



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017  
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo  
ISBN 978-85-7029-141-7

## DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS LÁCTEAS COM TEOR REDUZIDO DE LACTOSE UTILIZANDO HPLC-ELSD

Mariana Costa de **Freitas**<sup>1</sup>; Lucia dela Hoz **Urrejola**<sup>2</sup>; Maria Celeste Teixeira **Diniz**<sup>2</sup>; Vera Sonia Nunes da **Silva**<sup>3</sup>; Sueli Regina **Baggio**<sup>4</sup>

Nº 17222

**RESUMO** – O leite é uma das mais importantes fontes nutritivas para o ser humano e tem a lactose como o principal carboidrato presente em sua composição. No entanto, grande parcela da população manifesta sintomas de intolerância à lactose. A indústria alimentícia nos últimos anos vem diversificando e lançando no mercado produtos lácteos com teor reduzido de lactose, para atender este público-alvo. A cromatografia líquida é a técnica mais empregada para a determinação de lactose. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de lactose em produtos industrializados “zero lactose”, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espalhamento de luz evaporativo (HPLC-ELSD). Foram utilizadas amostras “zero lactose” de leite fluido, leite em pó, creme de leite, iogurte, bebida achocolatada, leite condensado e doce de leite. A preparação das amostras foi baseada no método de Burgner e Feinberg (1992), onde a extração dos açúcares é realizada em meio aquoso e os interferentes eliminados por ação do clarificante Carrez. A separação cromatográfica foi obtida utilizando uma coluna base sílica do tipo amino ligado e fase móvel acetonitrila:água (80:20, v/v). Os parâmetros otimizados para detecção no ELSD foram: temperatura de nebulização: 50°C; temperatura de evaporação: 80°C; fluxo de nitrogênio (SLM): 2,0; ganho (PMT): 5; LED: 100%; smoothing (STH): 40; data rate (HZ): 40. A identificação da lactose foi feita por comparação do tempo de retenção do padrão analítico com o da amostra e a quantificação por padronização externa. O método analítico foi validado através da especificidade/seletividade, linearidade, sensibilidade, exatidão e precisão.

**Palavras-chaves:** Lactose, produtos lácteos, HPLC-ELSD.

<sup>1</sup> Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biomedicina, METROCAMP, Campinas-SP; marianacf93@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Colaborador: Assistente Técnico de Pesquisa, ITAL, Campinas-SP.

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador Científico, ITAL, Campinas-SP.

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



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

**ABSTRACT** – *Milk is one of the greatest nutritional sources to human beings, in which lactose is the main carbohydrate of its composition. However, a large part of population manifests symptoms of lactose intolerance. Food industry has been diversifying and releasing reduced lactose products on market, to serve this target audience. Liquid Chromatography is the most commonly used technique to determine lactose. The purpose of this work was to develop an analytical methodology to quantify lactose on industrialized “lactose free” products, using High-Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection (HPLC-ELSD). There were used “lactose free” samples of fluid milk, powdered milk, cream, yogurt, chocolate milk, condensed milk and cooked condensed milk. The samples’ preparation was based on Burgner and Feinberg method (1992), in which the sugars’ extraction was made in aqueous medium and the interfering compounds were eliminated by Carrez clarifying. The chromatographic separation was achieved with a silica-based amino column and mobile phase acetonitrile:water (80:20, v/v). The optimized parameters to ELSD detection were: nebulizer temperature: 50°C; evaporator temperature: 80°C; nitrogen flow rate (SLM): 2,0; gain (PMT): 5; LED: 100%; smoothing (STH): 40; data rate (HZ): 40. The lactose identification was made by comparing the retention time of the analytical standard with that of the samples and quantification by external standardization. The validation of the analytical method was made by specificity/selectivity, linearity, sensitivity, accuracy and precision.*

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



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

## **INTRODUÇÃO**

A lactose é um dissacarídeo presente no leite e seus derivados, formado por dois monossacarídeos: glicose e galactose. Sob condições normais, o açúcar sofre hidrólise intestinal pela enzima lactase (ou  $\beta$ -D-galactosidase), de forma a possibilitar sua absorção na corrente sanguínea, convertido em energia para o organismo. Em casos onde o organismo não é capaz de produzir esta enzima, ocorre a fermentação do açúcar por microrganismos presentes no cólon, produzindo ácido láctico, metano ( $\text{CH}_4$ ) e gás hidrogênio ( $\text{H}_2$ ), sendo assim este quadro denominado intolerância à lactose.

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 135, de 8 de fevereiro de 2017 (ANVISA, 2017) publicada no DOU nº 29, de 9 de fevereiro de 2017, altera a Portaria SVS/MS nº 29, de 13 de janeiro de 1998, para regulamentar alimentos para dietas com restrição de lactose. De acordo com a RDC 135/2017, 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” contêm 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” contêm 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. A RDC 135/2017 também estabelece que 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.

Portanto, para a implementação destas novas exigências é necessária a utilização de técnicas de detecção mais sensíveis para a quantificação da lactose. A indústria alimentícia brasileira necessita de metodologias analíticas validadas em laboratórios nacionais que ofereçam resultados confiáveis para a lactose em uma variedade crescente de novos produtos que precisam de limites baixos de detecção e quantificação, direcionados para a grande parcela da população que apresenta sintomas de intolerância à lactose.

Dvoráková e colaboradores (2014) compararam diferentes métodos para a análise de açúcares usando HPLC, focando nas diferenças entre os métodos de extração de amostras e da sua detecção. O método HPLC-RI é simples e tem uma ampla faixa linear; no entanto, medidas efetuadas com este detector não permitem o uso de gradiente de eluição e requer um tempo longo de estabilização a cada troca da fase móvel ou da coluna de separação, além de também ter falta



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

de sensibilidade. Como uma técnica alternativa, e com maior sensibilidade, a cromatografia de intercâmbio aniônica com detecção amperométrica pulsada, tem sido muito utilizada, no entanto, tem vários inconvenientes que incluem instabilidade da linha base, perda de sensibilidade devido ao ruído e uso de alto pH e altas concentrações de sal (ANUMULA & TAYLOR, 1991).

O detector por espalhamento de luz evaporativo (ELSD) é o detector cada vez mais usado para análises de carboidratos por HPLC. É um detector semi-universal baseado na detecção de moléculas de soluto por espalhamento de luz depois de nebulização e evaporação da fase móvel; assim o detector ELSD é adequado para detectar compostos com baixa volatilidade durante o processo de evaporação, como os carboidratos. Como uma vantagem contra o detector de RI, o ELSD apresenta limite de detecção mais baixo para carboidratos e permite trabalhar com gradiente de eluição (NOGUEIRA et al., 2005).

Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar metodologia analítica para a determinação de lactose em produtos industrializados “zero lactose”, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espalhamento de luz evaporativo (HPLC-ELSD).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Materiais**

Para a validação das metodologias foram utilizadas amostras “zero lactose” de leite fluido, leite em pó, creme de leite, iogurte, bebida achocolatada, leite condensado e doce de leite. Os padrões analíticos de lactose, glicose, frutose, galactose e maltose foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). A fase móvel foi constituída por acetonitrila (grau HPLC) e água deionizada (80:20, v/v). A fase móvel foi filtrada em membrana filtrante de 0,45 µm e degaseificada. Os reagentes utilizados para a clarificação das amostras foram: Carrez I (ferrocianeto de potássio 15%) e Carrez II (sulfato de zinco 30%).

### **Métodos**

A extração dos açúcares foi baseada no método de Burgner e Feinberg (1992). O método consiste na extração dos açúcares (lactose) em meio aquoso, com uma etapa de clarificação da amostra, seguido da determinação da lactose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

ELSD), como descrito a seguir: transferir uma alíquota de amostra para um balão volumétrico, adicionar água deionizada até a metade do balão, adicionar os clarificantes ferrocianeto de potássio (Carrez I) e sulfato de zinco (Carrez II), agitar, completar o volume do balão com água deionizada, agitar, manter em repouso por 60 minutos, filtrar a amostra em papel de filtro qualitativo, depois filtrar através de filtro seringa diretamente nos “vials” e injetar no HPLC-ELSD.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, com amostrador automático (injeção de 20µL), sistema quaternário de solventes, forno de coluna e detector ELSD. As condições cromatográficas foram: coluna Zorbax Carboidrato (4,6 mm ID x 250mm) 5 µm; temperatura da coluna 30°C; fase móvel acetonitrila:água (80:20) com fluxo de 1,2 mL/min; volume de injeção 20 µL; temperatura de nebulização: 50°C; temperatura de evaporação: 80°C; fluxo de nitrogênio (SLM): 2,0; ganho (PMT): 5; LED: 100%; smoothing (STH): 40; data rate (HZ): 40.

A identificação da lactose foi realizada por comparação do tempo de retenção do padrão analítico de lactose com o da amostra, a quantificação da lactose foi feita por padronização externa e os resultados expressos em g/100g de amostra.

A metodologia analítica foi validada de acordo com Quattrocchi et al. (1992), seguindo os seguintes parâmetros: especificidade/seletividade, linearidade, sensibilidade (limite de detecção e limite de quantificação), exatidão (recuperação) e precisão.

Para a especificidade/seletividade foi realizada a análise do branco dos reagentes, ou seja, aplicação da metodologia com todos os reagentes, menos a amostra levando em consideração a efetiva limpeza da amostra e diluições distintas dependendo da matriz. A linearidade foi feita pela construção de uma curva analítica de lactose com sete pontos, considerando a origem, nas concentrações de 20, 45, 60, 75, 100 e 125 mg/L. Os testes de sensibilidade foram conduzidos com a construção de uma curva analítica de lactose suplementar com três pontos injetados em triplicata nas concentrações de 5, 10 e 15 mg/L. A exatidão ou recuperação do método foi feita em triplicata com adição de três níveis de concentração do padrão de lactose à amostra para cada uma das sete matrizes avaliadas. A precisão do método foi realizada com 6 repetições analíticas para cada matriz e com 9 injeções de uma concentração de 35 mg/L do padrão de lactose, representando a região inferior da curva de calibração analítica.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os testes de especificidade/seletividade realizados não apresentaram nenhum sinal analítico no tempo de retenção da lactose que pudesse interferir na quantificação da mesma, o que



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

pode ser observado nas Figuras 1 e 2. Os testes foram realizados nas mesmas condições cromatográficas já descritas anteriormente.

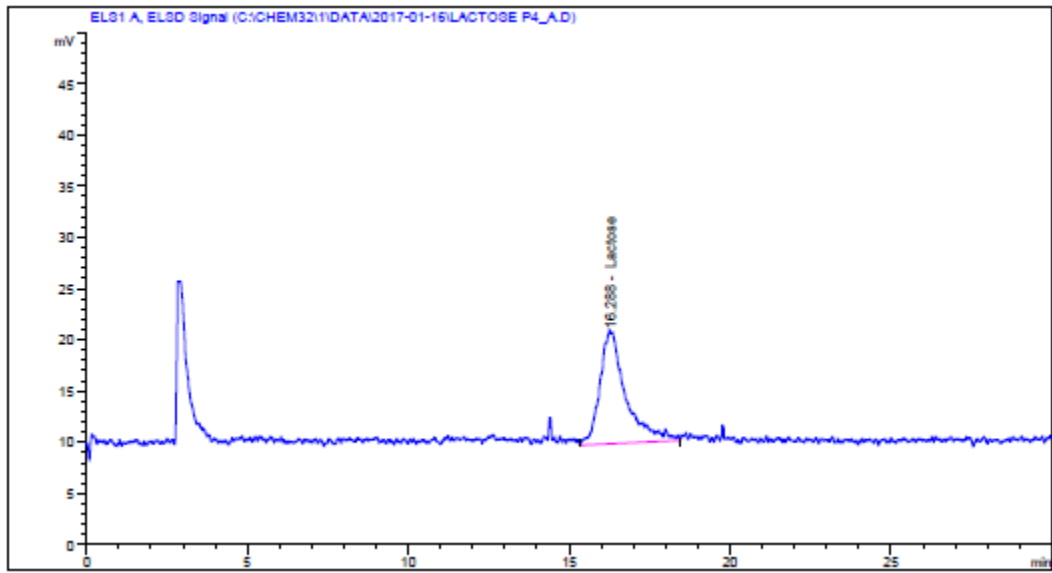


Figura 1. Cromatograma característico do padrão analítico de lactose.

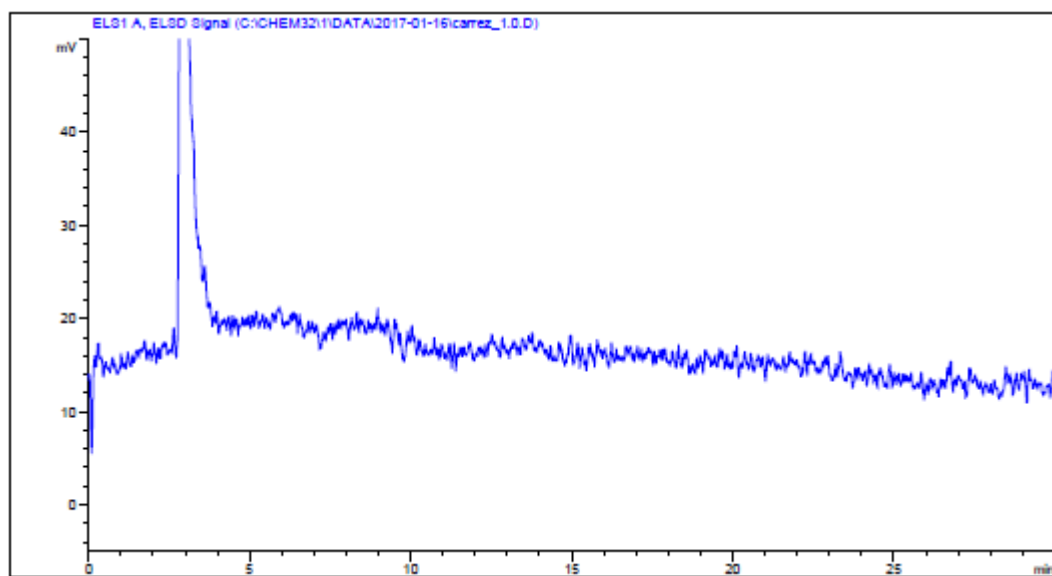


Figura 2. Cromatograma característico do branco dos reagentes.



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

A linearidade foi avaliada segunda a fórmula abaixo utilizando uma curva de calibração analítica com sete pontos (20, 45, 60, 75, 100 e 125 mg/L) (Figura 3).

Onde:  $t$  = Student's  $t$ -distribuição  
 $n$  = número de medidas  
 $r$  = coeficiente de correlação linear

$$tr = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

O  $t$  tabelado para  $t_{95,6}$  foi de 2,45 e o  $t$  obtido foi de 49,95, portanto, a correlação foi considerada significativa para a probabilidade calculada.

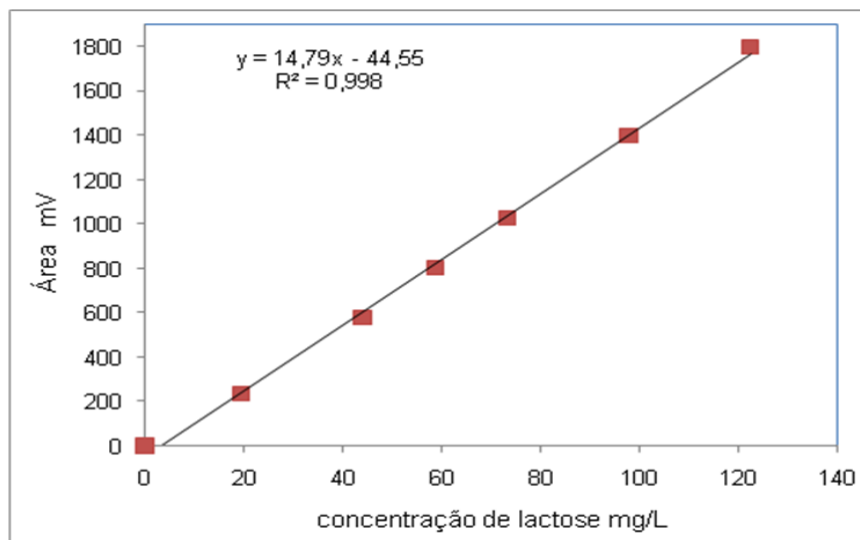


Figura 3. Curva de calibração do padrão analítico de Lactose

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

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

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

Onde:  $y_{bl}$  = estimativa da resposta do branco  
 $S_{bl}$  = estimativa de desvio padrão do branco  
 $b$  = inclinação da curva de calibração  
 $N$  = número de medidas



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) obtidos para as respectivas matrizes avaliadas na validação da metodologia analítica estão expressos na Tabela 1.

Para a exatidão do método, os testes de recuperação foram realizados pela adição de três níveis de concentração do padrão de lactose, em triplicata, para cada matriz avaliada. Os resultados das médias das taxas de recuperação estão expressos na Tabela 1. Para avaliar a exatidão do método foi utilizada a equação abaixo.

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

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

Tabela 1. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e recuperação (%) de lactose nas matrizes validadas.

Matriz	LD (g/100mL ou g/100g)	LQ (g/100mL ou g/100g)	Recuperação (%)
Leite fluido	0,002	0,005	99,57
Leite em pó	0,02	0,04	89,42
Creme de leite	0,002	0,005	99,67
logurte	0,004	0,008	92,96
Bebida achocolatada	0,02	0,04	92,96
Leite condensado	0,04	0,08	97,27
Doce de leite	0,04	0,08	97,92

Para o cálculo da precisão do sistema cromatográfico (HPLC-ELSD) utilizado foram feitas 9 injeções de uma concentração de lactose conhecida (35 mg/L), como mostra a Tabela 2. Para o cálculo da precisão do método foram realizadas no mínimo 6 repetições do procedimento de extração para cada matriz avaliada na validação. A Tabela 3 representada a precisão do método utilizando o leite fluido “zero lactose”.





11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017  
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo  
ISBN 978-85-7029-141-7

Tabela 2. Precisão do sistema cromatográfico (HPLC-ELSD).

Injeções	Área do pico (mV)	Concentração (mg/L)
1	395,9536	33,87
2	394,1594	33,71
3	405,1164	34,61
4	415,4987	35,46
5	371,6463	31,87
6	426,5552	36,37
7	356,5557	30,63
8	410,0505	35,02
9	408,2068	34,87
M	398,1936	34,04
S	21,9442	1,79
CV (%)	5,51	5,28
CV <sub>Máx</sub> (%)	6,50	9,41

M = Média; S = estimativa de desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV<sub>Máx</sub> = coeficiente de variação máximo permitido.

Tabela 3. Precisão do método de extração de lactose em leite fluido “zero lactose”.

Repetições Analíticas	Resultado analítico (g/100 mL)
1	0,0274
2	0,0263
3	0,0252
4	0,0292
5	0,0262
6	0,0276
M	0,027
S	0,001
CV (%)	5,17
CV <sub>Máx</sub> (%)	6,89

M = Média; S = estimativa de desvio padrão; CV = coeficiente de variação; CV<sub>Máx</sub> = coeficiente de variação máximo permitido.

O CV (%) determinado para as injeções analíticas ficou menor que o CV<sub>Máx</sub> (%), calculado segundo a equação de Horwitz [ $CV(\%) = 2^{(1-0,00001 \log C)}$ ], sendo assim, a precisão do sistema cromatográfico (HPLC-ELSD) utilizado para a determinação de lactose foi aceita.

O mesmo princípio foi usado para as repetições analíticas com as amostras, as quais também apresentaram CV (%) menor que o CV<sub>Máx</sub> (%), indicando assim a aceitação da metodologia utilizada para a extração e quantificação da lactose nas amostras “zero lactose” validadas.

Um perfil cromatográfico característico de lactose em uma das matrizes “zero lactose” estudadas, leite fluido, e o sinal referente à lactose estão representados na Figura 4. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas já descritas anteriormente.

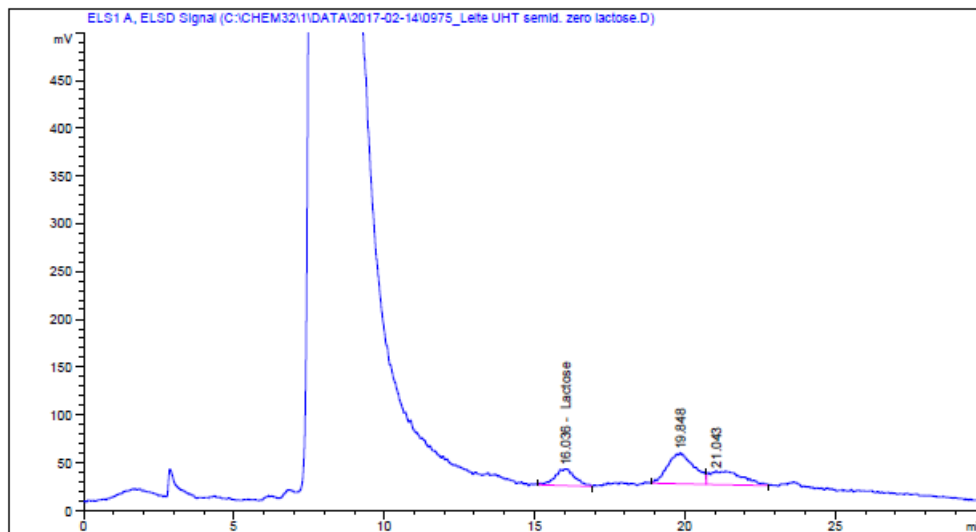


Figura 4. Cromatograma característico de uma amostra de leite UHT “zero lactose”.

## CONCLUSÃO

A metodologia validada para a determinação de lactose em amostras “zero lactose” de leite fluido, leite em pó, creme de leite, iogurte, bebida achocolatada, leite condensado e doce de leite, utilizando HPLC-ELSD, apresentou eficiência, sensibilidade, exatidão e precisão.

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS

ANUMULA, K. R.; TAYLOR, P.B. Rapid characterization of asparagine-linked oligosaccharides isolated from glycoproteins using a carbohydrate analyzer. *European Journal of Biochemistry*, v. 195, p. 269-280, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 135, de 8 de Fevereiro de 2017. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, nº 29, de 9 de fevereiro de 2017.

BURGNER, E.; FEINBERG, M. Determination of mono and disaccharides in foods by interlaboratory study: Quantitation of Bias components for liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, v. 75, n. 3, p. 443-464, 1992.



**11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017**  
**02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-141-7**

DVORÁCKOVÁ, E., SNOBLOVA, M., HRDLICKA, P. Carbohydrate analysis: From sample preparation to HPLC on different stationary phases coupled with evaporative light-scattering detection. *Journal of Separation Science*, v.37, p. 323-337, 2014.

NOGUEIRA, L. C., SILVA, F., FERREIRA, I. M. L. V. O., TRUGO, L.C. Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1065, p. 207-210, 2005.

QUATTROCCHI, O. A., ANDRIZZI, S. A., LABA, R. F. *Introducción a la HPLC aplicación y práctica*. Buenos Aires. Artes Prácticas Farro S.A. p. 301-328, 1992.