

INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA
CÂMPUS SÃO MIGUEL DO OESTE
TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

JHENIFER BAREA
MAIARA SPIECKER

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS LANE-EYNON E GLICOSE OXIDASE PARA
DETERMINAÇÃO TEOR DE LACTOSE RESIDUAL LEITE UHT ZERO LACTOSE**

São Miguel do Oeste – SC

2023

**Avaliação dos métodos de Lane-Eynon e Glicose Oxidase para determinação
do teor de lactose residual em leite UHT Zero Lactose**

Projeto do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Tecnologia em Alimentos do Câmpus São Miguel do Oeste do Instituto Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do diploma de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Patrícia Fernanda Schons

Coorientador: Stefany Grützmänn Arcari

São Miguel do Oeste – SC

2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família, minha mãe Elisete, meu pai Edio, meus irmãos Matheus e Pedro, minhas cunhadas Polyana e Manuella, que sempre foram meu alicerce, minha força, que me apoiaram em todos os momentos e nunca me deixaram desistir. Minha segunda família (Albani), por me acolher e ajudar em todos os projetos, por todo o carinho, cuidado e compreensão.

Ao meu esposo, Claudinei, por ter sido paciente, por todo o apoio durante o período do TCC, por sempre cuidar de mim e ser meu suporte, sem seu amor e cuidado eu não teria conseguido.

Aos meus sobrinhos: Cauã, Vitor, Paloma e Ana Clara, vocês são a alegria da minha vida, ser tia ressignificou minha existência.

Aos meus amigos, por terem dado apoio e compreendido o tempo de dedicação onde não estive tão presente, por estarem sempre na torcida.

A professora Patrícia Schons, pela amizade de longa data que agora se transformou nesta orientação, grata pelos ensinamentos e pela troca de conhecimentos, você é luz e força por onde passa.

A professora Stefany Arcari, por toda a paciência e dedicação com nosso trabalho, que honra poder absorver conhecimentos desta grande pesquisadora pela qual sinto imensa admiração. Obrigada pelas palavras de incentivo quando estávamos perdidas, por sempre ter um minutinho e um sorriso no rosto para melhorar nosso dia.

A técnica de laboratório e amiga Ane Luize de Oliveira, pelo acolhimento e conselhos durante o desenvolvimento do trabalho, pelos auxílios na organização dos laboratórios e palavras de incentivo.

A vigilante Cristiane e demais colaboradores do IFSC - São Miguel do Oeste, agradecemos por toda a ajuda e recepção nos domingos em que trabalhamos no laboratório.

E por fim a minha colega Jhenifer, por ter embarcado comigo nesta louca jornada que foi nosso trabalho, obrigada pela parceria e pela força que fomos uma pra outra, por sempre estar a ouvidos e pronta para ajudar, te admiro muito e fico feliz de termos concluído esta etapa juntas, significa muito pra nossa jornada.

Maiara Norma Spiecker

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família, meus pais Ivanete e Amantino e meus irmãos Beatriz e Arthur, que sempre estiveram me apoiando em todos os momentos e sempre acreditaram que um dia este momento chegaria. Gostaria de agradecer minha amiga Fernanda pelas palavras de incentivo nos momentos de dificuldade.

Quero agradecer também às professoras, Patrícia e Stefani pelo apoio e a orientação para que este projeto fosse concluído. A toda rede de apoio dos colaboradores do IFSC-São Miguel do Oeste, que nos auxiliaram na organização dos laboratórios e nos momentos de dificuldades estruturais.

A minha colega Maiara, que teve toda a paciência do mundo nesta jornada, obrigada por me proporcionar esta experiência.

E por fim quero agradecer a Deus, pelo suporte nos momentos de dificuldades e dúvidas.

Jhenifer Baréa

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS LANE-EYNON E GLICOSE OXIDASE PARA
DETERMINAÇÃO TEOR DE LACTOSE RESIDUAL LEITE UHT ZERO LACTOSE**

JHENIFER BAREA
MAIARA SPIECKER

Aprovado em ____/____/____.

Patrícia Fernanda Schons – Professora do IFSC, São Miguel do Oeste
Orientadora

Tiago Favero – Professor do IFSC, São Miguel do Oeste
Banca

Fernanda Broch Stadler – Professora do IFSC, São Miguel do Oeste
Banca

SUMÁRIO

RESUMO

1 INTRODUÇÃO

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de leite no Brasil

2.2 Leite UHT

2.3 Lactose

2.4 Intolerância a Lactose x APLV (Alergia à proteína do leite de vaca)

2.5 Lactase

2.6 Hidrólise Industrial da Lactose

2.7 Legislação

2.8 Métodos analíticos

2.8.1 Método Titulométrico – LANE-EYNON

2.8.2 Método enzimático Glicose Oxidase

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

3.2 Objetivos Específicos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

4.2 Análises

4.2.1 Lane-Eynon

4.2.2 Glicose Oxidase

4.2.3 Análise estatística de dados

5 RESULTADOS

6 CONCLUSÃO

7 REFERÊNCIAS

RESUMO

O leite é um alimento muito especial devido à sua rica composição. No cenário atual, muitos produtos têm sido formulados para atender às necessidades de diferentes tipos de consumidores. Um exemplo comum é a disponibilidade de leite sem lactose, destinado especialmente às pessoas com intolerância à lactose. É de extrema importância avaliar analiticamente esses produtos a fim de verificar se houve uma redução real no teor de lactose. Existem diferentes métodos disponíveis para quantificar a lactose em produtos lácteos. Neste trabalho, foi realizada uma avaliação do teor estimado de lactose residual em cinco amostras comerciais de leite UHT, que possuem a descrição "Zero Lactose" em seus rótulos. Essas amostras foram produzidas na região Sul do Brasil e adquiridas em supermercados da cidade de São Miguel do Oeste-SC. Foram testados dois métodos analíticos: o método titulométrico de Lane-Eynon, que se baseia na determinação do volume de amostra necessário para reduzir uma solução de Fehling de concentração conhecida, e o método enzimático de Glicose Oxidase. Uma hidrólise química foi realizada nas amostras como uma etapa adicional, antes da determinação do teor de lactose estimado. Nessa etapa, as amostras foram tratadas com ácido clorídrico e submetidas a uma temperatura de 100°C por 45 minutos. O objetivo dessa hidrólise foi estimar o teor de lactose por diferença, comparando os valores antes e depois da hidrólise. Os resultados obtidos pelo método de glicose oxidase indicaram que todas as amostras estavam em conformidade com a legislação vigente em relação ao teor estimado de lactose. Por outro lado, o método de Lane-Eynon se mostrou ineficiente, pois determina os açúcares redutores totais, sem diferenciar lactose, glicose e galactose.

Palavras chave: lactose, Lane-Eynon, glicose-oxidase, leite UHT, hidrólise química.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o capítulo III do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) "entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2020). Este tem grande importância na alimentação humana devido ao seu elevado valor nutritivo, fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais e vitaminas (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

O principal carboidrato presente no leite é a lactose, este é metabolizado no intestino por meio da ação da enzima lactase. A deficiência na produção enzimática de lactase acarreta em reação adversa, conhecida também como intolerância a lactose, que pode ocasionar dores abdominais, diarreia, vômito entre outros sintomas (ZYCHAR; OLIVEIRA, 2017). A intolerância a lactose não tem tratamento, recomenda-se aos pacientes uma dieta restritiva ou reduzida, de acordo com o grau da intolerância, de produtos lácteos, sendo que em alguns casos pode ser realizado o uso de medicamentos que contém a enzima lactase em conjunto com as refeições (MATTAR; MAZO, 2010).

Segundo Pereira (2012), as indústrias de alimentos já estão fabricando produtos com baixo teor ou zero lactose, com o intuito de abrangerem o mercado consumidor que apresenta este tipo de restrição em sua alimentação. Nestes casos os produtos, como o leite, recebem doses da enzima lactase, com o intuito de decompor a lactose em monossacarídeos digeríveis como a glicose e a galactose (DELGADO *et al.*, 2010).

No Brasil, existem leis para a rotulagem que preveem que os alimentos comercializados informem no rótulo a presença ou ausência de determinadas substâncias. Atualmente a RDC nº 136 de 8 de fevereiro de 2017, da Anvisa, os alimentos processados ou elaborados para eliminar ou reduzir o conteúdo de lactose, tornando-os adequados para indivíduos com restrição de lactose, são classificados como alimentos com restrição de lactose. Em termos de teor de lactose, os alimentos isentos de lactose devem conter menos de 0,1% de massa de lactose por quantidade de produto, o que corresponde a mais de 100 miligramas (mg) de lactose para cada 100 gramas ou mililitros de produto. A normativa também exige que a rotulagem

desses alimentos indique claramente a informação "sem lactose". Portanto, pessoas com restrições significativas a esse açúcar devem prestar atenção a essa rotulagem, uma vez que pode haver uma pequena quantidade de lactose presente no produto. Além disso, há uma regra específica para alimentos que contenham uma quantidade reduzida de lactose em sua composição, os quais devem ser rotulados como "baixo teor de lactose". Esses alimentos apresentam valores entre 0,1 e 1 g de lactose por 100 g ou mililitros de produto. Essas definições e requisitos são fundamentais para orientar e garantir a escolha adequada de alimentos por parte de indivíduos com restrições de lactose.

Neste cenário a realização deste estudo tem como objetivo avaliar o teor de lactose residual em amostras de leite semidesnatado UHT de marcas comerciais que contenham no rótulo a inscrição "Zero Lactose", comparando os resultados obtidos na determinação pelos métodos de Lane-Eynon e Glicose oxidase.

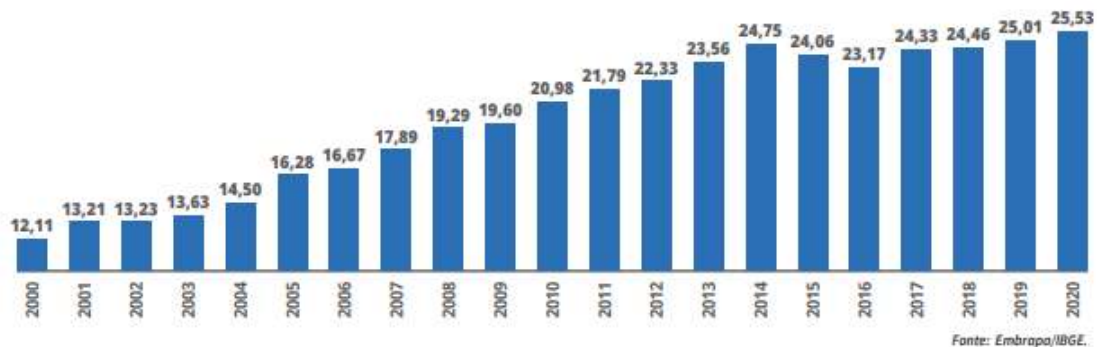
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de leite no Brasil

O leite é considerado uma das *commodities* mais importantes do mundo, sendo consumido *in natura* ou derivados por inúmeras pessoas em todo o mundo. No Brasil, a indústria de laticínios é o segundo segmento mais importante das indústrias do ramo alimentício. Em média, 116,5 equivalentes kg de leite são consumidos por cada habitante por ano, estes níveis de consumo variam consideravelmente entre os países sendo a renda um fator decisório (SIQUEIRA, 2019).

Em 2020, o ano de início da pandemia da Covid-19, a disponibilidade de leite no Brasil aumentou 2,8%, com volume de 734,08 milhões de litros superior a 2019. Os últimos dados da Pesquisa Trimestral do Leite/IBGE, mostrou produção recorde no país de 25,53 bilhões de litros (EMBRAPA, 2021), conforme mostra a figura 1.

Figura 1 - Produção Brasileira de leite sob inspeção: em bilhões de litros



Fonte: Anuário de Leite, Embrapa 2021.

Esse cenário sofreu mudanças em decorrência das consequências causadas pela pandemia, como a redução da renda e o endividamento das famílias brasileiras, o setor sofreu uma queda considerável em 2022. Outro fator agravante que reduziu a produção de leite brasileira foi o aumento no custo de produção (NEIVA, 2022).

Dotada de produção de 34,84 bilhões de litros de leite, em 2019, a atividade leiteira no Brasil se distribui por quase todo o país, sendo a região sul a 4ª maior produtora, como demonstrado na Figura 2 (ANUÁRIO EMBRAPA, 2021).

Figura 2 - Produção de leite nos estados brasileiros (2019).

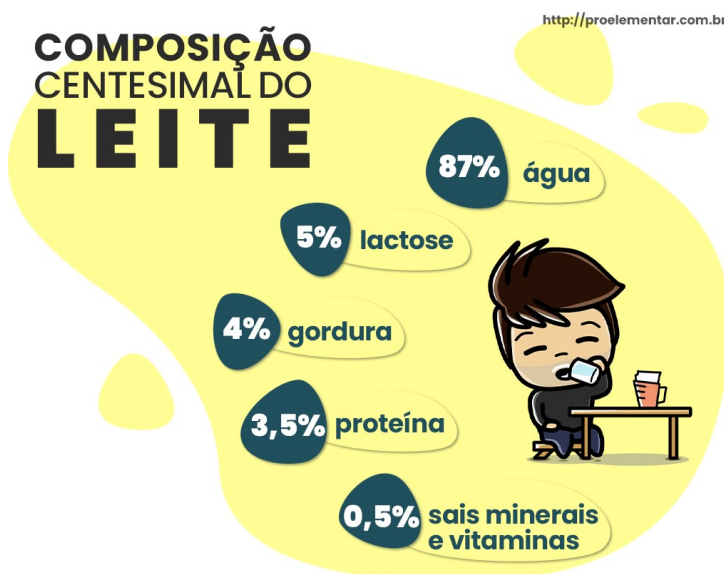
ESTADO	PRODUÇÃO (MIL LITROS)	PARTICIPAÇÃO PROD. BRASIL	PARTICIPAÇÃO ACUMULADA
Minas Gerais	9.447.549	27,11 %	27,11 %
Paraná	4.339.194	12,45 %	39,57 %
Rio Grande do Sul	4.270.799	12,26 %	51,82 %
Goiás	3.180.505	9,13 %	60,95 %
Santa Catarina	3.040.186	8,72 %	69,67 %
São Paulo	1.651.808	4,74 %	74,42 %
Rondônia	1.128.596	3,24 %	77,65 %
Bahia	1.068.451	3,07 %	80,72 %
Pernambuco	1.064.748	3,06 %	83,78 %
Ceará	797.368	2,29 %	86,06 %
Mato Grosso	657.526	1,89 %	87,95 %

Fonte: Anuário de Leite, Embrapa 2021.

2.2 Leite UHT

O leite é uma fonte nutritiva de grande importância, é um alimento considerado fonte de proteínas, gorduras, carboidratos e outros constituintes essenciais e possui a lactose como o principal carboidrato presente em sua composição. No leite cru, a lactose é responsável por 40% dos sólidos totais, 50% no leite desnatado e de 70 a 80% no soro (CUNHA *et al.*, 2008), como podemos observar na figura 3.

Figura 3: Composição do Leite



Fonte: JUNIOR, 2021.

Segundo o relatório publicado pela Associação Brasileira de Leite Longa Vida

(ABLV) o leite UHT representa no Brasil cerca de 62% do consumo, o segmento constitui 28% do destino do leite formal produzido no país e está presente em 90% dos lares. Pode-se ainda afirmar que o volume de leite UHT movimentado 25 bilhões/ano de reais se considerado seu valor finalizado nas gôndolas

O processo UHT é um tratamento térmico de fluxo contínuo, em que o leite é preaquecido, homogeneizado antes ou após a esterilização, esterilizado, resfriado e embalado assepticamente. Caracteriza-se pelo emprego de temperaturas entre 140 e 150 °C durante 2 a 4 segundos, para inoculação do produto (SÁ; BARBOSA, 1990). O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (BRASIL, 1997) estabelece como leite UHT : “O leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, 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”.

O tratamento térmico no leite UHT pode ser realizado pelo sistema direto, em que a esterilização do produto é obtida pela ação do calor proveniente da injeção direta de vapor. Neste sistema, o leite é preaquecido em temperatura entre 70 e 80 °C, é aquecido à temperatura de 130 a 150 °C, durante 2 a 4 segundos pela injeção de vapor quente e homogeneizado. Depois passa pela câmara de vácuo a fim de reduzir a temperatura e eliminar a água do vapor condensado e as substâncias presentes que podem causar odores indesejáveis ao produto. Em seguida, o leite é acondicionado assepticamente em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (LEWIS, 1986 SÁ, BARBOSA, 2011).

Outro sistema empregado para obtenção de leite UHT é o indireto, no qual se utiliza o mesmo princípio de permutação de calor por placas, como na pasteurização, ou melhor, o leite é aquecido pelo calor proveniente de dispositivos metálicos (placas ou tubos) condutores de energia calorífica. Como na pasteurização, o aquecimento destes dispositivos se dá por meio de água quente ou vapor (LEWIS, 1986; SÁ, BARBOSA, 2011).

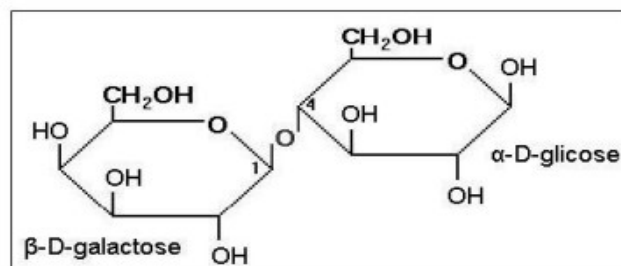
2.3 Lactose

A lactose, também conhecida como açúcar do leite, é um dissacarídeo formada pelos monossacarídeos glicose e galactose que são ligados através do grupo aldeído

da galactose ao carbono da glicose, formando a ligação glicosídica (1,4) (FERNANDES, 2014; BARBOSA, 2011). Existem duas formas isoméricas, a α -lactose e β -lactose, que diferem na posição da hidroxila e do hidrogênio do grupo redutor da lactose, o que a torna um açúcar redutor (ALMEIDA, 2014).

Este dissacarídeo pode ser hidrolisado pela enzima intestinal lactase (Figura 3) para então ser absorvido pela corrente sanguínea na forma de glicose e galactose, a estrutura está demonstrada na figura 2, (FERNANDES, 2014; BARBOSA, 2011).

Figura 4 - Estrutura química da lactose



Fonte: CAMPBELL (2000).

A intolerância à lactose é uma reação adversa causada pela deficiência enzimática da lactase no organismo. Segundo Zychar (2017), a intolerância à lactose pode ser classificada em quatro tipos:

- O primeiro e mais comum é a deficiência primária de lactase ou hipolactasia adulta. O termo hipolactasia está relacionado com a redução da ação da enzima lactase na mucosa do intestino, geralmente associados a fatores hereditários;
- A hipolactasia adquirida, está relacionada com a perda programada da atividade da lactase, podendo ser fisiológica ou decorrente de doenças que afetam a mucosa do intestino;
- O terceiro tipo é a intolerância congênita, trata-se de uma herança autossômica recessiva, sendo passada de geração para geração, ou seja, o recém nascido não apresenta atividade da enzima, como está relacionada a uma falha na absorção gástrica pode ser fatal na primeira infância;
- A intolerância ortogenética, quarto tipo, é caracterizada pela má absorção da lactose podendo se manifestar em qualquer fase da vida;

Os sintomas apresentados pelos pacientes geralmente são flatulência, dor tipo

cólica, diarreia e distensão abdominal. Estes sintomas são correlacionados com a quantidade de lactose ingerida pelo paciente, podendo variar de acordo com o grau de deficiência de lactase em cada caso (FERNANDES, 2014; HEYMAN, 2006).

Pesquisas apontam que cerca de 65% da população no mundo apresenta sintomas de má digestão da lactose, podendo este número ser superestimado devido ao autodiagnóstico (PEREIRA, 2012). No Brasil, segundo Cunha (2008), a deficiência ortogênica da lactose atinge 46 a 67% da população, variando conforme a etnia. Estudos apontam que a intolerância à lactose devido a má absorção é muito mais frequente em negros do que brancos (BARBOSA, 2011).

Para o tratamento é recomendado, inicialmente, a restrição do consumo de leite e produtos lácteos a fim de obter a remissão dos sintomas, porém a exclusão total da lactose deve ser evitada devido ao impacto nutricional causado ao paciente, portanto sugere-se a reintrodução gradual na dieta (ZYCHAR, 2017). Segundo Cunha, (2008) existem tipos de suplementação de lactose para pessoas intolerantes, como cápsulas de lactase e lactase líquida. Outra proposta para minimizar os efeitos causados pela intolerância à lactose pode ser o uso de alimentos funcionais que contêm culturas probióticas e prebióticas, estas podem garantir maior atividade enzimática, no caso de intolerantes, maior atividade da enzima lactase. Outra alternativa seria a ingestão de produtos isentos ou baixos em lactose, como por exemplo doce de leite com lactase, leites com adição de lactase, os lácteos fermentados e os queijos duros (FERNANDES, 2014).

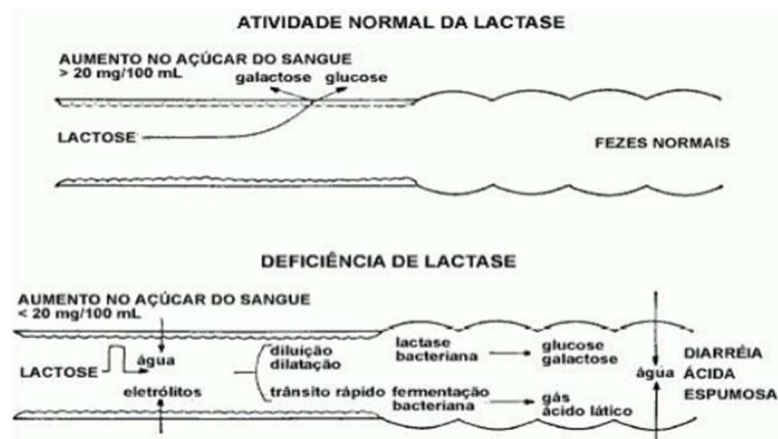
2.4 Intolerância a Lactose x APLV (Alergia à proteína do leite de vaca)

De acordo com Uggione e Fagundes (2006), apesar de apresentarem sinais e sintomas muito semelhantes (náuseas, vômito, dor abdominal e diarreia), as duas condições se desenvolvem de forma diferente no organismo. APLV ou alergia a proteína do leite de vaca, abrange apenas o sistema imune, acarretando reações contra o antígeno, já a intolerância a lactose é a ausência ou deficiência da enzima lactase que degrada a lactose presente no leite.

Nos quadros de intolerância à lactose, a enzima β -galactosidase responsável pela hidrólise apresenta uma redução parcial ou total de sua atividade enzimática. Sendo assim, o organismo não consegue metabolizar a lactose que foi ingerida e

transformá-la em glicose e galactose. Dessa forma, quando não ocorre a metabolização da lactose, ela fica armazenada no intestino grosso até sofrer a ação de bactérias da flora intestinal, que irão transformar a lactose em propionato, acetato e butirato, que posteriormente serão absorvidos pela mucosa intestinal conforme o demonstrado na Figura 5 (PERREIRA, 2019).

Figura 5 - Patogênese da intolerância da lactase.



Fonte: Izquierdo et al., (2011).

2.5 Lactase

A lactase é uma enzima que está presente em todos os mamíferos desde o nascimento, podendo diminuir sua produção ao longo da vida. As enzimas utilizadas em processos de deslactosação podem ser de origem microbiana (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*) ou de origem fúngica (*Aspergillus niger*, *Aspergillus orizae*). A estabilidade e a atividade da enzima utilizada depende da sua origem, sendo geralmente utilizado leveduras alimentares (TREVISAN, 2008).

A enzima lactase apresenta uma faixa ideal de pH e temperatura para maior eficiência, sendo o recomendado pH 6,9 ao 7,3 e uma temperatura em torno de 35°C (TREVISAN, 2008).

A velocidade das reações enzimáticas é influenciada pela concentração de enzima (lactase) ou substrato (lactose), pelo pH e pela temperatura. Na hidrólise da lactose, as primeiras amostras apresentam reação acelerada, devido a alta concentração de lactose (substrato). Após algumas horas a velocidade de hidrólise

diminui em função da redução da concentração (consumo) de lactose. Geralmente, valores extremos de pH inativam as enzimas. Em geral as enzimas reagem muito lentamente a temperaturas baixas. A lactase tem atividade ótima entre 39°C e 42 °C. Em temperaturas elevadas, ela perde seu poder de hidrolisar a lactose. Grande parte das enzimas é destruída por aquecimento acima de 70 °C (CARMINATTI, 2001).

2.6 Hidrólise Industrial da Lactose

A hidrólise enzimática da lactose pode ser realizada através de dois métodos, o enzimático e o químico, sendo o primeiro o mais empregado nos processos industriais, este consiste na hidrólise da lactose através da enzima lactase (DE BRITO, 2021).

Para a realização da hidrólise ácida são necessárias soluções diluídas de ácidos fortes como o sulfúrico e o clorídrico, as condições de processo devem ser severas quanto às margens de pH (1,5 a 2,0) e temperatura (100 a 150°C). Este processo não é tão empregado na indústria devido às alterações de cor e sabor no produto final (TREVISAN, 2008).

Segundo Brito (2021) o início do processo de produção ocorre na recepção do leite, este chega na unidade de beneficiamento através de caminhões isotérmicos e devem apresentar temperatura até 7 °C. Posteriormente é realizada uma etapa de filtração com a finalidade de remoção das impurezas de maior tamanho, seguindo para as etapas de clarificação e centrifugação, podendo ou não passar por uma etapa de padronização. Na sequência é realizada a etapa de pasteurização utilizando-se de um trocador de calor a placas. O leite então pode ser refrigerado ou seguir para a etapa de homogeneização, posteriormente é adicionado estabilizante, citrato de sódio, que tem por finalidade evitar a sedimentação do leite no processo de ultrapasteurização. Após o processo de esterilização (UHT) o leite é resfriado e adiciona-se a lactase, seguindo então para a etapa de envase em embalagem asséptica.

A temperatura do processo é relativamente baixa, o que torna a escolha do método mais vantajosa, pois propicia economia energética e não gera a desnaturação da proteína e o escurecimento enzimático (DE BRITO, 2021). O grau de hidrólise da lactose depende da dosagem da lactase no leite e das condições de processamento (TREVISAN, 2008). O processo de hidrólise pode ser realizado de formas diferentes

de acordo com a forma de produção da indústria (Figuras 6 e 7).

Figura 6. Fluxograma do leite Zero Lactose - adição da enzima no envase.

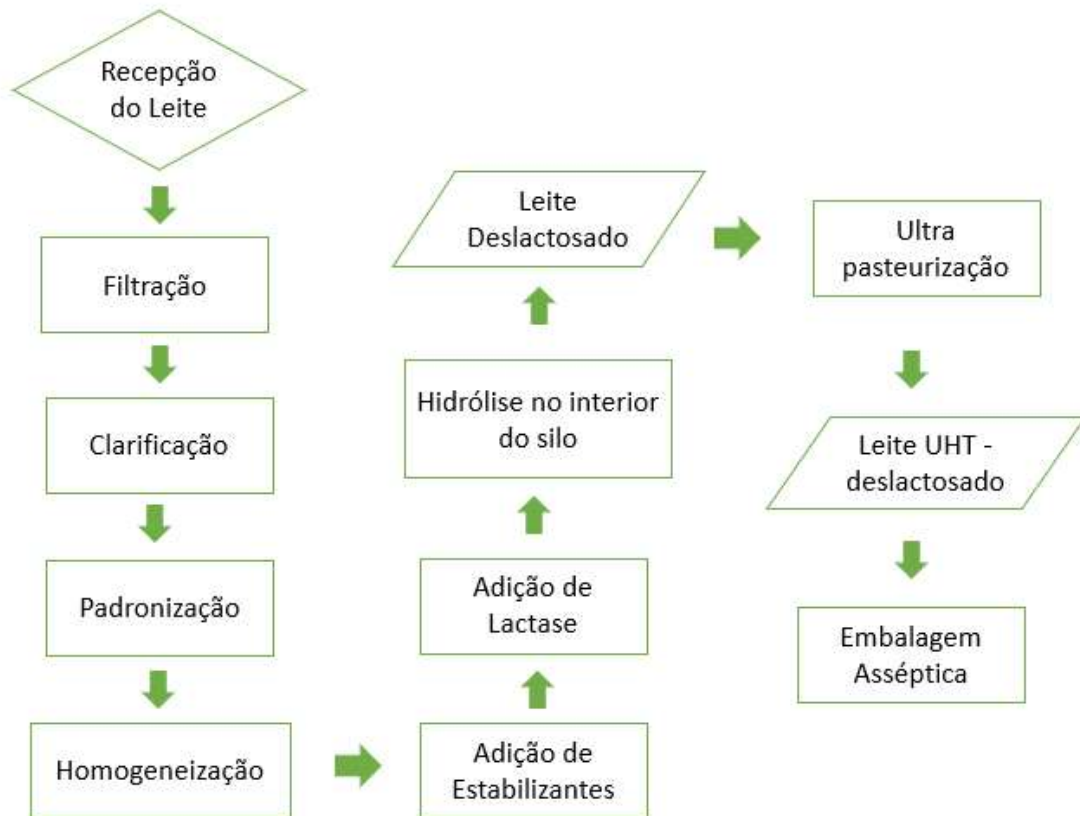


Fonte: as autoras

A hidrólise da lactose ocasiona modificações físicas e químicas, pois aumenta a solubilidade, o poder adoçante e a digestibilidade dos açúcares e a viscosidade, a textura e o paladar dos produtos (TREVISAN, 2008).

Ao adicionar a lactase no silo, é necessário aguardar o tempo de hidrólise da lactose, pois ao realizar o tratamento térmico para o envase do leite, a enzima é inativada, sendo assim no método de hidrólise no silo, a hidrólise deve ser acompanhada (por crioscopia), porém este método pode resultar em um teor de lactose residual maior no leite, já que há a inativação da lactase. Enquanto pelo método de adição no envase, o leite é envasado juntamente com a enzima, e a hidrólise acontece dentro da caixinha, sendo assim é mais garantido que ocorra uma hidrólise completa, pois a enzima não é inativada, o que resulta em menor teor de lactose residual no produto.

Figura 7 - Fluxograma do leite Zero Lactose - adição da enzima em silo.



Fonte: as autoras.

2.7 Legislação

No Brasil, a rotulagem do teor de lactose do leite é regulada através da RDC 727/2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os alimentos para dietas com restrição de lactose são classificados como isentos de lactose e baixo teor de lactose. Os alimentos considerados “isentos de lactose” contém quantidade de lactose igual ou menor a 0,1 g/100g ou 0,1 g/100mL do alimento pronto para o consumo, enquanto que os alimentos considerados “baixo teor de lactose” contém quantidade de lactose maior que 0,1 g/100g ou 0,1 g/100mL e igual ou menor do que 1g/100g ou 1g/100mL do alimento pronto para o consumo (ANVISA, 2017).

Os alimentos para dietas com restrição de lactose, que atendam a classificação de “isentos de lactose”, devem trazer na embalagem, próxima à denominação de venda do alimento, a seguinte redação: “isento de lactose”, “zero lactose”, “0% lactose”, “sem lactose” ou “não contém lactose”. Assim como os alimentos que atendam a classificação de “baixo teor de lactose” devem trazer a declaração “baixo teor de lactose” ou “baixo em lactose” próxima à denominação de venda do alimento (ANVISA, 2017).

Portanto, para os leites que contenham na embalagem a inscrição “Zero Lactose - Para dietas com restrição de lactose”, o teor de lactose residual deve ser menor ou igual a 0,1 g/100g ou 0,1 g/100mL do produto pronto para consumo.

2.8 Métodos analíticos

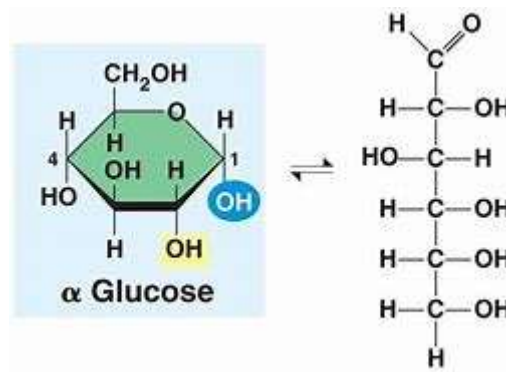
2.8.1 Método Titulométrico – LANE-EYNON

O método de Lane-Eynon baseia-se na determinação do volume de amostra necessário para reduzir uma medida da solução de Fehling, de concentração conhecida. É possível identificar o ponto final da titulação através do uso de indicador, como azul de metileno. A solução de Fehling é formada por íons bivalentes de cobre (Cu^{2+}) complexados com tartarato em meio alcalino. Neste meio, os carboidratos são oxidados a ácidos aldônicos, formando óxido de cobre I (precipitado vermelho-tijolo), conforme Figura 8. O tempo de aquecimento, temperatura e concentração dos reagentes devem ser bem controlados para a execução do método (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

A amostra necessariamente deve ser neutra e nenhum agente redutor deve estar presente na matriz a fim de não haver alteração nos resultados (BIRCH, 1985). A ebulição deve ser mantida na análise para evitar que o óxido cuproso entre em contato com o oxigênio do ar e seja oxidado, retornando à forma de óxido cúprico. O aquecimento prolongado pode decompor os açúcares da amostra, portanto a titulação deve ser realizada em, no máximo, três minutos (TAVARES *et al.*, 2010).

O método Lane-Eynon era o método oficial do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA para mensurar glicídeos redutores até setembro de 2018, pela IN 68/2006, revogada pela IN 30/2018 (BRASIL, 2018). Porém, este método não distingue os glicídeos resultantes da hidrólise enzimática da lactose.

Figura 8 - Açúcar redutor

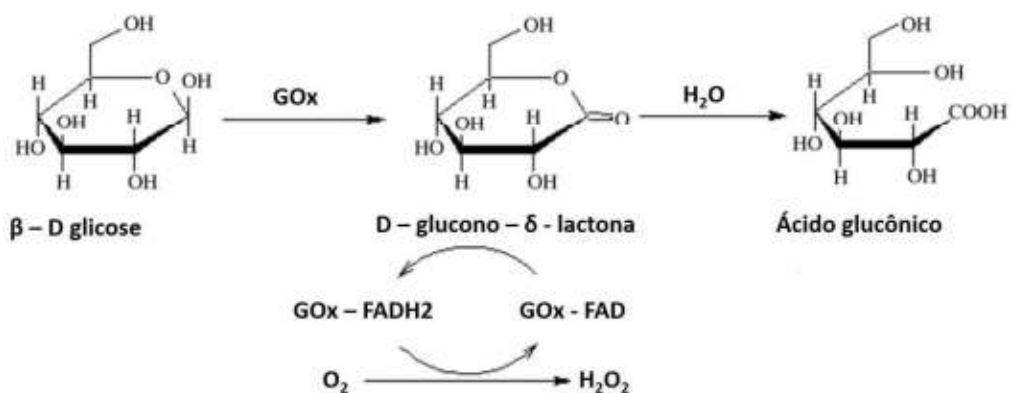


Fonte: Tavares, 2010.

2.8.2 Método enzimático Glicose Oxidase

A determinação da glicose pelo método enzimático apresenta elevada especificidade e simplicidade operacional envolvida. Em presença de oxigênio, a glicose sofre a ação da glicose oxidase, produzindo peróxido de hidrogênio, que pela ação da peroxidase e em presença de um reagente fenólico (fenol) e 4-aminoantipirina produz um composto corado (quinonimina), com máximo de absorção em 505 nm, conforme a Figura 9. A cor formada é proporcional à concentração de glicose presente na amostra.

Figura 9 - Representação estrutural da reação da Glicose Oxidase



Fonte: WITT et al., 2000.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência dos métodos na determinação do teor de lactose residual em amostras de leite de marcas comerciais que contenham no rótulo a inscrição “Zero Lactose”, antes e após uma hidrólise química.

3.2 Objetivos Específicos

- Estimar o teor de lactose em amostras comerciais de leite Zero Lactose.
- Analisar a conformidade das amostras analisadas com a legislação vigente.
- Comparar os resultados obtidos pelo método Lane-Eynon e Glicose Oxidase.
- Avaliar a utilização da hidrólise química para estimar o teor de lactose pelo método glicose oxidase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram adquiridas cinco amostras de leite semidesnatado UHT em supermercados do município de São Miguel do Oeste – SC. Destas, cinco amostras eram Zero Lactose. As amostras de marcas distintas foram denominadas como 1, 2, 3, 4, e 5. As mesmas amostras após a hidrólise foram denominadas respectivamente de 1H, 2H, 3H, 4H, e 5H (H significa que a amostra foi hidrolisada).

As amostras foram produzidas na região Sul do Brasil, todas foram produzidas no ano de 2023, não estando, nenhuma delas, próximo da data de vencimento. As amostras 1 a 5 continham no rótulo a inscrição “Zero Lactose - Para dietas com restrição de Lactose”.

4.2 Análises

4.2.1 Lane-Eynon

A metodologia para a determinação de lactose foi Lane-Eynon, conforme recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Instrução Normativa 68/2006 (BRASIL, 2006). Inicialmente foi pipetado 10 mL da amostra em um balão volumétrico de 250 mL, foi adicionado 6 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 6 mL de solução de acetato de zinco a 30% para precipitação da proteína e completado o volume com água. Deixado sedimentar por uma hora em papel filtro, o filtrado foi recolhido em erlenmeyer.

Para a determinação de açúcares redutores totais, foi adicionado em um erlenmeyer de 250 mL, 5 mL da solução de Fehling A e 5 mL de solução de Fehling B, juntamente com 40 mL de água destilada. A solução foi mantida em ebulição (aproximadamente 94°C) em chapa aquecedora para o início do gotejamento da amostra, contida na bureta, sem agitação, manteve-se a ebulição durante toda a titulação, até a descoloração de azul de metileno a 1 %, e continuou a titulação a cor vermelho tijolo. Iniciou-se com a padronização do reagente Fehling.

O reagente Fehling foi padronizado através da titulação da solução de glicose com os reagentes. O título da solução de Fehling é obtido pelo cálculo:

$$T = \frac{V \times m}{100}$$

Onde:

V= Volume gasto de glicose na titulação, em mL;

m= massa da glicose, em gramas.

Para calcular a concentração de glicose foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de glicídios} = \frac{100 \times 250 \times \left(\frac{T}{2}\right)}{V \times m}$$

Onde:

T= Título da solução de Fehling;

V=Volume gasto na titulação em mL;

m= massa da amostra em gramas;

As amostras foram então submetidas à hidrólise química, adicionando 1 mL de ácido clorídrico e ficando em banho maria a 94°C por aproximadamente 45 minutos e repetido a análise em triplicata para todas as amostras.

4.2.2 Glicose Oxidase

Para verificar a concentração de glicose nas amostras, utilizou-se o Kit de Glicose Enzimática SIGMA-ALDRICH®. O método baseia-se na oxidação da glicose a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, com a enzima glicose oxidase atuando como catalisador. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4 - aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha.

Para o procedimento, houve a preparação das amostras, onde foram transferidos 25 mL de cada amostra para um tubo de centrifuga de 50 mL, adicionados 5 mL de HCl 0,6N para precipitação da caseína, incubados os tubos em banho de gelo por 10 minutos, centrifugados em centrífuga MTD III® Plus a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante então foi transferido para béqueres de 50 mL, neutralizado com NaOH

0,6N e transferidos para balões volumétricos de 50 mL e completado o volume com água destilada.

Após a preparação as amostras então foram utilizadas para a realização da análise, foram adicionados em tubos de ensaio 2,5 mL da amostra, incubados em banho maria por 10 minutos, adicionado então 250 µL do reagente e novamente incubados em banho maria por 10 minutos. A coloração foi determinada em espectrofotômetro modelo 700 plus, marca FEMTO®, ajustado para comprimento de onda de 505 nm (MOTTA, 2009).

As amostras foram então submetidas à hidrólise química, adicionando 1,0 mL de ácido clorídrico e ficando em banho maria a 100°C por aproximadamente 45 minutos e repetido a análise em triplicata para todas as amostras.

4.3 Análise estatística de dados

As análises foram realizadas em triplicada para cada amostra. Os resultados foram avaliados estatisticamente, utilizando o Software XLStat versão 2022, foi feito análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro.

Para os dois métodos realizados, as análises tiveram resultados confiáveis, uma vez que no resultado da análise de variância, o F foi maior que o F crítico para todas as análises.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o método de Lane-Eynon foram realizadas análise das cinco amostras, em triplicatas, sendo o primeiro ensaio para as amostras sem hidrólise química (amostras 1, 2, 3, 4, e 5) e posteriormente para amostras submetidas previamente à hidrólise (amostras 1H, 2H, 3H, 4H, e 5H). Com o uso da equação determinamos a concentração de glicose através da porcentagem de glicídios presentes. No quadro 1 temos a média e o desvio padrão dos resultados encontrados para as mesmas.

Quadro 1 – Resultados de média e desvio padrão para a metodologia de Lane-Eynon

Amostra	Média	Desvio padrão
1	7,14	0,42
2	8,03	1,39
3	8,17	0,40
4	7,27	1,10
5	7,90	0,92
1H	12,24	0,38
2H	8,45	1,68
3H	10,39	0,57
4H	10,35	0,25
5H	8,29	0,57

Já no quadro 2, temos os resultados do teor de glicídios redutores, bem como seus dados estatísticos.

Quadro 2 - Resultados encontrados para as titulações na metodologia de Lane-Eynon

Amostra	Teor de glicídios redutores (%)	Amostra	Teor de glicídios redutores (%)
1	0,07 ^c	1H	0,09 ^a
2	0,08 ^a	2H	0,06 ^c
3	0,08 ^a	3H	0,07 ^b
4	0,07 ^c	4H	0,07 ^b
5	0,075 ^b	5H	0,06 ^c

Conforme o descrito pela metodologia de Lane-Eynon, inicialmente foi realizado um ensaio para a padronização do reagente de Fehling através da titulação da solução de glicose com os reagentes. Nesta titulação foram gastos 3,3mL de solução (média de uma triplicata), este valor foi necessário para calcularmos o título da solução. Como foram utilizados 0,5g de glicose, e a titulação gastou 3,3mL, $T = 0,00165$.

Posteriormente as amostras foram neutralizadas com solução de hidróxido de sódio a 40%, seguindo-se então para a titulação com as soluções de Fehling novamente.

Pode-se concluir que o método de Lane- Eynon não foi eficiente para a determinação de lactose residual no leite, por se tratar de um método que quantifica todos os açúcares redutores presentes. Sendo que diversos fatores como a preparação da amostra que, é complexa, a realização da análise em diferentes etapas, o tempo de ebulição incorreto e erro no momento da adição dos reagentes interferem na análise implicando na propagação de erros e impedindo a obtenção de um resultado confiável.

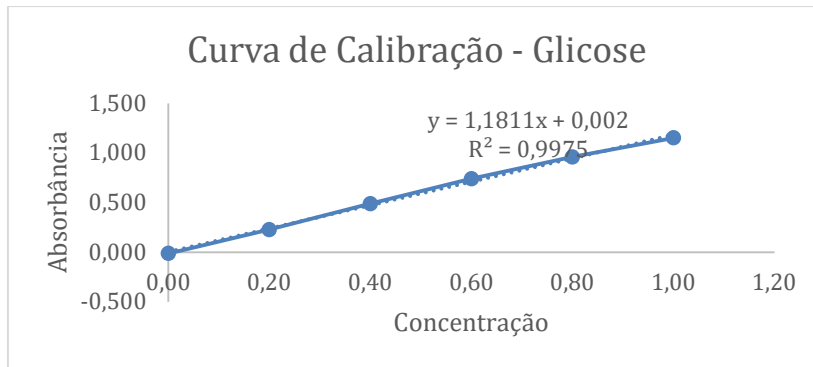
Para o método de glicose oxidase, inicialmente foi construída uma curva de calibração de glicose, os resultados obtidos estão no quadro 3 a seguir.

Quadro 3 - Resultados da curva de calibração de glicose

Amostras	Concentração de glicose (g/L)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média
1	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,20	0,223	0,229	0,231	0,228
3	0,40	0,491	0,489	0,488	0,489
4	0,60	0,741	0,734	0,747	0,741
5	0,80	0,961	0,957	0,955	0,958

Os dados de absorvância foram utilizados para construção da curva de calibração a seguir, Figura 10:

Figura 10 - Curva de calibração para o método de glicose - oxidase.



Fonte: as autoras.

Através dessa curva de calibração, obtivemos a equação da reta, que foi utilizada para calcular a concentração de glicose das amostras de leite, os resultados, juntamente com a média e desvio padrão, constam no quadro 4 a seguir:

Quadro 4 - Dados de concentração, média e desvio padrão para o método de glicose oxidase.

Amostras	Concentração final g/L	Média g/L	Desvio padrão
1	0,23	0,23	0,0005
2	0,40	0,40	0,0005
3	0,35	0,35	0,0005
4	0,24	0,24	0,0005
5	0,34	0,34	0,0005
1H	1,97	1,97	0,0052
2H	1,03	1,03	0,0067
3H	1,88	1,88	0,0027
4H	1,24	1,24	0,0027
5H	1,42	1,42	0,0010

Com estes resultados, foi possível analisar os dados e comparar a concentração antes e após a hidrólise química, bem como estimar o teor de lactose por diferença de glicose e analisar a conformidade com a legislação, os dados estão expostos no quadro 5.

Quadro 5 - Teor de glicose em leite UHT semidesnatado, deslactosado, pelo método glicose-oxidase

Amostra	Teor de glicose no leite mg/100ml	Teor de glicose no leite após hidrólise química mg/100ml	Diferença no teor de glicose antes e depois da hidrólise mg/100ml	Estimativa do teor de lactose mg/100ml	Valor estabelecido em legislação (RDC 136/2017)
1	13	97	84	84	Abaixo de 100mg/100ml
2	21	52	31	31	
3	19	93	74	74	
4	14	62	48	48	
5	19	70	51	51	

Para estimar o teor de lactose com relação à diferença antes e após a hidrólise, foi utilizada a estequiometria da reação, onde para cada molécula de lactose degradada se forma uma de glicose e uma de galactose, desta forma consegue-se estimar a quantidade de lactose presente.

Portanto, podemos concluir que é possível estimar o teor de lactose residual em amostras de leite zero lactose, utilizando o método de glicose oxidase e submetendo as amostras a uma hidrólise química para determinar a diferença após a hidrólise das moléculas restantes de lactose no leite. Os resultados estimados de lactose ficaram em conformidade com a legislação para todas as amostras.

Os resultados do trabalho ficaram dentro do esperado, confirmando o que já havia sido estudado por Oliveira (2018), que a eficiência do método de Lane-Eynon é questionável e sua aplicação é restrita, é importante que se tenha uma padronização de método para produtos lácteos, especialmente para os leites com baixo teor de lactose.

Oliveira (2018), também utilizou o método de glicose oxidase para analisar os resultados obtidos por Lane-Eynon em diversos produtos lácteos, tendo encontrado resultados coerentes com a literatura.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o método de Lane-Eynon não foi eficiente para a determinação de lactose residual no leite, por se tratar de um método que quantifica todos os açúcares redutores presentes na amostra de interesse e possuir alta sensibilidade quanto aos fatores externos, como preparação da amostra, que é complexa, a realização da análise em diferentes etapas e o tempo de ebulição incorreto.

Conclui-se também que é possível estimar o teor de lactose residual utilizando o método de glicose oxidase, submetendo as amostras a uma hidrólise química para determinar a diferença após a hidrólise das moléculas restantes de lactose no leite.

Os resultados encontrados estão dentro do estabelecido pela legislação vigente, afirmando que os produtos são baixos em lactose.

7. REFERÊNCIAS

ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No 135, de 8 de Fevereiro de 2017. Ministério da Saúde-Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, v. 29, 2017. Disponível em: http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucao_sanitaria/135.pdf . Acesso em: 22.06.2022

ANUÁRIO LEITE 2021. **Embrapa Gado de Leite**. Disponível em: embrapa.br/gado-de-leite. Acesso em: 18/07/2022.

ALMEIDA, K. N. de. **Elaboração de bebida isotônica a partir de permeado de soro com lactose hidrolisada**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).2014. 63 f.

BARBOSA, Cristiane Rickli; ANDREAZZI, Marcia Aparecida. **Intolerância à Lactose e suas Consequências no Metabolismo do Cálcio**. Saúde e Pesquisa, v. 4, n. 1, 2011.

BIRCH, G. G. (ed.). **Analysis of Food Carbohydrates**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT)**: aprovado pela Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 135, de 8 de fevereiro de 2017. **Adota o regulamento técnico sobre alimentos para fins especiais**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 9 fev. 2017a.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. Porto Alegre. Artmed Editora, 2000. 3ª ed. 751p.

CARMINATTI, Claudimir Antonio et al. Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase. **Kluyveromyces lactis**. 2001.

CUNHA, M. E. T. DA et al. Intolerância à Lactose e Alternativas Tecnológicas. **Revista UNOPAR Científica - Ciências Biológicas e Saúde**, v. 10, n. 2, p. 83–88, 2008. Disponível em <http://www.pgskroton.com.br/seer/index.php/JHealthSci/article/view/1523/1460> Acesso em 05.05.2022.

DE BRITO SODRÉ, Lainy Waleska; DECOL, Celina Martins. **Avaliação da hidrólise da lactose por β -galactosidase comercial em leite UHT**. Research, Society and Development, v. 10, n. 14, p. e262101421898-e262101421898, 2021.

DELGADO, A. F.; CARDOSO, A. L.; ZAMBERLAN, P. **Nutrologia Básica e**

Avançada. São Paulo: Manole, 2010.

FERNANDES, Carlos Eduardo Ramos. **Intolerância à lactose.** 2014.

HEYMAN, Melvin B. et al. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. **Pediatrics**, v. 118, n. 3, p. 1279-1286, 2006.

HOBMAN, P. G. Review of processes and products for utilization of lactose in deproteinated milk serum. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2630-2653, 1984.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Edição IV, 2008.

IZQUIERDO et al., Situação atual da intolerância à lactose em crianças. Revista *Pediatría Atención Primaria*, Madrid, vol.13, no.50, 2011.

JUNIOR, Rodrigues H. P. Laticínios: a composição do leite como base para crescimento da indústria. Revista *Pro elementar*. Disponível em proelementar.com.br/composicao-do-leite-para-crescimento-da-industria/. Acesso em 08.05.2022.

LEWIS. M.J. Advances in heat treatment of milk. In: MODERN dairy technology. Essex, England: Elsevier Applied Science, 1986. p. 1- 50. (v.1- Advances in Milk Processing).

MATTAR, Rejane; MAZO, Daniel Ferraz de Campos. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 230-236, 2010.

NEIVA, Rubens. Setor lácteo deve crescer na próxima década, mas 2022 será de cautela. **Embrapa gado de leite**. 18/01/2022. Disponível em: www.embrapa.br/gado-de-leite. Acesso em: 18/07/2022.

PEREIRA, Mônica Cecília Santana et al. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 57-65, 2012.

PEREIRA, Leandra Gonçalves; FERREIRA, Michelle Silva; MARQUES, Fabíola Pedrosa Peixoto. Intolerância à lactose e os aspectos legais de rotulagem. **Anais dos Cursos de Pós-Graduação Lato Sensu da Universidade Evangélica de Goiás-UniEVANGÉLICA**, v. 3, n. 1, p. 281-311, 2019.

SÁ, F.V. de; BARBOSA, M. **O leite e os seus produtos**. 5. ed. Lisboa, Portugal: Clássica, 1990. 519 p.

SIQUEIRA, Kennya Beatriz. O mercado consumidor de leites e derivados. Circular Técnica - Embrapa, Juiz de Fora - MG, Julho de 2019.

TAVARES, José Torquato de Queiroz, et al. "Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon." *Química nova* 33 (2010): 805-809.

TREVISAN, Ana Paula et al. Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado. 2008.

UGGIONI, P.L; FAGUNDES, R.L.M. Tratamento dietético da intolerância à lactose: teor de lactose em alimentos. **Higiene Alimentar**. São Paulo. v. 140, n. 21, p. 24-29, 192 p. 2006.

VILELA, D. et al. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Política agrícola**, v. 1, p. 5–24, 2017. Disponível em <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/163208/1/Evolucao-do-leite-nobrasil.pdf>. Acesso em 05.05.2022.

VENTURINI, Katiani Silva; SARCINELLI, Maryelle Freire; SILVA, LC da. Características do leite. **Boletim Técnico, Universidade Federal do Espírito Santo, Pró-Reitoria de Extensão, Programa Institucional de Extensão, PIE-UFES**, v. 1007, n. 6, 2007.

WITT, S. et al. Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. *Biochemical Journal*, v. 347, n. 2, p. 553–559, 2000.

ZYCHAR, Bianca Cestari; OLIVEIRA, Beatriz Araújo. Fatores desencadeantes da intolerância à lactose: metabolismo enzimático, diagnóstico e tratamento. **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)**, v. 5, n. 1, p. 35-46, 2017.