

DETERMINAÇÃO DE LACTOSE EM ACHOCOLATADOS

Mariéle Zanuzzo¹
Maria Tereza Friedrich²

Resumo: O objetivo deste trabalho é apresentar um levantamento bibliográfico sobre lactose, sua presença em achocolatados e o principal método de determinação de lactose em achocolatado. A lactose é o principal açúcar presente no leite, porém, muitos indivíduos não conseguem digerir a mesma, vindo a apresentar intolerância a lactose. Os sintomas da intolerância a lactose apresentam-se, normalmente, relativos ao teor de lactose ingerida, assim, para que estes consumidores saibam que o que consta no rótulo do derivado lácteo é o que realmente está no produto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis que determinem quantitativamente o teor de lactose presente em achocolatados, sendo que, o método mais utilizado é o da cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando detector de índice de refração. Com isso, para que o método utilizado garanta confiabilidade analítica, ele deve sofrer um processo denominado validação.

Palavras-chave: Lactose. Achocolatado. Cromatografia. Validação.

Introdução

Bebida achocolata é uma das categorias de derivados lácteos que mais cresce no mundo, sendo consumida por muitas pessoas. O consumo de derivados lácteos é constante na vida da maioria da população, pois são considerados uma fonte de energia, além de serem ricos em cálcio e proteínas. Entretanto, muitas pessoas apresentam algumas restrições quanto ao consumo destes alimentos por apresentarem intolerância à lactose, ou seja, o organismo destes indivíduos não consegue realizar a absorção deste carboidrato encontrado em leite e derivados. Assim, ao ingerirem lactose, devido à falta da enzima responsável pela hidrólise da lactose, o organismo não consegue absorver este carboidrato, ocasionando no indivíduo os sintomas da intolerância à lactose, que incluem inchaço, dor abdominal e flatulência.

Para que indivíduos intolerantes não venham a ingerir produtos com lactose, torna-se necessário que sejam desenvolvidos métodos analíticos confiáveis que determinem quantitativamente o teor deste carboidrato contido no produto. Além disso, deve-se garantir a confiabilidade analítica do método através do processo de validação, que garante que o método é adequado à finalidade que se propõe. Nesse sentido, o presente trabalho visa realizar uma revisão bibliográfica sobre validação de método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração, na determinação do teor de lactose em achocolatado com e sem lactose.

1 Achocolatado

¹ Acadêmica do Curso de Química Bacharelado – UPF. E-mail: 151521@upf.br

² Professora Doutora do Curso de Química Bacharelado – UPF. E-mail: friedrich@upf.br

Segundo a Normativa Nº 36, de 31/10/2000, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), bebida láctea é o produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, reconstituídos ou não, fermentados ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea represente pelo menos 51% massa/massa do total dos ingredientes do produto. Basicamente, o achocolatado, considerado uma bebida láctea, é formulado com leite, sacarose, cacau em pó e alguns espessantes como amidos, adicionados para melhorar a consistência e impedir a sedimentação de partículas do cacau (MAPA, 2000; CASSANEGO; RICHARDS; BERGMANN, 2011).

A sacarose, um importante constituinte do achocolatado, é acrescentada devido ao sabor amargo característico que o cacau pode oferecer à bebida. Resumidamente, a sacarose é constituída de duas moléculas monossacarídicas, uma de frutose e uma de glicose, sendo caracterizada como um dissacarídeo, ou seja, um composto formado pela união de dois monossacarídeos: a glicose e a frutose (MEDEIROS; LANNES, 2009; REVISTA ADITIVOS E INGREDIENTES, 2011).

O cacau em pó adicionado em bebidas achocolatadas é obtido a partir da pasta de cacau, preparada com sementes que passaram pelos processos de fermentação, secagem, torrefação, moagem e prensa, para separação da manteiga de cacau. São utilizados também espessantes, com o intuito de aperfeiçoar a textura das bebidas achocolatadas, pois causam a diminuição da fluidez e evitam que ocorra um acúmulo das partículas de cacau (MEDEIROS; LANNES, 2009).

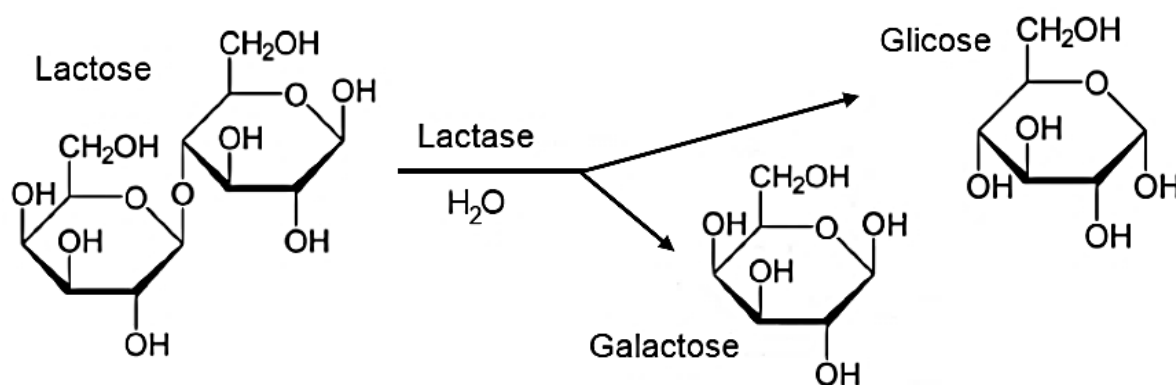
2 Lactose

A lactose é um açúcar que ocorre naturalmente apenas no leite. No entanto, é um componente comum em outros alimentos em que o leite ou a lactose foram adicionados, assim como em todos os derivados lácteos (JÄRVINEN; LOUKASKORPI; UUSITUPA, 2003). O "açúcar no leite", nome popular para a lactose, tem sua molécula formada por dois açúcares simples, que são glicose e galactose unidos por uma ligação glicosídica que facilita a absorção deste principal glicídio do leite, utilizado como fonte de energia pelo corpo. Em relação a outros açúcares, a lactose possui baixo poder adoçante, mas seus componentes monossacarídeos, glicose e galactose, possuem um alto poder adoçante. Comparada à sacarose, a doçura da lactose hidrolisada é de aproximadamente 70% a da sacarose. Assim, a hidrólise da lactose no leite resulta em uma diminuição da adição de sacarose em produtos lácteos, pois esta já

proporciona um sabor mais adocicado ao leite e seus derivados (RANGEL et al., 2016; FISCHER, 2010).

Para que a lactose possa ser absorvida pelo organismo humano, ela deve ser hidrolisada pela enzima lactase, conforme a Figura 1, se não ocorrer esta hidrólise, o indivíduo irá apresentar os sintomas da intolerância à lactose. Os sintomas incluem dor abdominal, inchaço, flatulência e diarreia (WEAVER; WIJESINHA-BETTONI; MCMAHON, 2013).

Figura 1: Representação da hidrólise da lactose.



Fonte: Adaptado de Fischer (2010).

Na literatura encontram-se vários fatores que podem influenciar o grau de tolerância de alimentos lácteos, entre eles tem-se a quantidade de lactose ingerida, se o alimento que contém lactose é ingerido durante uma refeição ou sozinho, o tipo de derivado lácteo ingerido e a adaptação do cólon, que varia para cada organismo (NATIONAL DAIRY COUNCIL, 2006).

Alguns tipos de alimentos derivados do leite são mais bem tolerados do que outros por pessoas com intolerância a lactose. Utilizando algumas estratégias dietéticas, os intolerantes a lactose podem incluir em sua dieta alguns produtos derivados do leite, conforme está representado no Quadro 1 abaixo. Vale ressaltar que diversos fatores influenciam o grau de intolerância que o indivíduo irá apresentar, pois a quantidade mínima de lactose que irá causar sintomas de intolerância varia de indivíduo para indivíduo e, muitas vezes, a menor quantidade de lactose ingerida pode acarretar em sintomas, devido ao grau mais alto de intolerância apresentado pelo consumidor. Portanto, nem sempre a substituição de alimentos será possível (NATIONAL DAIRY COUNCIL, 2006).

Quadro 1: Relação de alimentos e o grau de intolerância causado pelos mesmos.

	Alimentos contendo lactose
Menor grau de intolerância	Achocolatado (leite + chocolate)
	Queijos duros e envelhecidos
	Iogurtes com culturas vivas
Maior grau de intolerância	Leite puro
	Queijos frescos
	Iogurte natural

Fonte: Adaptado de National Dairy Council (2006).

3 Bebida achocolatada sem lactose

Pensando na população intolerante à lactose presente no leite e seus derivados, as empresas do setor lácteo iniciaram o processamento de produtos zero lactose e com baixo teor. Esse segmento está sendo alavancado por consumidores que apresentam incapacidade parcial ou completa de digerir o açúcar presente no leite e derivados, além dos consumidores que optam por dietas funcionais (RAMALHO; GANECO, 2016).

Para a produção de bebida achocolatada sem lactose, o leite que será acrescentado aos outros insumos aqui já citados, passa por um pré-tratamento que visa a hidrólise da lactose, deixando-o com baixo teor ou sem lactose, processo chamado de hidrólise enzimática. Esta hidrólise é catalisada pela enzima lactase. A vantagem da hidrólise enzimática é de que essa reação se processa à temperatura relativamente baixa, numa faixa que pode variar de 4 °C a 40 °C, sendo a temperatura ótima entre 30 °C a 40 °C, permitindo uma maior economia energética (FAEDO et al., 2013).

Com a finalidade de definir os termos baixo teor ou sem lactose, são utilizados como pontos os valores estabelecidos pela Portaria Nº 27, de 13 de janeiro de 1998 da ANVISA, que aprova o regulamento técnico referente à informação nutricional complementar. Esta estabelece que os termos “baixo teor”, “light”, ou “leve”, devem ser utilizados quando a concentração de açúcares for de no máximo 0,5 g/100 g de sólidos, ou 0,5 g/100 mL de líquidos; para a utilização dos termos “não contém” ou “isento”, a concentração de açúcares deve ser menor do que 0,5 g/100 g de sólidos ou 0,5 g/100 mL de líquidos. Para a utilização do termo “diet”, a Portaria Nº 29, de 13 de janeiro de 1998 da ANVISA, estabelece que estes produtos são destinados a dietas com restrição de nutrientes, tais como gorduras, proteínas e açúcares, como a lactose, sendo

considerados alimentos para fins especiais. Sendo assim, produtos diet são também conhecidos como sendo isentos de algum determinado nutriente.

4 Determinação de lactose por HPLC-IR

De acordo com os autores Silveira et al. (2015) e Chávez-servín, Castellote e López-sabater (2004), o método de determinação de lactose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Índice de Refração (CLAE-IR) mostrou-se eficiente para a análise de lactose em produtos lácteos. Silveira et al. (2015) ainda acrescentam que o método fornece resultados de precisão, recuperação e sensibilidade aceitáveis.

Cromatografia pode ser conceituada como um processo físico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido dispostos sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura, realizando assim a separação cromatográfica (PERES, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência utiliza pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas que contém partículas muito finas capazes de proporcionar separações muito eficientes (HARRIS, 2005).

No processo da CLAE, a fase móvel é acondicionada em um frasco apropriado e é impulsionada por uma bomba de alta pressão em direção à coluna. No decorrer da coluna, a amostra é introduzida na fase móvel através de uma válvula de injeção e arrastada para a coluna, assim irá ocorrer a separação cromatográfica. A medida que os componentes separados deixam a coluna cromatográfica, estes são detectados por um detector apropriado. O sinal gerado pelo detector é captado por um software apropriado, tratado no computador e um cromatograma é gerado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise (LANÇAS, 2009).

O detector mede o Índice de Refração (IR) da solução que passa por ele ao sair da coluna. A variação do índice de refração indica a passagem de analito pelo detector, essa diferença em relação ao valor de índice de refração da fase móvel é detectada. Para isso, o IR do componente analisado deve ser diferente do IR da fase móvel. Através de um forno, a temperatura da coluna cromatográfica será controlada, pois o IR varia com a variação da temperatura (ARGENTON, 2010).

5 Validação de métodos

A qualidade de medições químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem ocasionar resultados não confiáveis e prejuízos financeiros irreparáveis. Portanto, para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar pelo processo de validação (PEREZ, 2010).

Assim, através da validação, será demonstrado que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado a finalidade a que se propõe, atendendo a todas as exigências requeridas (ANVISA). Os parâmetros analíticos comumente empregados para procedimentos cromatográficos são: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

5.1 Parâmetros da validação de métodos

Seletividade é a capacidade em que o método tem de quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Diz-se que um método é seletivo quando produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir entre a resposta de um analito da de outros analitos (INMETRO).

A linearidade, de acordo com a ANVISA, deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma dada faixa, chamada de faixa de trabalho.

Outros parâmetros analisados são a precisão e a exatidão. A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado, sendo demonstrada através da dispersão dos resultados. Já a exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo, em relação a um valor aceito como verdadeiro (ANVISA).

Limite de detecção pode ser descrito como a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Enquanto que o limite de quantificação é definido como a menor quantidade de analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada, com precisão e exatidão aceitáveis (INMETRO).

De acordo com o que especifica a ANVISA, a robustez de um método analítico é a capacidade deste em resistir a pequenas variações que poderiam interferir no resultado analítico. Ou seja, a robustez mede a sensibilidade que um método apresenta frente a pequenas variações, tais como temperatura, pressão, entre outros. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por essas variações em seus parâmetros.

Considerações finais

O desenvolvimento de produtos com baixo teor e sem lactose está aumentando. A necessidade em ofertar estes produtos está fundamentada no número crescente de intolerantes à lactose. Assim, as empresas estão buscando ofertar constantemente novos produtos a estes consumidores. Os métodos de determinação de lactose em lácteos e seus derivados estão em constante pesquisa, sendo que, o procedimento mais utilizado para estas análises e que se mostrou mais eficiente é o da cromatografia líquida de alta eficiência.

Pode-se, ainda, constatar a importância da validação de um procedimento analítico, para que sejam desenvolvidos métodos que produzam resultados confiáveis, levando segurança aos consumidores.

Referências

A evolução do Açúcar. Revista Aditivos e Ingredientes, n. 82, p.34-39, set. 2011.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada – RDC Nº 166, de 25 de julho de 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 25 abr. 2018.

_____. Portaria Nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29PRT_SVS_29_1998_COMP.pdf/feffa45e-7dea-4c6d-9cf3-ef92d014490d>. Acesso em: 25 abr. 2018.

ARGENTON, Ayrton. *Conceitos Fundamentais de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC)*. Conselho Regional de Química – IV Região (SP). São José do Rio Preto, 2010. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2018.

CASSANEGO, D. B.; RICHARDS, N. S.; BERGMANN, G. P. *Análise Sensorial de bebidas achocolatadas enriquecidas com farinha de amaranto, banana, berinjela e maracujá*. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 194-195, 2011.

CHÁVEZ-SERVÁN, Jorge L; CASTELLOTE, Ana I; LÓPEZ-SABATER, M.carmen. *Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection*. Journal Of Chromatography A, [s.l.], v. 1043, n. 2, p.211-215, jul. 2004. Elsevier BV. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.002>>. Acesso em: 21 abr. 2018.

FAEDO, Rubens; BRIÃO, Vandrê Barbosa; CASTOLDI, Suelen; GIRARDELLI, Laisa; MILANI, Adriana. *Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados à hidrólise enzimática*. Revista Ciatec, Passo Fundo, v. 3, n. 1, p.44-54, 2013. Disponível em: <<http://seer.upf.br/index.php/ciatec/article/view/3222/2386>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

FISCHER, Janaína. *Hidrólise de lactose por β -galactosidade de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo*. 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010. Disponível em: <[https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15150/1/Diss Janaina.pdf](https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15150/1/Diss%20Janaina.pdf)>. Acesso em: 17 abr. 2018.

HARRIS, Daniel C. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: _____. *Análise Química Quantitativa*. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnico e Científicos Editora S.A., 2005. Cap. 25. p. 595-627.

INMETRO. Instituto nacional de metrologia, qualidade e tecnologia. *DOQ-CGCRE-008: orientação sobre validação de métodos analíticos*: documento orientativo. INMETRO, Revisão 06, nov. de 2017.

JÄRVINEN, R M K; LOUKASKORPI, M; UUSITUPA, M I J. *Tolerance of symptomatic lactose malabsorbers to lactose in milk chocolate*. European Journal Of Clinical Nutrition, v. 57, n. 5, p.701-705, maio 2003. Springer Nature. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601600>>. Acesso em: 14 abr. 2018.

LANÇAS, Fernando M. *A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente compatíveis?* Scientia Chromatographica, São Paulo, v. 1, n. 2, p.35-61, 2009.

MEDEIROS, Magda Leite; LANNES, Suzana Caetano da Silva. *Avaliação química de substitutos de cacau e estudo sensorial de achocolatados formulados*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 29, n. 2, p.247-253, maio 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. IN 36: *Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas*. 2000. Disponível em: <http://www.lex.com.br/doc_19408_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_36_DE_31_DE_OUT_UBRO_DE_2000.aspx>. Acesso em: 14 abr. 2018.

NATIONAL DAIRY COUNCIL. *Cow's milk allergy versus lactose intolerance*. The Dairy Council Digest, Rosemont, v. 773, n. 3, p.13-18, maio 2006.

PERES, Terezinha Bonanho. *Noções Básicas de Cromatografia. Biológico*, São Paulo, v. 2, n. 64, p.227-229, dez. 2002. Disponível em: <http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v64_2/peres.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2018.

PEREZ, Mary Ângela Fávaro. *Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante?*. Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens, [s.l.], v. 22, n. 3, p.1-9, jul. 2010. Disponível em: <http://www.cetea.ital.org.br/informativo/v22n3/v22n3_artigo2.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2018.

RAMALHO, Maria Eduarda Oliverio; GANECO, Aline Giampietro. *Intolerância à lactose e o processamento de produtos zero lactose*. Revista Interface Tecnológica, São Paulo, v. 13, n. 1, p.119-133, dez. 2016. Disponível em: <<http://159.203.166.88/index.php/interfacetecnologica/article/view/130>>. Acesso em: 14 abr. 2018.

RANGEL, Adriano Henrique do N.; SALES, Danielle c.; URBANO, Stela A.; GALVÃO JÚNIOR, José Geraldo B., ANDRADE NETO, Júlio C. de; MACEDO, Cláudia de Souza. *Lactose intolerance and cow's milk protein allergy*. Food Science And Technology, Campinas, v. 36, n. 2, p. 179-187, jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.0019>>. Acesso em: 14 abr. 2018.

SILVEIRA, Michelle Fernandes et al. *Simultaneous Determination of Lactulose and Lactose in Conserved Milk by HPLC-RID*. Journal Of Chemistry, [s.l.], v. 2015, p.1-6, 2015. Hindawi Limited. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/185967>>. Acesso em: 14 abr. 2018.

WEAVER, Connie; WIJESINHA-BETTONI, Ramani; MCMAHON, Deirdre. Milk and dairy products as part of the diet. In: MUEHLHOFF, Ellen; BENNETT, Anthony; MCMAHON, Deirdre. *Milk and dairy products in human nutrition*. Roma: Fao, 2013. Cap. 4. p. 103-183.