimática. As provas em branco A e B foram analisadas quanto ao ponto de congelamento e ao teor de lactose e comparadas às amostras experimentais t_0 dos Ensaios 1 e 2, a fim de avaliar se a adição da enzima seguida por sua inativação imediata e o processo de inativação por aquecimento são capazes de influenciar tais parâmetros.

5.2.4 Cálculo do Nível de Hidrólise Enzimática da Lactose

Atualmente o nível de hidrólise, dado em percentual (%), é estimado através do uso de fórmulas padrão sugeridas pelos fornecedores da enzima, as quais consideram a variação da depressão do ponto de congelamento (DPC) do leite adicionado da enzima ao longo do processo. No presente estudo, o nível de hidrólise foi calculado a partir da Equação 5.1, conforme especificação do fornecedor. A DPC é expressa em módulo e seu cálculo é dado pela multiplicação do ponto de congelamento por um fator de 10^3 (MARTINS, 2016).

$$\% \text{ hidrólise}_i = \left[DPC_i - DPC_0 \right] / 2,74 \quad (5.1)$$

Onde: % hidrólise_i é o grau de hidrólise no tempo de incubação t_i , DPC_i é a depressão do ponto de congelamento, em graus Celcius, no tempo t_i de incubação do sistema, sendo $i = 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180$ e 240 min, DPC₀ é a depressão do ponto de congelamento da amostra em t_0 , 2,74 é o fator padrão que considera um teor médio de 4,92 g lactose 100 mL^{-1} leite.

Considerando o teor de lactose obtido por CZE-UV, o % hidrólise foi calculado aplicando-se a Equação 5.2.

$$\% \text{ hidrólise}_i = 100 - \left\{ \left[LACT_i / LACT_0 \right] \times 100 \right\} \quad (5.2)$$

Onde: % hidrólise_i é o grau de hidrólise da lactose no tempo de incubação t_i , LACT_i é o teor de lactose na amostra em t_i , sendo $i = 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180$ e 240 min, e LACT₀ é o teor de lactose da amostra em t_0 .

5.2.5 Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados como média, desvio-padrão e os testes comparativos (t pareado e Wilcoxon pareado) e de normalidade (Shapiro-Wilk) foram realizados através do *software* Microsoft Excel® 14.0 ver. (Microsoft Office, 2010).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Branco A, B e as amostras experimentais t_0 dos Ensaios 1 e 2 foram comparadas quanto ao teor de lactose e ponto de congelamento via aplicação de Análise de Variância (ANOVA) mediante testagem prévia dos pressupostos de normalidade e homocedasticidade dos resíduos. Todos os parâmetros estatísticos, incluindo médias e desvios-padrão estão dispostos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Influência da etapa de inativação enzimática no teor de lactose e no ponto de congelamento do leite (PC)

	Parâmetros	
	Lactose (g 100 mL ⁻¹)	PC (°H)
Branco A ^a	4,44 (± 0,01)	-0,553 (± 0,002)
Branco B ^b	4,41 (± 0,02)	-0,553 (± 0,001)
Amostra t_0 (Ensaio 1)	4,44 (± 0,01)	-0,554 (± 0,001)
Amostra t_0 (Ensaio 2)	4,41 (± 0,03)	-0,553 (± 0,001)
Normalidade residual (Shapiro-Wilk)	0,994	0,108
p-valor _($\alpha = 0,05$)		
Homocedasticidade residual (Cochran)*	0,21	0,24
ANOVA – p-valor _($\alpha = 0,05$)	0,150	0,777

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Desvio-padrão entre parênteses ($n = 3$). ^a leite UHT, ^b leite UHT submetido ao aquecimento (90 °C/3 min). * $C_{\text{crítico}}$ ($n = 3$, $k = 4$; $\alpha = 0,05$) = 0,77, onde n é o número de observações em cada um dos k grupos.

A independência dos dados foi alcançada analisando de forma aleatória todas as réplicas autênticas (amostras em branco A, B e t_0), tanto para o conteúdo de lactose quanto para a detecção do ponto de congelamento. Perfis normais e homocedásticos (p-valor > 0,05 e $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$, respectivamente) foram encontrados nos resíduos dos parâmetros avaliados (Tabela 5.1), justificando a aplicação da ANOVA para comparação das amostras supracitadas.

Por sua vez, de acordo com os p-valores obtidos pela ANOVA, não há evidências de que os Brancos A, B e amostras t_0 dos Ensaios 1 e 2 diferem estatisticamente entre si (p-valor > 0,05) para ambos os fatores avaliados (teor de lactose e ponto de congelamento). Portanto,

torna-se válido considerar que no momento t_0 não houve ação significativa da β -galactosidase sobre a lactose, ou seja, amostras t_0 de ambos os ensaios apresentam grau de hidrólise igual à zero. Também é válido afirmar que o processo de aquecimento para a inativação da enzima não é capaz de influenciar significativamente o ponto de congelamento nem o teor de lactose do meio, indicando que esse tratamento pode ser utilizado para cessar a atividade enzimática ao longo dos ensaios experimentais.

Os dados obtidos para o ponto de congelamento (em °H), teor de lactose (em g 100 mL⁻¹) e seus respectivos níveis de hidrólise (em %) encontram-se dispostos na Tabela 5.2.

Considerando os dados dispostos na Tabela 5.2, podemos observar níveis mais elevados de hidrólise da lactose durante o Ensaio 2, realizado a 40 °C, em comparação com o Ensaio 1, realizado a 8 °C, comportamento esse verificado tanto nas determinações por crioscopia quanto por CZE-UV. Bosso et al. (2016) analisaram a atividade enzimática da β -galactosidase comercial Maxilact® LX5000 proveniente da levedura *K. lactis* adicionada ao leite UHT e leite desnatado. Os resultados indicaram que as melhores taxas de hidrólise da lactose foram atingidas a temperaturas entre 35 – 40 °C e pH 6,0 – 7,0, sendo que a maior taxa foi identificada em 40 °C e pH 7,0 e a inativação completa de atividade a 50 °C. Em outro estudo, verificou-se uma razão de 1/4,5 entre a atividade da β -galactosidase quando adicionada ao leite a 8 °C e quando adicionada ao substrato de o-nitrofenilgalactosídeo (oNPG) mantido a 37 °C, sugerindo que a atividade enzimática relatada pelo fornecedor não é relevante para a aplicação no processo industrial de hidrólise da lactose, uma vez que diferentes condições são utilizadas (ERICH; ANZMANN; FISCHER, 2012).

É possível observar também a necessidade de períodos de incubação superiores a 4 h para atingir a concentração residual máxima de lactose preconizada pela ANVISA (0,1 g 100 mL⁻¹) quando o processo de hidrólise é realizado antes do tratamento térmico (Ensaio 1 – teor de lactose de 2,02 g 100 mL⁻¹ em t_{240}). Por outro lado, para o processo hidrolítico simulado a 40 °C, um tempo de incubação de 4 h foi suficiente para obtenção da classificação “livre de lactose” (Ensaio 2 – teor de lactose de 0,11 g 100 mL⁻¹ em t_{240}) (BRASIL, 2017; EFSA, 2010). Esse comparativo entre os processos de hidrólise executados antes e após o tratamento térmico evidencia o esforço industrial requerido e o elevado custo associado à produção de leites hidrolisados pré-processamento térmico (por batelada), os quais demandam longos períodos de incubação da matéria-prima em silos de estocagem com constante refrigeração.

Tabela 5.2 – Ponto de congelamento (PC), em °H, teor de lactose, em g 100 mL⁻¹; e nível de hidrólise, em %, monitorados ao longo dos Ensaio 1 e 2. Testes estatísticos comparativos também são apresentados^a

Tempo (min)	Ensaio 1				Ensaio 2			
	Crioscopia		CZE-UV		Crioscopia		CZE-UV	
	PC	Hidrólise	Lactose	Hidrólise	PC	Hidrólise	Lactose	Hidrólise
0	-0,554 (±0,001)	0,00*	4,44 (±0,01)	0,00*	0,553 (±0,001)	0,00*	4,40 (±0,25)	0,00*
5	-0,567 (±0,001)	4,76 (±0,12)	4,18 (±0,01)	5,84 (±0,52)	0,597 (±0,001)	15,14 (±0,24)	3,77 (±0,20)	14,20 (±0,35)
10	-0,573 (±0,001)	6,70 (±0,25)	4,16 (±0,01)	6,24 (±0,20)	0,631 (±0,001)	26,71 (±0,72)	2,61 (±0,15)	40,65 (±0,04)
30	-0,585 (±0,004)	10,92 (±0,75)	3,94 (±0,01)	11,19 (±0,04)	0,690 (±0,001)	46,62 (±0,48)	2,57 (±0,14)	41,53 (±0,25)
45	-0,596 (±0,001)	15,33 (±0,37)	3,67 (±0,02)	17,27 (±0,58)	0,719 (±0,002)	56,49 (±0,48)	1,01 (±0,06)	76,92 (±2,58)
60	-0,607 (±0,001)	18,85 (±0,37)	3,54 (±0,01)	20,29 (±0,12)	0,759 (±0,002)	70,78 (±0,96)	0,37 (±0,04)	91,45 (±1,44)
90	-0,621 (±0,001)	23,61 (±0,01)	3,40 (±0,01)	23,44 (±0,31)	0,761 (±0,002)	70,78 (±0,96)	0,17 (±0,02)	96,04 (±0,70)
120	-0,636 (±0,002)	28,90 (±0,50)	2,28 (±0,01)	48,52 (±0,23)	0,793 (±0,001)	81,67 (±0,01)	0,16 (±0,01)	96,42 (±0,01)
180	-0,651 (±0,002)	34,18 (±0,50)	2,19 (±0,01)	50,57 (±0,18)	0,817 (±0,001)	90,01 (±0,24)	0,15 (±0,01)	96,56 (±0,29)
240	-0,671 (±0,004)	41,41 (±0,87)	2,02 (±0,01)	54,45 (±0,17)	0,824 (±0,004)	92,22 (±1,44)	0,11 (±0,01)	97,55 (±0,25)
	Teste estatístico**		p-valor		Teste estatístico**		p-valor	
Crioscopia	Normalidade (Shapiro-Wilk)		0,002		Normalidade (Shapiro-Wilk)		0,614	
vs.								
CZE-UV	Wilcoxon		0,028		t pareado		0,013	

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

^a Simulação dos processos industriais de hidrólise enzimática: Ensaio 1 (hidrólise por batelada: incubação a 8 °C) e Ensaio 2 (hidrólise asséptica: incubação a 40 °C). * Nível de hidrólise em t₀ foi considerado igual à zero. Desvio-padrão entre parênteses para n = 2 (duplicatas autênticas). ** Comparação dos % hidrólise obtidos por crioscopia e CZE-UV (n = 10, α = 0,05).

Além disso, é importante destacar que mudanças na cor e no valor nutricional do produto podem ser intensificadas quando a hidrólise da lactose é realizada antes do aquecimento do leite porque os monossacarídeos liberados durante a ação enzimática são mais reativos a aminas (lisina ligada às proteínas primárias e também outros grupos $-NH$ terminais) quando comparados à lactose, acelerando a reação de Maillard durante o tratamento térmico e período de estocagem. Devido a esse conjunto de fatores, o processo de hidrólise após o tratamento térmico é considerado por alguns autores como o método mais adequado para produção de leites hidrolisados (JANSSON et al., 2014; MESSIA; CANDIGLIOTA; MARCONI, 2007).

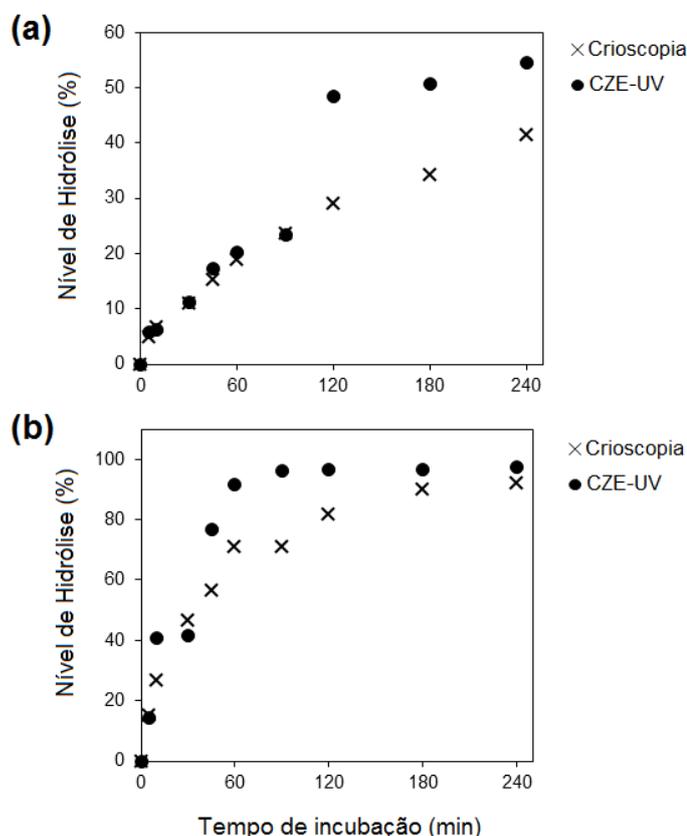
Quanto ao teste comparativo realizado a fim de verificar se os métodos eletroforético e crioscópico diferem entre si quanto ao monitoramento dos processos hidrolíticos, podemos observar na Tabela 5.2 que o Ensaio 1 foi avaliado por estatística não-paramétrica através do teste de Wilcoxon, visto que os dados não apresentaram perfil normal (p -valor $< 0,05$), enquanto que o Ensaio 2 foi avaliado empregando-se teste t pareado (dados com distribuição normal: p -valor $> 0,05$). De acordo com os testes comparativos realizados, os níveis de hidrólise obtidos pelos métodos CZE-UV e crioscopia diferem entre si (p -valores $< 0,05$) ao longo dos processos de hidrólise simulados pelos Ensaio 1 e 2.

Variações de até 20 % foram observadas entre os níveis de hidrólise identificados pelos os métodos analíticos, quando um mesmo tempo de incubação é considerado (Tabela 5.2), provavelmente relacionadas à sensibilidade de cada método. Essa diferença de sensibilidade de detecção entre os métodos pode ser notada mais facilmente considerando a representação gráfica dos dados de hidrólise disposta na Figura 5.2, com os gráficos *a* e *b* expondo os dados dos Ensaio 1 e 2, respectivamente, em função do tempo de incubação.

A discrepância entre os níveis de hidrólise detectados por crioscopia e CZE-UV observada durante o Ensaio 1 (Figura 5.2 – gráfico *a*) ocorre a partir dos 120 min de incubação. Neste caso, o método eletroforético detectou 50 % de redução da lactose aos 180 min de processo enquanto o método crioscópico não conseguiu detectar tal nível de hidrólise mesmo considerando o tempo total de incubação de 240 min. A maior sensibilidade do método eletroforético para a detecção do nível de hidrólise também é perceptível na representação gráfica do Ensaio 2 (Figura 5.2 – gráfico *b*) visto que 90 % de redução da lactose foi identificada por CZE-UV com 60 min de processo, enquanto que este mesmo nível de hidrólise foi detectado por crioscopia apenas com 180 min de incubação do sistema.

Figura 5.2 – Evolução gráfica para hidrólise enzimática da lactose detectada pelos métodos por crioscopia (x) e CZE-UV (●) durante Ensaio 1 (hidrólise por batelada – incubação a 8 °C)

(a) e Ensaio 2 (hidrólise asséptica – incubação a 40 °C) (b)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Rosolen et al. (2015) verificaram um aumento significativo da degradação da lactose no leite (monitorado pelo aumento da concentração de glicose) após 120 min de incubação a 10 °C utilizando 0,074 % e 0,111 % de β -galactosidase de *K. lactis*, seguido por ligeiro aumento do conteúdo desse monossacarídeo até 12 h de incubação. Este estudo corrobora com os dados encontrados durante o Ensaio 1, em que um aumento expressivo do nível de hidrólise é detectado por CZE-UV aos 120 min de incubação a 8 °C.

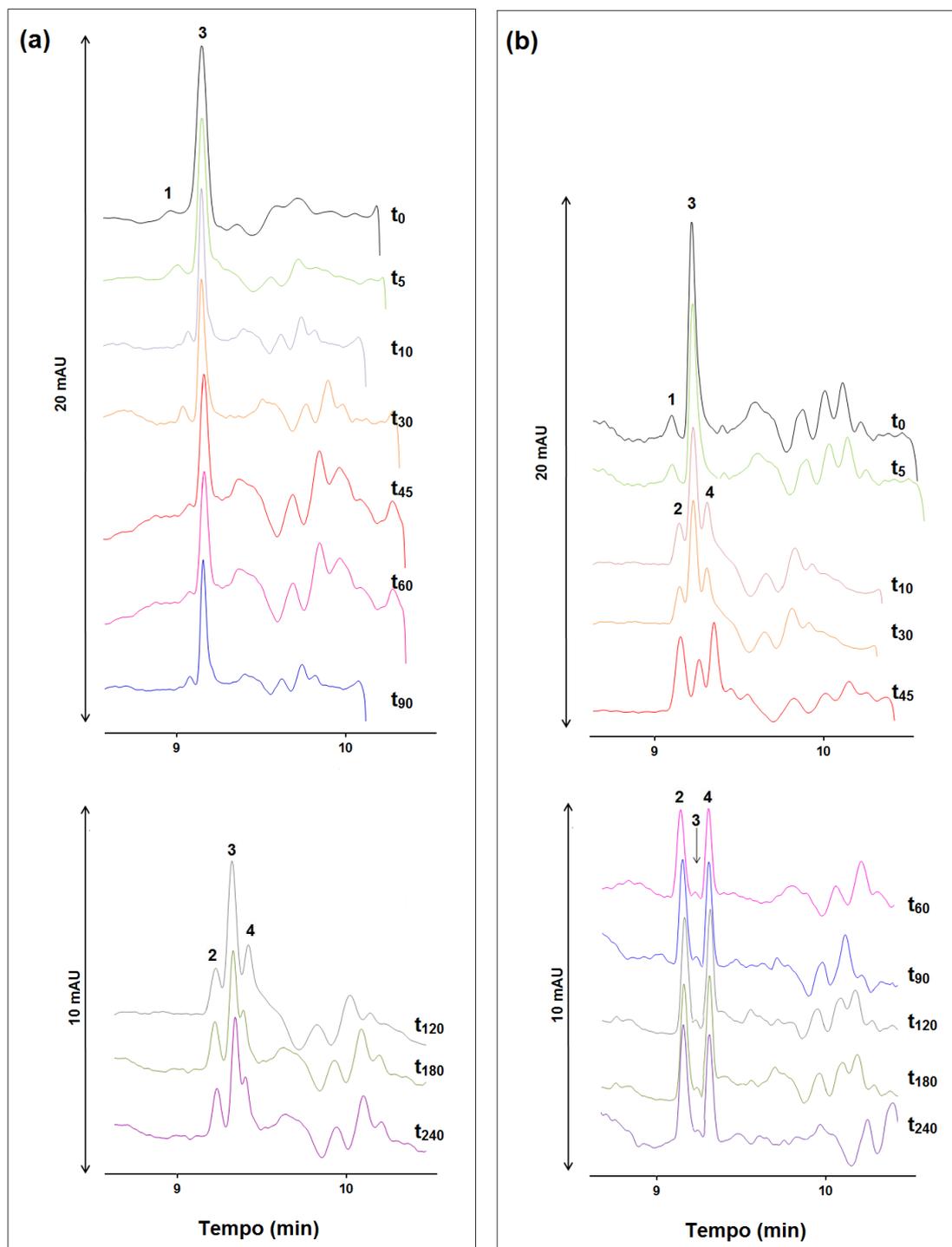
Durante o processo hidrolítico, a liberação dos monômeros de glicose e galactose gera um aumento da concentração molar de açúcares no leite, com uma redução linear concomitante no ponto de congelamento (NIJPELS et al., 1980). No entanto, sabe-se que as β -galactosidasas podem produzir oligossacarídeos como metabólitos secundários por meio de reações de transgalactosidação (HUSAIN, 2010). A maioria dos oligossacarídeos formados apresenta alto peso molecular e está associada a proteínas, causando variações menores ou

praticamente insignificantes no ponto de congelamento do leite quando comparadas às variações causadas quando apenas os monossacarídeos são liberados pela ação da enzima durante a hidrólise (JEON; MANTHA, 1985). Em um estudo similar ao proposto para o Ensaio 2, Jeon e Saunders (1986) verificaram que níveis mais baixos de hidrólise eram encontrados em amostras de leite tratadas com β -galactosidase e incubadas a 37 °C/4 h quando se empregava a crioscopia como método de controle, em comparação aos níveis encontrados quando se utilizava HPLC. Os autores também verificaram experimentalmente a formação de oligossacarídeos e sua influência no retardo da evolução do ponto de congelamento durante a hidrólise. As amostras com maior concentração de oligossacarídeos apresentaram pequenas variações no ponto de congelamento e, conseqüentemente, diferenças mais acentuadas entre os níveis de hidrólise obtido por crioscopia e por HPLC. Como a formação dos oligossacarídeos é difícil de ser controlada, pois a mesma depende da atividade enzimática e da presença de outros metabólitos, o uso do ponto de congelamento como parâmetro analítico para estimativa da hidrólise da lactose pode não somente comprometer o controle de qualidade da produção de leites hidrolisados, mas também aumentar o tempo de processamento.

A falta de sensibilidade do método crioscópico para o controle do processo de hidrólise da lactose também foi identificada em um estudo recente, o qual comparou um método de separação por cromatografia de troca iônica de alto desempenho (HPAEC-PAD) com nove métodos analíticos comumente usados para determinações de lactose residual em leite hidrolisado (CHURAKOVA et al., 2019). Diante dos resultados encontrados, os autores sugerem que a utilização do ponto de congelamento do leite para monitoramento do nível de hidrólise da lactose pode comprometer o controle do processo.

Ao avaliar os eletroferogramas dispostos na Figura 5.3 obtidos ao longo dos ensaios podemos verificar que os perfis eletroforéticos estão em consonância com o comportamento gráfico exibido pelos dados. É possível observar uma leve diminuição do pico 3 (referente à lactose) durante os primeiros 90 min do Ensaio 1. Aos 120 min de incubação, verifica-se o surgimento dos picos de glicose e galactose (picos 2 e 4, respectivamente), seguido de uma leve mudança no perfil eletroforético em t_{180} e t_{240} .

Figura 5.3 – Perfis eletroforéticos de leite submetido aos processos de hidrólise por batelada - Ensaio 1 (a) e asséptica - Ensaio 2 (b) monitorados ao longo do tempo t_i (sendo $i = 0, 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180$ e 240 min). Picos (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose^a



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

^a Hidrólise por batelada (Ensaio 1): incubação a 8 °C, hidrólise asséptica (Ensaio 2): incubação a 40 °C. Condições experimentais: extração da amostra (TCA 40 % m/v), capilar TSP (75 μm i.d., 50,0 cm LE), parâmetros eletroforéticos (injeção: 15 mbar/2 s, tensão: -20 kV, temperatura: 20 °C, detecção: 350 nm, referência em 275 nm).

Por outro lado, no Ensaio 2 (Figura 5.3-b) é possível observar uma diminuição rápida e progressiva do pico de lactose (pico 3) com o surgimento dos picos de glicose e galactose a partir de 10 min de incubação. Além disso, nota-se uma gradativa evolução dos picos 2 e 4 no perfil eletroforético até 60 min de processamento. Finalmente, uma manutenção do perfil eletroforético entre t_{60} e t_{240} é observada com ligeira modificação do nível de hidrólise conforme observado no perfil gráfico da Figura 5.2 indicando redução da atividade enzimática provavelmente por ação inibitória dos produtos gerados.

Outro fator interessante a ser destacado é que ao comparar os perfis eletroforéticos com os níveis de hidrólise dispostos na Tabela 5.2, é possível verificar que o surgimento dos picos de glicose e galactose ocorre quando o produto apresenta um nível de hidrólise acima de 40 % (em t_{120} no Ensaio 1 e em t_{10} no Ensaio 2). Diante desse comportamento, podemos inferir que o método CZE-UV também pode ser utilizado como uma ferramenta de análise qualitativa para a distinção de produtos convencionais e hidrolisados, quando este último apresentar um nível de hidrólise do conteúdo de lactose acima de 40 %.

A presença de lactulose (pico 1) foi detectada em ambos os Ensaio 1 e 2 principalmente nos momentos iniciais do processo enzimático, fato este já esperado visto que a amostra de leite utilizada nos ensaios foi submetida ao tratamento térmico UHT. À medida que a reação enzimática ocorre nota-se o desaparecimento do pico 1, indicando uma possível degradação da lactulose ao longo do processo enzimático já que a lactase microbiana também é capaz de hidrolisar este isômero (RUIZ-MATUTE et al., 2012).

É válido destacar a existência de correlação entre o teor de lactose ($g\ 100\ mL^{-1}$), quantificado por CZE-UV e o ponto de congelamento ($^{\circ}H$) para ambos os Ensaio 1 e 2 (R múltiplo de 0,97 e 0,98, respectivamente) e elevada significância de regressão ($F_{\text{calculado}}$ de 285 e 266, respectivamente; considerando um $F_{\text{crítico}} = 4,41$). Diante de tal comportamento, o uso da modelagem de regressão linear sinaliza uma correlação promissora entre os parâmetros propostos. Dessa forma, o teor residual de lactose nos Ensaio 1 e 2 pode ser correlacionado à DPC mediante aplicação das Equações 5.3 e 5.4, respectivamente:

$$LACT (g\ 100\ mL^{-1}) = -0,024\ DPC\ (^{\circ}H) + 17,99 \quad (5.3)$$

$$LACT (g\ 100\ mL^{-1}) = -0,018\ DPC\ (^{\circ}H) + 14,49 \quad (5.4)$$

Onde: LACT é o teor de lactose e DPC é a depressão do ponto de congelamento.

Colinas et al. (2006) apresentaram uma correlação de 0,99 entre o conteúdo residual de lactose (medido por metodologias como polarimetria, HPLC ou método enzimático) e o

índice crioscópico com a proposição de uma modelagem matemática. A grande vantagem da modelagem baseada em um método quantitativo como referência, em relação à regressão proposta pelo fornecedor da enzima, é personalizar o modelo matemático considerando a matéria-prima, a enzima e as características industriais particulares daquela unidade de produção. Dessa forma, obtém-se maior confiança quanto à estimativa do residual de lactose.

Embora a abordagem matemática seja interessante para um controle industrial interno mais rápido e confiável, é importante destacar que, por ser um método indireto baseado em estimativas, o método crioscópico não é adequado para inspeção quanto à adequação do produto aos requisitos legais estabelecidos para a linha de hidrolisados. Portanto, o uso de um método quantitativo para determinação direta da real concentração residual de lactose se torna indispensável para a indústria, quando se deseja garantir o atendimento à legislação vigente, bem como para os órgãos fiscalizadores.

É válido mencionar que variações na atividade da enzima utilizada, assim como no teor de lactose inicial da matéria-prima, irão afetar o tempo de incubação independente do tipo de processamento realizado (antes ou após o tratamento térmico). Nesse caso, torna-se essencial manter o controle da qualidade da enzima, do seu armazenamento e o uso de acordo com as condições especificadas pelo fornecedor. Além disso, estratégias de rastreabilidade da matéria-prima recepcionada como, por exemplo, verificar o perfil histórico quanto ao teor de lactose de acordo com a linha de produtores ou estação do ano, podem auxiliar na estimativa do tempo de hidrólise de acordo com o perfil traçado e permitir que pequenas alterações de processo sejam propostas para que se mantenha o mesmo nível de produtividade.

5.4 CONCLUSÃO

Apesar dos métodos avaliados não apresentarem diferenças estatísticas entre si quanto ao monitoramento do processo de hidrólise, o método CZE-UV apresentou maior sensibilidade para identificação do nível de hidrólise, podendo auxiliar na redução do tempo de incubação principalmente quando a hidrólise por batelada é adotada. Por se tratar de um método quantitativo, o método eletroforético pode ser utilizado tanto para o monitoramento da etapa de hidrólise pelas indústrias processadoras quanto para a checagem do produto quanto ao atendimento às especificações legais estabelecidas pelos órgãos regulamentadores. Outro fator importante a ser considerado é a possibilidade de se utilizar o método CZE-UV como ferramenta qualitativa para distinção de produtos convencionais e hidrolisados (quando estes

apresentarem uma redução superior a 40 % do seu teor de lactose) mediante avaliação dos perfis eletroforéticos.

O desempenho mais lento e a menor sensibilidade que o método crioscópico apresentou, além das possíveis interferências, podem comprometer a produtividade e a adequação do produto às normas estabelecidas.

5.5 PUBLICAÇÕES

DE OLIVEIRA NEVES, L. N.; LEAL DE OLIVEIRA, M. A. Assessment of enzymatic hydrolysis of lactose in lactose-free milk production - A comparative study using capillary zone electrophoresis and cryoscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 138, p. 110585, 2021.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos nesta tese, podemos afirmar que o método CZE-UV proposto pode ser aplicado para monitorar dois importantes processamentos industriais no setor lácteo: o tratamento térmico UHT, mediante determinação da lactulose, e o processo de hidrólise enzimática da lactose, com a determinação direta desse dissacarídeo. Assim, este é o primeiro relato, por eletroforese capilar de zona, de determinação dos isômeros lactulose e lactose em matriz láctea convencional e hidrolisada.

O estudo dos métodos de extração e ajuste dos parâmetros instrumentais viabilizaram a proposição de um método eletroforético capaz de determinar ambos os isômeros em leites com diferentes teores de lactose. Ademais, significativos ganhos de sensibilidade foram alcançados em comparação ao método inicialmente proposto por Neves (2015). Outro ponto de destaque deste trabalho é a frequência analítica obtida para o método CZE-UV em comparação ao método cromatográfico oficial, com a determinação dos dois isômeros em um tempo menor que a quantificação exclusiva da lactulose por HPLC-RID.

No estudo comparativo dos métodos crioscópico e eletroforético utilizados para monitorar diferentes processos de hidrólise enzimática, resultados importantes também foram obtidos, com destaque a maior sensibilidade do método quantitativo proposto. Dessa forma, o uso do método CZE-UV pode auxiliar de forma significativa na melhoria de produtividade por apresentar maior sensibilidade. Além disso, a proposição de modelagens de regressão baseadas no método eletroforético e considerando as particularidades de cada unidade de produção parece ser uma alternativa mais refinada e segura para estimativa do nível de hidrólise para a indústria.

É importante destacar ainda o comportamento dos indicadores térmicos HMF e WPNI utilizando métodos clássicos de baixo custo, e lactulose por CZE-UV em leite UHT hidrolisado. Através deste estudo foi possível identificar experimentalmente como a mudança do teor de lactose e do tipo de carboidrato presente (como consequência do processo de hidrólise enzimática) interfere no comportamento desses indicadores, propor novas aplicações para o índice de HMF e ainda alertar sobre o uso da lactulose como indicador térmico em matriz com lactose hidrolisada.

De posse dos resultados encontrados, uma das perspectivas deste trabalho é a aplicação do método CZE-UV como uma ferramenta analítica alternativa para o monitoramento de ambos os processos industriais, podendo ser aplicada tanto no controle interno de produção pelas indústrias do setor, quanto na verificação do cumprimento dos

requisitos legais por órgãos fiscalizadores. Trabalhos futuros deverão apresentar como motivação central o desenvolvimento de instrumental mais prático e aplicável em campo, facilitando o trabalho de fiscalização. A aplicação do método CZE-UV como método de referência para calibração de técnicas mais rápidas capazes de serem utilizadas em modo *online* pelo setor de produção também apresenta grande potencial e merece atenção futura.

REFERÊNCIAS

- ACQUARO JUNIOR, V. R. et al. Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação através de HPLC com índice de refração para lactose em leite pasteurizado. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 137–145, 2013.
- ADACHI, S.; PATTON, S. Presence and significance of lactulose in milk products: A Review. **Journal Series of The Pennsylvania Agricultural Experiment Station**, n. 2529, p. 1375–1393, 1961.
- ADHIKARI, A. K.; SAHAI, D.; MATHUR, O. N. A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of lactulose in heated milk and milk products. **Le Lait**, v. 71, n. 5, p. 555–564, 1991.
- ADPI. Standards for grades of dry milks. In: AMERICAN DAIRY PRODUCTS ASSOCIATION (Ed.). . **Bulletin 996**. New York: [s.n.].
- AIDER, M.; HALLEUX, D. DE. Isomerization of lactose and lactulose production: review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 7, p. 356–364, 2007.
- AKILLIOĞLU, H. G.; GÖKMEN, V. Advanced Glycation End Products (AGEs). In: **Chemical Hazards in Thermally-Processed Foods**. [s.l: s.n.]. p. 121–152.
- ALBALÁ-HURTADO, S. et al. Determination of Free and Total Furfural Compounds in Infant Milk Formulas by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2128–2133, 1997.
- ALVAREZ-BUENO, C. et al. Effects of Milk and Dairy Product Consumption on Type 2 Diabetes: Overview of Systematic Reviews and Meta-Analyses. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 2, p. S154–S163, 2019.
- AMINE, A. et al. A new enzymatic spectrophotometric assay for the determination of lactulose in milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 406, n. 2, p. 217–224, 2000.
- ANDRADE, V. T. DE; BRANDÃO, S. C. C.; ALVIM, T. DA C. Sorvete de doce de leite delactosado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 126–130, 2004.
- ANEMA, S. G. The whey proteins in milk: Thermal denaturation, physical interactions, and effects on the functional properties of milk. In: BOLAND, M.; SINGH, H. (Eds.). . **Milk Proteins**. 3rd. ed. London: Elsevier Inc., 2020. p. 325–384.
- AOAC INTERNATIONAL. **Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals**. Maryland: [s.n.].
- ATKINS, P. W.; PAULA, J. DE. **Físico-química: volume 1**. 9^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. v. 1
- AUNE, D. et al. Dairy products and the risk of type 2 diabetes : a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1066–1083, 2013.

BASTOS, D. H. M.; GUGLIUCCI, A. Contemporary and controversial aspects of the Maillard reaction products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 13–20, 2015.

BECCHI, C. S. **Estudo do índice crioscópico do leite tipo B “in natura” produzido na bacia leiteira do Vale do Taquari, RS.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

BERG, H. E. **Reactions of lactose during heat treatment of milk: a quantitative study.** [s.l.: s.n.]. v. 48

BHUPATHI, V. et al. Dairy Intake and Risk of Cardiovascular Disease. **Current Cardiology Reports**, v. 22, n. 11, 2020.

BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C. Determination of furosine in food products by capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 33, n. 15, p. 2382–2389, 2012.

BOSSO, A. et al. Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial β -galactosidase in UHT and skimmed milk. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 159–165, 2016.

BRASIL. **Portaria N 370, de 4 de Setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite UHT (UAT).** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Brasília-DF: D.O.U.- Diário Oficial da União de 8 de setembro de 1997., 1997.

BRASIL. **RDC N° 360, de 23 de Dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados [Retificação].** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília-DF: D.O.U. - Diário Oficial da União n° 251, de 26 de dezembro de 2003., 2003.

BRASIL. **Guia Alimentar para a População Brasileira.** Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília - DF: [s.n.], v. 2, 156p., 2014.

BRASIL. **RDC N° 135, de 8 de Fevereiro de 2017. Regulamento técnico de alimentos para fins especiais.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília - DF: D.O.U. - Diário Oficial da União n° 29, de 9 de fevereiro de 2017., 2017.

BRASIL. **Instrução Normativa N° 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos para fixação da qualidade e identidade do leite cru refrigerado, leite pasteurizado e leite pasteurizado tipo A.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Brasília - DF: D.O.U. - Diário Oficial da União de 30 de novembro de 2018., 2018a.

BRASIL. **Instrução Normativa N° 30, de 23 de junho de 2018. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Brasília: D.O.U. - Diário Oficial da União de 13 de setembro de 2018., 2018b.

BURVALL, A. et al. Nutritional value of lactose-hydrolysed milk: Protein quality after some industrial processes. **Journal of Dairy Research**, v. 44, n. 3, p. 549–553, 1977.

BURVALL, A. et al. Storage of lactose-hydrolysed dried milk: Effect of water activity on the

protein nutritional value. **Journal of Dairy Research**, v. 45, n. 3, p. 381–389, 1978.

CARDONE, M. J.; PALERMO, P. J. Potential error in single-point-ratio calculation based on linear calibration curves with significant intercept. **Analytical Chemistry**, v. 52, p. 1187–1191, 1980.

CARMINATTI, C. A. **Ensaios de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

CATALDI, T. R. I.; ANGELOTTI, M.; BUFO, S. A. Method development for the quantitative determination of lactulose in heat-treated milks by HPAEC with pulsed amperometric detection. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 21, p. 4919–4925, 1999.

CATTANEO, S.; MASOTTI, F.; PELLEGRINO, L. Effects of overprocessing on heat damage of UHT milk. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 5, p. 1099–1106, 2008.

CATTANEO, S.; MASOTTI, F.; ROSI, V. Evaluation of some heat-treatment indices in uht milk marketed in Italy. **Italian Journal of Food Science**, v. 20, n. 4, p. 553–565, 2008.

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, C. Analysis of mono and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, p. 211–215, 2004.

CHEN, S. L.; FRANK, J. F.; LOEWENSTEIN, M. Estimation of lactose hydrolysis by freezing point measurement in milk and whey substrates treated with lactases from various microorganisms. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 64, n. 6, p. 1414–1419, 1981.

CHEN, Z.; YAN, X. Simultaneous determination of melamine and 5-hydroxymethylfurfural in milk by capillary electrophoresis with diode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 8742–8747, 2009.

CHURAKOVA, E. et al. Accurate analysis of residual lactose in low-lactose milk: Comparing a variety of analytical techniques. **International Dairy Journal**, v. 96, p. 126–131, 2019.

COLINAS, C.; BARRERA, I.; BLANCO, C. A. A novel correlation for rapid lactose determination in milk by a cryoscopic technique. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 6, p. 1581–1584, 2006.

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

DATTA, N. et al. Ultra-high-temperature (UHT) treatment of milk: Comparison of direct and indirect modes of heating. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 3, p. 211–227, 2002.

DE BLOCK, J. et al. Evaluation of two methods for the determination of lactulose in milk. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 2, p. 217–222, 1996.

DE OLIVEIRA NEVES, L. N.; LEAL DE OLIVEIRA, M. A. Quantification of lactose and lactulose in hydrolysed-lactose UHT milk using capillary zone electrophoresis. **International Dairy Journal**, v. 106, p. 104710, 2020.

DEETH, H. C. The effect of UHT processing and storage on milk proteins. In: BOLAND, M.; SINGH, H. (Eds.). **Milk Proteins**. 3rd. ed. London: Elsevier Inc., 2020. p. 385–421.

DEKKER, P. J. T. Enzymes exogenous to milk in dairy technology: β -d-galactosidase. **Reference Module in Food Science**, 1 jan. 2016.

DEKKER, P. J. T.; KOENDERS, D.; BRUINS, M. J. Lactose-free dairy products: Market developments, production, nutrition and health benefits. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2019.

DEL CASTILLO, M. D. et al. Healthy Eating Recommendations: Good for Reducing Dietary Contribution to the Body's Advanced Glycation/Lipoxidation End Products Pool? **Nutrition Research Reviews**, p. 1–57, 2020.

EFSA. Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. **EFSA Journal**, v. 8, n. 9, p. 1–29, 2010.

ELLIOTT, A. J. et al. Heat-induced changes in UHT milks - Part 1. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, p. 3–10, 2003.

ELLIOTT, A. J. et al. Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 4, p. 442–446, 2005.

EMBRAPA. **Anuário do Leite 2019** (N. Rentero, Ed.). São Paulo: [s.n.].

ERBERSDOBLER, H. F.; SOMOZA, V. Forty years of furosine - Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 4, p. 423–430, 2007.

ERICH, S.; ANZMANN, T.; FISCHER, L. Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2393–2396, 2012.

F. J. MORALES, C. ROMERO, S. J.-P. An enhanced liquid chromatographic method for 5-hydroxymethylfurfural determination in UHT milk. **Chromatographia**, v. 33, n. 1–2, p. 45–48, 1992.

FAO. **Dairy market review, March 2020**. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ca8341en/CA8341EN.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2020.

FARIA, A. F.; DE SOUZA, M. V. N.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 389–396, 2008.

FDA. **Problems Digesting Dairy Products?** Disponível em: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/problems-digesting-dairy-products>. Acesso em: 25 ago. 2019.

FEINBERG, M. et al. Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 188–194, 2006.

FERRER, E. et al. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1–2, p. 599–606, 2000.

FORSGÅRD, R. A. Lactose digestion in humans: intestinal lactase appears to be constitutive whereas the colonic microbiome is adaptable. **The American journal of clinical nutrition**, v. 110, n. 2, p. 273–279, 2019.

FOX, P. F. Lactose: Chemistry and Properties. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Eds.). **Advanced Dairy Chemistry - Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. 3rd. ed. New York: Springer-Verlag, 2009. p. 1–16.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Chapter 2. Lactose. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Eds.). **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London-UK: Thomson Science, 1998. p. 21–66.

FRIEDMAN, M. Food Browning and Its Prevention: An Overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 631–653, 1996.

GARAY-SEVILLA, M. E. et al. The Potential Role of Dietary Advanced Glycation End Products in the Development of Chronic Non-Infectious Diseases. A narrative review. **Nutrition Research Reviews**, v. april, p. 1–14, 2020.

GARBALLO-RUBIO, A. et al. Determination of residual lactose in lactose-free cow milk by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 39–45, 2017.

GAUR, V.; SCHALK, J.; ANEMA, S. G. Sedimentation in UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 92–102, 2018.

GUO, J. et al. Milk and dairy consumption and risk of cardiovascular diseases and all-cause mortality: dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. **European Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 4, p. 269–287, 2017.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 104–109, 2012.

HARLAND, H. A.; ASHWORTH, U. S. The Preparation and Effect of Heat Treatment on the Whey Proteins of Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 28, n. 12, p. 879–886, 1945.

HENNO, M. et al. Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 2, p. 210–215, 2008.

HORNER, T. W. et al. β -Galactosidase activity of commercial lactase samples in raw and pasteurized milk at refrigerated temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3242–3249, 2011.

HUSAIN, Q. β -Galactosidases and their potential applications : a review. **Critical Reviews in**

Biotechnology, v. 30, n. 1, p. 41–62, 2010.

HUTH, P. J.; PARK, K. M. Influence of Dairy Product and Milk Fat Consumption on Cardiovascular Disease Risk: A Review of the Evidence. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 266–285, 2012.

IDDA, I. et al. Gas chromatography analysis of major free mono- and disaccharides in milk: Method assessment, validation and application to real samples. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 23, p. 4577–4584, 2016.

INAN-EROGLU, E.; AYAZ, A.; BUYUKTUNCER, Z. Formation of advanced glycation endproducts in foods during cooking process and underlying mechanisms: A comprehensive review of experimental studies. **Nutrition Research Reviews**, v. 33, n. 1, p. 77–89, 2020.

ISO / IDF. **Milk - Determination of lactulose content - Enzymatic method (ISO 11285/IDF 175)**. (International Dairy Federation, Ed.). Brussels: [s.n.].

ISO / IDF. Heat-treated milk - Determination of lactulose content - Method using high-performance liquid chromatography (ISO 11868/IDF 147). p. 10, 2007.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363–373, 2001.

JANSSON, T. et al. Lactose-hydrolyzed milk is more prone to chemical changes during storage than conventional ultra-high-temperature (UHT) milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 31, p. 7886–7896, 2014.

JEON, I. J.; MANTHA, V. R. High Performance Liquid Chromatography Analysis of Oligosaccharides Formed During β -Galactosidase Action on Lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 3, p. 581–588, 1985.

JEON, I. J.; SAUNDERS, S. R. Effect of Oligosaccharide Formation on the Cryoscopic Measurements of Enzymatic Hydrolysis of Lactose in Dairy Products. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 1, p. 245–246, 1986.

JONES, A. D.; TIER, C. M.; WILKINS, J. P. G. Analysis of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin and lactose in skimmed milk powder by capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 822, n. 1, p. 147–154, 1998.

KEENEY, M.; BASSETTE, R. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reaction in milk products. **Journal of Dairy Science**, v. 42, n. 6, p. 945–960, 1958.

KIM, J. Dairy food consumption is inversely associated with the risk of the metabolic syndrome in Korean adults. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 26, n. SUPPL.1, p. 171–179, 2013.

KIM, S. H.; LIM, K. P.; KIM, H. S. Differences in the Hydrolysis of Lactose and Other Substrates by β -D-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2264–2269, 1997.

KRATZ, M.; BAARS, T.; GUYENET, S. The relationship between high-fat dairy

consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 1, p. 1–24, 2013.

KURAMOTO, S. et al. Standardization of the Harland-Ashworth test for whey protein nitrogen. **Scientific Journal Series of Minnesota Agricultural Experiment Station**, n. 3975, p. 28–38, 1958.

LAN, X. Y. et al. Effects of heating temperatures and addition of reconstituted milk on the heat indicators in milk. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. 653–658, 2010.

LEE, Y.-H.; LIN, T.-I. Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 681, n. 1, p. 87–97, 1996.

LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: Lactose intolerance in clinical practice - Myths and realities. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 93–103, 2008.

LUZZANA, M. et al. Milk lactose and lactulose determination by the differential pH technique. **Le Lait**, v. 83, n. 5, p. 409–416, 2003.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. **Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. v. 53

MANTOVANI, V. et al. Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides. **Electrophoresis**, v. 39, n. 1, p. 179–189, 2018.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. HPLC determination of lactulose in heat treated milk. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 851–857, 2013.

MARCONI, E. et al. Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 447–450, 2004.

MARTÍNEZ MONTERO, C. et al. Analysis of Low Molecular Weight Carbohydrates in Food and Beverages: A Review. **Chromatographia**, v. 59, n. 1–2, p. 15–30, 2004.

MARTINS, E. **HA-LACTASE™ referência para produtos lácteos sem lactose Aditivos e Ingredientes**. São Paulo, Brasil: Editora Insumos, 2016.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 230–236, 2010.

MCCARTHY, O. J.; SINGH, H. Physico-chemical Properties of Milk. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Eds.). **Advanced Dairy Chemistry - Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. 3rd. ed. New York: Springer-Verlag, 2009.

MCGREGOR, R. A.; POPPITT, S. D. Milk protein for improved metabolic health: A review of the evidence. **Nutrition and Metabolism**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2013.

MEINHART, A. D. et al. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v. 85, n.

1, p. 237–244, 2011.

MENDOZA, M. R.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. Chemical indicators of heat treatment in fortified and special milks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2995–2999, 2005.

MESHAM, B. D.; SHAKEEL, A.; SHAIKH, A. Chemical markers for monitoring heat damage of processed milk : Review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 1, p. 2073–2081, 2018.

MESSIA, M. C.; CANDIGLIOTA, T.; MARCONI, E. Assessment of quality and technological characterization of lactose-hydrolyzed milk. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 910–917, 2007.

MISSELWITZ, B. et al. Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. **United European Gastroenterology Journal**, v. 1, n. 3, p. 151–159, 2013.

MONAKHOVA, Y. B. et al. NMR spectroscopy as a screening tool to validate nutrition labeling of milk, lactose-free milk, and milk substitutes based on soy and grains. **Dairy Science and Technology**, v. 92, n. 2, p. 109–120, 2012.

MONTILLA, A.; MORENO, F. J.; OLANO, A. A Reliable Gas Capillary Chromatographic Determination of Lactulose in Dairy Samples. **Chromatographia**, v. 62, n. 5–6, p. 311–314, 2005.

MORALES, F. J. HYDROXYMETHYLFURFURAL (HMF) AND RELATED COMPOUNDS. In: STADLER, R. H.; LINEBACK, D. R. (Eds.). . **Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2008. p. 135–174.

MORALES, F. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. HMF formation during heat-treatment of milk-type products as related to milkfat content. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 5, p. 855–859, 1999.

MORALES, F. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Hydroxymethylfurfural determination in infant milk-based formulas by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Food Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 525–531, 2001.

MORALES, F. J.; ROMERO, C.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 193–200, 2000.

MORALES, F.; ROMERO, C.; JIMENEZ-PEREZ, S. Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk : hydroxymethylfurfural and available lysine content. **International Journal of Food Science and Tecnology**, v. 31, p. 411–418, 1996.

MORTIER, L. et al. Intrinsic indicators for monitoring heat damage of consumption milk. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment (BASE)**, v. 4, n. 4, p. 221–225, 2000.

MOSCONE, D. et al. Rapid determination of lactulose in milk by microdialysis and biosensors. **The Analyst**, v. 124, n. 3, p. 325–329, 1999.

- NEVES, L. N. DE O.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Effects of enzymatic lactose hydrolysis on thermal markers in lactose-free UHT milk. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 9, p. 3518–3524, 2020.
- NEVES, L. N. O. **Desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para avaliação de indicadores de tratamento térmico em leite UHT**. Juiz de Fora-MG, Brasil.: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015.
- NEVES, L. N. O. et al. Alternative method for lactulose quantification in the presence of lactose in milk using HILIC with refractive index detection. **Analytical Methods**, v. 9, p. 4657–4662, 2017.
- NEVES, L. N. O.; SILVA, P. H. F.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Determinação espectrofotométrica de WPNI e HMF em leite UHT através da análise por componentes principais. **Química Nova**, v. 39, p. 741–747, 2016.
- NIJPELS, H. H. et al. Application of Cryoscopy for the Measurement of Enzymatic Hydrolysis of Lactose. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 6, p. 1684–1687, 1980.
- O'BRIEN, J. Non-enzymatic degradation pathways of lactose and their significance in dairy products. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Eds.). . **Advanced Dairy Chemistry. Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. 3rd. ed. New York: Springer-Verlag, 2009. p. 231–294.
- OECD/FAO. Dairy and dairy products. In: **OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028**. Rome, Italy: OECD Publishing, 2019. p. 180–189.
- OLANO, A.; CALVO, M. M. Kinetics of lactulose, galactose and epilactose formation during heat-treatment of milk. **Food Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 239–248, 1989.
- PANESAR, P. S.; KUMARI, S. Lactulose: Production, purification and potential applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 940–948, 2011.
- PARKER, A. M.; WATSON, R. R. Lactose Intolerance. In: WATSON, R. R.; COLLIER, R. J.; PREEDY, V. R. (Eds.). . **Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease**. 1st. ed. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 205–211.
- PATERSON, A. H. J. Production and Uses of Lactose. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Eds.). . **Advanced Dairy Chemistry - Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. 3rd. ed. New York: Springer-Verlag, 2009. p. 105–120.
- PEREDA, J. et al. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1974–1979, 2009.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- RITOTA, M. et al. New trends for the evaluation of heat treatments of milk. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, n. Article ID 1864832, p. 12p., 2017.
- ROSOLEN, M. D. et al. Lactose hydrolysis in milk and dairy whey using microbial β -galactosidases. **Enzyme Research**, p. 1–7, 2015.

RUIZ-MATUTE, A. I. et al. Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, n. 2, p. 164–169, 2012.

SAKKAS, L. et al. Assessment of heat treatment of various types of milk. **Food Chemistry**, v. 159, p. 293–301, 2014.

SALTMARCH, M.; LABUZA, T. P. Nonenzymatic Browning via the Maillard Reaction in Foods. **Diabetes**, v. 31, n. June, p. 29–36, 1982.

SCHUSTER-WOLFF-BÜHRING, R.; MICHEL, R.; HINRICHS, J. A new liquid chromatography method for the simultaneous and sensitive quantification of lactose and lactulose in milk. **Dairy Science and Technology**, v. 91, p. 27–37, 2011.

SHIPE, W. F. The freezing point of milk. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 42, n. 11, p. 1745–1762, 1959.

SIKORSKI, Z. E.; POKORNY, J.; DAMODARAN, S. Physical and chemical interactions of components in food systems. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. (Eds.). . **Fennema's Food Chemistry**. 4th. ed. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. p. 849–884.

SILVA, P. H. F. DA. **Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 1st. ed. Juiz de Fora: Templo, 2004.

SILVEIRA, M. F. et al. Simultaneous determination of lactulose and lactose in conserved milk by HPLC-RID. **Journal of Chemistry**, v. 2015, n. Article ID 185967, p. 6, 2015.

SIQUEIRA, K. B. O Mercado Consumidor de Leite e Derivados. **Circular Técnica 120 - Embrapa**, p. 1–17, 2019.

SOGA, T.; SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Chemistry**, v. 69, p. 339–344, 2000.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Eletroforese Capilar: uma breve introdução. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.

SUNDS, A. V. et al. Maillard reaction progress in UHT milk during storage at different temperature levels and cycles. **International Dairy Journal**, v. 77, p. 56–64, 2018.

SWAISGOOD, H. E. Chapter 15. Characteristics of milk. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. (Eds.). . **Fennema's Food Chemistry**. 4th. ed. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. p. 885–921.

TAN, R. Significance of Lactose in Dairy Products. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Eds.). . **Advanced Dairy Chemistry - Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. 3rd. ed. New York: Springer-Verlag, 2009. p. 35–104.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v.

20, n. 5, p. 493–511, 1997.

TRANI, A. et al. Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk. **Food Chemistry**, v. 233, p. 385–390, 2017.

VALERO, E. et al. Chemical and sensorial changes in milk pasteurised by microwave and conventional systems during cold storage. **Food Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 77–81, 2000.

VAN RIEL, J.; OLIEMAN, C. Selectivity control in the anion-exchange chromatographic determination of saccharides in dairy products using pulsed amperometric detection. **Carbohydrate Research**, v. 215, n. 1, p. 39–46, 1991.

VAN SCHEPPINGEN, W. B. et al. Selective and sensitive determination of lactose in low-lactose dairy products with HPAEC-PAD. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1060, n. June, p. 395–399, 2017.

VAZ, F. A. S. et al. Chromophoreasy, an excel-based program for detection and integration of peaks from chromatographic and electromigration techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1899–1911, 2016.

VAZ, F. A. S.; DE OLIVEIRA, C. L. M.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Fundamentos de eletroforese capilar: Uma abordagem por animações. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 732–737, 2015.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.; GEURTS, T. Chapter 2. Milk Components. In: WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. (Eds.). . **Dairy Science and Technology**. 2nd. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006a. p. 17–108.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.; GEURTS, T. Chapter 1. Milk: Main Characteristics. In: WALSTRA, P.; WOUTERS, J.; GEURTS, T. (Eds.). . **Dairy Science and Technology**. [s.l.] CRC Press, 2006b. p. 3–16.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.; GEURTS, T. Chapter 7. Heat treatment. In: WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. (Eds.). . **Dairy Science and Technology**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006c. p. 225–272.

WANG, W.; WU, Y.; ZHANG, D. Association of dairy products consumption with risk of obesity in children and adults: a meta-analysis of mainly cross-sectional studies. **Annals of Epidemiology**, v. 26, n. 12, p. 870- 882.e2, 2016.

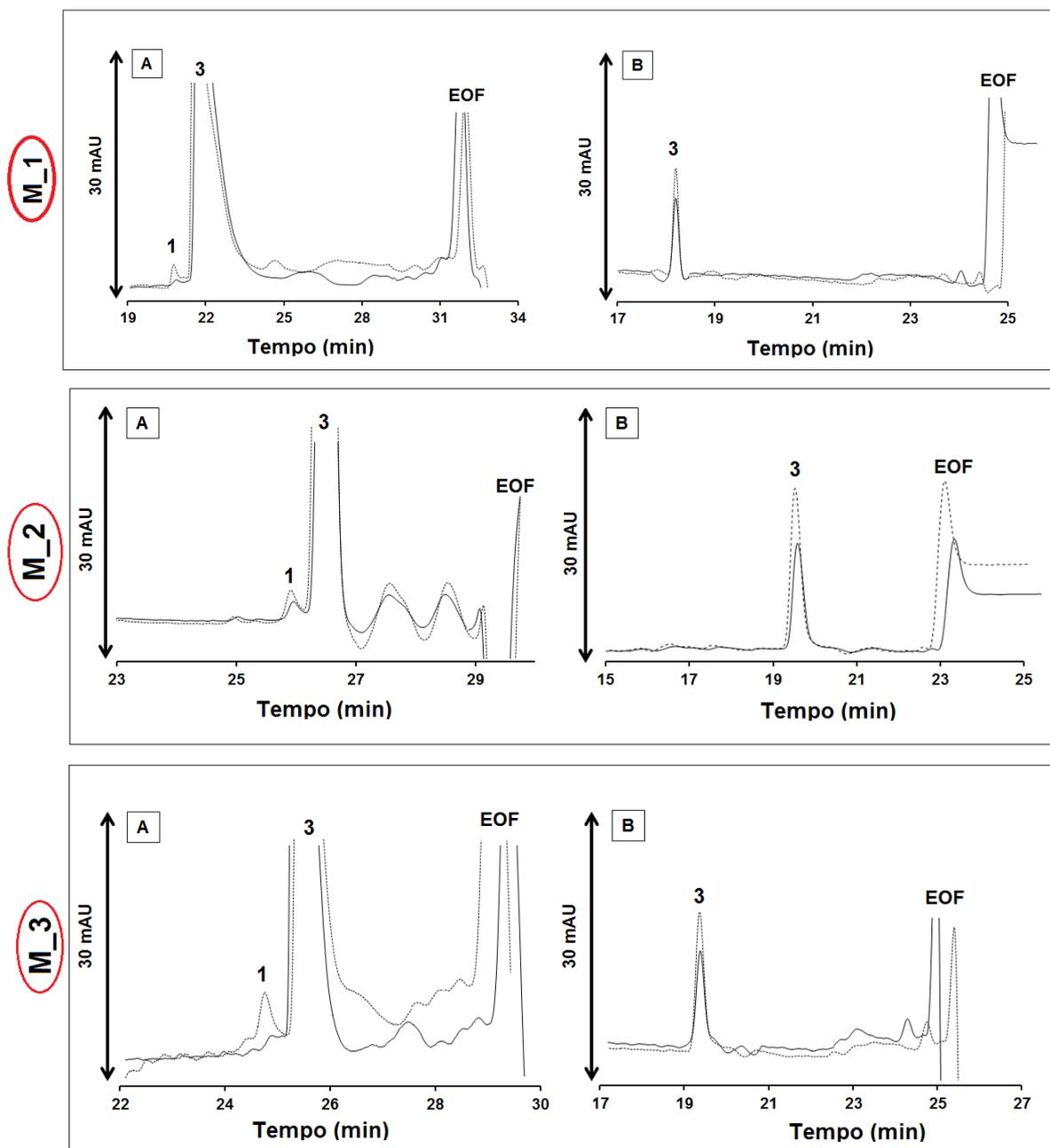
WILLETT, W. C.; LUDWIG, D. S. Milk and health. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 7, p. 644–654, 2020.

WOLF, A.; BRAY, G. A.; POPKIN, B. M. A short history of beverages and how our body treats them. **Obesity Reviews**, v. 9, n. 2, p. 151–164, 2008.

ZAGORSKA, J.; CIPROVICA, I. Evaluation of Factors Affecting Freezing Point of Milk. **International Journal of Nutrition and Food Engineering**, v. 7, n. 2, p. 106–111, 2013.

APÊNDICE A – PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LACTULOSE E LACTOSE EM LEITE UHT CONVENCIONAL

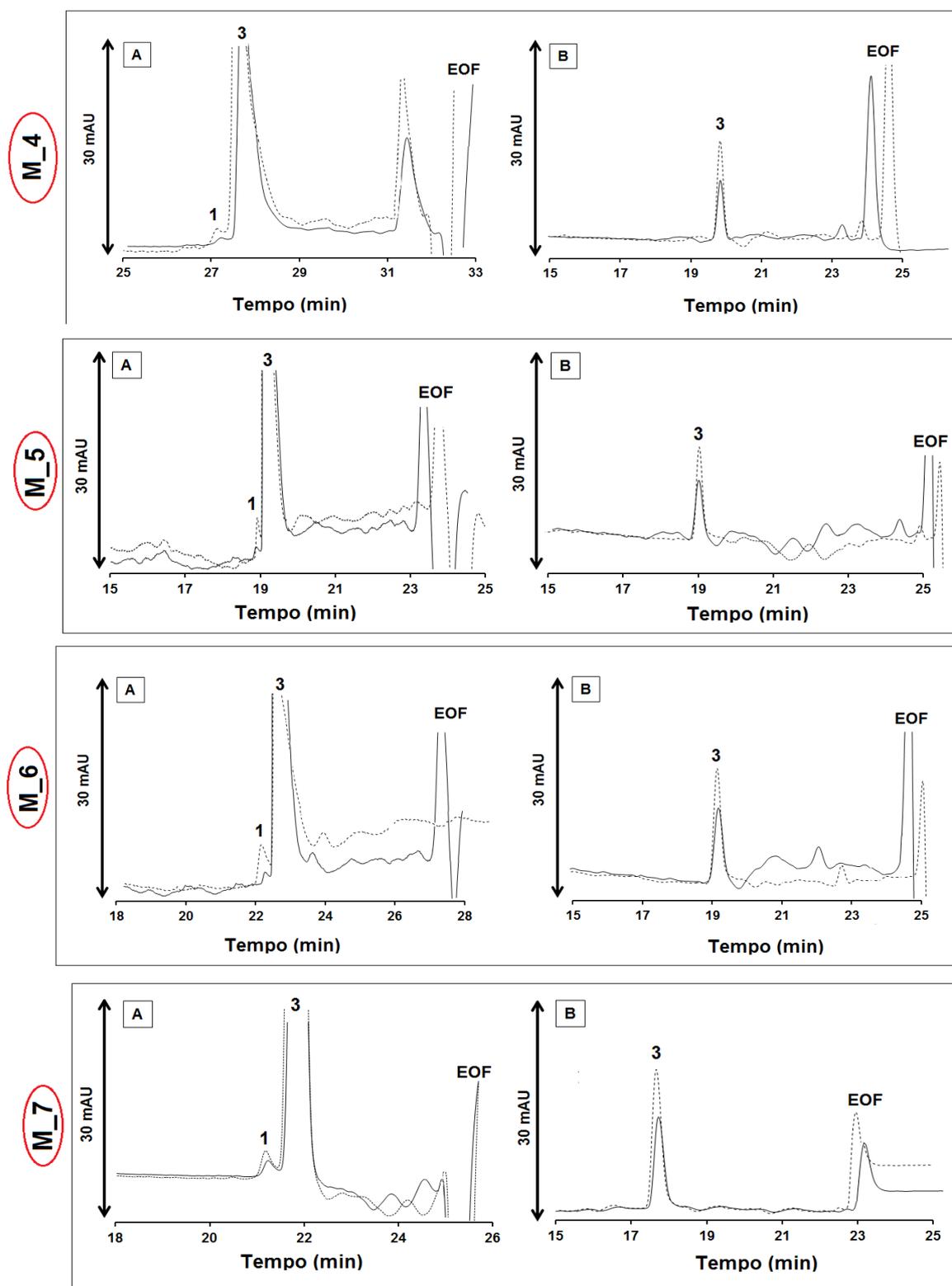
Figura 6.1 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_1 a M_3. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

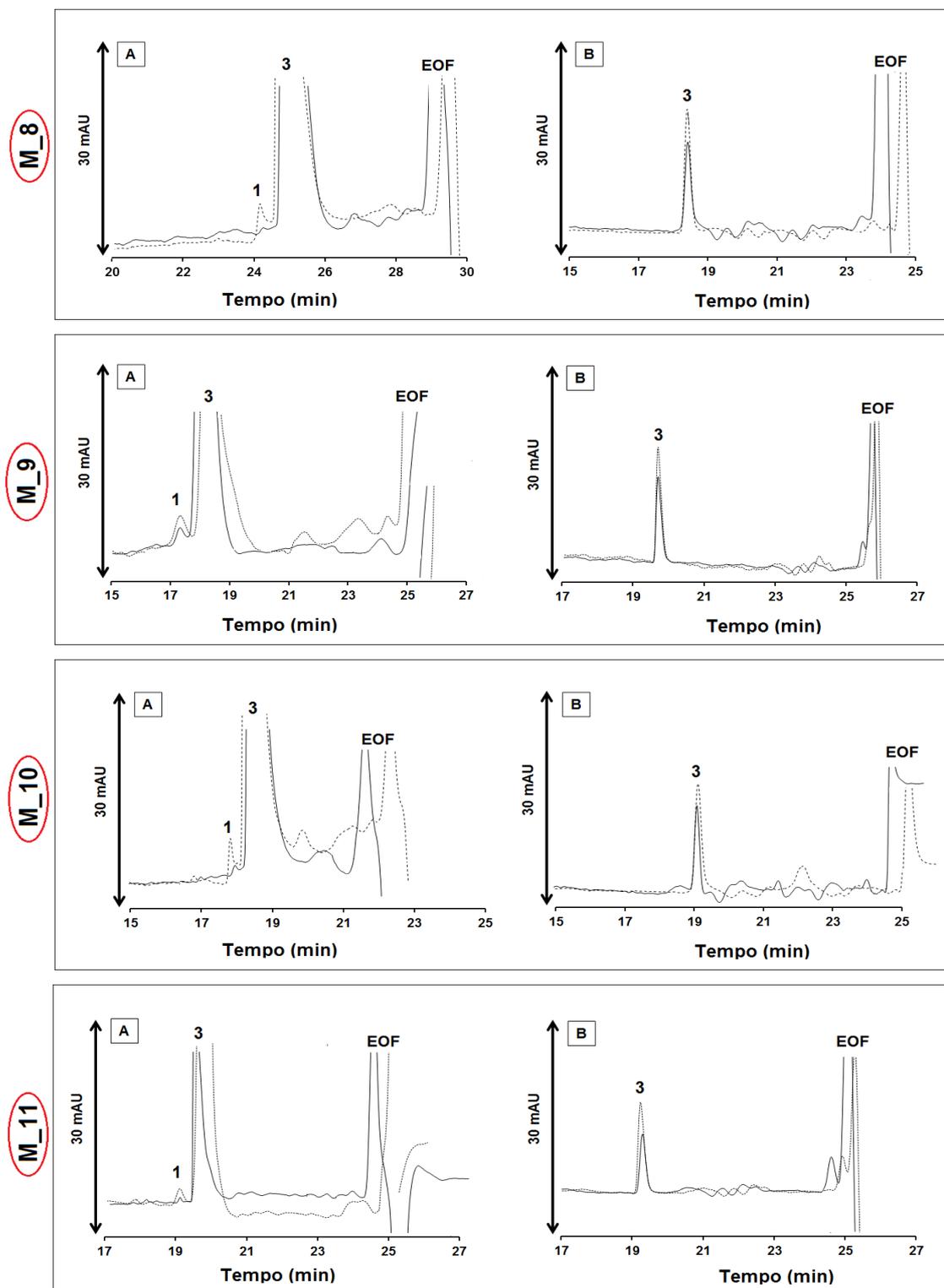
Condições experimentais: extração amostra (método Carrez), capilar (TSP 75 μm i.d., 50,0 cm L_E), injeção (10 mbar/1 s), tensão (-15 kV), temperatura (20 $^{\circ}\text{C}$), detecção (350 nm, referência em 275 nm).

Figura 6.2 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_4 a M_7. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato a amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose



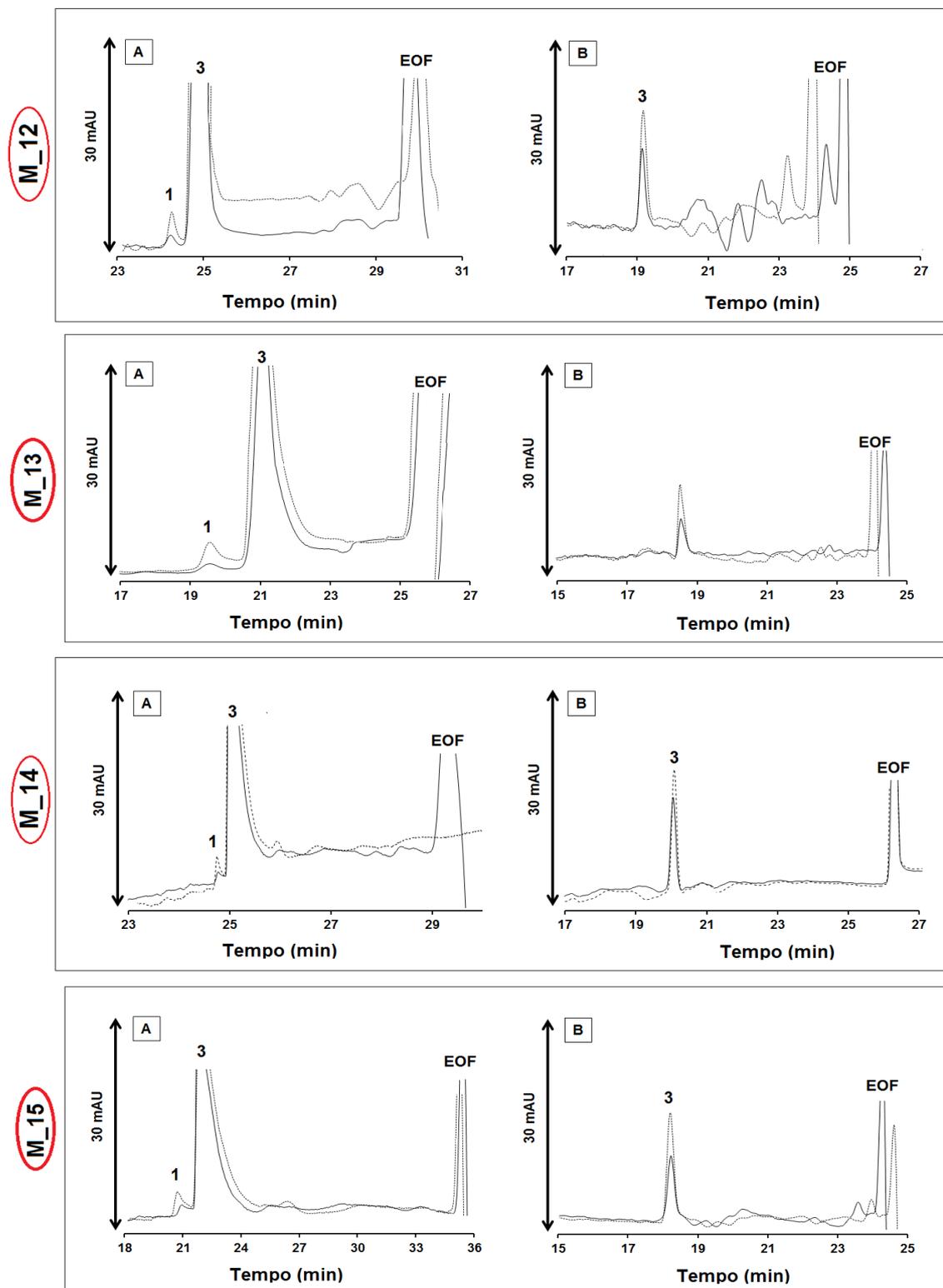
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).
Condições experimentais: idem Figura 6.1.

Figura 6.3 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_8 a M_11. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose



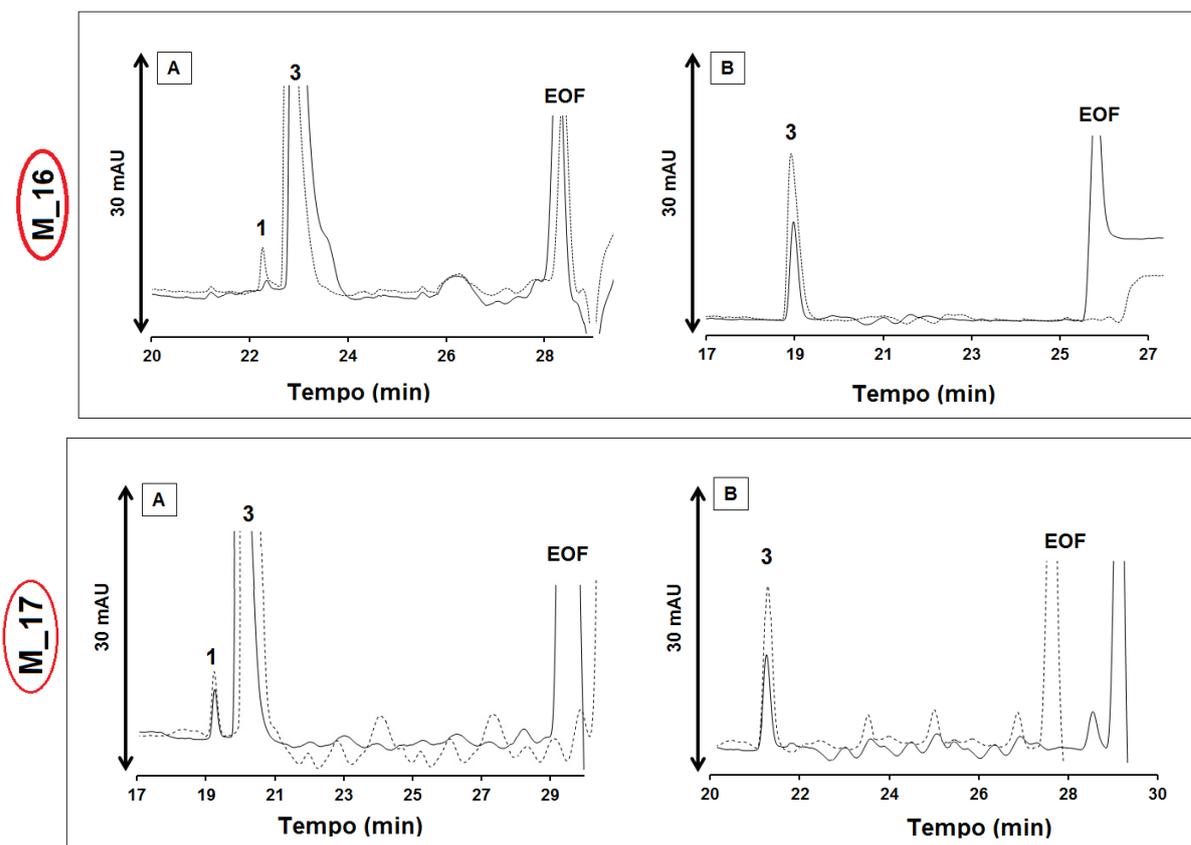
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).
Condições experimentais: idem Figura 6.1.

Figura 6.4 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_12 a M_15. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).
Condições experimentais: idem Figura 6.1.

Figura 6.5 – Perfis eletroforéticos obtidos na determinação de lactulose (A) e lactose (B) para as marcas de leite UHT convencional M_16 e M_17. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose e (3) lactose

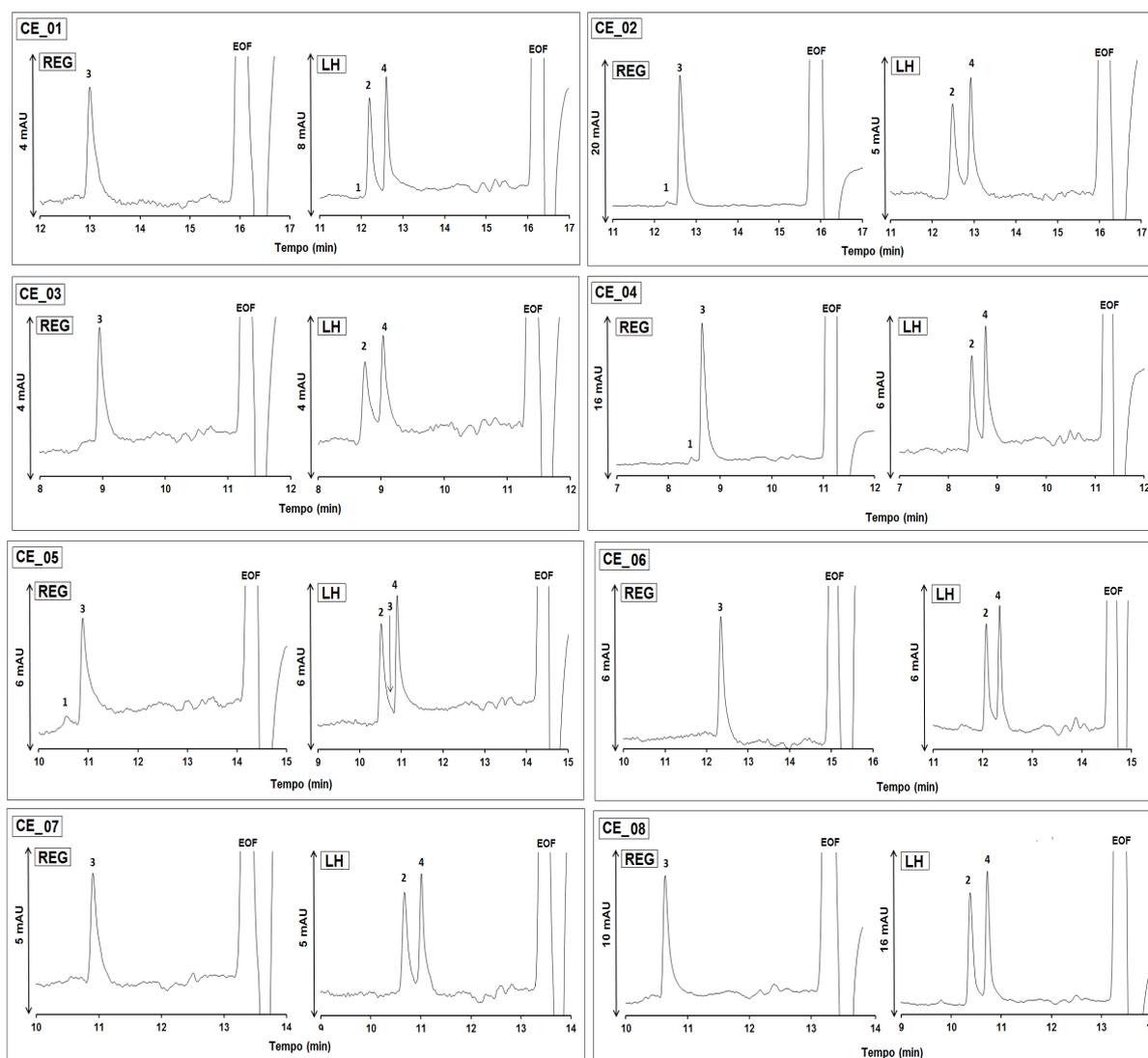


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Condições experimentais: idem Figura 6.1.

APÊNDICE B – PERFIS ELETROFORÉTICOS OBTIDOS NA ETAPA DE OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DO MÉTODO CZE-UV

Figura 6.6 – Perfis eletroforéticos obtidos para leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) submetidos aos ensaios CE_01 a CE_08 para otimização dos parâmetros instrumentais via planejamento Box-Behnken 3³. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Condições experimentais: extração da amostra (método de clarificação com Carrez I e II), detecção (350 nm, referência em 275 nm), capilar (TSP 75 μ m i.d., 50,0 cm L_E). *Parâmetros instrumentais:*

CE_01 (10 mbar/ 2s, -15 kV, 22 °C),

CE_02 (20 mbar/ 2s, -15 kV, 22 °C),

CE_03 (10 mbar/ 2s, -20 kV, 22 °C),

CE_04 (20 mbar/ 2s, -20 kV, 22 °C),

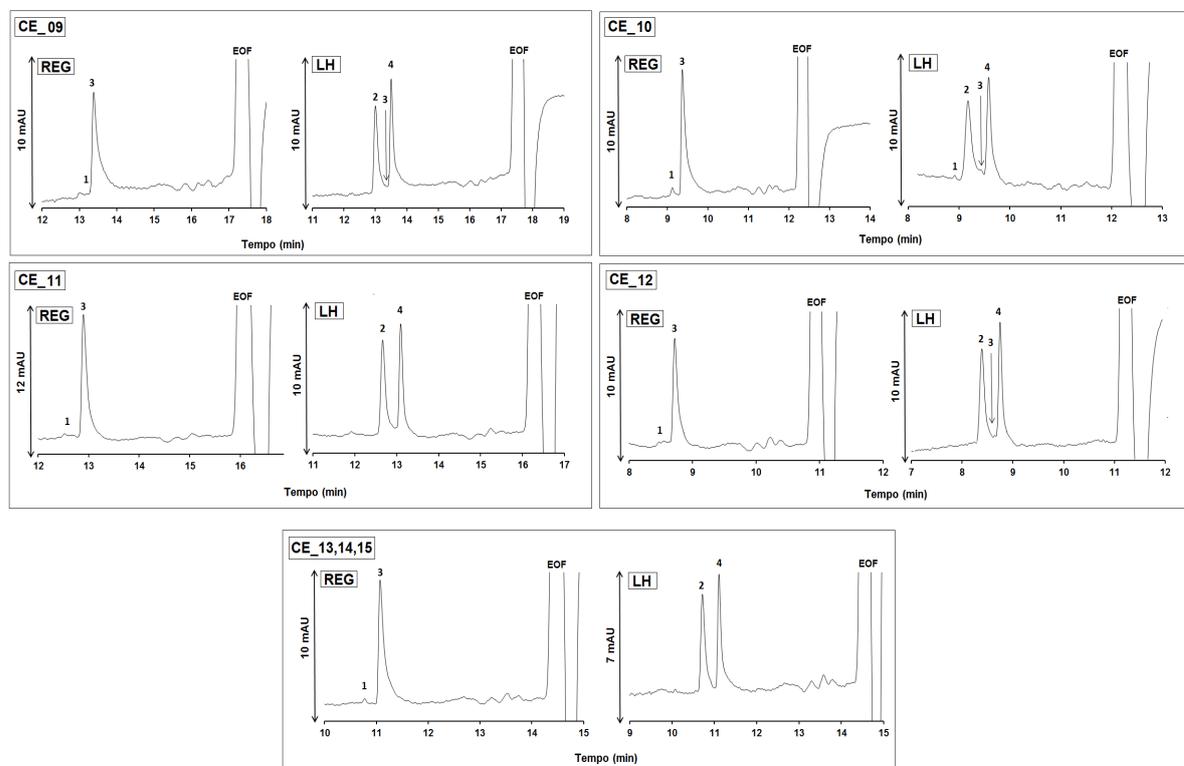
CE_05 (10 mbar/ 2s, -17 kV, 20 °C),

CE_06 (20 mbar/ 2s, -17 kV, 20 °C),

CE_07 (10 mbar/ 2s, -17 kV, 25 °C),

CE_08 (20 mbar/ 2s, -17 kV, 25 °C).

Figura 6.7 – Perfis eletroforéticos obtidos para leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) submetidos aos ensaios CE_09 a CE_15 para otimização dos parâmetros instrumentais via planejamento Box-Behnken 3³. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Condições experimentais: extração da amostra (método de clarificação com Carrez I e II), detecção (350 nm, referência em 275 nm), capilar (TSP 75 μ m i.d., 50,0 cm L_E). *Parâmetros instrumentais:*

CE_09 (15 mbar/ 2s, -15 kV, 20 °C),

CE_10 (15 mbar/ 2s, -20 kV, 20 °C),

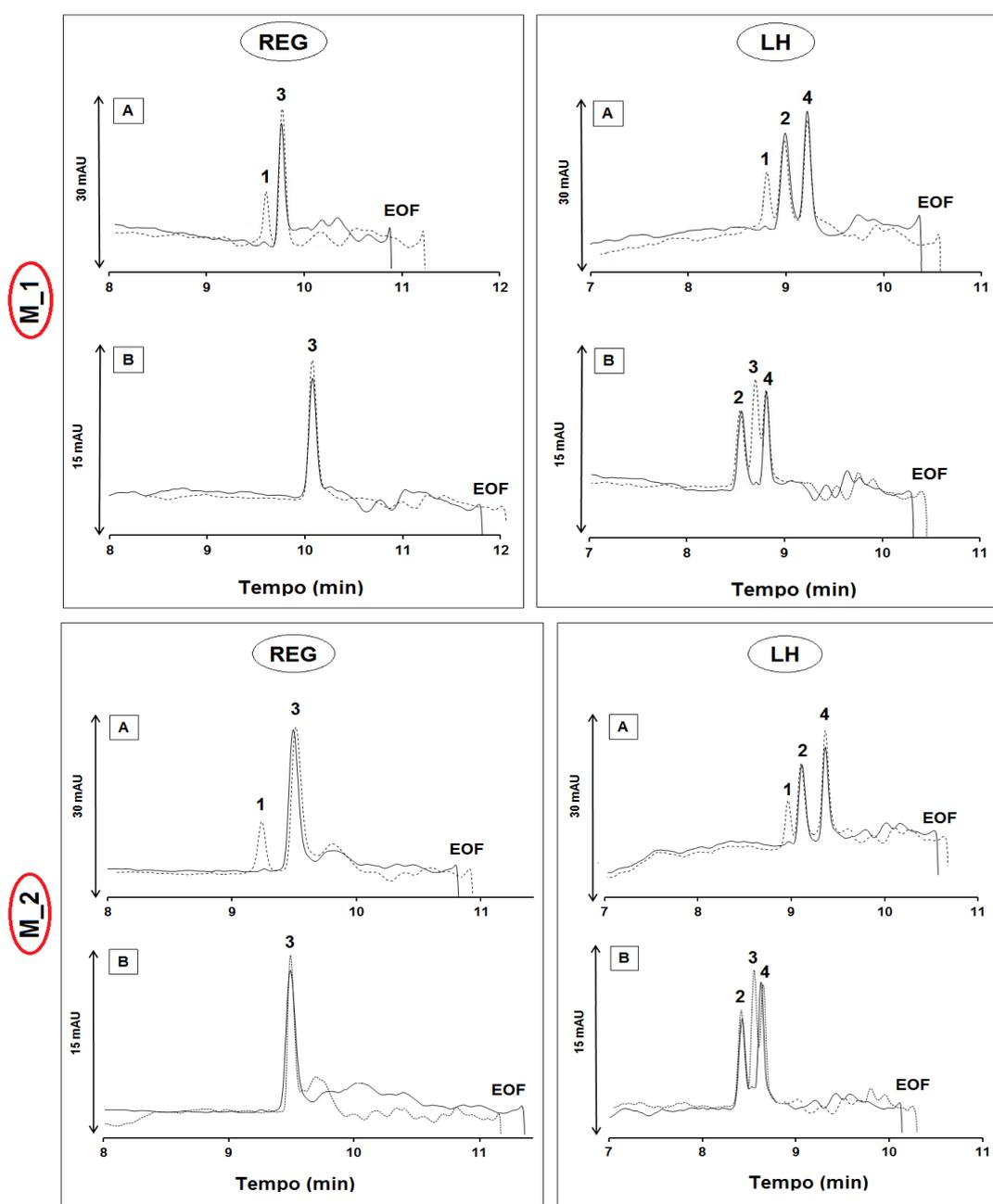
CE_11 (15 mbar/ 2s, -15 kV, 25 °C),

CE_12 (15 mbar/ 2s, -20 kV, 25 °C),

CE_13, CE_14, CE_15 (15 mbar/ 2s, -17 kV, 22 °C).

APÊNDICE C – PERFIS ELETROFORÉTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LACTULOSE E LACTOSE EM LEITE UHT CONVENCIONAL E HIDROLISADO

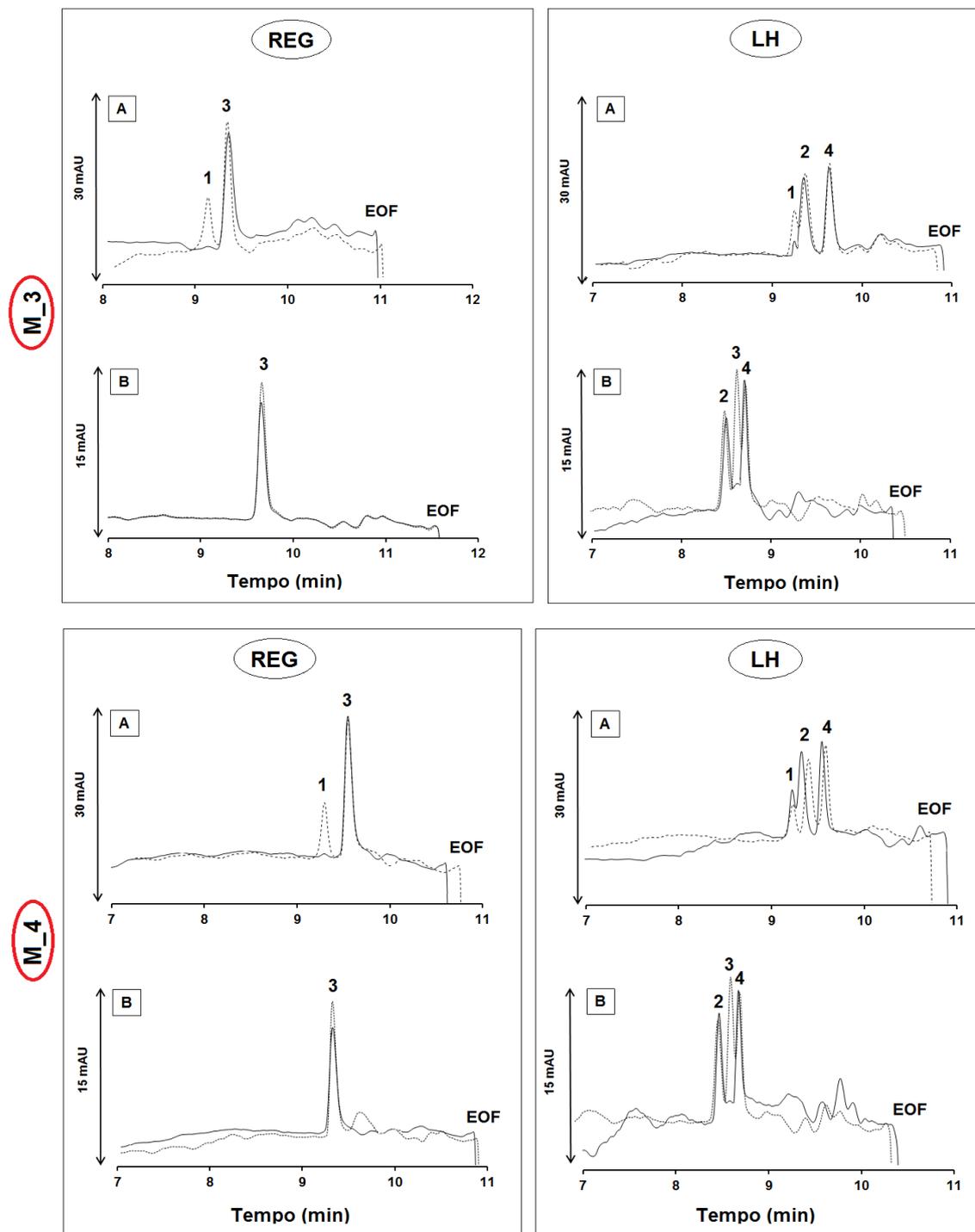
Figura 6.8 – Eletroferogramas obtidos na quantificação de lactulose (A) e lactose (B) nas amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) das marcas M_1 e M_2. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

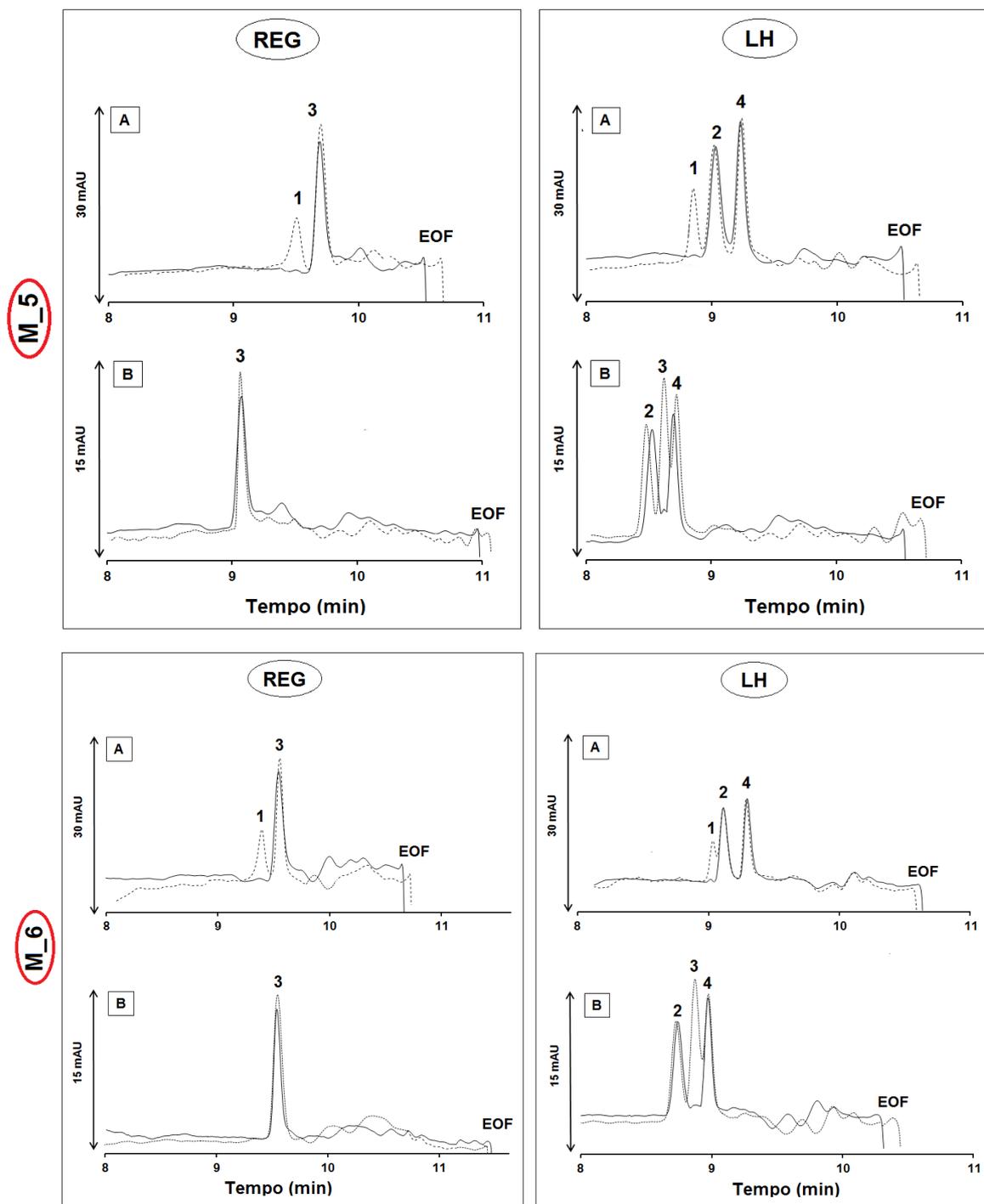
Condições experimentais: extração da amostra (TCA 40% m/v), injeção (15 mbar/ 2s), tensão (-20 kV), temperatura (20 °C), detecção (350 nm, referência em 275 nm), capilar (TSP 75 μ m i.d., 50,0 cm LE).

Figura 6.9 – Eletroferogramas obtidos na quantificação de lactulose (A) e lactose (B) nas amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) das marcas M_3 e M_4. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).
Condições experimentais: idem Figura 6.8.

Figura 6.10 – Eletroferogramas obtidos na quantificação de lactulose (A) e lactose (B) nas amostras de leite UHT convencional (REG) e hidrolisado (LH) das marcas M_5 e M_6. Linha cheia: sinal analítico do extrato da amostra, linha tracejada: sinal analítico do extrato da amostra + padrão. Picos: (1) lactulose, (2) glicose, (3) lactose e (4) galactose



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).
Condições experimentais: idem Figura 6.8.