

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

Leandra Natália de Oliveira Neves

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS
PARA AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE TRATAMENTO TÉRMICO EM LEITE
UHT**

Juiz de Fora

2015

LEANDRA NATÁLIA DE OLIVEIRA NEVES

**Desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para avaliação
de indicadores de tratamento térmico em leite UHT**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora
2015

Neves, Leandra Natália de Oliveira.

Desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para avaliação de indicadores de tratamento térmico em leite UHT / Leandra Natália de Oliveira Neves. -- 2015.

153 p.

Orientador: Paulo Henrique Fonseca da Silva

Coorientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2015.

1. Leite UHT. 2. WPNI. 3. Lactulose. 4. Eletroforese. 5. HPLC. I. da Silva, Paulo Henrique Fonseca, orient. II. de Oliveira, Marcone Augusto Leal, coorient. III. Título.

LEANDRA NATÁLIA DE OLIVEIRA NEVES

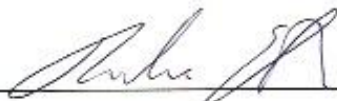
DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE TRATAMENTO
TÉRMICO EM LEITE UHT

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 17/04/2015



Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu



Dr. Rodrigo Stephani



Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira



Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por colocar as oportunidades em meu caminho e me dar capacidade para transpor as dificuldades.

Aos meus pais, Maria José e Valmir, pelos ensinamentos em todos os momentos da minha vida. Em especial à minha mãe pelo apoio eterno, pelo amor imensurável, pelos conselhos e conversas. Mãe, simplesmente amo você!

A minha irmã Vanessa, pela amizade, apoio e “puxões de orelha” e por servir sempre como minha inspiração desde às coreografias aos seis anos de idade até à disciplina de estudo na faculdade.

Ao meu esposo Arthur, pelo amor, companheirismo, paciência, compreensão e apoio durante estes longos dois anos nos quais vivemos fisicamente distantes. Perto ou longe estamos sempre juntos; e juntos, somos imbatíveis! Te amo!

Aos meus amigos João Neves Júnior e Regina Neves pelos momentos de descontração regados a almoços, cafés e pizzas, pelo apoio e pelos conselhos. Vocês são demais!

Ao meu orientador Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva, pelos valiosos ensinamentos profissionais, acadêmicos e pessoais que vou levar sempre comigo. Obrigada por acreditar que seria possível!

Ao meu co-orientador Dr. Marcione A. L. de Oliveira pelas longas conversas no laboratório, por confiar e acreditar no meu trabalho, pelas palavras de incentivo e por sempre me motivar ainda que eu não enxergasse a luz no fim do túnel.

Ao professor Dr. Jair Adriano K. de Aguiar pela disponibilidade na colaboração deste estudo, pelo apoio, ensinamentos, discussões e atenção.

Aos grandes contribuintes deste trabalho: Rafael Guzella e Rafael Marques, o meu muito obrigado pela disponibilidade, amizade, apoio, conversas, dicas e horas

extras de experimento. E, principalmente, por aguentarem meu desespero! Sem vocês todos os frutos deste trabalho não seriam alcançados.

Ao laboratório de Cromatografia Gasosa da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, em especial ao Dr. Fernando César F. Lopes por gentilmente ceder às instalações do laboratório para liofilização das amostras, e ao colaborador Ernando F. Motta pela disponibilidade e cordialidade durante as etapas de liofilização.

Aos TAE's e professores do Departamento de Nutrição e alunos do Laboratório de Valor Nutricional e Composição de Alimentos pelo apoio, companheirismo e pelos momentos felizes, em especial aos colaboradores diretos e amigos: João Pablo, pelas gambiarras, disponibilidade, amizade e discussões; Fernando Bretas, pelo auxílio nas traduções e companhia nos cafés da tarde sempre com histórias inacreditáveis; Vanessa Toledo e Júlia Barra, pela eficiência, dedicação, risadas, e claro, análises e inúmeras repetições de análises.

Aos colegas do GQAG, por me acolherem no grupo e por me ajudarem a concluir esta etapa, em especial: Renata Castro, por sempre me tirar do sufoco não importando qual fosse e por me entender nos momentos de desespero; Fernando Vaz, pela disponibilidade, pelas contribuições relevantes e por ser o melhor químico-programador que conheço; Lucas Duarte, por ser a mesma pessoa que conheci desde o início da faculdade (só que agora mais CDF e *playboy*), por sempre me fazer rir com piadas sem graça, por me ensinar a dançar Funk e por me dar a oportunidade de ter um álbum decente de formatura; Brenda por estar sempre disposta a ajudar e pelos incentivos, ainda que todos os experimentos estejam dando errado; ao professor Rafael Arromba pelas dicas e conversas produtivas.

Às VIPs Tatiana Gomes, Vanessa Toledo, Júlia Francisquini e Arícia Mendes (apesar de sempre furar) por fazerem as segundas-feiras mais gostosas com cafés raros, mas hilários, regados a uma boa história, risadas e fofocas.

Aos meus eternos mestres e amigos Vanessa Aglaê, Elisângela Miguel, Junio de Paula, Denise Sobral e Gisela Machado, obrigada pela amizade, disponibilidade, motivação e pelo ambiente de trabalho sempre agradável. Vocês são brutos!

Aos grandes amigos Larissa Lavorato, Michelle Nascimento, Cássia Cardoso, Vanessa Almeida, Fabiana Almeida e Daniel Lizardo pelas conversas, pelo apoio nos momentos difíceis e desesperadores, pelas saídas, cervejas e viagens das quais jamais esquecerei. Vocês são os melhores! Obrigada por, simplesmente, fazerem parte da minha vida!

Às agências de fomento CNPq e FAPEMIG e ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados pelo apoio e financiamento do projeto.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Curie

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.”

Jean Cocteau

RESUMO

O leite é considerado um alimento rico nutricionalmente por ser fonte de proteínas, carboidrato, vitaminas e minerais. Durante o processamento térmico do leite, reações químicas podem ocorrer gerando modificações de compostos pré-existentes ou formação de novos compostos, os quais se comportam como indicadores do tratamento térmico utilizado. O monitoramento destes indicadores em leite UHT é de grande importância uma vez que permite traçar o perfil do produto e do processo, podendo sugerir intervenções tecnológicas capazes de minimizar custos de produção bem como reduzir a ocorrência de eventuais perdas nutricionais e descaracterização do produto. O presente trabalho teve como objetivo quantificar os indicadores índice de soroproteína não desnaturada – WPNI, 5-hidroximetilfurfural – HMF e lactulose em amostras de leite UHT, com teor regular e reduzido de lactose, comercializadas no mercado nacional. Metodologias analíticas para WPNI e HMF, ambos determinados por métodos espectrofotométricos, foram implantadas e os modelos estatísticos foram ajustados. Dois métodos analíticos de separação para determinação de lactulose foram desenvolvidos e validados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por índice de refração e eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção indireta no ultravioleta. Os resultados obtidos no teste de comparação de médias do teor de lactulose pelos métodos por HPLC e CZE indicaram não haver diferença significativa entre os métodos propostos. A média do índice de WPNI indicou que 76% das amostras em estudo são classificadas como “médio tratamento térmico”. Os índices de HMF livre e total mostraram-se capazes de discriminar amostras com teor regular e com teor reduzido de lactose. Flutuações nos índices de WPNI e HMF livre e no teor de lactulose das amostras analisadas sugeriram a ocorrência de falta de uniformidade do processamento adotado pelas indústrias nacionais processadoras de leite UHT, o que foi confirmado pelo efeito de marca sobre estes índices no produto. Verificou-se que os métodos analíticos implantados e desenvolvidos são capazes de atender à demanda de métodos de controle aptos em avaliar o processo e oferecer suporte para desenvolvimento e estudo do processamento. Os indicadores monitorados remetem a ocorrência de despadrão do perfil químico do leite UHT atualmente comercializado no mercado nacional, refletindo a necessidade de um maior controle do processamento pelas indústrias processadoras.

Palavras-chave: Leite UHT. Desnaturação. WPNI. HMF. Lactulose. Eletroforese. HPLC.

ABSTRACT

Milk is considered a nutritionally rich food because it is a source of protein, carbohydrate, vitamins and minerals. During milk heat treatment, chemical reactions can occur causing changes of pre-existing compounds or formation of new compounds, which can be used as indicators of heat treatment used. The monitoring of these indicators in UHT milk is very important since they allow to draw the product and process profile and can suggest technological interventions that can minimize production costs and reduce the occurrence of any nutritional losses and distortion of the product. This study aimed to quantify the indicators whey protein nitrogen index - WPNI, 5-hydroxymethylfurfural – HMF and lactulose in UHT milk samples, with regular and reduced lactose content, sold in the domestic market. Analytical methodologies for WPNI and HMF (both measured by spectrophotometric methods) were implemented and the statistical models were fitted. Two analytical methods of separation for lactulose determination were developed and validated using high performance liquid chromatography (HPLC) with detection by refractive index and capillary zone electrophoresis (CZE) with indirect UV detection. The results obtained in the mean comparison test of lactulose content by HPLC and CZE methods showed no significant difference between the proposed methods. The average WPNI index indicated that 76% of the samples studied are classified as "medium heat treatment". The contents of free and total HMF were able to discriminate samples with regular and reduced lactose content. Fluctuations in WPNI, free HMF and lactulose content of the examined samples suggested the occurrence of non-uniformity of processing adopted in processing UHT milk of national industries, which was confirmed by the effect of these indicators in the product. It was found that analytical methods studied are able to achieve the control methods demanded to evaluate the process and support the development and study of processing. The monitored indicators refer to the occurrence of lack of standardization in the chemical profile of UHT milk currently commercialized in Brazilian market, reflecting the need for greater control of processing by milk processing industries.

Keywords: UHT milk. Denaturation. WPNI. HMF. Lactulose. Electrophoresis. HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de isomerização da lactose em lactulose no leite via transformação de LA.	40
Figura 2. Esquema do mecanismo de separação HILIC.	45
Figura 3. Esquema de refração da luz incidente (a) pelo eluato sem amostra, e (b) pela amostrana célula de fluxo evidenciando a mudança da proporção de luz em cada elemento de fotodiodo.	48
Figura 4. Princípio da eletroforese capilar de zona em solução livre (a) estado inicial, (b) zonas distintas de amostra, gerando uma migração diferencial.	50
Figura 5. Representação da superfície interna de um capilar de sílica fundida e perfil radial do fluxo eletrosmótico se deslocando do anodo para o catodo em fluxo normal.	52
Figura 6. Perfil de velocidade radial para (a) um fluxo induzido por um campo elétrico (fluxo eletrosmótico), e (b) um fluxo induzido por pressão (fluxo laminar), e correspondente efeito na variância da distribuição.	53
Figura 7. Esquema da metodologia usada para análise do índice de WPNI em leite UHT.	56
Figura 8. Esquema da metodologia usada para análise do índice de HMF em leite UHT.	63
Figura 9. Esquema do preparo da amostra para análise de lactulose por HPLC e CZE em leite UHT.	99
Figura 10. Cromatogramas (I) amostra 01, (II) amostra 02, (III) amostra 03. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.	103

Figura 11. Cromatogramas (I) amostra 04, (II) amostra 05, (III) amostra 06. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.....	104
Figura 12. Cromatogramas (I) amostra 07, (II) amostra 08, (III) amostra 09. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.....	105
Figura 13. Cromatogramas (I) amostra 10, (II) amostra 11, (III) amostra 12. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.....	106
Figura 14. Cromatogramas (I) amostra 13, (II) amostra 14, (III) amostra 15. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.....	107
Figura 15. Cromatogramas (I) amostra 16, (II) amostra 17, (III) amostra 18. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.....	108
Figura 16. Cromatogramas (I) amostra 19, (II) amostra 20, (III) amostra 21. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.....	109

Figura 17. Eletroferogramas (I) amostra 01, (II) amostra 02 e (III) amostra 03. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.114

Figura 18. Eletroferogramas (I) amostra 04, (II) amostra 05 e (III) amostra 06. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.115

Figura 19. Eletroferogramas (I) amostra 07, (II) amostra 08 e (III) amostra 09. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.116

Figura 20. Eletroferogramas (I) amostra 10, (II) amostra 11 e (III) amostra 12. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.117

Figura 21. Eletroferogramas (I) amostra 13, (II) amostra 14 e (III) amostra 15. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.	118
Figura 22. Eletroferogramas (I) amostra 16, (II) amostra 17 e (III) amostra 18. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.	119
Figura 23. Eletroferogramas (I) amostra 19, (II) amostra 20 e (III) amostra 21. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.	120
Figura 24. Mapa conceitual para determinação de indicadores de tratamento térmico em leite UHT.	133
Figura 25. Cromatogramas para FM ACN-água (60:40) + 0,2%TEA para (a) padrão de lactulose 0,1 mg,mL ⁻¹ e, (b) padrão de lactose 0,1 mg,mL ⁻¹ . Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU.....	141

Figura 26. Cromatogramas para FM ACN-água (65:35) + 0,2%TEA para (a) padrão de lactulose 0,1 mg,mL ⁻¹ e, (b) padrão de lactose 0,1 mg,mL ⁻¹ . Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU.....	142
Figura 27. Cromatogramas para FM ACN-água (67:33) + 0,2%TEA para (a) padrão de lactulose 0,1 mg,mL ⁻¹ e, (b) padrão de lactose 0,1 mg,mL ⁻¹ . Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU.....	142
Figura 28. Cromatogramas para FM ACN-água (75:25) + 0,2%TEA para (a) padrão de lactulose 0,1 mg,mL ⁻¹ e, (b) padrão de lactose 0,1 mg,mL ⁻¹ . Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU.....	143
Figura 29. Cromatograma de coinjeção de padrão de lactulose e lactose a 0,1 mg,mL ⁻¹ Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU, ACN-água (75:25)+0,2%TEA.R _s = 1,76.....	144
Figura 30. Cromatograma de coinjeção de padrão de lactulose e lactose a 0,1 mg,mL ⁻¹ Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,5 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU, ACN-água (75:25)+0,2%TEA.R _s = 1,74.....	145
Figura 31. Cromatograma de coinjeção de padrão de lactulose e lactose a 0,1 mg,mL ⁻¹ Condições de injeção: fluxo isocrático de 2,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU, ACN-água (75:25)+0,2%TEA.R _s = 1,44.....	146
Figura 32. Eletroferogramas obtidos no estudo das condições de injeção (a) coinjeção de padrões 0, 5 mmol.L ⁻¹ com capilar TSP 50,0 cm L _E , 50 mbar/6 s, -11kV; (b) amostra 01 com capilar TSP 50,0 cm L _E , 50 mbar/6 s, -11kV; (c) coinjeção de padrões 0, 5 mmol.L ⁻¹ com capilar TSU 50,0 cm L _E , 10 mbar/1 s, -15kV; (d) amostra 01 com capilar TSU 50,0 cm L _E , 10 mbar/1 s, -15kV.	147

Figura 33. Cromatograma de amostra submetida ao processo de tratamento 1 (Tabela 24). Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU, ACN-água (65:35)+0,2%TEA.....	148
Figura 34. Cromatograma de amostra submetida ao processo de tratamento 2 (Tabela 24). Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU, ACN-água (65:35)+0,2%TEA.....	149
Figura 35. Cromatograma de amostra submetida ao processo de tratamento 3 (Tabela 24). Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU, ACN-água (65:35)+0,2%TEA.....	150
Figura 36. Cromatograma de amostra submetida ao processo de tratamento 4 (Tabela 24). Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min ⁻¹ , sensibilidade 512 DelRIU, ACN-água (65:35)+0,2%TEA.....	151
Figura 37. Eletroferogramas de amostras submetidas aos processos de tratamento (1) método 01, (2) método 02, (3) método 03 e (4) método 04 (Tabela 24). Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.....	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do tipo de tratamento térmico o qual o leite foi submetido de acordo com índice de WPNI.....	36
Tabela 2. Classificação e identificação das amostras em estudo.....	55
Tabela 3. Combinação de filtrados dos padrões ADPI de leite para construção da curva analítica.....	57
Tabela 4. Valores para ajuste do modelo para índice de WPNI.....	58
Tabela 5. Coeficientes do modelo proposto para WPNI e valores de F para verificação da falta de ajuste.....	59
Tabela 6. Análise estatística descritiva do índice de WPNI das amostras comerciais de leite UHT (N=63).....	60
Tabela 7. Índice médio de WPNI para as amostras de leite UHT em estudo.....	61
Tabela 8. Valores para ajuste do modelo para índice de HMF livre e total.....	64
Tabela 9. Coeficientes calculados para o modelo de HMF livre e total e valores de F para verificação da falta de ajuste.....	65
Tabela 10. Análise estatística descritiva do índice de HMF livre e total das amostras de leite UHT em estudo.....	66
Tabela 11. Média dos índices de HMF livre para amostras de leite UHT em estudo.....	68
Tabela 12. Média do índice de HMF total para amostras de leite UHT em estudo...	69
Tabela 13. Proporção da FM constituída por ACN e água e cálculo da resolução (R_s) para cada tentativa.....	76
Tabela 14. Condições de injeção e aquisição de dados para HPLC.....	78
Tabela 15. Limites de detecção e quantificação.....	79

Tabela 16. Valores de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo do teor de lactulose para uma mesma amostra avaliada por HPLC.	79
Tabela 17. Resultados para percentual de recuperação de lactulose para o método proposto.	80
Tabela 18. Avaliação das condições de injeção para CZE.	86
Tabela 19. Condições de injeção e aquisição de dados otimizadas para CZE.	88
Tabela 20. Limites de detecção e quantificação do método proposto por CZE.	88
Tabela 21. Valores de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo do teor de lactulose para uma mesma amostra avaliada por CZE.	89
Tabela 22. Resultados para percentual de recuperação de lactulose obtidos para o método analítico por CZE.	89
Tabela 23. Classificação e identificação das amostras em estudo.	93
Tabela 24. Descrição dos métodos de preparo da amostra avaliados.	95
Tabela 25. Análise estatística descritiva do teor de lactulose das amostras de leite UHT em estudo por HPLC.	110
Tabela 26. Teor médio de lactulose nas amostras de leite UHT com teor regular de lactose em estudo, obtido por HPLC.	111
Tabela 28. Análise estatística descritiva do teor de lactulose nas amostras de leite UHT em estudo, por CZE.	121
Tabela 29. Teor médio de lactulose nas amostras de leite UHT com teor regular de lactose em estudo, obtido por CZE.	122
Tabela 30. Análise de correlação entre os métodos HPLC e CZE propostos.	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - percentual;

% m/m – percentual de massa em relação à massa;

% m/v – percentual de massa em relação ao volume;

%v/v – percentual de volume em relação ao volume;

°C – graus Celsius (unidade de temperatura);

μ_{ep} – mobilidade eletroforética;

μm - micrômetros (unidade de medida de comprimento);

ACN – acetonitrila;

ADPI – do inglês, *American Dairy Products Institute*;

AGE – do inglês, *Advanced Glycation End Products*

ANOVA - Análise de Variância; do inglês, *Analysis of Variance*;

AOAC – do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*;

bar – bar (unidade de medida de pressão);

cm – centímetro (unidade de medida de comprimento);

CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio; do inglês, *cetyl trimethylammonium bromide*;

CZE – do inglês, *Capillary Zone Electrophoresis*;

CZE-UV – CZE com detecção na região do ultravioleta;

D.E. – diâmetro externo;

D.I. – diâmetro interno;

DAD – Detector com Arranjo de Diodos; do inglês, *Diode Array Detector*

ddp – diferença de potencial;

DeRIU – unidade de índice de refração; do inglês, *Refractive Index Units*;

DPR – desvio-padrão relativo (parâmetro estatístico);

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;

EOF – fluxo eletrosmótico; do inglês, *electrosmotic flow*;

EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais;

EUA – Estados Unidos da América;

F.C. – fator de concentração;

FDA-USA – do inglês, *Food and Drug Administration of the United State of America*;

FE – fase estacionária;

FM – fase móvel;

g – grama (unidade de medida de massa);

h – hora (unidade de medida de tempo);

HILIC – Cromatografia Líquida por Interação Hidrofílica; do inglês, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*

HMF – 5-Hidroximetilfurfural;

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; do inglês, *High Pressure Liquid Chromatography*;

HPLC-RI – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por índice de refração; do inglês *HPLC by refractive index*;

IDF – Federação Internacional de Lácteos; do inglês, *International Dairy Federation*

IR – índice de refração;

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada; do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*;

kg – quilograma (unidade de medida de massa);

L – litro (unidade de medida de volume);

LOD – Limite de detecção; do inglês, *Limit of Detection*;

LOQ – Limite de quantificação; do inglês, *Limit of Quantification*;

min – minutos (unidade de medida de tempo);

mL – mililitro (unidade de medida de volume);

mm – milímetro (unidade de medida de comprimento);

mol – unidade de quantidade de matéria;

nm – nanômetro (unidade de medida de comprimento);

NPLC – Cromatografia Líquida de Fase Normal, do inglês; *Normal Phase Liquid Chromatograph*;

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – valor p estatístico;

p.a. – do inglês, *pro analysis*;

PDC – ácido 2,6-piridinodicarboxílico;

pH – potencial hidrogeniônico;

pKa – cologaritmo da constante de dissociação ácida;

RM – reação e Maillard;

RPLC – Cromatografia Líquida de Fase Reversa, do inglês; *Reverse Phase Liquid Chromatograph*;

TBA – Ácido Tiobarbitúrico;

TCA – Ácido Tricloroacético;

TEA – trietilamina;

TSP – capilar com recobrimento externo de poliimida;

TSU – capilar com recobrimento externo de teflon transparente ao UV;

u.a. – unidade de absorvância;

UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora;

UHT – Ultra Alta Temperatura; do inglês, *Ultra High Temperature*,

USA – do inglês, *United States of America*;

UV/VIS – região do espectro Ultravioleta e Visível;

V – voltz (unidade de medida de potencial elétrico);

vs – versus;

WPN – *do inglês, Whey Protein Nitrogen;*

WPNI – *do inglês, Whey Protein Nitrogen Index;*

λ - lâmbda, símbolo usado para comprimento de onda.

SUMÁRIO

Introdução	30
Leite UHT e os indicadores de tratamento térmico	33
1. Leite UHT	33
2. Indicadores de tratamento térmico em leite UHT	34
2.1. Índice de soroproteína não desnaturada (Whey Protein Nitrogen Index - WPNI).....	35
2.2. 5-Hidroximetilfurfural (HMF).....	36
2.3. Lactulose.....	38
Métodos de separação: cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – Conceitos básicos.....	43
1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	43
1.1. Cromatografia líquida por interação hidrofílica (Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography – HILIC).....	44
1.2. Detecção por índice de refração	46
2. Eletroforese Capilar.....	49
2.1. Modos de separação.....	49
2.2. Fundamentos gerais de eletroforese capilar	50
Determinação espectrofotométrica do índice de soroproteína não desnaturada e 5-hidroximetilfurfural em amostras comerciais de leite UHT	54
1. Introdução	54
2. Objetivo	54
3. Execução.....	54
4. Aquisição das amostras comerciais	54

5. Implantação da metodologia para determinação do índice de WPNI nas amostras comerciais em estudo	55
4.1. Construção da curva analítica.....	57
4.2. Ajuste do modelo para quantificação do índice de WPNI	58
4.3. Quantificação do índice de WPNI nas amostras de leite UHT	60
5. Implantação de metodologia para determinação do índice de HMF nas amostras comerciais em estudo	62
5.1. Construção da curva analítica.....	63
5.2. Ajuste do modelo para quantificação do índice de HMF livre e total.....	64
5.3. Quantificação do índice de HMF livre e total em leite UHT	65
6. Conclusão	71
Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lactulose por HPLC com detecção por índice de refração	73
1. Introdução	73
2. Objetivo	73
3. Execução.....	73
4. Desenvolvimento do método	74
4.1. Estudo da FM.....	75
4.2. Estudo do fluxo da FM	77
4.3. Metodologia desenvolvida para quantificação de lactulose em leite UHT por HPLC	77
5. Validação do método desenvolvido para quantificação de lactulose por HPLC em leite UHT	78
5.1. Sensibilidade.....	78

5.2. Precisão	79
5.3. Exatidão	80
6. Conclusão	81
Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lactulose por CZE	
com detecção indireta no ultravioleta	82
1. Introdução	82
2. Objetivo	82
3. Execução.....	83
4. Desenvolvimento do método	83
4.1. Estudo do eletrólito	83
4.2. Estudo das condições de injeção e aquisição de dados	85
4.3. Metodologia desenvolvida para quantificação de lactulose em	
leite UHT por CZE	87
5. Validação dos métodos desenvolvidos para quantificação de	
lactulose em leite UHT	88
5.1. Sensibilidade.....	88
5.2. Precisão	89
5.3. Exatidão	89
6. Conclusão	90
Investigação de métodos de preparo de amostra e aplicação dos métodos de	
separação por HPLC-RI e CZE-UV indireto para quantificação de lactulose em	
leite UHT	92
1. Introdução	92
2. Objetivo	93
3. Aquisição das amostras comerciais	93

4. Investigação dos métodos de preparo de amostra para quantificação de lactulose em leite UHT por HPLC e CZE	94
4.1. Execução	94
4.2. Estudo dos métodos de preparo de amostra	94
5. Quantificação do teor de lactulose em amostras comerciais de leite UHT por HPLC com detecção por índice de refração	100
5.1. Execução	100
5.2. Aplicação da metodologia desenvolvida	100
5.3. Método de quantificação	100
6. Quantificação do teor de lactulose em amostras comerciais de leite UHT por CZE com detecção indireta no UV	112
6.1. Execução	112
6.2. Aplicação da metodologia desenvolvida	113
6.3. Método de quantificação	113
7. Correlação entre os métodos analíticos desenvolvidos.....	123
8. Conclusão	124
Avaliação dos indicadores WPNI, HMF e lactulose para caracterização do perfil das amostras comerciais de leite UHT em estudo	125
1. Avaliação do comportamento dos indicadores nas amostras comerciais selecionadas	125
2. Uso de indicadores como ferramenta para avaliação do processamento térmico e identificação de não-conformidades	128
3. Avaliação dos métodos utilizados para determinação dos indicadores em estudo	130

4. Elaboração de mapa conceitual para avaliação de indicadores de tratamento em leite UHT	132
Considerações Finais	135
Referências Bibliográficas	136
Apêndices.....	141

INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento rico nutricionalmente por ser fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. Além de apresentar diferentes tipos de nutrientes essenciais para a saúde, se destaca pela interação e biodisponibilidade destes nutrientes. Apesar da existência de mitos a cerca do consumo de leite e derivados, verifica-se excelentes indicadores de participação ativa deste alimento na prevenção da obesidade (LOUIE *et al.*, 2011), doenças cardiovasculares (KONDO *et al.*, 2013), diabetes (RICE *et al.*, 2013) e síndrome metabólica (KIM, 2013; MCGREGOR e POPPITT, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o consumo de três porções diárias de leite ou derivados.

Durante o processamento térmico do leite, reações químicas podem ocorrer gerando modificações de compostos pré-existentes ou formação de novos. Portanto, o monitoramento destas substâncias, denominadas indicadores de tratamento térmico, se tornam necessárias por oferecerem informações únicas e relevantes sobre o processamento utilizado.

O mercado do leite UHT demonstrou um crescimento global ao longo dos anos. No Brasil o consumo *per capita* de leite UHT para o ano de 2014 foi de 178 litros e, de acordo com previsões do setor lácteo estima-se ainda um crescimento de 15% para os próximos oito anos (MILKPOINT, 2014). Todo este desenvolvimento do mercado nacional do leite Longa Vida pode ser justificado pela ascensão econômica da classe C, mudanças nos hábitos alimentares, expressiva participação do público infantil, o qual é o maior consumidor de leite branco do mundo, e pelo crescimento da taxa de exportação para países como a Venezuela.

Neste cenário, com o aumento da produção de leite UHT e o consequente crescimento do produto no setor lácteo, torna-se imperioso diagnosticar e estudar os indicadores de tratamento térmico os quais permitem traçar o perfil do produto e do processo, podendo sugerir intervenções tecnológicas capazes de minimizar custos de produção bem como reduzir a ocorrência de eventuais perdas nutricionais e descaracterização do produto causadas pela excessiva exposição do leite ao calor.

O uso de métodos analíticos capazes de oferecer resultados rápidos e precisos quanto à ocorrência destes indicadores no produto torna-se cada vez mais necessário, e tem despertado o interesse da indústria a qual busca incessantemente por padronização de processo, manutenção e controle acurado da qualidade do produto.

O presente trabalho apresentou como objetivo geral quantificar três importantes indicadores de intensidade do tratamento térmico aplicado ao leite destinado à produção de leite UHT, implantando metodologias analíticas para índice de soroproteína não desnaturada (WPNI), 5-hidroximetilfurfural (HMF) e desenvolvendo metodologias analíticas para lactulose. Os objetivos específicos apresentam-se listados abaixo:

- Implantar as metodologias analíticas para determinação de HMF e WPNI em leite no laboratório de Composição e Valor Nutricional dos Alimentos – Departamento de Nutrição/UFJF.
- Desenvolver metodologias analíticas para determinação de lactulose utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar de zona (CZE).

- Caracterizar o perfil do leite UHT atualmente comercializado no mercado nacional, com base nos indicadores WPNI, HMF e lactulose, visando o controle do processamento quanto à intensidade do tratamento térmico aplicado.

LEITE UHT E OS INDICADORES DE TRATAMENTO TÉRMICO

1. Leite UHT

Leite UHT (do inglês, *Ultra High Temperature*) ou UAT (ultra-alta temperatura), também conhecido como leite Longa Vida, é definido como leite homogeneizado submetido a temperatura entre 130 °C e 150°C durante 2 a 4 segundos, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a um temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

O processamento UHT é considerado uma técnica de preservação de alimentos líquidos em geral, através da sua exposição ao calor intenso por um rápido período de tempo, eliminando do produto os microrganismos vegetativos e algumas formas esporuladas (SILVA, 2004). No entanto, este resultado só se aplica caso o produto permaneça em condições assépticas, devendo-se, portanto, evitar recontaminação durante envase e estocagem.

Existem dois tipos principais de processamento UHT: processamento direto e indireto. No processamento UHT direto o produto entra em contato direto com o meio de aquecimento, seguido por um resfriamento instantâneo em câmara de vácuo, e posterior resfriamento adicional indireto até que a temperatura de envase seja atingida. Este processamento pode ser efetuado através da injeção de vapor, ou seja, o vapor é injetado diretamente no produto; ou através do processo de infusão de vapor, no qual o produto é introduzido em uma câmara de vapor. No processamento UHT indireto, o calor é transferido para o produto por meio de uma parede divisória trocadora de

calor, o qual pode ser caracterizado por trocadores de calor a placas, tubulares ou com superfície raspada (SILVA, 2004).

2. Indicadores de tratamento térmico em leite UHT

Durante o processo de ultrapasteurização o leite é submetido a elevadas temperaturas por curtos períodos de tempo. Segundo Walstra e Janness (1984), as principais modificações causadas pela aplicação do calor ao leite são: eliminação de gases; aumento na quantidade de fosfato coloidal e diminuição da concentração de cálcio iônico, isomerização parcial da lactose, formando lactulose e ácidos orgânicos; hidrólise dos ésteres fosfóricos, particularmente os da caseína; diminuição do pH do leite e aumento de sua acidez; insolubilização de grande parte das soroproteínas devido à desnaturação; inativação de enzimas; reação entre as proteínas e a lactose, especialmente a reação de Maillard (RM), tendo como consequência à diminuição da lisina disponível; formação de grupos sulfidril livres e agregação das micelas de caseína.

De acordo com Mortier *et al.* (2000) existem dois tipos de reações químicas que são utilizadas para avaliar o tratamento térmico de produtos lácteos, sendo os constituintes avaliados classificados como indicadores Tipo 1 relacionado com reações de degradação, desnaturação e inativação de componentes termolábeis, como enzimas e soroproteínas; e indicadores Tipo 2, os quais são associados às reações de formação de novas substâncias como produtos da RM e geração de lactulose. Em geral, utiliza-se mais de um tipo de indicador de tratamento térmico para se avaliar o alimento em questão.

A Comissão Européia bem como a Federação Internacional de Lácteos (*International Dairy Federation* - IDF) propõem dois indicadores de tratamento

térmico como parâmetros de classificação do leite tratado termicamente: a lactulose e a β -lactoglobulina (β -lg), Assim, para ser classificado como leite UHT, o leite deve conter um teor de lactulose entre 100 mg.L⁻¹ e 600 mg.L⁻¹ e um conteúdo de β -lg entre 2000 mg.L⁻¹ e 50 mg.L⁻¹ (ELLIOTT *et al.*, 2005).

2.1. Índice de soroproteína não desnaturada (*Whey Protein Nitrogen Index - WPNI*)

Fenômenos de desnaturação e agregação de soroproteínas e sua interação com caseínas durante o processamento térmico desempenham um importante papel nas propriedades funcionais do produto final (PATEL *et al.*, 2007).

O grau de desnaturação de soroproteínas em leite tratado termicamente é usualmente indicado pelo índice de soroproteína não desnaturada (*whey protein nitrogen index - WPNI*) o qual é mensurado a partir do teor (em miligramas) de nitrogênio de soroproteínas não desnaturadas (*whey protein nitrogen - WPN*) por miligrama de pó ou mililitro de leite fluido (PATEL *et al.*, 2007). Neste contexto, a fração do soro de leite é frequentemente utilizada para monitoramento dos efeitos do calor sob os produtos lácteos, uma vez que tais proteínas são diretamente afetadas.

O efeito da desnaturação e agregação das soroproteínas no leite UHT depende da intensidade e do tempo do tratamento térmico aplicado, sendo assim, o leite tratado termicamente pode ser classificado quanto ao tipo de tratamento térmico em que é submetido de acordo com as normas do *American Dairy Products Institute* (ADPI) dispostas na Tabela 1 (PATEL *et al.*, 2007; PERRONE *et al.*, 2008).

Tabela 1. Classificação do tipo de tratamento térmico o qual o leite foi submetido de acordo com índice de WPNI.

Classificação do produto	WPNI (mg WPN.mL⁻¹ produto)	Tratamento térmico
Baixo tratamento térmico	≥ 6,0	75°C / 20 s
Médio tratamento térmico	1,51 – 5,99	85°C-105°C por 1 min-2 min
Alto tratamento térmico	< 1,50	120°C-135°C por 2 min-3 min

Fonte: Adaptado de Patel *et al.* (2007), Perrone *et al.* (2008).

Para produtos submetidos a médio tratamento térmico a agregação protéica é caracterizada por interações entre as soroproteínas via grupos sulfidrilas, enquanto que, em produtos de alto tratamento térmico a agregação protéica resulta principalmente pela ocorrência de interações entre β -lactoglobulinas e κ -caseínas por meio de ligações dissulfídicas (ROBINSON, 1986). Tais interações aumentam o grau de hidrofobicidade do produto e podem interferir diretamente nas propriedades funcionais do mesmo.

2.2. 5-Hidroximetilfurfural (HMF)

A RM tende a ocorrer em uma grande variedade de alimentos, com destaque para produtos lácteos, causando importantes alterações na cor, sabor, *flavor*, valor nutricional, propriedades antioxidantes e textura do alimento. Sua ocorrência apresenta-se associada à fatores como: alimentos processados a temperaturas acima de 40°C, presença de grupos amino reativos e açúcares redutores, e pH do alimento entre 6 e 8 (SHIBAO e BASTOS, 2011).

A RM pode ser dividida em três fases: inicial, intermediária e final. A fase inicial consiste no ataque nucleofílico do grupo α -carbonílico do açúcar redutor ao grupamento amina de uma proteína, culminando na formação do

primeiro composto estável da RM, o produto de Amadori (lactosil-lisina). Esta fase da RM está diretamente relacionada à perda da qualidade nutricional no leite, devido à formação de compostos como a lactosil-lisina a qual bloqueia os resíduos deste aminoácido (PEREDA *et al.*, 2009).

Prolongando o aquecimento ou armazenamento inicia-se a segunda fase; nesta etapa intermediária pode-se verificar a origem de uma série de reações como desidratação, enolização e retroaldolização, a partir dos compostos de Amadori, gerando a formação de compostos dicarbonílicos, redutonas, derivados do furfural como o 5-hidroximetilfurfural. Tais produtos correspondem a compostos químicos com ampla variação no peso molecular e ocorrem tanto nos alimentos submetidos a qualquer tipo de tratamento térmico quanto no organismo humano, neste caso, denominada de reação de Glicação (VAN BOEKEL, 1998; SHIBAO e BASTOS, 2011).

A última fase da RM consiste na reação dos compostos intermediários com resíduos de lisina ou arginina de proteínas formando compostos estáveis, além de reações de fragmentação e polimerização gerando melanoidinas e estruturas fluorescentes (VAN BOEKEL, 1998). Os produtos da RM tendem a causar diminuição da digestibilidade, inibição de enzimas proteolíticas e glicolíticas, além da produção de compostos tóxicos que contribuem para depreciação do valor nutricional do alimento (FRIEDMAN, 1996).

A redução do teor dos produtos da RM pode ser obtida através da utilização de tratamento térmico e métodos de cozimento mais brandos e em alimentos com alta atividade de água (KEENEY e BASSETTE, 1959).

Estudos recentes demonstram a interferência dos produtos da RM em processos biológicos, os chamados AGE (*Advanced Glycation End Products*),

os quais estão relacionados à inibição do crescimento celular, redução da digestibilidade e absorção de proteínas, hipertrofia de órgãos, redução de atividades enzimáticas e intestinais. Além disso, estes estudos apontam o potencial dos AGE para desencadear desequilíbrio na reação de glicação, com importantes implicações negativas para indivíduos diabéticos e insuficientes renais, além de estarem relacionados ao aumento dos riscos de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas em grupos populacionais expostos ao consumo excessivo destas substâncias (SHIBAO e BASTOS, 2011; BASTOS *et al.*, 2012).

O estudo desenvolvido por Bastos *et al.* (2012) demonstra que produtos da RM incorporados ao organismo através da alimentação são os principais responsáveis pelo aumento exacerbado da concentração endógena de AGE. A atividade biológica dos produtos da RM tende a interferir na biodisponibilidade de minerais, uma vez que estes produtos tendem a formar quelatos com íons metálicos como magnésio e cálcio.

O 5-hidroximetilfurfural (HMF) é um composto intermediário da RM, detectável por técnica espectrofotométrica que pode ser usado como indicador de tratamentos térmicos severos, a exemplo o processamento UHT e o processo de esterilização (MORTIER *et al.*, 2000).

2.3. *Lactulose*

Durante o tratamento térmico do leite, a lactose, dissacarídeo natural do leite com ocorrência média de 4,9 gramas por 100 mililitros de produto, encontra-se associada ao desenvolvimento da RM e ao processo de isomerização.

A lactulose é um dissacarídeo, formado por resíduos de frutose e galactose, obtida a partir da isomerização da lactose, a qual pode ocorrer em meio alcalino ou durante o processamento térmico do leite (ZHANG *et al.*, 2010). Como principais características apresenta solubilidade de 76,4 g.100g⁻¹ de água a 30°C e poder edulcorante 1,5 vezes mais baixo que da lactose. Ao contrário da lactose, não pode ser hidrolisada por enzimas intestinais humanas, no entanto, é fermentada por bactérias presentes no cólon, principalmente por espécies de *Bifidobacterium* sp., agindo como ingrediente prebiótico. É estável quando aquecida até 130°C por 10 minutos em meios de pH baixo, sendo uma característica desejável em se tratando de processamento de alimentos (FOX e MCSWEENEY, 2009).

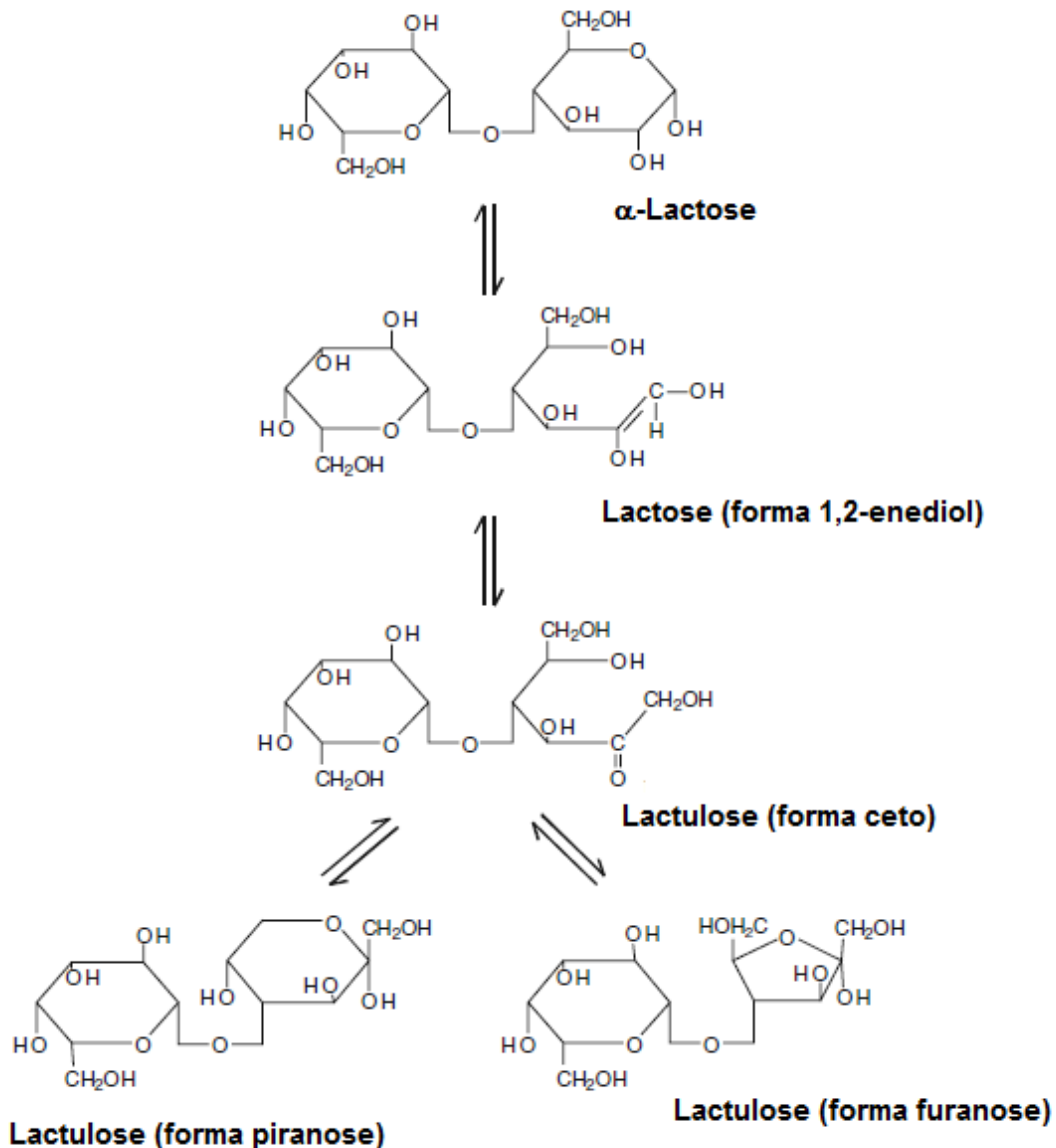
a) *Processo de isomerização da lactose*

Teoricamente, a lactulose pode ser obtida a partir da lactose por meio do rearranjo do resíduo de glicose em uma molécula de frutose, através da modificação da estrutura de aldose em cetose.

Segundo Adachi e Patton (1961) desde a década de 30 estudos sugerem que a principal forma de isomerização da lactose no leite ocorre via transformação de Lobrey de Bruyn-Alberda van Ekenstein (LA), seguida por degradação de outros ácidos e açúcares. Reações tipo LA podem ser catalizadas por bases, ácidos ou por metais alcalinos terrosos. A formação da lactulose durante o processamento térmico do leite é particularmente favorecida pelo ligeiro aumento do pH; além da presença de aminoácidos que provavelmente tendem a contribuir para a catálise das reações do tipo LA (OLANO *et al.*, 1989; CHÁVEZ-SERVÍN *et al.*, 2004; FOX e MCSWEENEY, 2009).

A Figura 1 demonstra o processo de formação da lactulose a partir da lactose via transformação de LA.

Figura 1. Esquema de isomerização da lactose em lactulose no leite via transformação de LA.



Fonte: Adaptado de Fox e McSweeney (2009).

Aider e Halleux (2007) descrevem a influência de sulfatos e fosfatos no processo de isomerização da lactose. Tais compostos apresentam como característica a prevenção da oxidação dos dissacarídeos e, por esta razão, reduzem a taxa de isomerização da lactose e consequente formação da lactulose. Sendo assim, o uso destes compostos em alimentos com elevado teor de lactose

tende a mascarar o efeito do uso de temperaturas mais elevadas, ou da exposição prolongada ao calor.

b) Lactulose como indicador térmico

De acordo com Chávez-Servín *et al.* (2004) a lactulose não ocorre naturalmente no leite sendo formada apenas em produtos lácteos submetidos ao calor e, portanto, é considerada um bom indicador de tratamento térmico para leite e derivados.

A lactulose é o principal composto formado durante o tratamento térmico do leite que possui padrão de formação proporcional ao aquecimento o qual o produto foi submetido (ERBERSDOBLER, 1995). Por apresentar comportamento tão peculiar frente aos demais compostos gerados, ou modificados, durante o processamento térmico, como HMF, desnaturação protéica, furosina, carboximetilisina, dentre outros; a lactulose tem despertado interesse de diversos órgãos para que seu uso como indicador de tratamento térmico seja legalmente adotado. A Federação Internacional de Lácteos (*International Dairy Federation - IDF*) e a União Européia referem-se ao teor de lactulose como um parâmetro capaz de diferenciar amostras de leite submetidas a tratamentos térmicos distintos, podendo ser usada principalmente para diferenciação entre leite UHT e leite esterilizado; sendo o limite de 600 miligramas de lactulose por litro de produto definido para distinguir entre estes dois tipos de tratamento térmico (MORTIER *et al.*, 2000).

Feinberg *et al.* (2006) verificaram que a reação de isomerização da lactose é acelerada quando a temperatura de aquecimento ultrapassa 90°C. Neste caso, a lactulose é considerada um ótimo indicador da extensão do tratamento térmico

uma vez que sua formação tende a exibir um comportamento linear com o aquecimento (ERBERSDOBLER, 1995).

Alguns estudos demonstram que a determinação do teor de lactulose em leite permite a diferenciação dos tipos de tratamentos térmicos utilizados (pasteurização, UHT, esterilização), além de possibilitar a diferenciação entre processamento UHT direto e indireto (MORTIER *et al.*, 2000; MARCONI *et al.*, 2004; FEINBERG *et al.*, 2006; LAN *et al.*, 2010).

Atualmente, os métodos analíticos oficiais para determinação e quantificação da lactulose em leite utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou método enzimático, ambos padrão internacional (IDF, 2004; 2007).

MÉTODOS DE SEPARAÇÃO: CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ELETROFORESE CAPILAR – CONCEITOS BÁSICOS

1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária (FE) geralmente de grande área superficial e outra que percola através desta, denominada fase móvel (FM). Sendo assim, é uma técnica de separação baseada na migração da amostra através de uma FE por intermédio de uma FM. Após a introdução da amostra no sistema cromatográfico, os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases e migram lentamente. O equilíbrio de distribuição determina a velocidade com a qual cada componente migra através do sistema (SKOOG *et al.*, 2006a).

Na cromatografia líquida os compostos analisados devem ser solúveis na FM e devem apresentar diferenças de interação com a FE. O uso de partículas menores no recheio da coluna cromatográfica resulta em aumento da pressão interna do sistema, além de uma maior área superficial, ou sítio de adsorção, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra, sendo então denominada cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) (SKOOG *et al.*, 2006a).

Dentre as técnicas analíticas de separação, a HPLC é a mais usada devido à grande variedade de combinações entre FM e FE; possuindo alta sensibilidade, fácil adaptação em determinações quantitativas acuradas, adequação a separações de espécies não-voláteis ou termicamente instáveis,

ampla aplicabilidade a substâncias como proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, aminoácidos, carboidratos, terpenóides, pesticidas dentre outras (SKOOG *et al.*, 2006a; SNYDER *et al.*, 2010).

As FE empregadas na HPLC podem ser classificadas de acordo com o mecanismo pelos quais estas separam as moléculas: partição, adsorção, troca iônica e exclusão por tamanho.

1.1. *Cromatografia líquida por interação hidrofílica (Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography – HILIC)*

Alpert, em 1990, sugeriu o uso do termo cromatografia de interação hidrofílica para descrever sistemas que utilizavam a combinação de FE hidrofílicas e FM com elevada proporção orgânica, surgindo assim, um novo sistema no cenário da cromatografia.

A cromatografia líquida de alta eficiência por interação hidrofílica (HILIC) é amplamente aplicada para separação de compostos orgânicos neutros e polares. É efetivamente usada na análise de compostos em sistemas complexos os quais tendem a co-eluir em sistemas cromatográficos de fase reversa (ALPERT, 1990; BUSZEWSKI e NOGA, 2012).

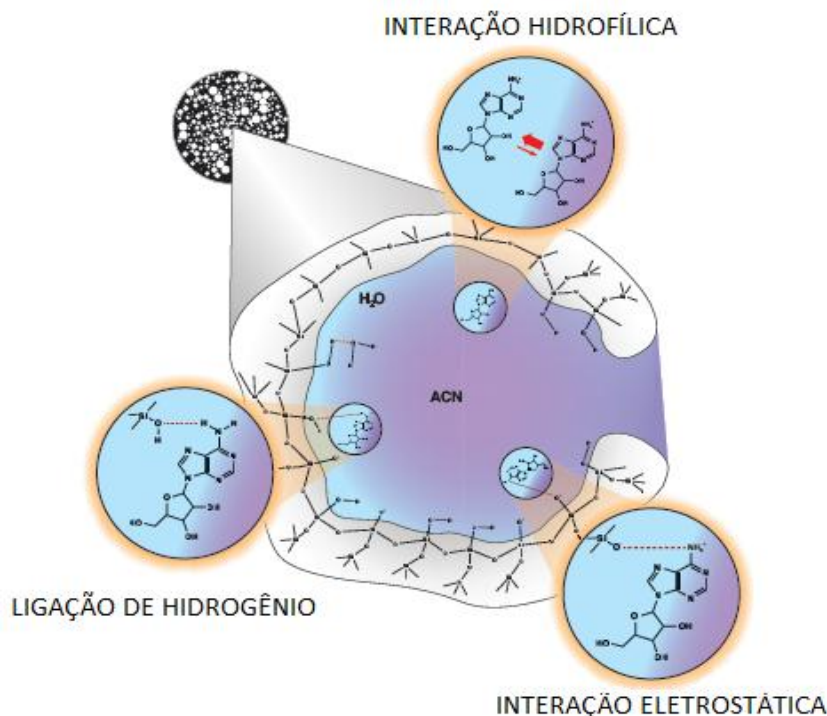
Bastante similar à cromatografia líquida de fase normal, utiliza uma coluna com FE hidrofílica (“fase normal”, *Normal Phase Liquid Chromatograph – NPLC*), porém emprega-se uma FM contendo água, tampão e uma concentração elevada de solvente orgânico miscível com água (típico de “fase reversa”, *Reverse Phase Liquid Chromatograph – RPLC*) (LANÇAS, 2010).

Separações por HILIC podem ser executadas tanto em modo isocrático (com elevado percentual de solvente orgânico) quanto em gradiente (iniciando

com elevado percentual de orgânico e terminando com elevadas concentrações de solventes aquosos).

De acordo com Buszewski e Noga (2012) o mecanismo de separação em HILIC baseia-se na formação de uma camada rica em água sob a superfície da FE polar e, como a FM é deficiente em água, cria-se um sistema de extração líquido/líquido, sendo o analito distribuído entre estas duas camadas. Segundo estes mesmos autores, algumas teorias propõem que a retenção no sistema HILIC é causada por particionamento o qual é baseado na diferença de distribuição das moléculas do analito entre a FM, rica em acetonitrila (ACN), e a rica camada em água adsorvida na FE hidrofílica. Assim, quanto mais hidrófilo for o analito mais o equilíbrio de partição é deslocado para a camada de água immobilizada na FE e, portanto, mais a substância é retida. A Figura 2 mostra o esquema do mecanismo de separação discutido.

Figura 2. Esquema do mecanismo de separação HILIC.



Fonte: Adaptado de HILIC Separations Technical Guide (THERMO SCIENTIFIC, 2014).

Verifica-se que a partição de analitos polares entre a camada rica em água e o solvente orgânico presente na FM é uma combinação de diferentes interações como ligação de hidrogênio entre os grupos funcionais do analito e a FE; partição hidrofílica do analito entre a camada aquosa e a porção orgânica da FM; e interação eletrostática de grupos funcionais ionizados.

Um fator importante que interfere nas características de retenção em HILIC é o pH do tampão. O fato do pH estar acima ou abaixo do pK_a do analito determina a carga que o mesmo irá apresentar, a qual afeta a hidrofiliabilidade do analito e, portanto, sua interação com a FE.

Um dos desafios mais comuns em HILIC é distorção da forma do pico que surge a partir da discrepância entre o solvente da amostra e a FM. A utilização de um solvente aquoso na amostra (eluição com uma elevada resistência) tende a prejudicar a partição dos analitos e, conseqüentemente, influencia de forma negativa na forma dos picos cromatográficos. Outro efeito negativo em se utilizar solventes exclusivamente aquosos para as amostras a serem injetadas em sistemas HILIC é a maior facilidade de sobrecarga da coluna, reduzindo a resolução da mesma. Para assegurar um melhor desempenho cromatográfico em sistemas HILIC é recomendável que o solvente da amostra contenha cerca de 50% de solvente orgânico. No entanto, deve-se fazer um estudo de solubilidade do composto a ser analisado, visto que analitos de elevada polaridade tenderão a ficar insolúveis, podendo prejudicar o funcionamento da coluna (THERMO SCIENTIFIC, 2014).

1.2. Detecção por índice de refração

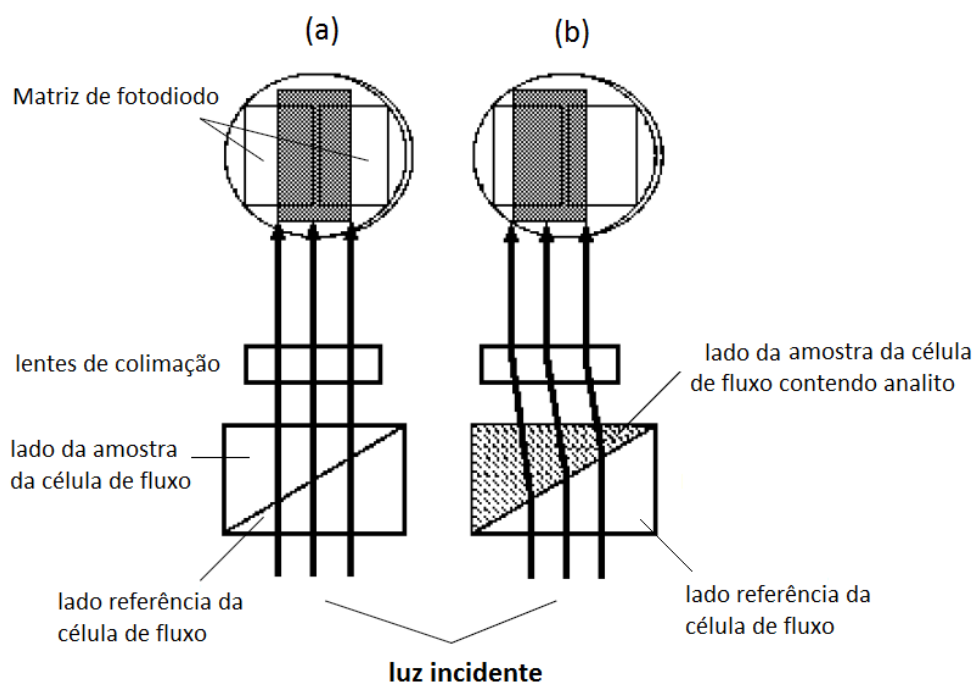
O detector por índice de refração (IR) mede mudanças no índice de refração do eluato. Quando um feixe de luz passa de um meio para outro, ela

muda sua velocidade. Se a luz forma um ângulo que não é perpendicular à superfície do meio, diz-se que ela foi refratada. O IR mede o quanto a luz foi refratada e é calculado como a razão entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz no meio. É uma propriedade física do meio, com um valor inteiro sem dimensão representada pela letra n .

O detector por IR é composto por uma célula de vidro, denominada célula de fluxo, a qual é dividida em duas câmaras ou células (célula de referência e célula de amostra).

A Figura 3 mostra como a refração pela amostra na célula de fluxo muda a proporção de luz em cada elemento de fotodiodo. Quando o eluato que passa pela célula de fluxo não contém o analito, o conteúdo das duas células (amostra e referência) é o mesmo (Figura 3a). Neste caso, quando um feixe de luz incide sobre as células, o feixe observado não sofre desvio. No entanto, se o eluato contiver qualquer componente diferente da composição da FM, ocorrerá um desvio do feixe devido à diferença nos índices de refração nos dois líquidos (Figura 3b).

Figura 3. Esquema de refração da luz incidente (a) pelo eluato sem amostra, e (b) pela amostrana célula de fluxo evidenciando a mudança da proporção de luz em cada elemento de fotodiodo.



Fonte: Adaptado de Waters Associates, Inc., Milford, MA 0175 (2008).

O sistema de detecção por IR não é adequado para análises de gradiente uma vez que alterações na temperatura, composição e pressão do solvente tendem a causar instabilidade da linha de base; no entanto, ao se manter tais variáveis da FM constantes, as alterações no IR medidas pelo refratômetro serão devidas apenas à mudança de concentração da amostra; aferindo-se essa diferença, a presença dos componentes pode ser calculada.

O uso da detecção por IR apresenta como vantagem a adequação para detecção de qualquer componente, principalmente para amostras que não absorvem no UV, como carboidratos, álcoois ou íons inorgânicos.

2. Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar é definida como uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos neutros, íons solvatados e espécies ionizáveis, mediante a aplicação de um campo elétrico tangenciando uma coluna capilar, a qual contém em seu interior uma solução de eletrólito normalmente tamponada, atuando como canal de migração (TAVARES, 1996).

De acordo com Tavares (1997) o uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel e papel, por exemplo). Fatores geométricos como o fato da relação entre a área superficial interna e o volume do capilar ser apreciavelmente grande, possibilita a dissipação eficiente do calor, gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule) resultando em separações de alta eficiência e menores tempos de análise.

É possível empregar diversos modos de separação no âmbito da eletroforese capilar, cada qual com seu mecanismo e seletividade característicos: eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia electrocinética micelar (MEKC), isotacoforese capilar (CITP), focalização isoeletrica capilar (CIEF), eletroforese capilar em gel (CGE) e electrocromatografia capilar (CEC) (TAVARES, 1996; SKOOG *et al.*, 2006a).

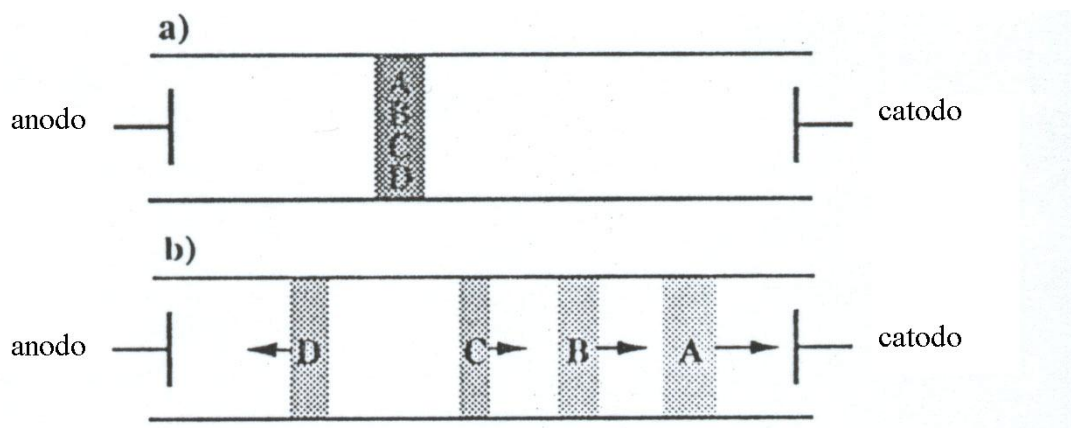
2.1. Modos de separação

Como citado acima, existem vários modos possíveis em eletroforese capilar de separação com mecanismos singulares e seletividade característica. No entanto, no presente trabalho, será discutida apenas a eletroforese capilar de zona, pois esse foi o modo de eletroforese utilizado.

2.1.1. Eletroforese Capilar de Zona

A eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*) é um dos modos de separação eletroforética mais utilizados devido à simplicidade do equipamento e maior facilidade da otimização das condições experimentais (TAVARES, 1996). A amostra, contendo uma mistura iônica, é introduzida no capilar como uma banda de pequena espessura. Sob a influência do campo elétrico (gerado a partir da aplicação de uma diferença de potencial - ddp), as espécies iônicas da amostra e do tampão migram para o eletrodo correspondente, isto é, cátions em direção ao catodo e ânions em direção ao anodo, como é mostrado na Figura 4.

Figura 4. Princípio da eletroforese capilar de zona em solução livre (a) estado inicial, (b) zonas distintas de amostra, gerando uma migração diferencial.



Fonte: Adaptado de Kuhn e Hofstetter-Kuhn (1993).

2.2. Fundamentos gerais de eletroforese capilar

2.2.1. Fluxo eletrosmótico

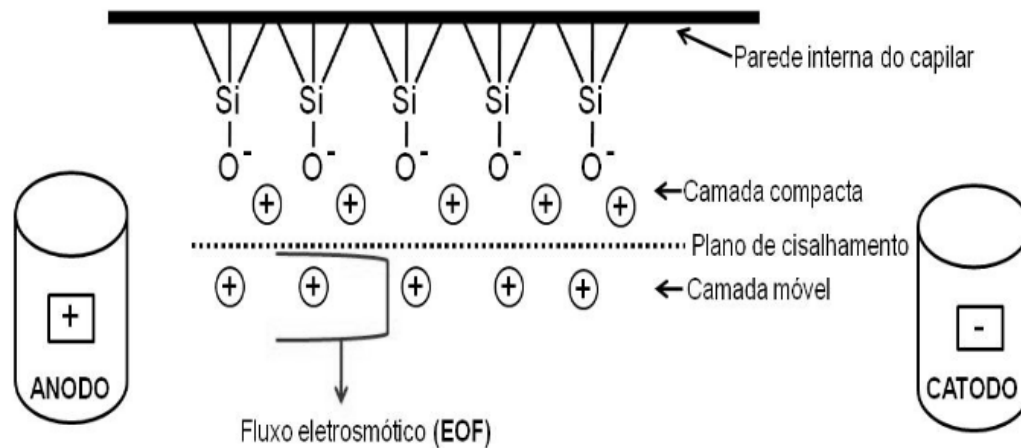
Quando a alta voltagem é aplicada em um capilar de sílica fundida, ou teflon, contendo uma solução tampão, a solução tampão se move através do capilar sob a influência de um campo elétrico; este fenômeno é denominado

fluxo eletrosmótico (do inglês, *electroosmotic flow* - EOF). Sob a aplicação de voltagem positiva na injeção, utilizando capilar de sílica fundida, o EOF segue em direção ao catodo, ou seja, a solução tampão flui do reservatório de entrada através do capilar e é descartada no reservatório de saída (TAVARES, 1996).

Em capilares de sílica fundida os grupos silanóis (Si-OH) de caráter ácido (pK_a 5,9), quando em contato com o meio aquoso, são ionizados e a superfície interna do capilar torna-se negativamente carregada. Cátions hidratados na solução eletrolítica são atraídos pelos grupos silanóis negativos e começam a se organizar em duas camadas, sendo uma camada compacta (ligada por forças eletrostáticas) e a outra difusa. A camada compacta é formada na região imediatamente adjacente à superfície devido à adsorção específica, por forças eletrostáticas e/ou de coesão, de moléculas de água e alguns íons, provavelmente desidratados, e através da adsorção não-específica de íons hidratados que se ligam fracamente à superfície. A camada difusa é a região na qual a concentração de íons de carga oposta à superfície do capilar diminui aproximando-se da concentração dos íons em solução (TAVARES, 1996).

Quando um campo elétrico é aplicado, a camada difusa move-se em direção ao catodo, arrastando com ela um volume de solução do eletrólito, que é chamado fluxo eletrosmótico. A Figura 5 ilustra a superfície interna de um capilar de sílica fundida e formação do EOF.

Figura 5. Representação da superfície interna de um capilar de sílica fundida e perfil radial do fluxo eletrosmótico se deslocando do anodo para o catodo em fluxo normal.



Fonte: Castro (2011).

O controle adequado do EOF é de grande importância para a eficiência da separação, por isso algumas propriedades físico-químicas da solução devem ser controladas. Entre estas propriedades destacam-se: pH, concentração (força iônica) da solução tampão, viscosidade, constante dielétrica e temperatura (CASTRO, 2011).

2.2.2. Mobilidade eletroforética

A mobilidade eletroforética (μ_{ep}), é o fenômeno exclusivo de cada substância, correspondente a sua velocidade em um campo elétrico unitário, logo, tal mobilidade é intrínseca de cada espécie analisada. A mobilidade é diretamente proporcional à carga e inversamente proporcional ao coeficiente de atrito. A separação das espécies é possível graças à diferença nas mobilidades iônicas dos analitos, que estão relacionadas com suas densidades de carga, isto é, com a razão carga-raio. Logo, formam-se zonas de amostras distintas de acordo com a mobilidade (TAVARES, 1997; SILVA *et al.*, 2007).

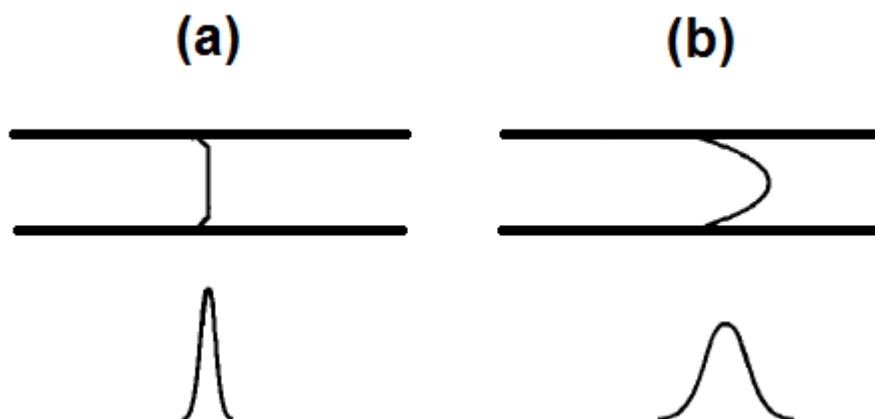
2.2.3. Eficiência da separação

Na separação por eletroforese capilar é possível obter picos com alta definição (resolução), pois os efeitos de alargamento dos picos são mínimos.

Diferentemente da cromatografia, a inexistência de FE diminui o efeito de alargamento, causado pela transferência de massa entre as fases estacionária e móvel. Outro motivo da alta eficiência de separação por eletroforese capilar é que a aplicação de voltagem ao sistema, e não de pressão, evita gradientes de velocidade ao longo da parede do capilar. Desta forma, o EOF é gerado uniformemente ao longo de todo o capilar diminuindo o alargamento dos picos.

Como o EOF afeta o período de tempo em que um soluto permanece no interior do capilar, tanto a eficiência quanto a resolução são relacionadas ao perfil do EOF, o qual pode se caracterizar de forma planar ou radial (Figura 6), diferente do fluxo laminar característico dos fluídos sob pressão, e tem mínima resistência à transferência de massa (TAVARES, 1996).

Figura 6. Perfil de velocidade radial para (a) um fluxo induzido por um campo elétrico (fluxo eletroosmótico), e (b) um fluxo induzido por pressão (fluxo laminar), e correspondente efeito na variância da distribuição.



Fonte: Adaptado de Tavares (1996).

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO ÍNDICE DE SOROPROTEÍNA NÃO DESNATURADA E 5-HIDROXIMETILFURFURAL EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE LEITE UHT

1. Introdução

Os índices de soroproteína não desnaturada (WPNI) e 5-hidroximetilfurfural são indicadores de tratamento térmicos facilmente quantificados por métodos espectrofotométricos e podem oferecer informações rápidas sobre o tipo de tratamento térmico o qual o produto foi submetido.

2. Objetivo

Teve-se por objetivo implantar o método proposto por Kuramoto *et al.* (1958), para determinação do índice de soroproteína não desnaturada (WPNI); e o método descrito originalmente por Keeney e Bassette (1959) para determinação do índice de 5-hidroximetilfurfural (HMF), ambos espectrofotométricos, em amostras comerciais de leite UHT selecionadas.

3. Execução

A implantação e execução dos métodos foram efetivadas no laboratório de Composição e Valor Nutricional de Alimentos (Departamento de Nutrição/UFJF).

4. Aquisição das amostras comerciais

As amostras comerciais usadas no estudo foram coletadas de forma aleatória nas principais regiões produtoras de leite UHT do Brasil (Sudeste, Centro-Oeste e Sul).

Selecionou-se dezoito marcas comerciais nacionais de leite UHT, sendo destas: 18 marcas de leite UHT desnatado com teor regular de lactose e três marcas de leite UHT semidesnatado lactose reduzida. Foram adquiridas três amostras (em lotes diferentes) de cada tipo de leite a ser avaliado (“regular”: teor de lactose regular; e “delactosado”: teor de lactose reduzido), totalizando sessenta e três amostras analisadas.

As amostras foram codificadas e classificadas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Classificação e identificação das amostras em estudo.

Amostra	Código	Grupo
Leite UHT desnatado com teor regular de lactose	01 a 18	“Regular”
Leite UHT semidesnatado com teor reduzido de lactose	19 a 21	“Delactosado”

Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras foram coletadas de forma aleatória não havendo padronização do tempo de fabricação, a fim de simular a compra do produto pelo consumidor.

5. Implantação da metodologia para determinação do índice de WPNI nas amostras comerciais em estudo

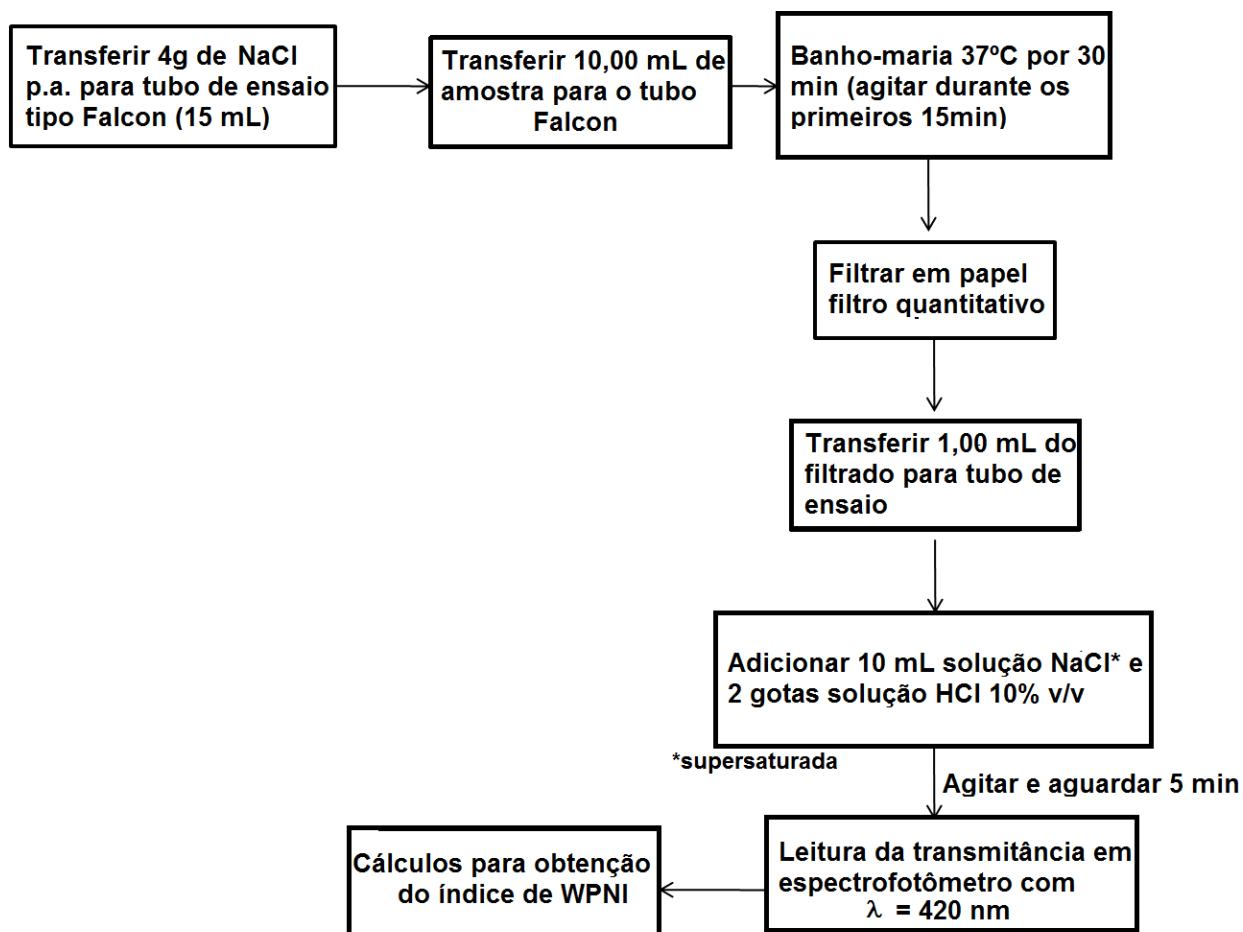
A metodologia implantada no laboratório de Composição e Valor Nutricional dos Alimentos (Nutrição/UFJF) foi proposta por Kuramoto *et al.* (1958) procedendo-se nas etapas descritas a seguir.

Efetou-se a precipitação das caseínas por “salting out” empregando 10 mL de amostra e 4 g de cloreto de sódio (NaCl) p.a., mantendo o sistema em banho termostático a 37°C durante trinta minutos, com agitação vigorosa dos tubos nos primeiros quinze minutos. Após os trinta minutos, filtrou-se as amostras com papel filtro quantitativo (2 µm a 3µm) Sartorius Stedium®, sendo

o filtrado coletado em um erlenmeyer de 125 mL. Transferiu-se 1 mL do filtrado para um tubo de ensaio e adicionou-se 10 mL de solução supersaturada de NaCl p.a. seguindo de acidificação do meio com gotas de ácido clorídrico a 10% v/v, para produção de turbidez. Aguardou-se aproximadamente 5 minutos e efetuou-se a leitura da transmitância a 420 nm em espectrofotômetro UV/Visível ThermoScientific® modelo Evolution 60S. O resultado de índice de WPNI expresso em miligrama de WPN por mililitro de leite UHT, deu-se a partir da construção de uma curva analítica (transmitância vs. WPNI), com faixa de detecção de 0,63 mg.mL⁻¹ a 7,86 mg.mL⁻¹.

A Figura 7 mostra um esquema simplificado da metodologia para determinação do índice de WPNI em leite UHT.

Figura 7. Esquema da metodologia usada para análise do índice de WPNI em leite UHT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1. Construção da curva analítica

Para a construção da curva analítica utilizou-se padrões de leite em pó desnatado ADPI (AMERICAN DAIRY PRODUCTS ASSOCIATION, 2009) submetidos a elevado aquecimento (baixa concentração de WPNI: 0,63 mg WPN.mL⁻¹ leite) e a baixo aquecimento (alta concentração de WPNI: 7,86 mg WPN.mL⁻¹ leite). Pesou-se 10 g de cada padrão de leite em pó (alto e baixo aquecimento) em um erlenmeyer e adicionou-se 100 mL de água deionizada homogeneizando os sistemas até completa dissolução do pó. Adicionou-se 40 g de NaCl p.a. em cada erlenmeyer e manteve-se os mesmos em banho termostático a 37°C por trinta minutos, agitando durante os quinze primeiros minutos. Filtrou-se em papel filtro quantitativo (2 µm a 3 µm) Sartorius Stedium®, sendo os filtrados de cada um coletados e utilizados para a construção dos níveis da curva de acordo com os índices de WPNI descritos na Tabela 3.

A curva de WPNI foi reproduzida em triplicata autêntica nas seguintes concentrações: 0,63 mg WPN.mL⁻¹ leite; 2,08 mg WPN.mL⁻¹ leite; 3,52 mg WPN.mL⁻¹ leite; 4,97 mg WPN.mL⁻¹ leite; 6,41 mg WPN.mL⁻¹ leite; 7,86 mg WPN.mL⁻¹ leite. A leitura, em espectrofotômetro, da transmitância dos pontos descritos acima foi feita por sorteio inteiramente casualizado.

Tabela 3. Combinação de filtrados dos padrões ADPI de leite para construção da curva analítica.

Tubo	Baixo aquecimento	Alto aquecimento	Índice de WPNI (mg WPN.mL⁻¹leite)
1	10 mL	0 mL	7,86
2	8 mL	2 mL	6,41
3	6 mL	4 mL	4,97
4	4 mL	6 mL	3,52
5	2 mL	8 mL	2,08
6	0 mL	10 mL	0,63

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2. Ajuste do modelo para quantificação do índice de WPNI

Para a quantificação do índice de WPNI foi proposto o estudo estatístico envolvendo o cálculo dos parâmetros e de ajuste de modelo. Os valores para ajuste de modelo se encontram na Tabela 4.

Tabela 4. Valores para ajuste do modelo para índice de WPNI.

WPNI (mg WPN.mL ⁻¹ leite)	1ª Replicata	2ª Replicata	3ª Replicata
7,86	62,9	56,9	53,3
6,41	70,1	63,3	64,5
4,97	75,9	69,4	71,6
3,52	81,5	77,3	78,8
2,08	84,7	83,0	82,6
0,63	90,3	88,4	95,8

*Teste de normalidade (Shapiro–Wilk): $p = 0,81$

*Teste de homocedasticidade (Cochran): $p = 0,08$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O modelo de regressão foi implementado utilizando método dos mínimos quadrados. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade foi averiguada utilizando o teste de Cochran (mesmo número de réplicas no nível). Verificou-se um comportamento normal do modelo uma vez que o p-valor encontrado foi maior que 0,05. Como o C_{cal} (0,08) foi menor que o C_{tab} (0,72) o modelo apresenta comportamento homocedástico. A independência foi verificada através do gráfico de resíduos o qual demonstrou uma dispersão não tendenciosa, indicando que os resultados são independentes. Todos os pressupostos testados confirmaram a aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários para verificação da falta de ajuste no modelo (PIMENTEL e NETO, 1996).

Para o cálculo do método dos mínimos quadrados ordinários, utilizou-se Teste de Hipótese *a priori* (equação 1) recomendado pela IUPAC (DANZER e CURRIE, 1998) para a realização deste estudo.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{S^2_{x,y}}{S^2_y} = \frac{\sum_{i=1}^p \frac{m_i(\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{(p-2)}}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} \frac{(y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{(m-p)}} \quad (1)$$

Onde: m_i = número de medidas de cada ponto; p = número de pontos ou níveis; $m = m_i \times p$.

Se o valor calculado de $F_{\text{calculado}}(F_{\text{calc}})$ ($p-2, m-p$) for menor que o valor de $F_{\text{tabelado}} (F_{\text{tab}})$ dentro do intervalo estimado, não haverá falta de ajuste no modelo e os coeficientes angular e linear da equação obtida poderão ser usados para quantificação.

Os valores dos parâmetros do modelo, bem como os valores de F para falta de ajuste estão representados na Tabela 5.

Tabela 5. Coeficientes do modelo proposto para WPNI e valores de F para verificação da falta de ajuste.

Parâmetro	WPNI ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Coefficiente angular	$(-4,412 \pm 0,267)$
Intercepto	$(93,913 \pm 1,311)$
F_{calc}	0,24
F_{tab}	3,26*
r^2	0,94

* $F_{\text{tab}}(v_1=4, v_2=12)$ Onde: v_1 : grau de liberdade do numerador ($p-2$); v_2 : grau de liberdade do denominador ($m-p$). Intervalo de 95% de confiança. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

O modelo de regressão foi considerado satisfatório, onde o valor de F_{calc} foi menor que o de F_{tab} , com isso pode-se afirmar que para o intervalo de 95% de confiança estimado, não há evidência de falta de ajuste no modelo implementado e, portanto, a equação da reta pode ser usada para quantificar o teor de WPNI nas amostras de leite UHT ou em outras matrizes que apresentem concentrações de WPNI dentro do intervalo da curva construída.

4.3. Quantificação do índice de WPNI nas amostras de leite UHT

Para a quantificação do índice de WPNI nas amostras comerciais de leite UHT, empregou-se os valores dos coeficientes do modelo analítico obtido substituindo o valor do sinal analítico obtido para cada amostra.

A análise estatística descritiva e análise de variância – ANOVA dos dados obtidos foi realizada utilizando o software Assistat (Statistical Assistance - versão 7.7 beta), sendo os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Análise estatística descritiva do índice de WPNI das amostras comerciais de leite UHT (N=63).

Parâmetro	WPNI (mg WPN. mL ⁻¹ leite)
Intervalo de Confiança	(2,32 ± 1,41)
Desvio-padrão	1,11
Amplitude	4,58
DPR	47,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com o valor médio de WPNI, as amostras de leite UHT em estudo podem ser classificadas como “produto de médio aquecimento”, conforme classificação ADPI (2009). No entanto, a amplitude aponta a possibilidade da incidência de amostras classificadas como alto tratamento térmico, a qual foi comprovada ao se avaliar o teor de WPNI obtido para cada amostra, onde 23,8% das amostras avaliadas se enquadraram na classificação de “produto de alto aquecimento” e 76,2% como “médio aquecimento”.

A análise de variância para o índice de WPNI mostrou efeitos estatisticamente significativos entre as marcas analisadas ($p < 0,0001$) indicando uma despadronização do produto comercializado. O elevado valor de DPR corrobora com tal assertiva a qual torna-se um fator desfavorável para indústria

uma vez que a falta de uniformidade do tratamento térmico aplicado ao leite pode desencadear inúmeros problemas no produto final.

A aplicação do teste de Tukey para comparação das médias entre amostras forneceu os resultados expressos na Tabela 7.

Tabela 7. Índice médio de WPNI para as amostras de leite UHT em estudo.

Amostra	WPNI (mg WPN.mL⁻¹)
09	3,84 a
03	3,65 ab
20	3,61 ab
19	3,52 abc
01	3,09 abcd
13	2,96 abcd
14	2,88 abcd
16	2,87 abcd
06	2,84 abcd
10	2,83 abcd
05	2,30 abcde
07	2,15 abcde
04	1,98 bcdef
15	1,95 bcdef
02	1,93 bcdef
18	1,84 cdef
17	1,49 def
08	1,32 def
21	0,88 ef
12	0,55 ef
11	0,31 f

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

Depreende-se que o índice de WPNI médio diferiu entre a maioria das amostras, evidenciando a formação de dez grupos distintos, concordando com os indicativos de despadronização do processamento UHT adotado pelas indústrias processadoras das marcas selecionadas.

As amostras 11 e 09 do grupo “regular” se destacaram frente às demais por apresentarem a menor e maior média para o índice de WPNI,

respectivamente; reafirmando a ocorrência do efeito de marca sobre o indicador avaliado.

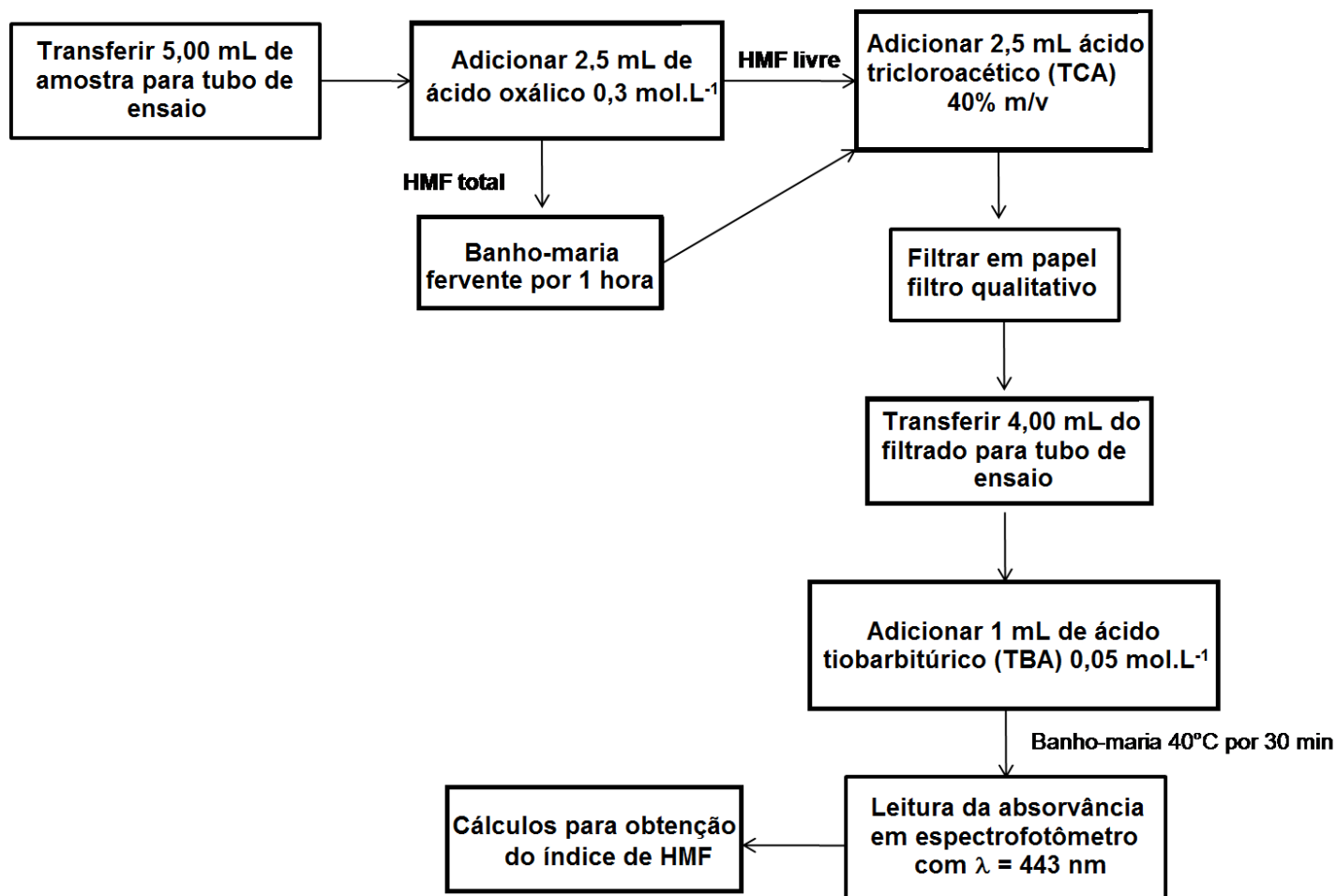
5. Implantação de metodologia para determinação do índice de HMF nas amostras comerciais em estudo

Determinou-se o índice de HMF total da seguinte maneira: transferiu-se 10 mL de amostra em um tubo de ensaio e em seguida adicionou-se 5 mL de ácido oxálico $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$. Homogeneizou-se o sistema e submeteu-se o mesmo a banho fervente durante uma hora. Após este período, procedeu-se ao resfriamento imediato da amostra até temperatura ambiente e posterior adição de 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 40% m/v, filtrando-se posteriormente em papel filtro qualitativo ($14\mu\text{m}$) JProLab®.

Transferiu-se 4 mL do filtrado obtido para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. O sistema foi submetido ao aquecimento em banho termostático ajustado para 40°C durante 30 minutos para desenvolvimento de coloração. Procedeu-se a leitura da absorvância a 443 nm em espectrofotômetro UV/Visível ThermoScientific® modelo Evolution 60S. Para determinação do índice de HMF livre nas amostras procedeu-se da mesma maneira descrita acima para HMF total, excluindo-se apenas a etapa do banho fervente.

A Figura 8 mostra um esquema simplificado da metodologia para determinação do índice de HMF livre e total em leite UHT.

Figura 8. Esquema da metodologia usada para análise do índice de HMF em leite UHT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1. Construção da curva analítica

A concentração de HMF em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi dada a partir da construção de uma curva analítica utilizando diferentes níveis de padrão de HMF vs absorvância. A curva de HMF foi reproduzida em triplicadas autênticas nas seguintes concentrações: $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$; $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$; $6,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$; $9,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$; $12,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$; $15,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$; $20,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e a leitura dos mesmos em espectrofotômetro foi feita por sorteio inteiramente casualizado.

5.2. Ajuste do modelo para quantificação do índice de HMF livre e total

Para a quantificação do índice de HMF livre e total foi proposto o estudo estatístico envolvendo o cálculo dos parâmetros e de ajuste de modelo. Os valores para ajuste de modelo se encontram na Tabela 8.

Tabela 8. Valores para ajuste do modelo para índice de HMF livre e total.

HMF($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	1ª Replicata	2ª Replicata	3ª Replicata
1,0	0,0270	0,0220	0,0270
3,0	0,0310	0,0310	0,0320
6,0	0,0550	0,0600	0,0630
9,0	0,0910	0,0910	0,0880
12,0	0,1220	0,1250	0,1250
15,0	0,1450	0,1490	0,1540
20,0	0,1940	0,2080	0,1970

*Teste de normalidade (Shapiro–Wilk): $p = 0,064$.

*Teste de homocedasticidade (Cochran): $p = 0,17$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O modelo de regressão foi implementado utilizando o método dos mínimos quadrados. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade foi averiguada através do teste de Cochran (mesmo número de réplicas no nível). Verificou-se um comportamento normal do modelo uma vez que o p-valor encontrado foi maior que 0,05. Como o C_{cal} (0,17) foi menor que o C_{tab} (0,66) o modelo apresenta comportamento homocedástico. A independência foi verificada através do gráfico de resíduos o qual demonstrou uma dispersão não tendenciosa, indicando que os resultados são independentes. Todos os pressupostos testados confirmaram a aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários para verificação da falta de ajuste no modelo (PIMENTEL e NETO, 1996).

Para o cálculo do método dos mínimos quadrados ordinários, utilizou-se Teste de Hipótese *a priori* (equação 1 – item 4.2) recomendado pela IUPAC (DANZER e CURRIE, 1998) para a realização deste estudo.

Os valores dos parâmetros calculados para o modelo bem como os valores de F para averiguação da falta de ajuste estão representados na Tabela 9.

Tabela 9. Coeficientes calculados para o modelo de HMF livre e total e valores de F para verificação da falta de ajuste.

Parâmetro	HMF ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
Coeficiente angular	(0,0095 \pm 0,0002)
Intercepto	(0,0073 \pm 0,0023)
F_{calc}	2,82
F_{tab}	2,96*
r^2	0,99

* $F_{\text{tab}}(v_1=5, v_2=14)$ Onde: v_1 : grau de liberdade do numerador ($p-2$); v_2 : grau de liberdade do denominador ($m-p$). Intervalo de 95% de confiança. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

O modelo de regressão foi considerado satisfatório, onde o valor de F_{calc} foi menor que o de F_{tab} , com isso pode-se afirmar que para o intervalo de 95% estimado, não há evidência de falta de ajuste no modelo implementado e, portanto, a equação da reta pode ser usada para quantificar o índice de HMF livre e total nas amostras de leite UHT ou em outras matrizes que apresentem concentrações destes indicadores dentro do intervalo da curva construída.

5.3. Quantificação do índice de HMF livre e total em leite UHT

Para as amostras de leite UHT com teor reduzido de lactose foi necessário o preparo de uma solução de análise a 20% v/v, procedendo normalmente às etapas descritas anteriormente no item 5 para determinação do índice de HMF livre e total. Esta diluição tornou-se indispensável uma vez que tais amostras já apresentavam coloração amarronzada e ofereceram sinais de absorvância muito acima de 1,0 u.a.; estando fora do limite de linearidade previsto pela lei de Lambert-Beer. De acordo com a lei de Lambert-Beer, o

aumento da concentração da amostra é acompanhado pelo aumento crescente e proporcional da absorvância, até um ponto limite ($A=1,0$ u.a.). A partir deste ponto (amostras muito concentradas) deixa de existir o comportamento linear previsto entre absorvância e concentração. Neste caso, torna-se necessária a diluição da amostra.

A quantificação do índice de HMF livre e total nas amostras comerciais de leite UHT foi realizada empregando-se os valores dos coeficientes do modelo analítico previamente calculados substituindo o valor do sinal analítico obtido para cada amostra. Para a análise estatística descritiva e análise de variância – ANOVA dos dados foi utilizado o software Assistat (Statistical Assistance - versão 7.7 beta). A Tabela 10 exibe os resultados obtidos da estatística descritiva para ambos os índices de HMF avaliados.

Tabela 10. Análise estatística descritiva do índice de HMF livre e total das amostras de leite UHT em estudo.

Parâmetro	HMF livre ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)		HMF total ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
	Regular N=54	Delactosado N=9	Regular N=54	Delactosado N=9
Intervalo de Confiança	2,83 \pm 0,44	6,45 \pm 0,44	12,03 \pm 0,36	137,75 \pm 5,47
Desvio-padrão	1,27	3,64	3,40	66,37
Amplitude	7,12	12,08	13,06	158,68
DPR	45,01	56,44	28,20	48,21

Fonte: Elaborado pelo autor.

Realizou-se a análise estatística descritiva para os grupos “regular” e “delactosado”, uma vez que estes exibiram um comportamento bastante distinto para ambos os índices de HMF avaliados, necessitando inclusive de tratamento de amostra diferenciado para as amostras do grupo “delactosado”. Este comportamento já era esperado uma vez que o processamento de leite

com baixo teor de lactose é caracterizado atualmente por hidrólise prévia seguida do tratamento térmico UHT. Durante a etapa de hidrólise da lactose libera-se monômeros de glicose e galactose. A glicose apresenta-se mais reativa que a lactose, participando mais ativamente da RM e, conseqüentemente da formação de intermediários como o HMF (FERRER *et al.*, 2000). Shibao e Bastos (2011) relataram que a composição do alimento também exerce influência na ocorrência da RM. O tipo de açúcar redutor interfere na velocidade de reação com os grupamentos amina, sendo que pentoses são mais reativas que as hexoses. O tipo de aminoácido também interfere na velocidade de reação, a lisina é cerca de 2 a 3 vezes mais reativa quando comparada aos outros aminoácidos, devido à presença de grupamentos α e ϵ -amino em sua estrutura.

As amostras do grupo “regular” apresentaram valores de HMF livre e total em consonância com estudos realizados por Silva (2004) o qual verificou que o leite UHT desnatado apresentou valores médios de $1,82 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $14,03 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para HMF livre e total, respectivamente; e por Ferreira *et al.* (1994) cujos índices médios detectados foram de $1,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para HMF livre e $17,18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para HMF total em amostras de leite UHT desnatado comercializadas no Brasil.

Segundo Silva (2004) e Pereda *et al.* (2009) os valores de HMF livre representam o estágio de desenvolvimento dos compostos durante a ocorrência da RM formados até o momento da análise. Já os valores de HMF total estão relacionados com a estimativa da extensão de formação de HMF, ou seja, o quanto a reação pode prosseguir.

Os valores médios obtidos tanto para o grupo “regular” quanto para o grupo “delactosado” demonstraram que, embora a formação de HMF tenha fornecido valores baixos para índice de HMF livre, a estimativa do avanço da reação indicou elevados valores para o índice de HMF total (12,03 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 137,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para grupo “regular e “delactosado”, respectivamente), em contraste com estudo feito por Pereda *et al.* (2009) os quais encontraram valores de HMF total de 8,34 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para leite UHT e por Ferrer *et al.* (2000) cujos índices de HMF total foram de 7,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para amostras de leite UHT de marca própria com teor regular de lactose e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para amostra de leite UHT com baixo teor de lactose.

A análise de variância para os índices de HMF livre e total mostrou efeito estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) para as amostras em estudo. A ANOVA foi realizada considerando todas as amostras ($N=63$) visto que o foco do trabalho é a avaliação do efeito de marca sobre os indicadores aqui abordados. Deste modo foi realizada a análise de comparação de médias pelo teste Tukey, para ambos os índices de HMF, sendo os resultados destacados nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Média dos índices de HMF livre para amostras de leite UHT em estudo.

Amostra	HMF livre ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
20	9,66 a
12	7,26 ab
21	5,98 abc
19	3,70 bcd
17	3,18 cd
05	3,12 cd
07	2,98 cd
04	2,96 cd
16	2,87 cd
02	2,80 cd

Continua...

01	2,78	cd
15	2,76	cd
11	2,75	cd
14	2,71	cd
18	2,65	cd
08	2,43	cd
09	2,28	cd
06	2,27	cd
03	2,26	cd
13	1,60	d
10	1,31	d

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% probabilidade. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

Tabela 12. Média do índice de HMF total para amostras de leite UHT em estudo.

Amostra	HMF total ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
21	199,17	a
20	161,51	b
19	52,57	c
12	19,90	d
05	14,12	d
01	14,02	d
17	13,67	d
06	13,41	d
14	12,93	d
02	12,88	d
18	12,28	d
07	12,28	d
11	12,13	d
03	10,65	d
04	10,50	d
16	10,38	d
09	10,31	d
08	9,87	d
15	9,66	d
13	9,61	d
10	7,86	d

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% probabilidade. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

Quanto ao índice de HMF livre verifica-se a distribuição das médias das amostras em seis grupos distintos. As amostras com teor regular de lactose

apresentaram-se distribuídas em três grupos, sendo que a amostra 12 exibiu o maior índice médio ($7,26 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e as amostras 10 e 13 os menores índices ($1,31 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $1,60 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente).

Por outro lado, o índice de HMF total mostrou não haver diferença significativa entre as marcas do grupo “regular” apesar da amostra 12 manter a maior média do grupo ($19,90 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Esta homogeneidade entre as amostras com teor regular de lactose sugere que a explicação advenha de dois fatores interligados: (1) todas as amostras do grupo “regular” tendem a apresentar teor de lactose pouco variável e, (2) o índice de HMF total relaciona-se com o grau de extensão da reação de formação deste composto. A extensão de reação está relacionada à disponibilidade e ao grau de reatividade do substrato (além de condições do meio como pH e temperatura) durante a comercialização e estocagem do produto. Como na análise de HMF total das amostras o pH e temperatura são ajustados, o fator que tende justificar uma variação entre as amostras analisadas é a disponibilidade de substrato e suas características de reatividade.

Todas as amostras com teor reduzido de lactose apresentaram os maiores índices médios de HMF livre e total, estando em consenso com a afirmativa acima quanto à relação entre reatividade do substrato e formação de HMF. Além disso, as amostras com teor reduzido de lactose apresentaram-se em grupos distintos quanto ao teste de comparação de médias, demonstrando que todas as três marcas estudadas diferiram estatisticamente entre si para ambos os índices de HMF avaliados. Este comportamento permite supor variações entre as marcas quanto ao processamento UHT utilizado e/ou quanto ao grau de hidrólise alcançado.

A amostra 12 apresentou um comportamento muito distinto das demais amostras pertencentes ao seu grupo. Além de exibir as maiores médias para ambos os índices de HMF ($7,26 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $19,90 \mu\text{mol.L}^{-1}$, para HMF livre e total, respectivamente); estes estão acima dos limites reportados pela literatura como HMF livre variando de $(1,0 \text{ a } 4,2) \mu\text{mol.L}^{-1}$ e HMF total de $(10,47 \text{ a } 14,30) \mu\text{mol.L}^{-1}$ segundo estudo abordado por Silva (2004).

De acordo com van Boekel (1998) os estágios avançado e final da RM tendem a ocorrer durante o período de estocagem de leite submetido a processamento UHT direto, estando dependentes do tempo e temperatura de estocagem. Para leites submetidos a tratamentos térmicos de maior intensidade, como esterilização ou processamento UHT indireto, os estágios avançado e final da RM tendem a ocorrer tanto durante o processamento térmico quanto durante o período de estocagem promovendo a formação de coloração amarronzada e compostos de aroma característicos.

As amostras 10 e 13 do grupo “regular” diferiram das demais amostras apresentando os menores índices para HMF livre e total, sugerindo a possível adoção de processamento UHT direto pelas indústrias processadoras das referidas marcas.

6. Conclusão

Os índices de WPNI e HMF observados sugerem a ocorrência de falta de uniformidade no processamento UHT adotado pelas indústrias de leite UHT no país.

O índice de HMF total permitiu a discriminação entre os grupos “delactosado” e “regular”, sendo que as amostras com teor reduzido de lactose apresentaram os maiores índices para este indicador.

A amostra 12 destacou-se das demais amostras do grupo “regular” por apresentar os maiores teores médios de HMF livre e total ($7,26 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $19,90 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente) e a segunda menor média para índice de WPNI ($0,55 \text{ mg WPN.mL}^{-1}\text{leite}$), permitindo inferir sobre alguma não-conformidade durante seu processamento.

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LACTULOSE POR HPLC COM DETECÇÃO POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO

1. Introdução

A cromatografia líquida de alta eficiência por interação hidrofílica é uma técnica de separação bastante eficaz na separação de compostos como biomarcadores, aminoácidos, proteínas e carboidratos (ALPERT, 1990; LANÇAS, 2010; BUSZEWSKI e NOGA, 2012).

Como a lactulose que tem se mostrado um indicador de tratamento térmico de grande importância devido ao seu comportamento peculiar frente à exposição do alimento ao calor, o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de quantificar este analito tem despertado o interesse da academia e indústria, os quais demandam quantificações cada vez mais fáceis, rápidas e precisas.

2. Objetivo

Teve-se por objetivo desenvolver, validar e implantar uma metodologia analítica para determinação do teor de lactulose em amostras comerciais de leite UHT empregando HPLC com detecção por índice de refração (HPLC-RI) com interação hidrofílica como técnica analítica de separação e quantificação.

3. Execução

O desenvolvimento, validação e aplicação do método foram efetivadas no laboratório de Glicoconjugados (Departamento de Bioquímica/UFJF).

4. Desenvolvimento do método

O desenvolvimento do método para determinação de lactulose por HPLC foi conduzido a partir do sistema de cromatografia líquida Breeze 2 Modular HPLC Waters®, equipado com detector de índice de refração 2414 Waters® para sistemas modulares, e sistema de bomba binária 1525. As análises foram conduzidas em coluna XBridge Amide Waters® (3,5 µm; 4,6 mm x 150 mm) mantendo-se a temperatura da coluna e do detector a 35°C.

O método foi desenvolvido a partir do estudo de FM e otimização das variáveis de injeção a fim de se obter as melhores condições de separação.

Todas as etapas estudadas para desenvolvimento do método foram executadas com a injeção de uma mistura de padrões (lactose e lactulose) a 1,0 mg.mL⁻¹ e, posteriormente com uma amostra-teste submetida ao mesmo processo de extração descrito no item 4.2.1 do capítulo sobre “Investigação de métodos de preparo de amostra e aplicação dos métodos de separação por HPLC-RI e CZE-UV indireto para quantificação de lactulose em leite UHT”.

Uma série de variáveis cromatográficas devem ser levadas em consideração para identificação dos compostos separados, avaliação do desempenho do método e auxílio na otimização do processo (HARRIS, 2005).

O cálculo do poder de resolução (R_s) da coluna, a qual fornece uma medida quantitativa da habilidade que a coluna apresenta em separar dois analitos, é de extrema importância e deve ser ajustado a fim de se obter uma separação que permita a quantificação do analito. A literatura aponta $R_s = 1,5$ como o valor mínimo necessário para se obter uma separação total dos analitos (HARRIS, 2005). O poder de resolução pode ser obtido experimentalmente através da equação 2 abaixo:

$$R_s = \frac{2(t_{rB} - t_{rA})}{W_A + W_B} \quad (2)$$

Onde: W_A e W_B é a largura da base do pico da substância A e B, respectivamente; e t_{rA} e t_{rB} é o tempo de retenção da substância A e B, respectivamente.

4.1. Estudo da FM

O estudo da FM é crucial para a otimização das variáveis cromatográficas, e está associada principalmente à retenção do analito. Como a técnica cromatográfica proposta é baseada no sistema de separação HILIC a escolha da FM deu-se essencialmente através da combinação de água e ACN com adição de 0,2% de trietilamina (TEA).

A TEA é um modificador o qual se encontra em sua maior parte na forma de íon trietilamônio (amina protonada). Com o uso deste modificador os picos de compostos básicos tendem a apresentar simetria adequada, uma vez que a função primária da TEA em métodos HILIC é suprimir as interações entre grupos silanóis fortemente ionizados (-Si-OH) presentes na superfície da sílica com analitos alcalinos. Os silanóis ionizados (-Si-O-) serão embebidos pelo excesso de TEA na FM e não irão interagir com os compostos alcalinos, impedindo ou minimizando, conseqüentemente, o efeito cauda (SANTOS-NETO, 2010). Dependendo do composto a assimetria não chega a ser completamente eliminada, mas é reduzida a níveis aceitáveis.

A Tabela 13 descreve o estudo das proporções destes solventes na FM. Para todas as proporções avaliadas foi realizada uma corrida com co-injeção dos padrões de lactose e lactulose a uma concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ a fim de se verificar o efeito da FM no poder de resolução destes analitos, visto que a lactose é o principal interferente na análise de determinação de lactulose.

Tabela 13. Proporção da FM constituída por ACN e água e cálculo da resolução (R_s) para cada tentativa.

Tentativa	ACN	Água	R_s
1	60	40	0,34
2	65	35	0,61
3	67	33	0,76
4	75	25	1,88

Fonte: Elaborado pelo autor.

Por se tratar de um sistema HILIC, os testes avaliaram o poder de resolução para FM com elevadas concentrações de solvente orgânico, variando entre 60% e 75%, de acordo com dados da literatura (CHÁVEZ-SERVÍN *et al.*, 2004; THERMO SCIENTIFIC, 2014). Ao analisar o comportamento da resolução evidenciado na Tabela 13, verifica-se que a resolução aumenta à medida que aumenta-se a fração orgânica na FM. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que, em sistemas HILIC, ao elevar a proporção orgânica na FM a interação do analito (de caráter polar) com a FE da coluna tende a ser maior (interação hidrofílica). Sabe-se que cada analito exibe um comportamento diferente em relação à interação com a FE, ainda que estruturalmente semelhantes, lactose e lactulose apresentam conformações espaciais diferentes e, portanto, interações diferentes com a FM e FE.

De acordo com os valores de R_s , a proporção 75:25 (ACN-água) foi a que ofereceu melhores condições de separação ($R_s > 1,5$) e, portanto, foi a escolhida para o desenvolvimento do trabalho. Os cromatogramas obtidos no estudo da FM estão dispostos no Apêndice 1.

4.2. *Estudo do fluxo da FM*

Com a proporção da FM já definida, fez o ajuste do fluxo da FM visto que este pode interferir diretamente no fator de retenção do analito. De acordo com a velocidade a qual os componentes da amostra são submetidos, estes irão apresentar modificações na interação com a FE. Desta forma, o aumento do fluxo da FM pode ocasionar:

- Fator positivo: redução do tempo de análise;
- Fator negativo: redução do poder de resolução da coluna, uma vez que ao migrar mais rapidamente os constituintes tendem a reduzir sua interação com a FE, podendo ocorrer sobreposição de picos.

Verificou-se o efeito de separação com fluxos $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e avaliou-se o valor de R_s para co-injeções de padrões (lactose e lactulose $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os cromatogramas obtidos e os respectivos valores de R_s calculado estão dispostos no Apêndice 2.

O fluxo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foi o que apresentou melhor condição de separação, com um valor de $R_s = 1,76$.

4.3. *Metodologia desenvolvida para quantificação de lactulose em leite UHT por HPLC*

Primeiramente acondicionou-se a coluna XBridge Amide Waters® ($3,5 \mu\text{m}$; $4,6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$) com ACN mantendo-se a temperatura da coluna e do detector a 35°C . Efetuou-se o condicionamento da coluna com a FM, empregando-se a proporção ACN-água (75:25) com adição de 0,2% de TEA (conforme estudo do item 4.1); e aguardou-se estabilização do sistema. Como o sistema de detecção utilizado foi por IR, todas as análises foram executadas em modo isocrático a fim de se evitar perdas de estabilidade da linha base.

A Tabela 14 evidencia as condições de injeção e aquisição de dados otimizados para a determinação de lactulose em leite UHT.

Tabela 14. Condições de injeção e aquisição de dados para HPLC.

HPLC				Detector I.R.	
Fase móvel	Fluxo (mL.min ⁻¹)	Vol. Injeção (µL)	Tempo de Corrida (min)	Polaridade	Sensibilidade (DeIRIU)
ACN-água (75:25)+0,2%TEA	1,0 (isocrático)	20	17	Positiva	512

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após completa estabilização do sistema, procedeu-se na limpeza da seringa de injeção com metanol e água Mili-Q, bem como limpeza do loop de injeção com água Mili-Q. Realizou-se a injeção manual de 20 µL de amostra-teste (ou mistura de padrões a 1,0 mg.mL⁻¹) e aguardou-se a obtenção do cromatograma para posterior tratamento de dados e quantificação.

5. Validação do método desenvolvido para quantificação de lactulose por HPLC em leite UHT

Procedeu-se o esquema de validação proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

5.1. Sensibilidade

Os limites de detecção (*Limit of Detection* - LOD) e quantificação (*Limit of Quantification* - LOQ) foram determinados com base na relação sinal-ruído e calculados de acordo com as equações 3 e 4 abaixo:

$$LOD = \frac{3 \times sd_{ruído} \times C_x}{H_{max} - H_{min}} \quad (3)$$

$$LOQ = \frac{10 \times sd_{ruído} \times C_x}{H_{max} - H_{min}} \quad (4)$$

Desta maneira a Tabela 15 aponta a média dos limites calculados para o método de quantificação de lactulose por HPLC para todas as amostras selecionadas no presente estudo.

Tabela 15. Limites de detecção e quantificação.

Parâmetro	HPLC
LOD (mg.L ⁻¹)	(23,31 ± 5,40)
LOQ (mg.L ⁻¹)	(77,70 ± 17,99)

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2. Precisão

A fim de avaliar a repetibilidade do método proposto, seis réplicas de uma mesma amostra de leite UHT comercial selecionada para o presente estudo foram determinadas no mesmo dia com os resultados de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo (DPR) dispostos na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo do teor de lactulose para uma mesma amostra avaliada por HPLC.

Parâmetro	HPLC
Média (mg.L ⁻¹)	293,54 ± 21,11
DPR (%)	7,19

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a ANVISA (2003) o valor de DPR deve ser inferior a 15,0%. Verifica-se que o método desenvolvido mostrou-se de acordo com o limite estabelecido pela ANVISA.

5.3. Exatidão

A exatidão do método proposto foi apurada por meio da determinação do percentual de recuperação do analito.

Padrão de lactulose foi adicionado em três níveis ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) em uma amostra de leite cru, ou seja, isenta de lactulose. As amostras foram submetidas ao mesmo processo de tratamento das amostras comerciais selecionadas no presente estudo e foram analisadas em triplicata. Os valores médios, e seus respectivos desvios-padrão, dos percentuais de recuperação para cada nível estão dispostos na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados para percentual de recuperação de lactulose para o método proposto.

Nível	HPLC	
	% Recuperação	DPR
Nível 1 ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$)	$100,6 \pm 7,0$	7,0
Nível 2 ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$)	$98,5 \pm 1,3$	1,4
Nível 3 ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$)	$103,6 \pm 0,4$	0,3

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com o manual da *Association of Official Analytical* (AOAC, 2002) existem valores críticos aceitáveis de acordo com a concentração do analito ocorrente na matriz em estudo. Esses valores são estimados considerando-se que análises de elementos majoritários costumam apresentar erros sistemáticos relativos muito inferiores àqueles obtidos para analitos em concentrações muito pequenas. Valores de recuperação entre 80% e 110% são aceitáveis para analitos em concentrações acima de 0,001% na matriz analisada. Considerando este o teor mínimo de lactulose sugerido pela IDF para leite UHT (ELLIOTT *et al.*, 2005) e os valores de recuperação obtidos, verifica-se que o método proposto é exato.

A linearidade não foi avaliada visto que o método de quantificação por adição padrão com um incremento na amostra não justifica o estudo deste parâmetro.

6. Conclusão

O método para determinação de lactulose por HPLC com detecção por índice de refração foi desenvolvido, sendo que as condições do método e de injeção que ofereceram os melhores valores de R_s foram: FM composta basicamente por ACN e água na proporção de 75:25, respectivamente, e utilizada em fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Por se tratar de uma matriz muito complexa, o uso de uma amostra-teste para ajuste final das condições de injeção tornou-se essencial, visto que o meio em que o analito de interesse se encontra é capaz de alterar o perfil cromatográfico.

Os testes de validação do método proposto demonstraram a aplicabilidade para amostras de leite UHT, tendo uma resposta analítica satisfatória para tal matriz.

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LACTULOSE POR CZE COM DETECÇÃO INDIRETA NO ULTRAVIOLETA

1. Introdução

A eletroforese capilar de zona é uma técnica de separação que vem ganhando força no controle e desenvolvimento de qualidade de alimentos visto sua versatilidade, reduzido gasto com solventes, ausência de etapas de derivatização e resultados reprodutíveis. Podendo ser uma alternativa às técnicas analíticas de separação já consagradas na aplicação em alimentos como a cromatografia gasosa e cromatografia líquida.

Como a lactulose que tem se mostrado um indicador de tratamento térmico de grande importância devido ao seu comportamento peculiar frente à exposição do alimento ao calor, o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de quantificar este analito tem despertado o interesse da academia e indústria, os quais demandam quantificações cada vez mais fáceis, rápidas e precisas.

2. Objetivo

Teve-se por objetivo desenvolver, validar e implantar uma metodologia analítica para determinação do teor de lactulose em amostras comerciais de leite UHT empregando a eletroforese capilar de zona com detecção indireta no ultravioleta (CZE-UV indireto) como técnica analítica de separação e quantificação.

3. Execução

O desenvolvimento, validação e aplicação do método foram efetivados no laboratório do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (Departamento de Química/UFJF).

4. Desenvolvimento do método

O desenvolvimento do método para determinação de lactulose por CZE deu-se a partir do sistema Agilent 7100 (HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, California, EUA) equipado com um detector por arranjo de diodos (*Diode Array Detector* - DAD), detecção indireta por UV, controle de temperatura no interior do cartucho e no detector em 20°C por ar forçado e software para aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01).

Realizou-se o estudo do eletrólito bem como a otimização das condições de injeção.

Todas as etapas estudadas para desenvolvimento do método foram executadas com a injeção de uma mistura de padrões (lactose e lactulose) a 0,5 mmol.L⁻¹ e, posteriormente com uma amostra-teste submetida ao mesmo processo de extração descrito no item 4.2.1 do capítulo sobre “Investigação de métodos de preparo de amostra e aplicação dos métodos de separação por HPLC-RI e CZE-UV indireto para quantificação de lactulose em leite UHT”.

4.1. Estudo do eletrólito

A determinação de carboidratos por CZE é baseada no grau de dissociação destes compostos e, portanto, torna-se necessário o uso de um eletrólito capaz de manter tais carboidratos ionizados. De acordo com os

valores de pK_a dos carboidratos (11,94 a 12,74; sendo pK_a lactose = 11,98), verifica-se que o eletrólito de corrida deve ser fortemente alcalino ($pH \geq 12,0$) a fim garantir a ionização destes analitos. Deste modo, a separação será baseada nas mobilidades eletroforéticas das espécies sem a necessidade de etapas de derivatização (LEE e LIN, 1996; SOGA e SERWE, 2000).

O eletrólito, adaptado de Soga e Serwe, (2000), consistiu em 20 mmol.L^{-1} de ácido 2,6-piridinodicarboxílico (PDC), 50 mmol.L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH) e $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) o qual foi utilizado para inverter a direção do EOF. A temperatura do cartucho foi mantida em 20°C , com sistema de injeção hidrodinâmico e sistema eletroforético conduzido por polaridade invertida. A detecção foi por UV indireto, visto que os carboidratos não absorvem na região do ultravioleta, utilizando-se o PDC como cromóforo, o qual absorve em 275 nm. O sinal de comprimento de onda foi então ajustado para 350 nm com uma amplitude de banda de 20 nm e a referência foi a 275 nm com uma amplitude de banda de 10 nm. De acordo com Soga e Serwe (2000) esta combinação de comprimento de onda para sinal e para referência é usada a fim de que os picos negativos associados à detecção indireta sejam registrados como picos positivos. Desta forma, um decréscimo de absorção a 275 nm resultante da presença de carboidratos é registrada como um aumento relativo do sinal a 350 nm, desde que o sinal em 275 nm seja utilizado como comprimento de onda de referência.

O condicionamento do capilar novo consistiu em *flush* de 40 minutos de solução NaOH 1 mol.L^{-1} , 15 minutos de água deionizada e 15 minutos de eletrólito. O condicionamento do capilar para início de análise foi estabelecido com *flush* de 15 minutos de solução NaOH 1 mol.L^{-1} , 15 minutos de água

deionizada e 15 minutos de eletrólito; e o condicionamento entre corridas foi ajustado em dois minutos de *flush* com água deionizada.

a) *Preparo do eletrólito*

Inicialmente preparou-se um tampão PDC/NaOH na concentração 40 mmol.L⁻¹/100 mmol.L⁻¹, respectivamente da seguinte forma: pesou-se o NaOH e diluiu-se em água deionizada, transferiu-se o NaOH solubilizado para o béquer contendo a massa de PCD previamente medida, solubilizando-o. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico e completou-se o volume com água deionizada.

O eletrólito foi preparado a partir desta solução tampão efetuando-se os cálculos de diluição necessários para atingir a concentração final de 20 mmol.L⁻¹ e 50 mmol.L⁻¹ de PDC e NaOH, respectivamente, e adicionando-se o CTAB para concentração final de 0,5 mmol.L⁻¹. O pH final do eletrólito foi aferido e manteve-se em aproximadamente 12,5 sem necessidade de ajuste posterior.

4.2. *Estudo das condições de injeção e aquisição de dados*

Realizou-se testes modificando tipo e tamanho de capilar, e condições de injeção como tempo e pressão, além da voltagem aplicada durante a análise. Todos os testes e combinações avaliadas são evidenciados na Tabela 18. Apenas para as condições que ofereceram o maior valor de R_s foi realizado um teste com a amostra-teste a fim de se verificar o poder de resolução na matriz estudada e efetuar possíveis ajustes considerando o sistema real de trabalho (leite).

Tabela 18. Avaliação das condições de injeção para CZE.

Capilar	Injeção	Voltagem (kV)	R _s dos padrões	R _s da amostra-teste
TSP 50µm (D.I.), 48,5 cm (L_T) e 40,0 cm (L_E)	50 mbar/6 s	-11	1,80	---
	50 mbar/6 s	-20	1,93	---
TSP 50µm (D.I.), 58,5 cm (L_T) e 50,0 cm (L_E)	50 mbar/6 s	-11	2,00	1,27
TSU 75µm (D.I.), 58,5 cm (L_T) e 50,0 cm (L_E)	50 mbar/6 s	-11	< 1,00	---
	50 mbar/4 s	-11	1,27	---
	35 mbar/4 s	-11	1,46	---
	30 mbar/4 s	-11	1,54	---
	10 mbar/2 s	-11	1,93	---
	10 mbar /1 s	-15	2,01	1,93

TSP – capilar com recobrimento externo de poliimida; TSU - capilar com recobrimento externo de teflon transparente ao UV; D.I. – diâmetro interno; L_T – comprimento total; L_E – comprimento efetivo. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

Verificou-se que com o aumento do comprimento efetivo do capilar aumenta-se o tempo de análise, porém melhora-se a separação. Portanto, como o objetivo primordial é a separação dos constituintes para posterior quantificação, padronizou-se o comprimento efetivo em 50,0 cm.

Obteve-se uma melhor separação dos padrões para a condição de injeção de 50 mbar por 6 segundos a -11 kV para o capilar de TSP (R_s = 2,00). No entanto, para a amostra 01 em teste, o R_s obtido foi de 1,27. Por apresentar um D.I. maior, o capilar de TSU na condição de injeção de 10 mbar por 1 segundo a -15 kV foi o que ofereceu melhor separação tanto para os padrões (R_s = 2,01) quanto para a amostra 01 em teste (R_s = 1,93). Os eletroferogramas das condições de injeção que demonstram o comportamento dos padrões e amostra 01 para ambos capilares (TSP e TSU) estão dispostos no Apêndice 3.

Os capilares de TSP e TSU, ambos de sílica fundida, se diferem pelo revestimento externo que possuem. Para análise com detecção no UV torna-se necessário retirar o revestimento externo de poliimida do capilar TSP,

produzindo uma janela de detecção, uma vez que este revestimento não possui transparência para os comprimentos de onda na região do UV. Em contrapartida, o capilar de TSU é transparente aos comprimentos de onda no UV, excluindo a etapa de abertura de janela de detecção, minimizando a manipulação do mesmo. Portanto, com base na facilidade de uso e na resolução obtida para a amostra 01, padronizou-se o uso do capilar de TSU, sob as condições de injeção previamente otimizadas, para avaliação da lactulose nas amostras de leite UHT.

4.3. Metodologia desenvolvida para quantificação de lactulose em leite UHT por CZE

Utilizou-se capilar de sílica fundida revestido externamente com politetrafluoroetileno transparente ao UV (capilar TSU) com L_T de 58,5 cm e L_E de 50,0 cm; 75 μ m de D.I. e 375 μ m de D.E. Realizou-se o preparo do eletrólito e condicionamento do capilar conforme descrito no item 4.1 do presente capítulo.

Injetou-se a amostra-teste (ou mistura de padrões a 0,5 mmol.L⁻¹) hidrodinamicamente a uma pressão de 10 mbar com tempo de injeção de um segundo. O sistema eletroforético foi operado em polaridade negativa e voltagem constante de -15 kV.

A Tabela 19 evidencia as condições de injeção e aquisição de dados otimizados para a determinação de lactulose em leite UHT.

Tabela 19. Condições de injeção e aquisição de dados otimizadas para CZE.

Eletrólito	CZE			Detector UV indireto
	Voltagem (kV)	Injeção	Capilar	λ
PDC / NaOH 20 mmol.L ⁻¹ /50 mmol.L ⁻¹ pH ~12,5 CTAB 0,5 mmol.L ⁻¹	-15	10 mbar por 1 segundo	TSU 75 m D.I. 50,0 cm L _E 58,5 cm L _T	350 nm 275 nm (ref)

Fonte: Elaborado pelo autor.

5. Validação dos métodos desenvolvidos para quantificação de lactulose em leite UHT

Procedeu-se o esquema de validação proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003). Todos os cálculos para sensibilidade, repetibilidade e exatidão seguiram os mesmos padrões citados no item 5 do capítulo sobre “Investigação de métodos de preparo de amostra e aplicação dos métodos de separação por HPLC-RI e CZE-UV indireto para quantificação de lactulose em leite UHT”.

5.1. Sensibilidade

Os limites de detecção (*Limit of Detection* - LOD) e quantificação (*Limit of Quantification* - LOQ) foram determinados com base na relação sinal-ruído. A Tabela 20 aponta a média dos limites calculados para o método de quantificação de lactulose por CZE para todas as amostras selecionadas no presente estudo.

Tabela 20. Limites de detecção e quantificação do método proposto por CZE.

Parâmetro	CZE
LOD (mg.L ⁻¹)	(29,88 ± 5,75)
LOQ (mg.L ⁻¹)	(99,62 ± 19,18)

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2. Precisão

A repetibilidade contou coma análise de seis réplicas de uma mesma amostra de leite UHT comercial selecionada para o presente estudo foram determinadas no mesmo dia sendo os resultados de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo (DPR) dispostos na Tabela 21.

Tabela 21. Valores de média, desvio-padrão e desvio-padrão relativo do teor de lactulose para uma mesma amostra avaliada por CZE.

Parâmetro	CZE
Média (mg.L ⁻¹)	253,45 ± 13,37
DPR (%)	5,27

Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo a ANVISA (2003) o valor de DPR deve ser inferior a 15,0% e, portanto, o método desenvolvido encontra-se dentro do limite recomendado.

5.3. Exatidão

A exatidão do método proposto foi verificada por meio da determinação do percentual de recuperação do analito.

Padrão de lactulose foi adicionado em três níveis (0,5 mg.mL⁻¹, 1,0 mg.mL⁻¹ e 1,5 mg.mL⁻¹) em uma amostra de leite cru, ou seja, isenta de lactulose. As amostras comerciais selecionadas no presente estudo e foram analisadas em triplicata. Os valores médios, e seus respectivos desvios-padrão, dos percentuais de recuperação para cada nível estão dispostos na Tabela 22.

Tabela 22. Resultados para percentual de recuperação de lactulose obtidos para o método analítico por CZE.

Nível	CZE	
	% Recuperação	DPR
Nível 1 (0,5mg.mL ⁻¹)	99,5 ± 2,1	2,1
Nível 2 (1,0 mg.mL ⁻¹)	102,9 ± 4,0	3,9

Continua...

Nível 3 (1,5 mg.mL ⁻¹)	101,5 ± 1,3	1,3
------------------------------------	-------------	-----

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com o manual da *Association of Official Analytical* (AOAC, 2002) existem valores críticos aceitáveis de acordo com a concentração do analito em estudo. Esses valores são estimados considerando-se que análises de elementos majoritários costumam apresentar erros sistemáticos relativos muito inferiores àqueles obtidos para analitos em concentrações muito pequenas. Valores de recuperação entre 80% e 110% são aceitáveis para analitos em concentrações acima de 0,001%. Considerando este o teor de lactulose mínimo encontrado em leite UHT, segundo a IDF (ELLIOTT *et al.*, 2005), verifica-se que o método proposto é exato.

A linearidade não foi avaliada visto que o método de quantificação por adição padrão com um incremento na amostra não justifica o estudo deste parâmetro.

6. Conclusão

O método para determinação de lactulose por CZE com detecção indireta no UV foi desenvolvido, sendo que as condições do método e de injeção que ofereceram os melhores valores de R_s foram: capilar de TSU com D.I. 75 μm e 58,5 cm de L_T , voltagem de -15kV e injeção hidrodinâmica a 10 mbar por 1 segundo.

Por se tratar de uma matriz muito complexa, o uso de uma amostra-teste para ajuste final das condições de injeção tornou-se essencial, visto que o meio em que o analito de interesse se encontra é capaz de alterar o perfil cromatográfico.

Os testes de validação do método proposto demonstraram a aplicabilidade para amostras de leite UHT, tendo uma resposta analítica satisfatória para tal matriz.

INVESTIGAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA E APLICAÇÃO DOS MÉTODOS DE SEPARAÇÃO POR HPLC-RI E CZE-UV INDIRETO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LACTULOSE EM LEITE UHT

1. Introdução

O leite apresenta, em sua composição, macronutrientes dos quais destacam-se proteínas, lipídios e carboidratos. Por apresentar essa variedade de componentes, é caracterizado por ser um alimento de matriz complexa. Para se avaliar os carboidratos presentes, em especial a lactulose, ocorrente em pequenas concentrações (MORALES *et al.*, 2000); torna-se necessário o desenvolvimento de um método de extração capaz de retirar estes possíveis interferentes, mantendo o analito de interesse intacto e mais acessível na amostra.

Além disso, por serem isômeros, lactose e lactulose apresentam estruturas químicas e comportamento muito semelhantes. O grande desafio no desenvolvimento de uma metodologia analítica de separação, como HPLC e CZE, para determinação de lactulose em leite é a presença de lactose em elevada concentração. Neste sentido, a escolha de um preparo de amostra adequado é essencial para que a lactose interfira o mínimo possível na determinação de seu isômero, objeto de estudo do presente trabalho.

Para análise de carboidratos em leite, os possíveis e principais interferentes são proteínas e gorduras. Durante o processo de desproteinização promove-se o aumento da hidrofobicidade superficial acessível (ou decréscimo do potencial de hidratação), gerando agregação de resíduos protéicos e, por consequência, dos compostos lipídicos;

permanecendo solúvel apenas os carboidratos, eventuais resíduos de aminoácidos solúveis e sais.

2. Objetivo

O objetivo desta etapa foi minimizar o número de interferentes para análise de lactulose em amostras comerciais de leite UHT aplicando os métodos de separação por HPLC e CZE previamente desenvolvidos.

3. Aquisição das amostras comerciais

As amostras analisadas foram as mesmas utilizadas para determinação dos índices de WPNI e HMF do presente estudo. Tais amostras foram coletadas de forma aleatória nas principais regiões produtoras de leite UHT do Brasil (Sudeste, Centro-Oeste e Sul).

Foram selecionadas dezoito marcas comerciais nacionais de leite UHT, sendo destas: 18 marcas de leite UHT desnatado com teor regular de lactose e três marcas de leite UHT semidesnatado lactose reduzida. Foram adquiridas uma amostra de cada tipo de leite a ser avaliado (“regular”: teor de lactose regular; e “delactosado”: teor de lactose reduzido), totalizando quarenta e duas amostras analisadas.

As amostras foram codificadas e classificadas de acordo com a Tabela 23.

Tabela 23. Classificação e identificação das amostras em estudo.

Amostra	Código	Grupo
Leite UHT desnatado com teor regular de lactose	01 a 18	“Regular”
Leite UHT semidesnatado com teor reduzido de lactose	19 a 21	“Delactosado”

Fonte: Elaborado pelo autor.

4. Investigação dos métodos de preparo de amostra para quantificação de lactulose em leite UHT por HPLC e CZE

4.1. Execução

Os métodos de preparo de amostra foram estudados, executados e testados no Laboratório de Composição e Valor Nutricional de Alimentos (Departamento de Nutrição/UFJF) e Laboratório de Glicoconjugados (Departamento de Bioquímica/UFJF), gerando os extratos, os quais foram testados para ambos os métodos analíticos propostos (HPLC e CZE).

4.2. Estudo dos métodos de preparo de amostra

Realizou-se então o estudo do método de preparo, ou tratamento, da amostra, baseado no processo de desproteínização, a fim de se estabelecer o método que oferecesse melhor resultado de separação.

A título de comparação e avaliação dos métodos de preparo, submeteu-se uma mesma amostra de leite UHT a todos os métodos descritos na Tabela 24, eliminando possíveis efeitos de matriz, visto que o leite apresenta composição química naturalmente variável de acordo com período de lactação, estação do ano, clima da região e alimentação do gado (SILVA, 2004).

Os cromatogramas e eletroferogramas obtidos nesta etapa estão dispostos no Apêndice 4.

Tabela 24. Descrição dos métodos de preparo da amostra avaliados.

Método	Descrição	Referência
01	1.1 Desproteínização com TCA (ácido tricloroacético) 12% m/v: 10 mL de amostra + 10 mL TCA 24% m/v. Obtenção do filtrado. Injeção	(FOX, 1989)
	1.2 Precipitação dos carboidratos do filtrado obtido: 5 mL de filtrado + 5 mL de metanol + gotas de acetona gelada. Manutenção do sistema a -20°C por 24h. Centrifugação e obtenção do precipitado. Ressuspensão em 1mL de diluente (ACN-H ₂ O 50:50) – para HPLC ou em 1 mL de água – para CZE.	
02	2.1. Aquecimento de 50 mL da amostra a 40°C seguida de desproteínização com 0,5 mL de ácido acético glacial. Obtenção de filtrado. Adição de 20 mL NaOH 0,5 mol.L ⁻¹ no filtrado obtido seguida de aquecimento até floculação. Obtenção de filtrado. Injeção.	(LABORATÓRIO DE GLICOCONJUGADOS, 2014)
03	3.1. Adição de 15 mL de amostra + 20 mL de água destilada + 5,5 mL de solução de pré-tratamento (91,0 g acetato de zinco hidratado, 56,6 g de ácido fosfotúngstico e 58,1 mL de ácido acético glacial e água destilada q.s.p. 1.000 mL) + água destilada q.s.p. 50 mL; seguida de estabilização por 1h. Obtenção do filtrado. Injeção.	(IDF, 2007)
04	4.1. Adição de 14 mL de amostra + 20 mL de diluente (Etanol-H ₂ O 1:1) e aquecimento (banho-maria 60°C/25min), seguida de resfriamento e adição de 500 µL de soluções de Carrez I e II, respectivamente; e 10 mL de ACN (grau HPLC). Volume final de 50 mL com diluente. Estabilização de 1h a 2h. Obtenção do filtrado. Filtração em filtro de membrana 0.45 µm. Injeção	(CHÁVEZ-SERVÍN <i>et al.</i> , 2004)
	4.2. Concentração do filtrado obtido: rotaevaporação do filtrado a 80°C por 20 min, liofilização do resíduo. Ressuspensão do resíduo em 1 mL de solução (Etanol-H ₂ O 1:1 + 20% ACN) – para HPLC, ou ressuspensão do resíduo em a) 1 mL de água, b) 1 mL de eletrólito – para CZE.	
	4.3. Pré-concentração da amostra por processo de liofilização. Ressuspensão do pó em 7,5 mL de água destilada + 10 mL de diluente (Etanol-H ₂ O 1:1) e aquecimento (banho-maria 60°C/25min), seguida de resfriamento e adição de 250 µL de soluções de Carrez I e II, respectivamente; e 5 mL de ACN (grau HPLC). Volume final de 25 mL com diluente. Estabilização de 1h a 2h. Obtenção do filtrado. Filtração em filtro de membrana 0.45 µm. Injeção	

Fonte: Elaborado pelo autor.

A condição de preparo de amostra que melhor se adequou foi o método 04 (Tabela 24) empregando-se o processo de liofilização como pré-concentração das amostras (item 4.3 da Tabela 24). Este método foi escolhido para ambos os métodos analíticos propostos devido à obtenção de cromatogramas e eletroferogramas com linhas de base mais estáveis e, conseqüentemente melhor visualização e separação do pico de lactulose (menor interferência da lactose). Este resultado pode estar relacionado a fatores como:

- O pH do filtrado do método 04. Para HPLC: Por se tratar de um método de extração orgânica o filtrado apresentava pH próximo da neutralidade e dentro da faixa de pH ótimo de trabalho da coluna, conseguindo-se trabalhar em condições mais próximas da recomendada pelo fabricante sem a necessidade de ajuste para injeção. Este fato não ocorria para os métodos de preparo por precipitação ácida (métodos 01 e 03), os quais obrigavam ao trabalho na faixa extrema de pH da coluna uma vez que o ajuste do pH para a faixa ideal era mais uma etapa de diluição da amostra. Para CZE: como o eletrólito de trabalho deve apresentar pH acima de 12,0; uma amostra a ser injetada com pH próximo da neutralidade tende a causar menos perturbações no sistema quando comparado à amostras que apresentem pH muito baixo (como no caso dos extratos dos métodos 01 e 03). Quanto ao método 02, apesar de o filtrado apresentar-se próximo à neutralidade, estima-se que a precipitação não seja totalmente eficaz devido à falta de controle e padronização da etapa de floculação.

- O uso de soluções clarificadoras (Carrez I e II). Para HPLC e CZE: possibilitar a retirada de compostos ainda solúveis no filtrado, reduzindo assim a ocorrência de ruídos no sinal devido à presença dos mesmos.

4.2.1. Descrição do preparo da amostra (Método 4.3)

Submeteu-se à amostra ao processo de secagem via liofilização. Durante o processo de liofilização a água do alimento é retirada por sublimação, ou seja, a água congelada presente nas células do alimento passa diretamente do estado sólido para o gasoso. Para tal, o equipamento é composto por uma câmara de liofilização onde a temperatura interna é de aproximadamente -50°C , sendo mantida a vácuo. Neste ambiente os microcristais de gelo evaporam sem romper a estrutura molecular do alimento.

Transferiu-se exatamente 30,00 mL de amostra para um tubo de ensaio tipo Falcon, manteve-se a amostra em freezer a -80°C por 12 horas. Posteriormente transferiu-se o tubo com a amostra congelada para a câmara do liofilizador a -50°C e iniciou-se o processo de liofilização durante cerca de 48 horas.

Todas as amostras de leite UHT foram liofilizadas no liofilizador Liobras® Modelo L120 do laboratório de Cromatografia Gasosa da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora com temperatura do condensador mantida a -50°C e pressão na câmara de liofilização de $67\ \mu\text{mHg}$.

Após a obtenção do leite liofilizado, adicionou-se 7,5 mL de água deionizada no tubo tipo Falcon, promovendo agitação intensa com agitador tipo vortex até completa dissolução do pó. Promoveu-se assim a concentração da amostra, com um fator de concentração (F.C.) de 4,0.

Posteriormente realizou-se o preparo da amostra com o processo de extração selecionado de acordo com os resultados da Tabela 24 (método 04). Em análise de carboidratos, o uso de soluções de clarificação no processo de extração de amostras que contém gorduras e proteínas, como o leite e outros produtos lácteos, é de extrema importância para purificação do filtrado (MARTÍNEZ-CASTRO *et al.*, 1987). Sendo assim, verificou-se que as soluções de Carrez desempenham importante papel na obtenção de um filtrado livre de interferentes, sendo capaz de ser utilizado em ambos os métodos propostos.

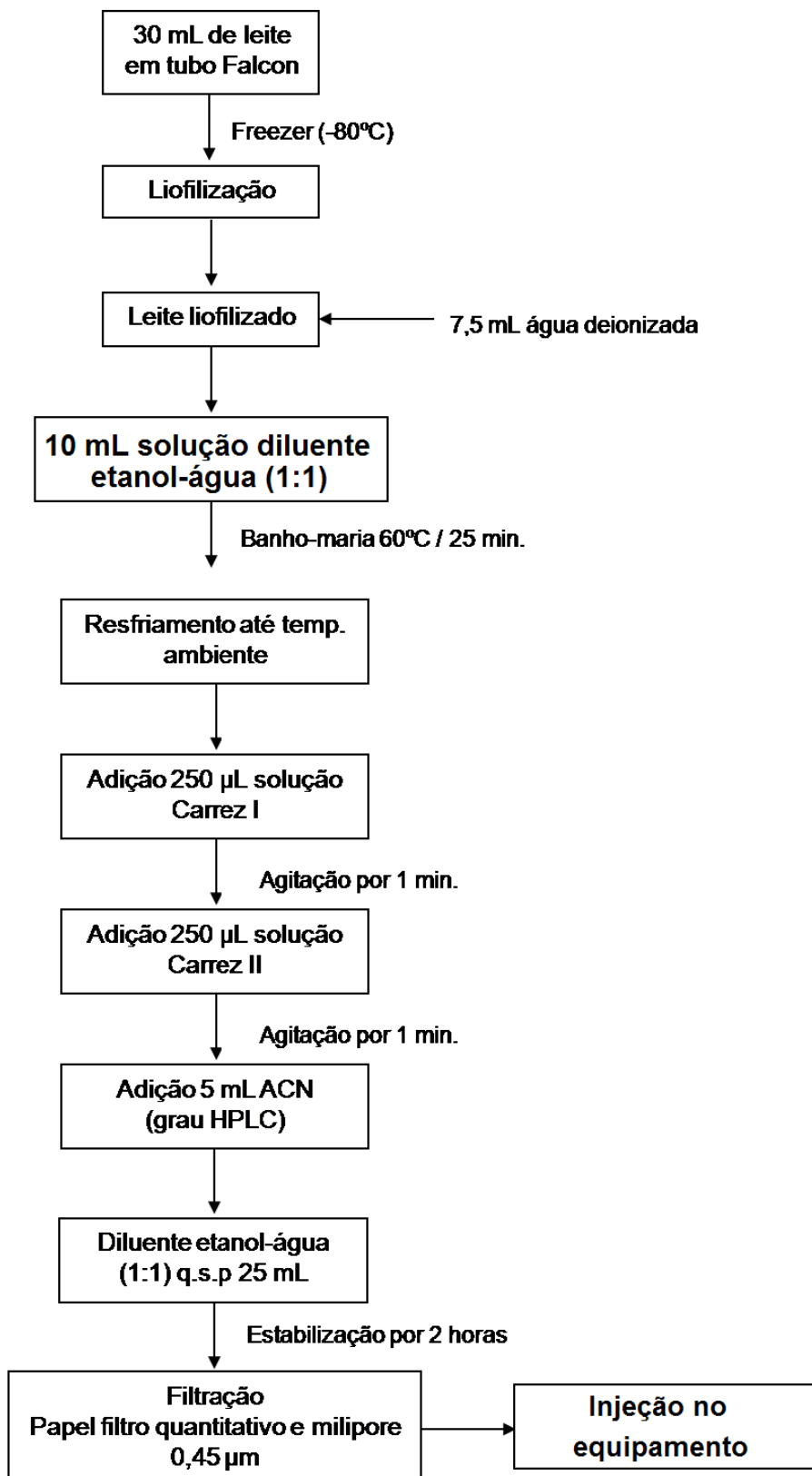
Adicionou-se 10 mL de solução diluente etanol-água (1:1 v/v) na amostra liofilizada previamente reconstituída e manteve-se o tubo em banho termostático a 60°C durante 25 minutos. Após resfriamento até temperatura ambiente, adicionou-se 250 µL de solução Carrez I agitando vigorosamente por 1 minuto e 250 µL de solução Carrez II, novamente agitando o tubo por 1 minuto. *Nota:* o preparo das soluções Carrez I e II apresenta-se descrito no Apêndice 5.

Adicionou-se 5 mL de ACN (grau HPLC) e completou-se o volume do tubo para 25 mL com solução diluente etanol-água (1:1 v/v).

Manteve-se o tubo em repouso por 2 horas para estabilização do sistema, filtrou-se em papel filtro quantitativo (2 µm a 3 µm) Sartorius Stedium® e posteriormente em filtro milipore 0,45 µm Macherey-Nagel®. Utilizou-se o filtrado obtido para as análises em HPLC e CZE, injetando diretamente nos equipamentos.

O esquema completo de preparo da amostra selecionado é abordado pela Figura 9 abaixo.

Figura 9. Esquema do preparo da amostra para análise de lactulose por HPLC e CZE em leite UHT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5. Quantificação do teor de lactulose em amostras comerciais de leite UHT por HPLC com detecção por índice de refração

5.1. Execução

A quantificação do teor de lactulose nas amostras comerciais de leite UHT selecionadas foi realizada no laboratório de Glicoconjugados (Departamento de Bioquímica/UFJF).

5.2. Aplicação da metodologia desenvolvida

Apenas um lote de cada marca selecionada foi analisado, sendo injetadas em duplicata, totalizando 42 amostras.

As amostras foram previamente tratadas de acordo com método de preparo de amostra predefinido e, posteriormente, foram submetidas às etapas descritas de acordo com o item 4.3 do capítulo sobre “Investigação de métodos de preparo de amostra e aplicação dos métodos de separação por HPLC-RI e CZE-UV indireto para quantificação de lactulose em leite UHT”, a fim de se obter seus respectivos cromatogramas.

5.3. Método de quantificação

Como o leite é uma matriz complexa e de composição naturalmente variável de acordo com período de lactação, estação do ano e alimentação do gado (SILVA, 2004), o uso de curva analítica externa para quantificação não se torna adequado, visto à ocorrência de efeitos de matriz que interferem diretamente no sinal analítico monitorado. Sabe-se que o interesse na obtenção dos resultados de forma ágil e na eliminação dos efeitos de matriz durante a quantificação de cada amostra é crescente, desta forma, verifica-se a

possibilidade em se realizar a quantificação por adição de padrão usando-se um incremento na amostra (SKOOG *et al.*, 2006b).

Assim, uma adição única de V_s (mL) de padrão de lactulose em uma amostra fornece:

$$S_1 = \frac{k \cdot V_x \cdot C_x}{V_t} \quad (5)$$

$$S_2 = \frac{k \cdot V_x \cdot C_x}{V_t} + \frac{k \cdot V_s \cdot C_s}{V_t} \quad (6)$$

Onde: S_1 e S_2 são os sinais analíticos resultantes da adição da amostra sem adição de padrão e da amostra com adição de padrão, respectivamente.

V_x é a alíquota de amostra injetada.

V_s é o volume de padrão adicionado na amostra.

C_s é a concentração do padrão adicionado.

C_x é a concentração da amostra.

V_t é o volume total do sistema (amostra+padrão).

Dividindo-se a equação 5 pela 6 e rearranjando, tem-se:

$$C_x = \frac{S_1 \cdot C_s \cdot V_s}{(S_2 - S_1) \cdot V_x} \quad (7)$$

Desta forma, o esquema de injeção para quantificação do teor de lactulose foi:

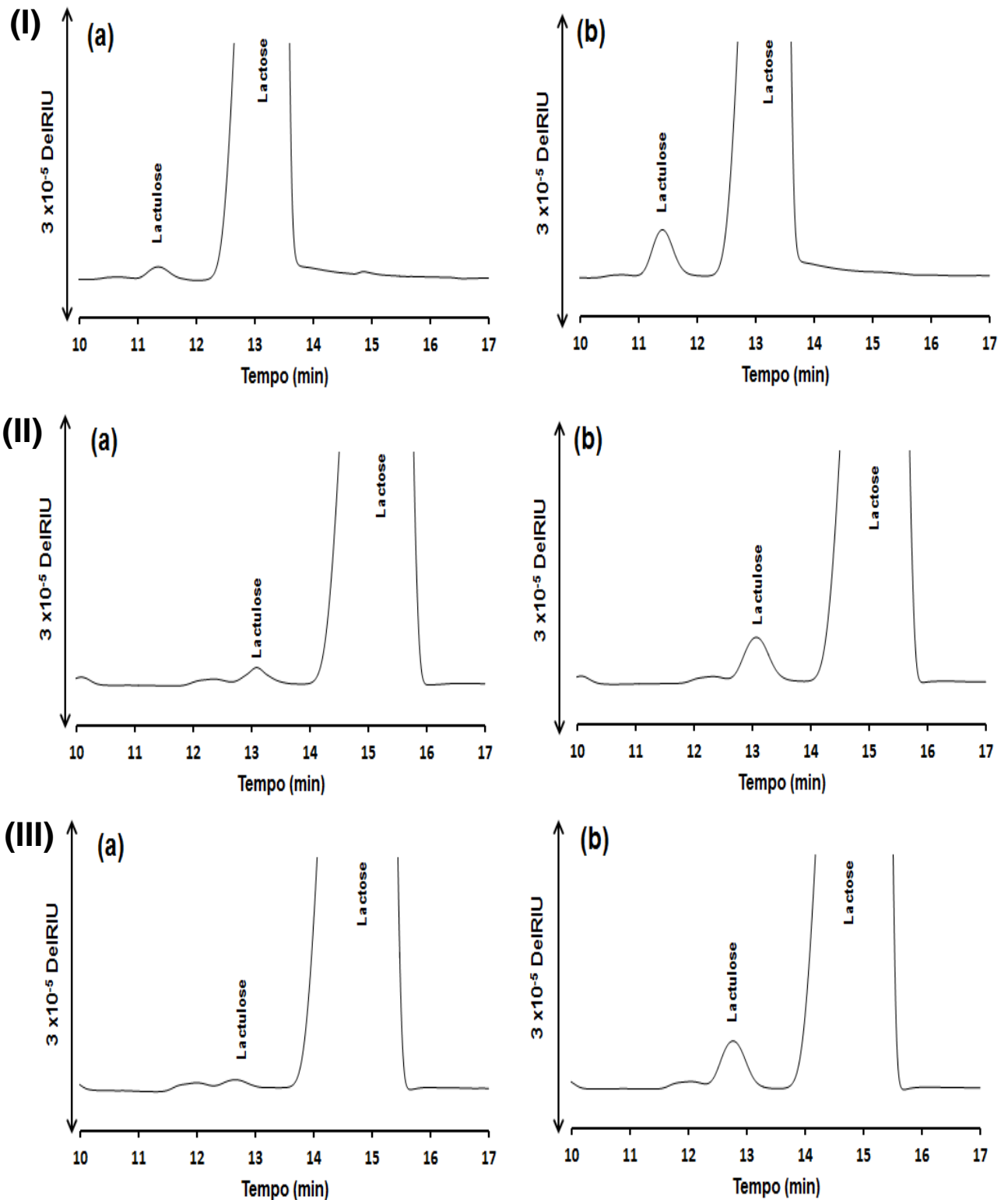
- a) Uma alíquota de 920 μ L de amostra (filtrado, obtido de acordo com o esquema da Figura 9) foi transferida para um frasco volumétrico de 1 mL e o volume completado com água deionizada. Injetou-se no sistema (amostra sem incremento).
- b) Uma alíquota de 920 μ L de amostra (filtrado, obtido de acordo com o esquema da Figura 9) foi transferida para um frasco volumétrico de 1 mL

e adicionou-se 80 μL de solução padrão lactulose a 10 mg.mL^{-1} . Injetou-se no sistema (amostra com incremento).

Para cálculos posteriores, considerou-se o volume inicial de 30 mL de amostra e volume final de 25 mL (considerando processo de liofilização e posterior reconstituição e extração); tendo um F.C._{final} de 1,2; o qual foi utilizado após aplicação da equação 7.

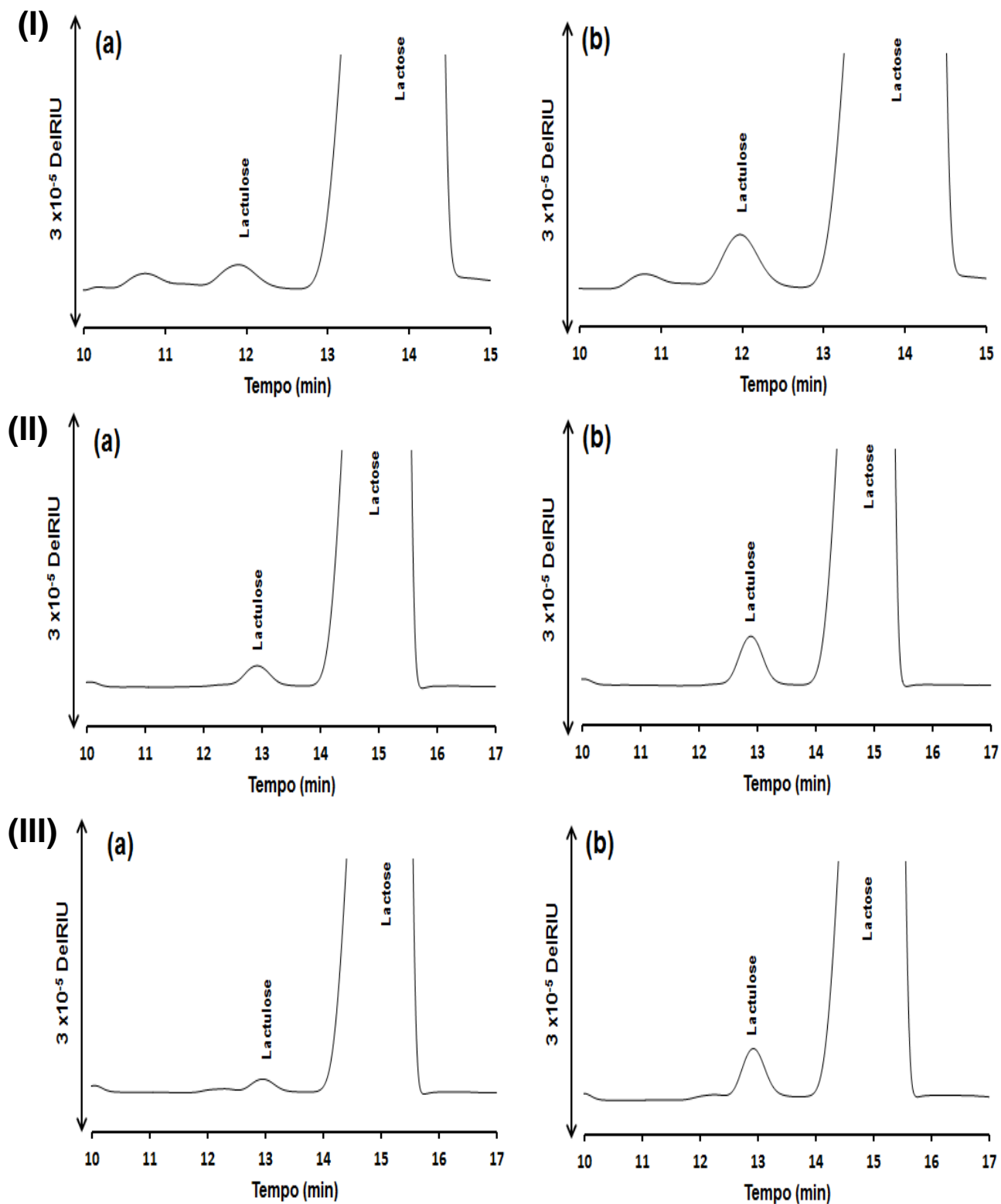
Os cromatogramas de todas as amostras de leite UHT em estudo estão dispostos na Figura 10 a Figura 16.

Figura 10. Cromatogramas (I) amostra 01, (II) amostra 02, (III) amostra 03. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de 1,0 mL.min⁻¹, sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.



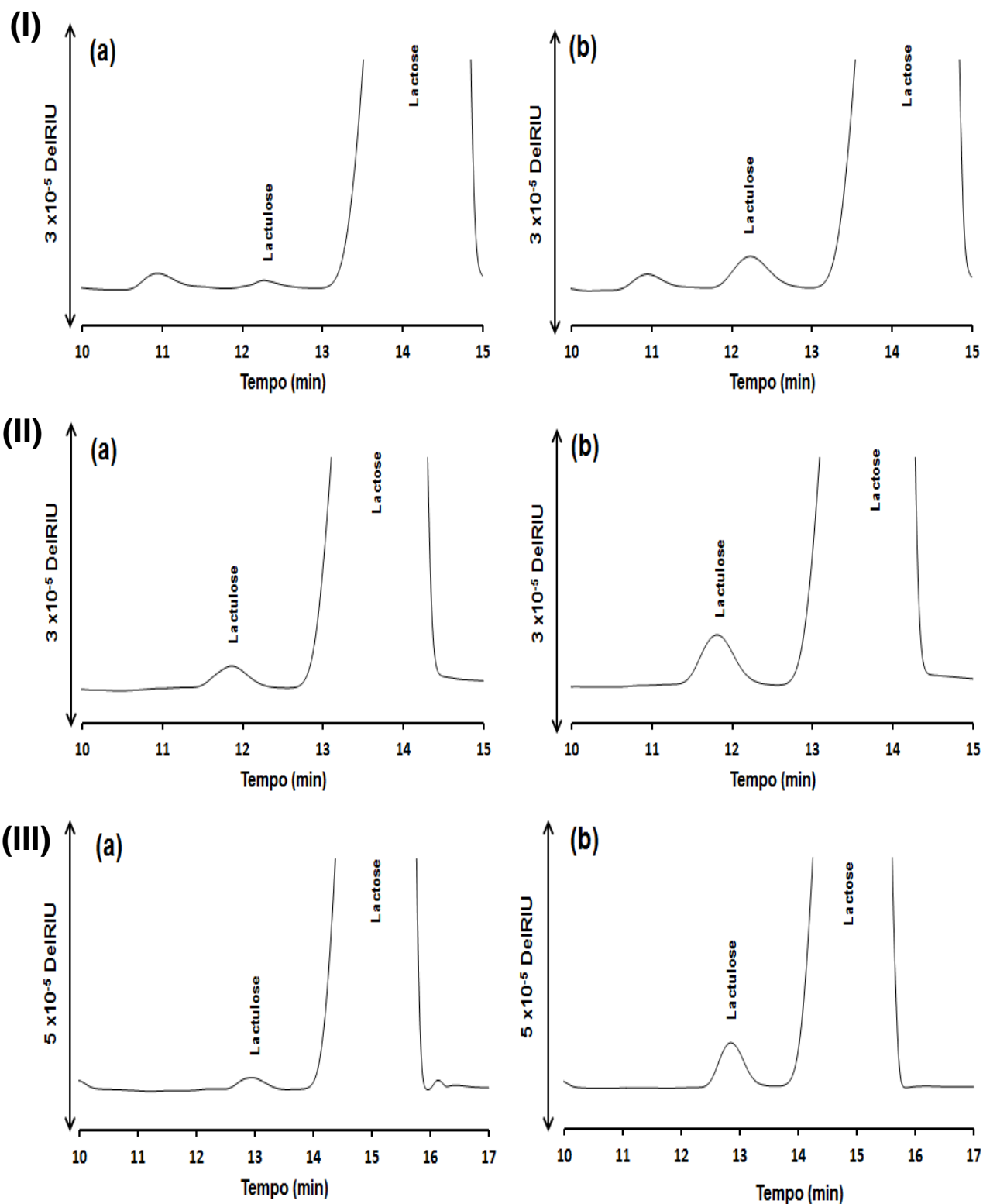
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 11. Cromatogramas (I) amostra 04, (II) amostra 05, (III) amostra 06. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU , ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.



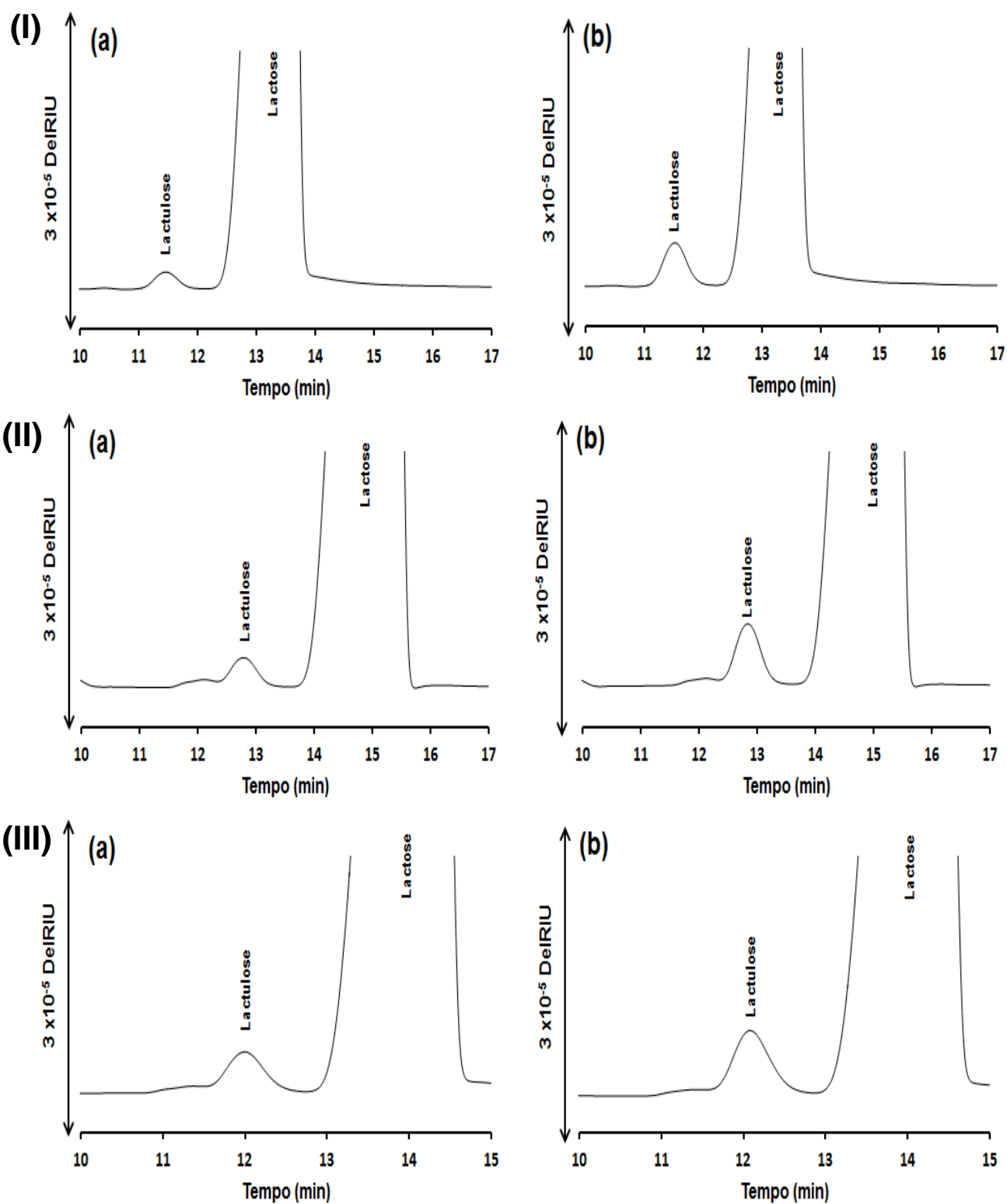
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 12. Cromatogramas (I) amostra 07, (II) amostra 08, (III) amostra 09. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU , ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.



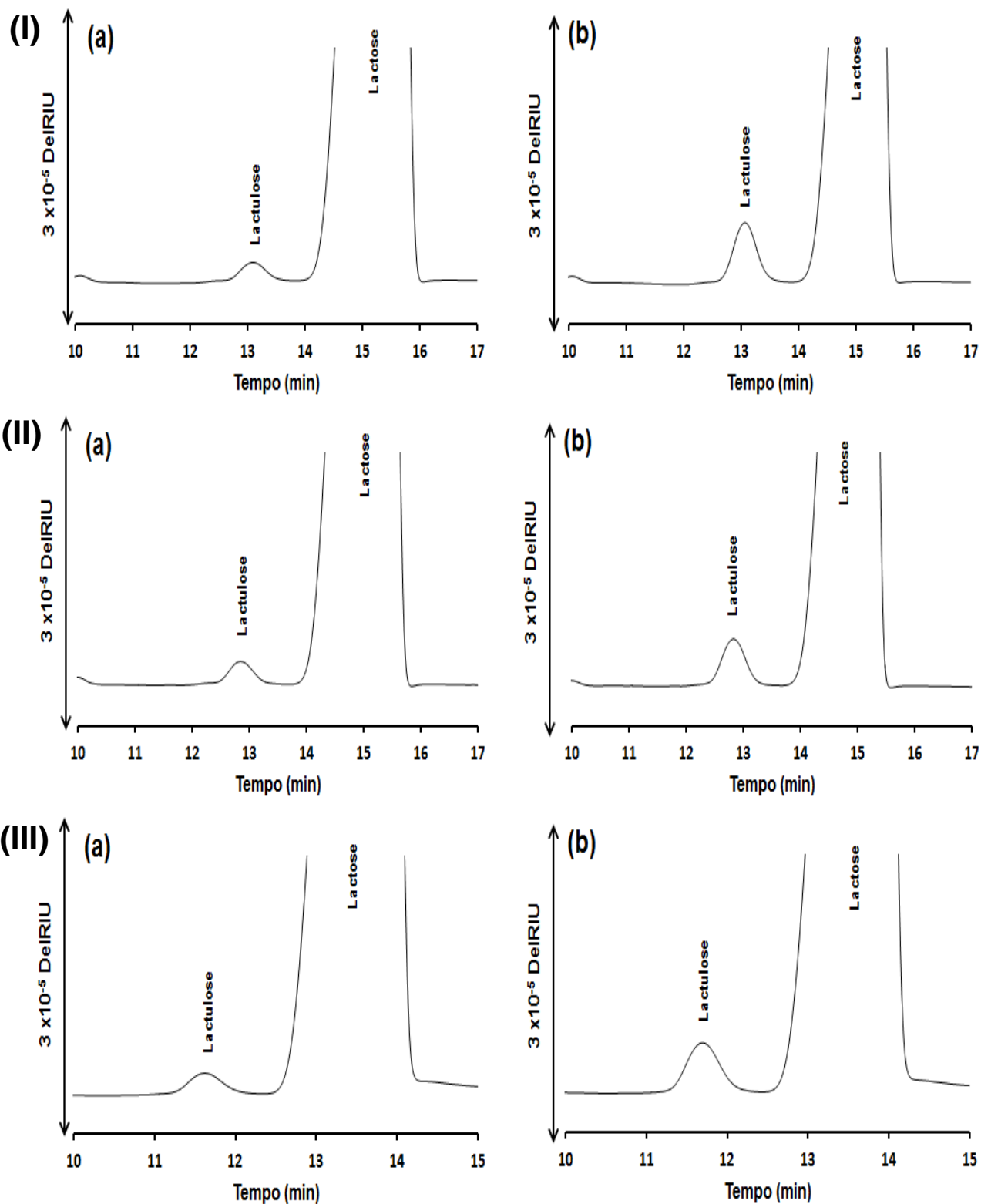
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 13. Cromatogramas (I) amostra 10, (II) amostra 11, (III) amostra 12. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU , ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.



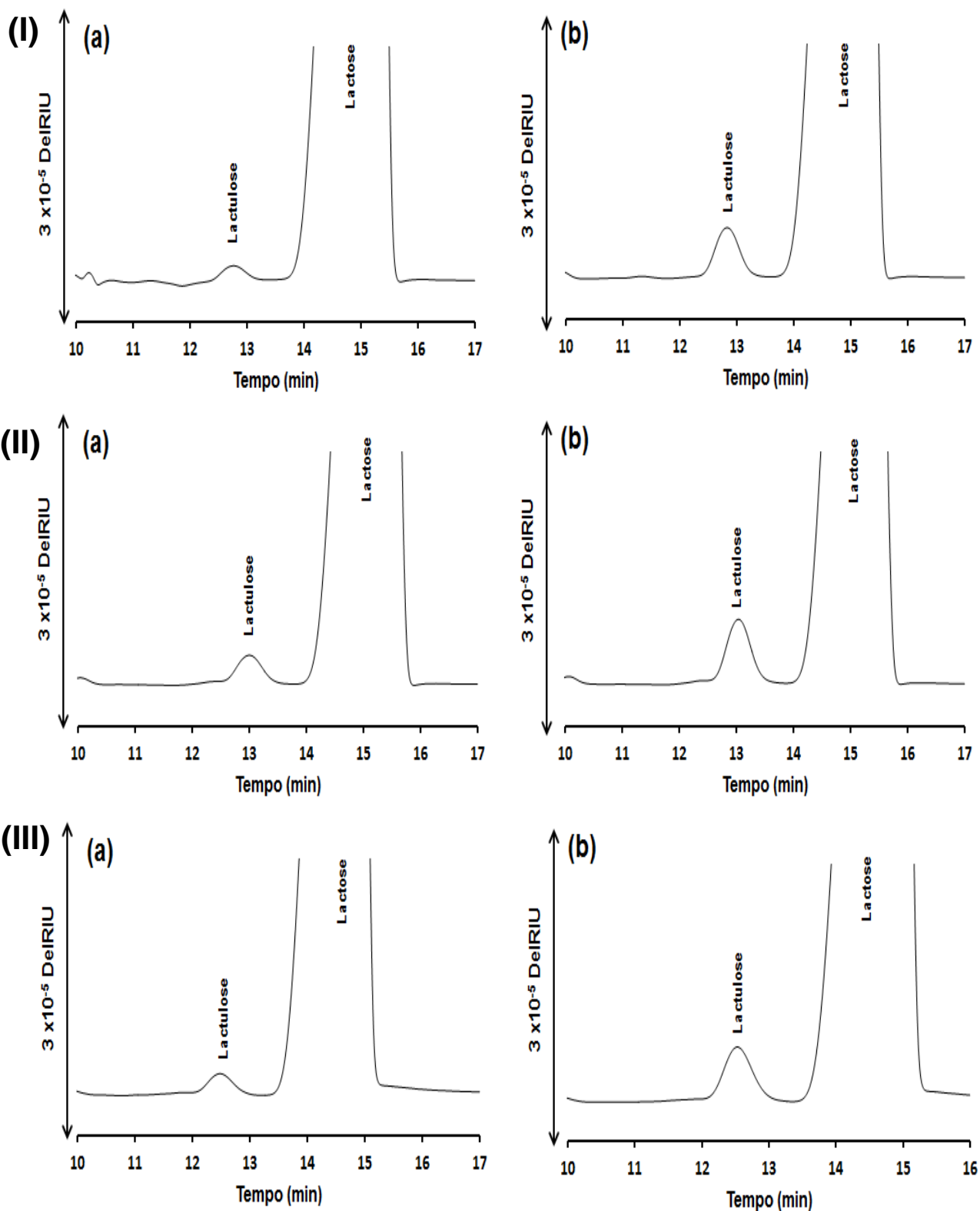
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 14. Cromatogramas (I) amostra 13, (II) amostra 14, (III) amostra 15. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU , ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.



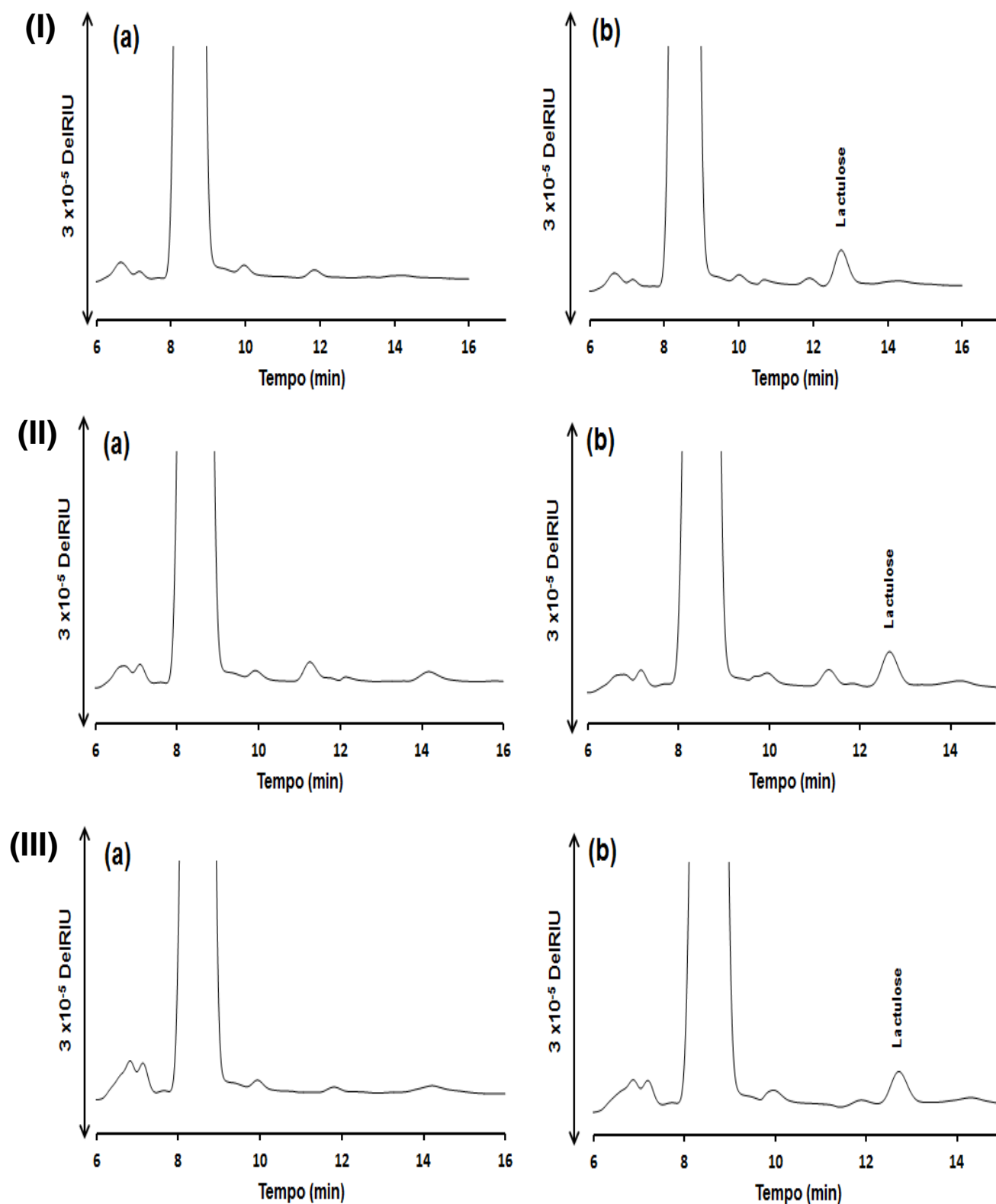
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15. Cromatogramas (I) amostra 16, (II) amostra 17, (III) amostra 18. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU , ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16. Cromatogramas (I) amostra 19, (II) amostra 20, (III) amostra 21. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU , ACN-água (75:25)+ 0,2%TEA.



Fonte: elaborado pelo autor.

Verifica-se que apenas as amostras com teor regular de lactose apresentaram sinal analítico e, conseqüentemente foram quantificadas. A Tabela 25 descreve a média do teor de lactulose destas 36 amostras, de 18 marcas comerciais de leite UHT avaliadas por HPLC.

Tabela 25. Análise estatística descritiva do teor de lactulose das amostras de leite UHT em estudo por HPLC.

Parâmetro	HPLC	
	Regular (N=36)	Delactosado (N=6)
Média (mg.L ⁻¹)	(352,28 ± 201,01)	nd
Amplitude (mg.L ⁻¹)	963,99	nd
DPR	57,1	---

nd: não detectado. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

Realizou-se a análise estatística descritiva do teor de lactulose considerando os grupos “regular” e “delactosado” visto a elevada discrepância dos resultados.

De acordo com Andrews (1989) a concentração de lactose no leite cru desempenha um importante papel na ocorrência da reação de isomerização da lactose e conseqüente formação de lactulose. Portanto, a formação de lactulose depende do teor de lactose disponível, legitimando o comportamento das amostras do grupo “delactosado”, as quais apresentaram-se abaixo do limite de detecção do método (< 23,31 mg.L⁻¹) para teor de lactulose. Isso sugere a ocorrência de hidrólise e conseqüente redução do teor de lactose do produto.

Elliot *et al.* (2005) verificaram que amostras de leite UHT submetidas ao processamento UHT direto e indireto apresentaram um teor médio de lactulose de 189,1 mg.L⁻¹ e 484,7 mg.L⁻¹, respectivamente. Outro estudo também

confirmou a ocorrência de lactulose num teor médio de 144 mg.L⁻¹ para processamento UHT direto, e 400 mg.L⁻¹ para UHT indireto (FEINBERG et al., 2006).

A média do teor de lactulose encontrada para as 18 marcas do grupo “regular” se assemelha com os dados reportados pela literatura para leites submetidos ao processamento UHT indireto. No entanto, os elevados valores de amplitude, desvio-padrão e DPR apontam para possíveis variações no tipo de processamento (direto e indireto) e no binômio tempo/temperatura usado entre as marcas avaliadas.

A análise de variância mostrou efeito estatisticamente significativo de marcas ($p < 0,0001$). A ANOVA foi realizada considerando a população total de 36 amostras, a fim de se tentar verificar o grau de homogeneidade do produto atualmente comercializado quanto ao teor de lactulose, visto que o foco do trabalho é a avaliação do efeito de marca sobre os indicadores aqui abordados. Deste modo foi realizada a análise de comparação de médias pelo teste Tukey, cujo resultado apresenta destacado na Tabela 26.

Tabela 26. Teor médio de lactulose nas amostras de leite UHT com teor regular de lactose em estudo, obtido por HPLC.

Amostra	Lactulose (mg.L⁻¹)
12	992,76 a
17	487,32 b
14	463,56 bc
04	444,06 bc
05	417,98 bc
08	414,07 bc
11	413,51 bc
15	409,84 bc
10	343,14 bcd
18	340,85 bcd
13	322,07 bcd
16	280,13 cde
02	217,18 de
09	211,53 de
06	202,78 de

Continua...

01	180,73	de
07	102,86	e
03	96,62	e

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% probabilidade. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

Ao avaliar os resultados obtidos para o teste Tukey de comparação das médias, pode-se observar o agrupamento das amostras quantificadas em sete grupos distintos evidenciando o efeito de marca, e conseqüentemente o efeito do tipo e das condições de processamento adotadas sob o teor de lactulose do produto final.

Apesar desta variação evidente entre as marcas selecionadas, todas as amostras, com exceção da amostra 12, estão de acordo com os dados da literatura e abaixo do limite máximo de 600 mg.L⁻¹ sugerido pela Federação Internacional de Lácteos quanto ao teor de lactulose para leite submetido ao tratamento UHT.

A amostra 12 exibiu o teor de lactulose (992,76 mg.L⁻¹), 65% acima do limite máximo sugerido pela IDF, permitindo supor a ocorrência de não-conformidades durante o processamento da mesma.

6. Quantificação do teor de lactulose em amostras comerciais de leite UHT por CZE com detecção indireta no UV

6.1. Execução

A quantificação do teor de lactulose nas amostras comerciais de leite UHT selecionadas foram executadas no laboratório do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (Departamento de Química/UFJF).

6.2. *Aplicação da metodologia desenvolvida*

Apenas um lote de cada marca selecionada foi analisado, sendo as amostras injetadas em duplicata, totalizando 42 amostras.

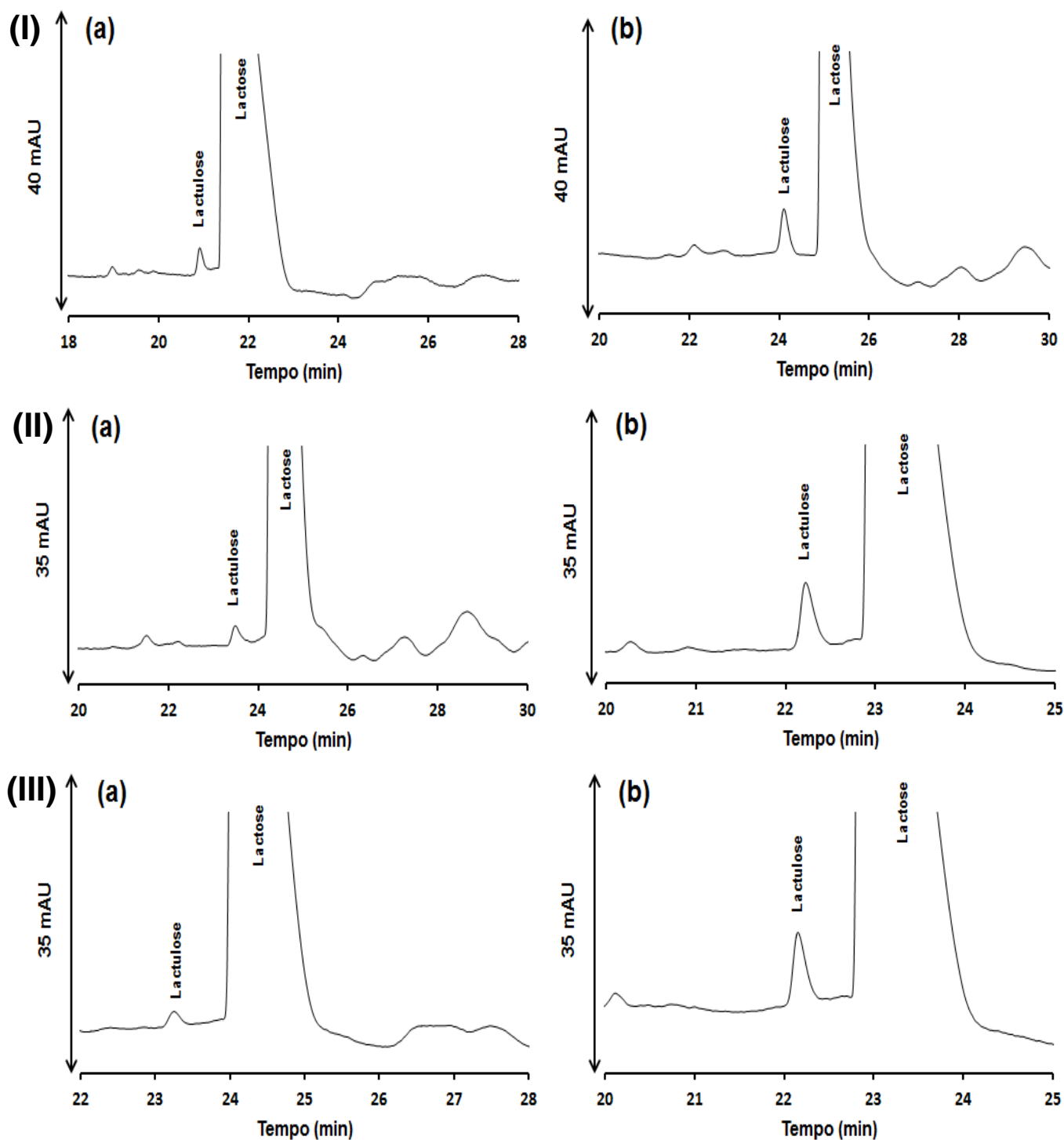
As amostras foram previamente tratadas de acordo com método de preparo de amostra predefinido e, posteriormente, foram submetidas às etapas descritas de acordo com o item 4.3 do capítulo “Desenvolvimento de método analítico para quantificação de lactulose por CZE com detecção indireta no ultravioleta”, a fim de se obter seus respectivos eletroferogramas.

6.3. *Método de quantificação*

Utilizou-se o método de quantificação por adição de padrão usando-se apenas um incremento na amostra, assim como foi efetuado para o método por HPLC, por se tratar do mesmo sistema a ser determinado (lactulose em amostras comerciais de leite UHT).

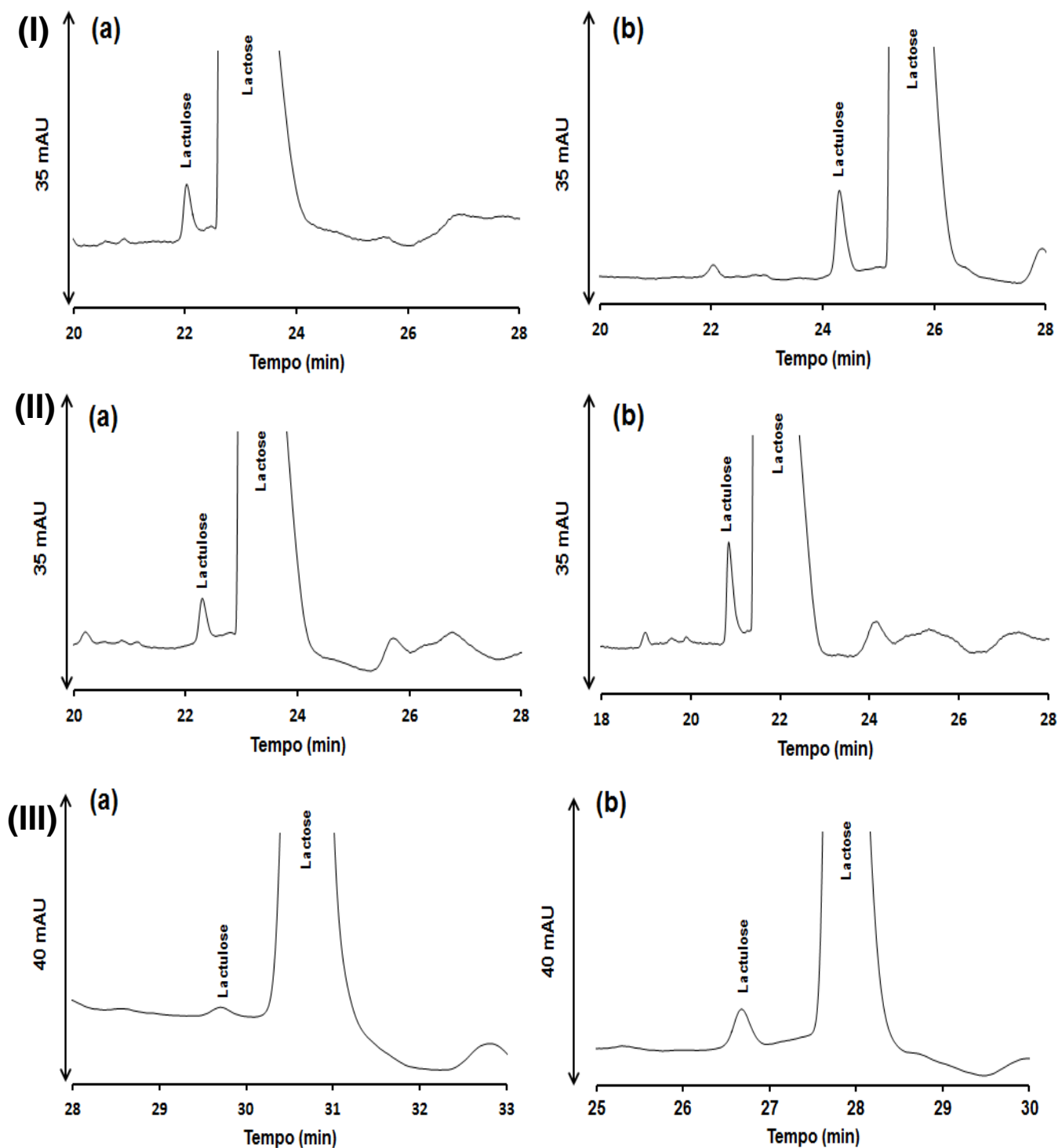
Os eletroferogramas de todas as amostras avaliadas estão dispostos nas Figura 17 a Figura 23.

Figura 17. Eletroferogramas (I) amostra 01, (II) amostra 02 e (III) amostra 03. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.



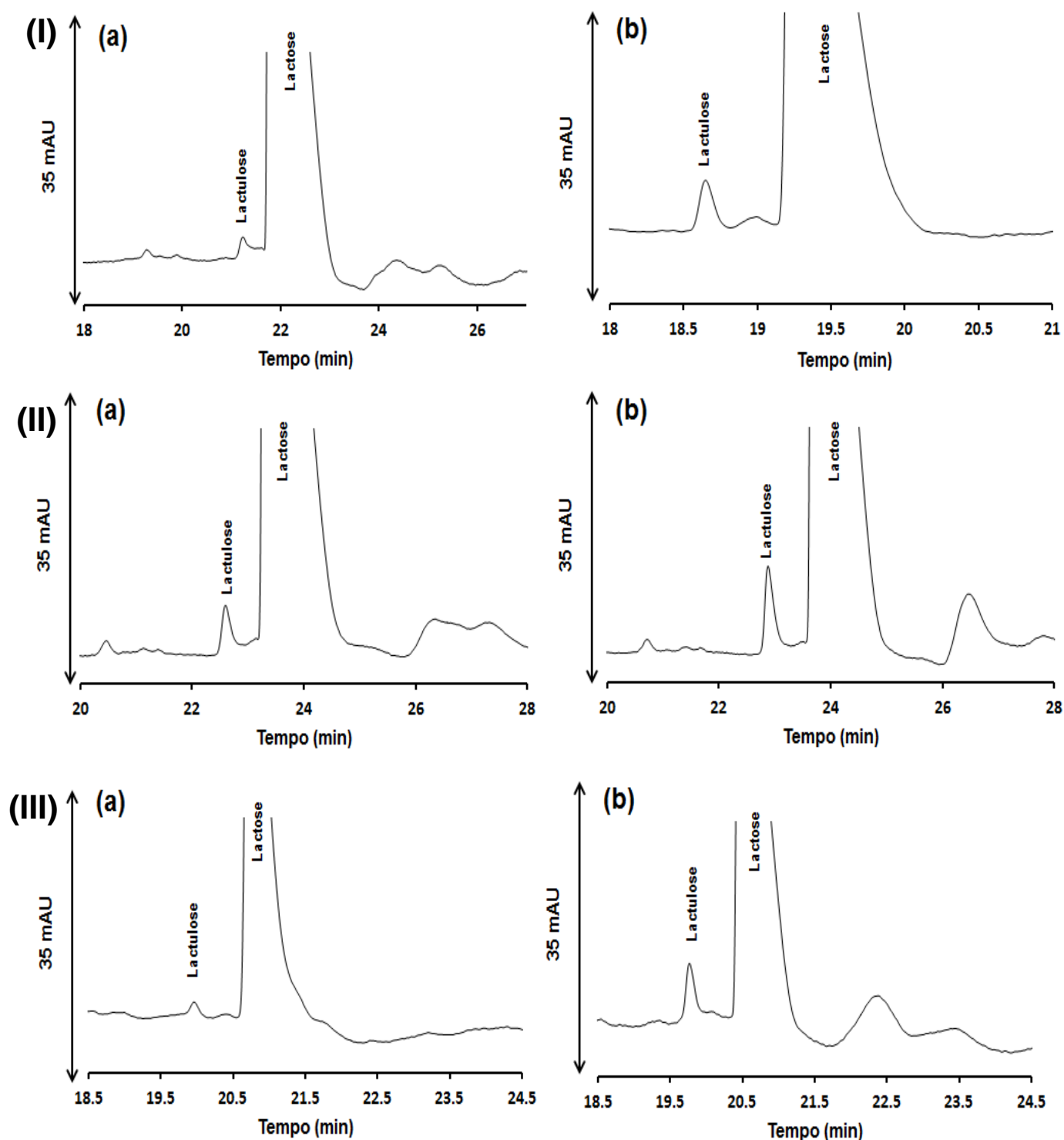
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18. Eletroferogramas (I) amostra 04, (II) amostra 05 e (III) amostra 06. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.



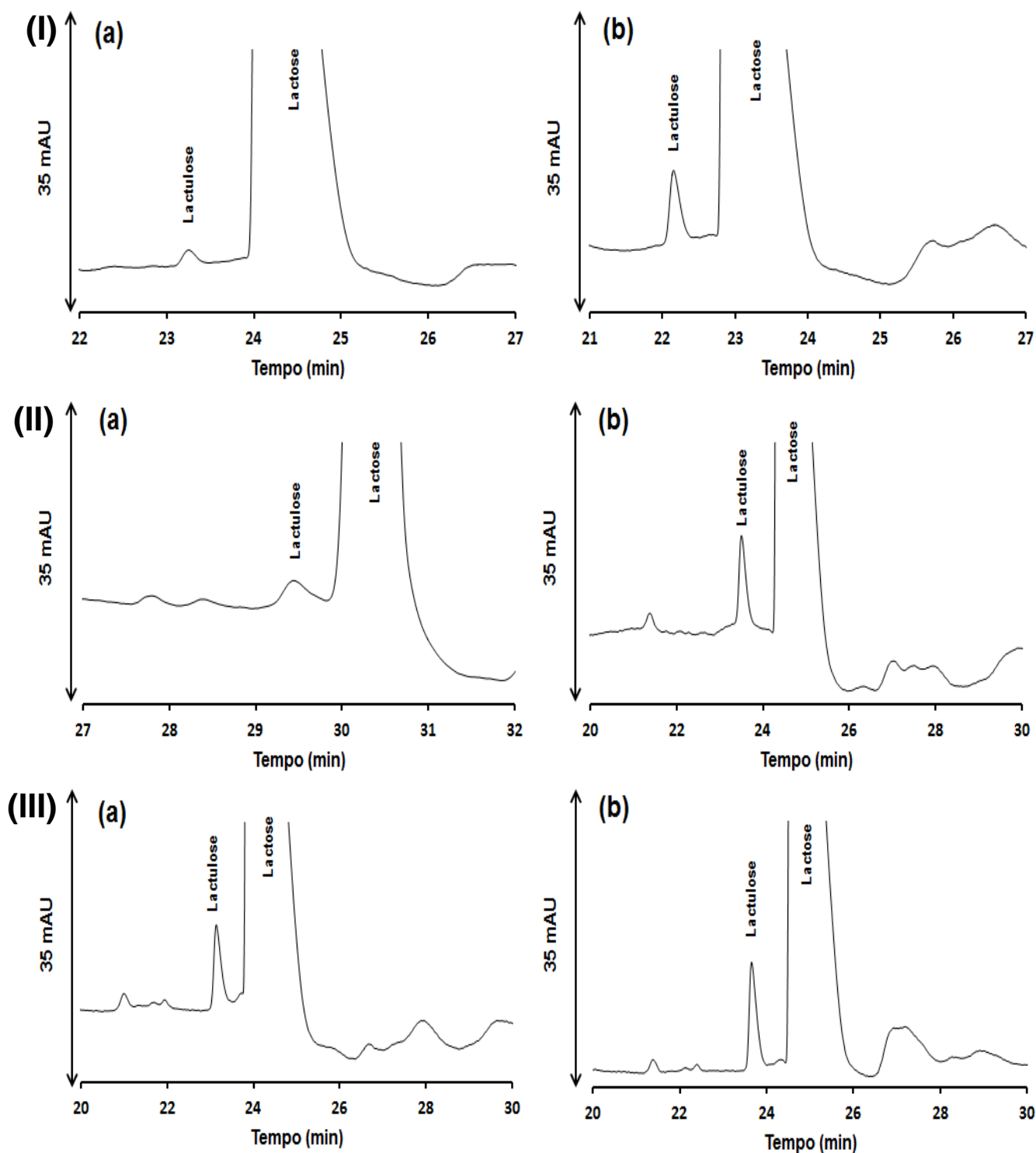
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 19. Eletroferogramas (I) amostra 07, (II) amostra 08 e (III) amostra 09. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.



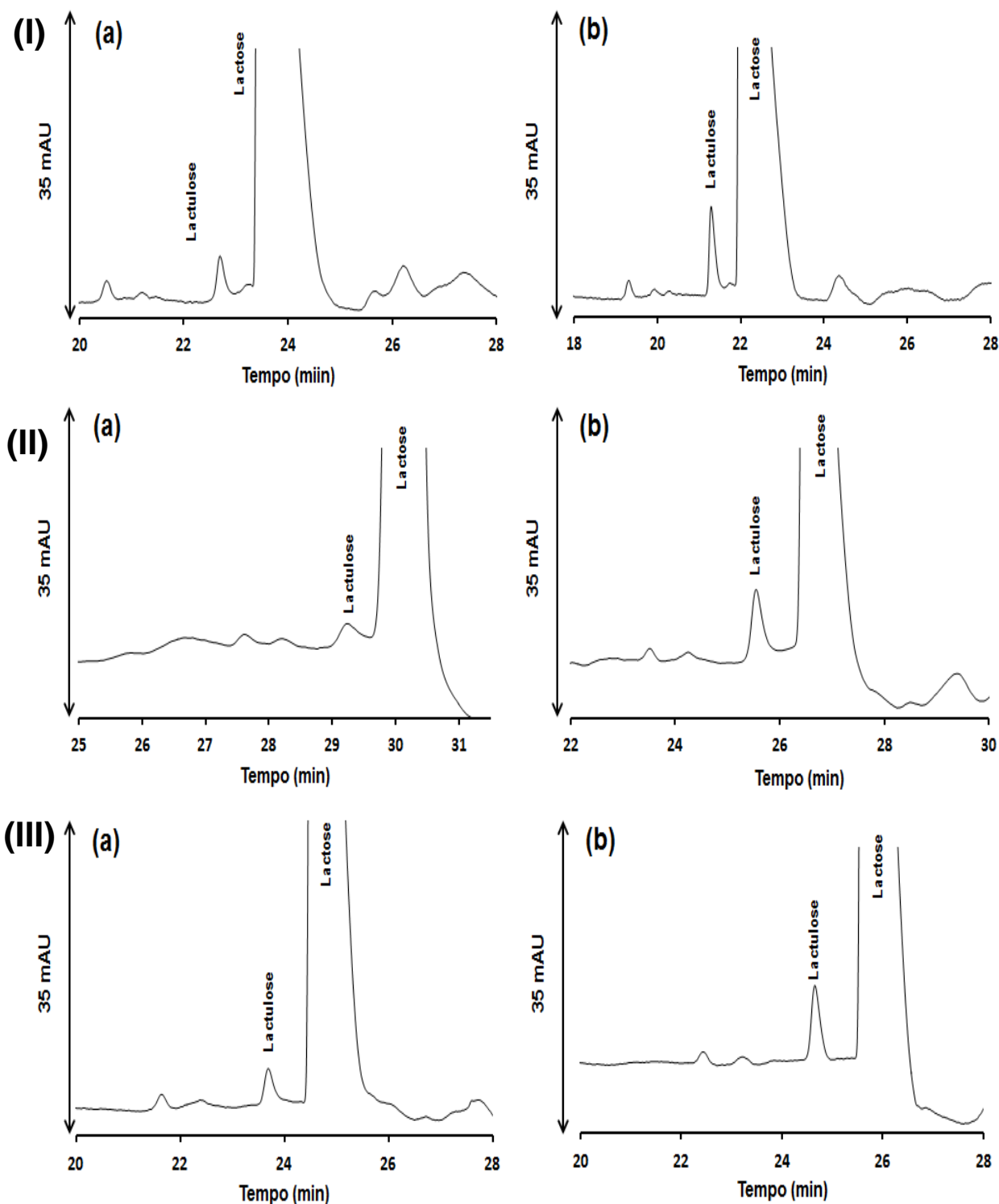
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 20. Eletroferogramas (I) amostra 10, (II) amostra 11 e (III) amostra 12. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.



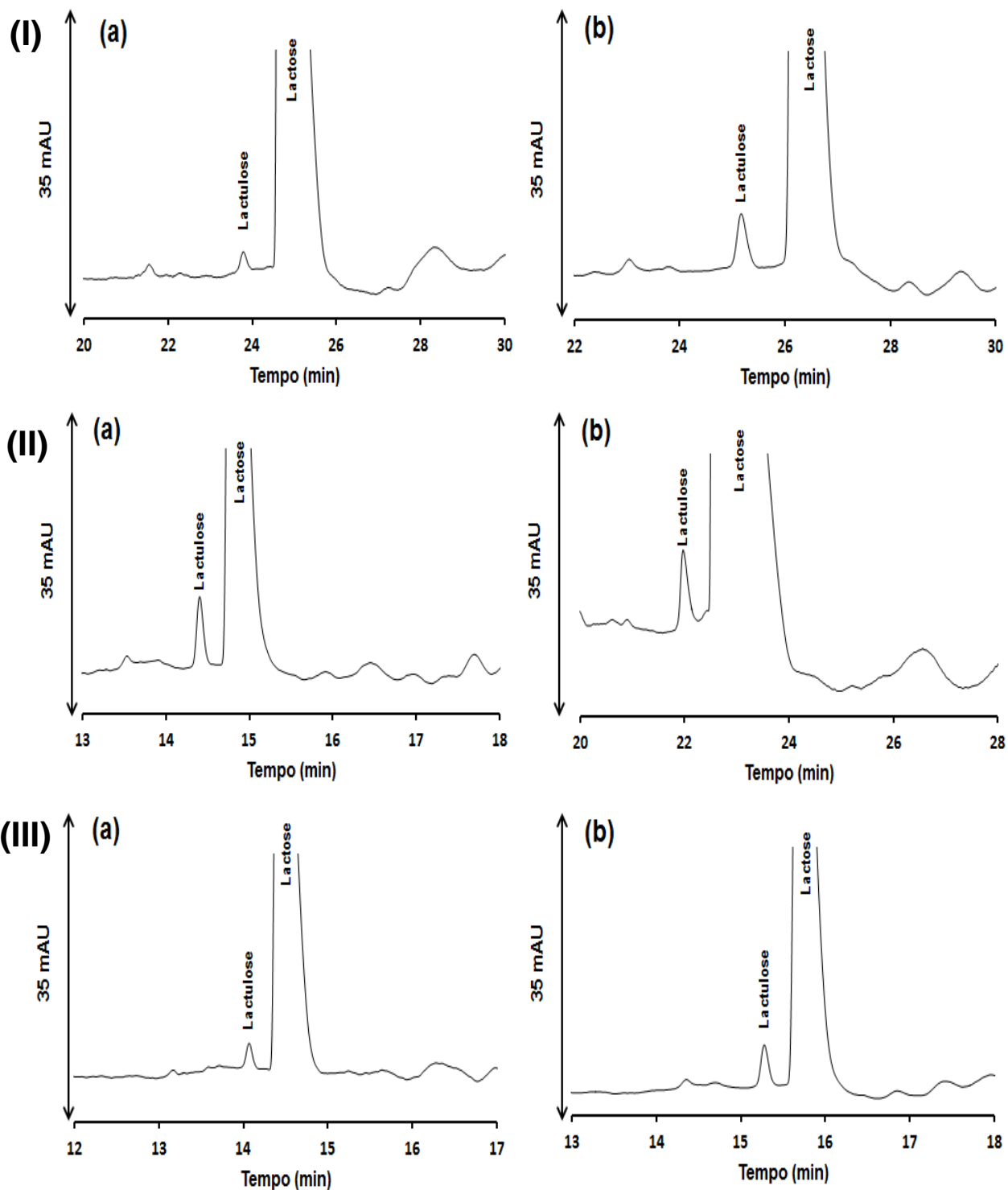
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 21. Eletroferogramas (I) amostra 13, (II) amostra 14 e (III) amostra 15. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.



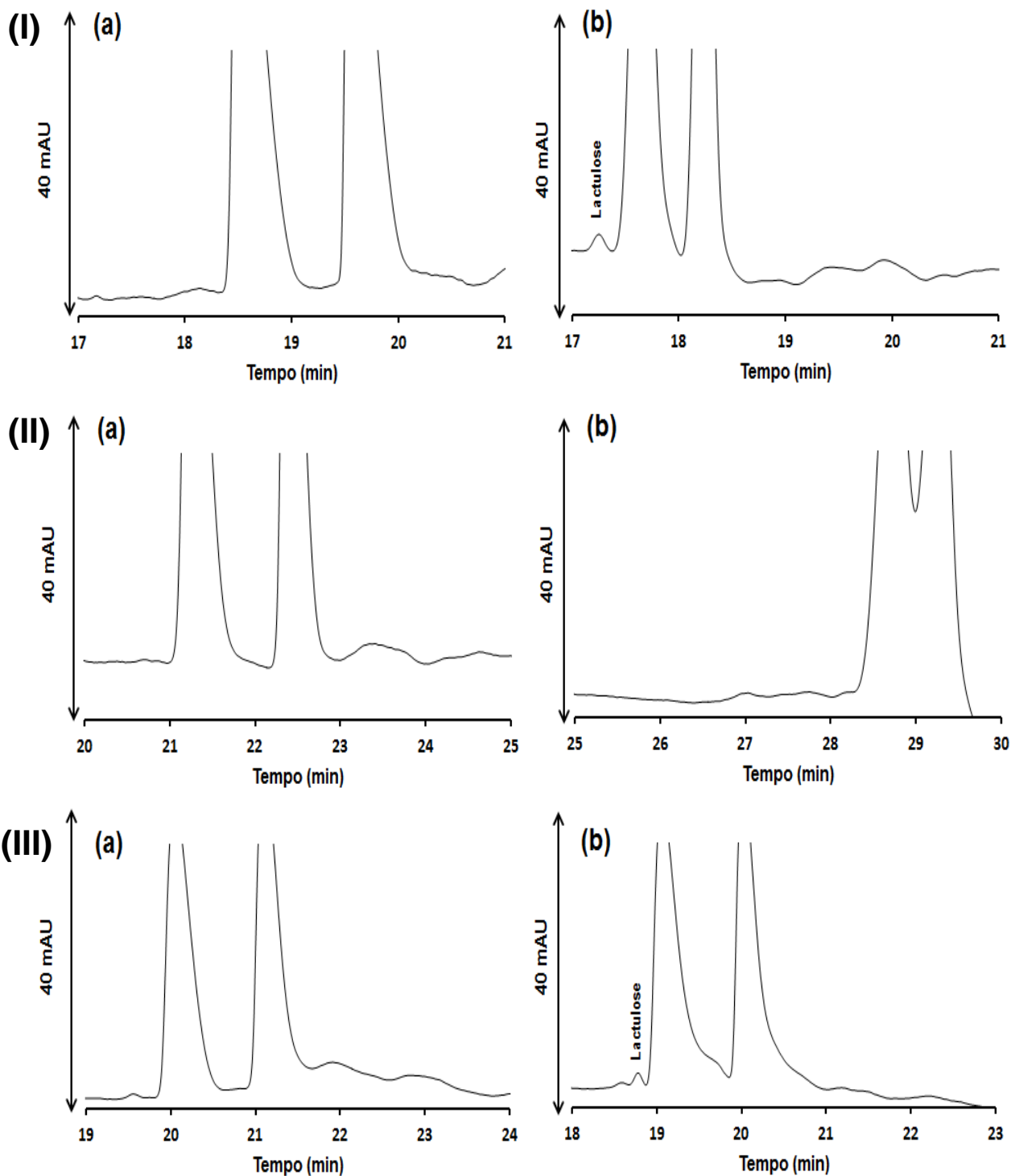
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 22. Eletroferogramas (I) amostra 16, (II) amostra 17 e (III) amostra 18. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 23. Eletroferogramas (I) amostra 19, (II) amostra 20 e (III) amostra 21. Onde: (a) sem incremento e, (b) com incremento de padrão de lactulose. Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 µm de D.I. e 375 µm de D.E.



Fonte: elaborado pelo autor.

Verifica-se que apenas as amostras com teor regular de lactose apresentaram sinal analítico e, conseqüentemente foram quantificadas. A Tabela 27 descreve a média do teor de lactulose destas 36 amostras, de 18 marcas comerciais de leite UHT avaliadas por CZE.

Tabela 27. Análise estatística descritiva do teor de lactulose nas amostras de leite UHT em estudo, por CZE.

Parâmetro	CZE	
	Regular (N=36)	Delactosado (N=6)
Média (mg.L ⁻¹)	(369,36 ± 234,24)	nd
Amplitude (mg.L ⁻¹)	1185,96	nd
DPR	63,4	-----

nd: não detectado. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

Apenas as amostras com teor regular de lactose (amostras 01 a 18) obtiveram seus teores de lactulose quantificados, as amostras 19 a 21 não apresentaram sinal analítico, provavelmente por apresentarem teores de lactulose abaixo do limite de detecção do método (< 29,88 mg.L⁻¹). Mendoza *et al.* (2005) determinaram o teor de lactulose por cromatografia gasosa em leite de cabra com teor regular e reduzido de lactose, ambos submetidos ao tratamento UHT, observando-se um valor médio de lactulose de 325 mg.L⁻¹ para o produto com teor regular de lactose, sendo o teor de lactulose não detectado para as amostras com lactose hidrolisada.

Pereda *et al.* (2009) encontraram valores para concentração de lactulose em amostras comerciais de 438 mg.L⁻¹ para leite UHT. Feinberg (2006) determinou o teor de lactulose em leite UHT submetido aos processamentos direto e indireto, os quais apresentaram valores de (144,0 ± 48,6) mg.L⁻¹ e (400,0 ± 134,4) mg.L⁻¹, respectivamente. E Morales *et al.* (2000) verificaram

concentrações de lactulose de (120 ± 10) mg.L⁻¹ e $(250 \pm 15$ a $456 \pm 21)$ mg.L⁻¹ para leite UHT direto e indireto, respectivamente.

A média do teor de lactulose expressa pelas 18 marcas do grupo “regular” se assemelha com os dados reportados pela literatura para leites submetidos ao processamento UHT indireto. No entanto, os elevados valores de amplitude, desvio-padrão e DPR apontam possíveis variações no tipo de processamento (direto e indireto) e no binômio tempo/temperatura usado entre as marcas avaliadas.

A análise de variância mostrou efeito estatisticamente significativo entre as marcas quantificadas ($p < 0,0001$). A ANOVA foi realizada considerando a população total de 36 amostras, a fim de se tentar verificar o grau de homogeneidade do produto atualmente comercializado quanto ao teor de lactulose, visto que o foco do trabalho é a avaliação do efeito de marca sobre os indicadores aqui abordados. Deste modo foi realizada a análise de comparação de médias pelo teste Tukey, cujo resultado apresenta destacado na Tabela 28.

Tabela 28. Teor médio de lactulose nas amostras de leite UHT com teor regular de lactose em estudo, obtido por CZE.

Amostra	Lactulose (mg.L⁻¹)	
12	1119,95	a
04	493,59	b
08	486,39	b
14	434,60	b
13	433,34	b
11	423,50	b
05	418,62	b
10	408,00	b
17	373,92	b
15	337,27	b
18	327,54	b
16	303,42	b
06	218,88	b
03	212,89	b

Continua...

07	208,56	b
09	183,74	b
02	153,99	b
01	110,21	b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste Tukey, a 5% probabilidade. *Fonte:* Elaborado pelo autor.

O teste de comparação de médias demonstrou que apenas uma amostra (amostra 12) diferiu das demais quantificadas, sendo que estas não diferiram estatisticamente entre si.

A amostra 12, apresentou o maior teor de lactulose ($1119,95 \text{ mg.L}^{-1}$), 1,86 vezes (86%) acima do limite máximo sugerido pela IDF (600 mg.L^{-1}) para leite UHT, permitindo supor a ocorrência de não-conformidades durante o processamento da mesma.

7. Correlação entre os métodos analíticos desenvolvidos

A título de verificação da existência de correlação entre os métodos analíticos propostos, a normalidade dos resíduos foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk o qual indicou um comportamento normal ($p=0,60$) dos dados. A homocedasticidade entre os métodos também foi averiguada utilizando o teste de Cochran (mesmo número de réplicas no nível), obtendo-se um p-valor de 0,17 evidenciando a ocorrência de comportamento homocedástico. Os resíduos não apresentaram dispersão tendenciosa, indicando a independência dos mesmos. Por fim, com todos os pressupostos testados, realizou-se o teste-t pareado bi-caudal, sendo os resultados expressos na Tabela 29.

Tabela 29. Análise de correlação entre os métodos HPLC e CZE propostos.

Parâmetro	Resultado
Correlação de Pearson	0,94
p (bi-caudal)	0,34
t crítico bi-caudal	2,10

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados indicam que os resultados obtidos por ambos os métodos não diferem entre si a um nível de 5% de probabilidade e apresentam uma correlação de 94%. Portanto, ambos os métodos podem ser utilizados para determinação de lactulose em leite UHT e conseqüentemente para o controle do processamento.

8. Conclusão

O método de extração constituído por uma etapa prévia de concentração por liofilização, seguida de precipitação orgânica e clarificação de amostra, foi o procedimento que ofereceu os melhores resultados para ambos os métodos de separação propostos (HLPC e CZE).

Os métodos de separação (HPLC e CZE) desenvolvidos mostraram-se equivalentes para determinação de lactulose em leite UHT, podendo ser utilizados de acordo com a disponibilidade de recursos.

O teor de lactulose apresentou um comportamento discriminatório tanto para possíveis variações no processamento UHT adotado e conseqüente efeito de marca quanto para o efeito comparativo entre amostras com teor regular e com teor reduzido de lactose. Dentre as marcas comerciais com teor regular de lactose em estudo, 94% das amostras apresentaram resultados de lactulose abaixo do limite máximo de 600 mg.L^{-1} recomendado pela Federação Internacional de Lácteos. Contudo, os elevados valores de amplitude e desvio-padrão relativo encontrados para ambos os métodos analíticos propostos sugere falta de uniformidade de processamento industrial; fato este evidenciado pela distinção das marcas comerciais encontrada no método por HPLC.

AVALIAÇÃO DOS INDICADORES WPNI, HMF E LACTULOSE PARA CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE LEITE UHT EM ESTUDO

1. Avaliação do comportamento dos indicadores nas amostras comerciais selecionadas

Os indicadores de tratamento térmico abordados neste estudo permitem inferir sobre os danos ocasionados pelo aquecimento por meio do estudo das modificações químicas de diferentes constituintes do leite; possibilitando verificar, em vertentes distintas, os efeitos do aquecimento sobre o produto.

De acordo com Marconi *et al.* (2004) há a necessidade de se utilizar ao menos dois indicadores de tratamento térmico para diferenciar, com maior acurácia, os vários tipos de tratamentos térmicos utilizados e seus efeitos associados.

A variação no índice de WPNI entre as marcas selecionadas sugere falta de padronização do tratamento térmico adotado pelas indústrias processadoras das marcas analisadas, ainda que 76% das amostras sejam classificados como “médio tratamento térmico”. A incidência de despadronização do processo torna-se um fator desfavorável para indústria uma vez que a falta de uniformidade do tratamento térmico aplicado ao leite pode desencadear inúmeros problemas no produto final como modificações no sabor e na coloração do produto, além da ocorrência de sedimentação ao longo do período de estocagem e comercialização. De acordo com Silva (2004) a sedimentação pode ser entendida como um efeito da perda progressiva de estabilidade protéica no leite submetido ao calor. Este mesmo autor verificou experimentalmente o efeito acumulativo das diversas etapas de aquecimento

ao longo do processamento, além de variações nos parâmetros como fluxo do produto no equipamento ou eventual recirculação, as quais tendem a interferir no nível de desnaturação protéica. Portanto, o teor de WPNI torna-se uma ferramenta que pode ser facilmente adotada pela indústria como um atributo de controle capaz de estimar a severidade do tratamento térmico utilizado, oferecendo informações relevantes quanto à estabilidade do produto a ser comercializado.

Os índices de HMF livre e total mostraram-se capazes de discriminar amostras com teor regular e com teor reduzido de lactose, visto que a disponibilidade e reatividade do açúcar redutor no produto interferem significativamente no quanto a reação de formação de HMF pode prosseguir. Apenas o índice de HMF livre possibilitou a diferenciação entre marcas sem hidrólise da lactose, demonstrando a existência de falta de uniformidade entre os processamentos térmicos adotados para as marcas selecionadas. Verifica-se desta forma que o índice de HMF livre é influenciado tanto pela severidade do tratamento térmico utilizado quanto pela reatividade do açúcar redutor envolvido na RM.

Esta mesma discriminação entre marcas não foi evidenciada para o teor de HMF total, o qual infere sobre a extensão da reação; sendo capaz, no entanto, de detectar variações entre amostras submetidas ou não ao processo de hidrólise da lactose. Neste caso, amostras com teor reduzido de lactose tenderão a apresentar maiores índices de HMF total uma vez que o açúcar majoritário envolvido na RM é a glicose (monossacarídeo mais reativo que a lactose). Portanto, o uso do índice de HMF livre como ferramenta para verificar a ocorrência de despadronização de processo, torna-se mais indicado;

enquanto a determinação do índice de HMF total pode ser uma ferramenta analítica para distinção entre amostras que foram submetidas ao processo de hidrólise antes do processamento térmico e amostras com teor regular de lactose.

Quanto ao teor de lactulose determinado, de acordo com Andrews (1989), o processo de isomerização depende do teor de lactose disponível, corroborando com o comportamento das amostras do grupo “delactosado”, as quais apresentaram-se abaixo do limite de detecção dos métodos propostos. Este comportamento demonstra a possibilidade de utilização da determinação do teor de lactulose no produto final para confirmação e controle do processo de hidrólise pré-tratamento térmico.

Por exibir um comportamento linear com o aquecimento, a lactulose tem se mostrado um ótimo indicador de tratamento térmico frente aos demais compostos gerados, ou modificados durante o processamento térmico, como HMF e furosina. De acordo com Claeys *et al.* (2001), os indicadores HMF e furosina tendem a manter uma cinética de reação significativa pós-processamento térmico, visto suas energias de ativação relativamente baixas quando comparadas à energia de ativação da lactulose; gerando informações não exclusivamente dos danos causados pelo tratamento térmico, mas também sobre as condições de estocagem e armazenamento.

A lactulose tende a oferecer informações específicas quanto à severidade do tratamento térmico adotado, podendo apresentar resultados com um nível de credibilidade maior uma vez que sua formação está exclusivamente relacionada ao aquecimento do produto (CLAEYS *et al.*, 2001; MENDOZA *et al.*, 2005).

Todos os indicadores foram capazes de identificar a existência de falta de uniformidade do processamento UHT adotado pelas indústrias nacionais processadoras de leite UHT, indicando uma real demanda para implantação de métodos de controle capazes de avaliar o processo e oferecer suporte para desenvolvimento e estudo do processamento, de forma a reduzir os danos causados ao produto, custos e eventuais problemas associados à despadronização e descontrole do processo.

2. Uso de indicadores como ferramenta para avaliação do processamento térmico e identificação de não-conformidades

A amostra 12 destacou-se das demais amostras com teor regular de lactose, exibindo as maiores médias para todos os indicadores avaliados no presente estudo. Neste sentido, verificou-se a necessidade de destacá-la visto que este comportamento sugere a ocorrência de alguma não-conformidade durante seu processamento.

Os índices de HMF exibidos pela referida amostra foram $7,26 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $19,90 \mu\text{mol.L}^{-1}$, para HMF livre e total, respectivamente; apresentando-se acima dos limites reportados por Silva (2004) sendo o índice de HMF livre normalmente variando de $(1,0 \text{ a } 4,2) \mu\text{mol.L}^{-1}$ e HMF total de $(10,47 \text{ a } 14,30) \mu\text{mol.L}^{-1}$. Este mesmo autor verificou índices de HMF livre e total de $(6,50 \text{ e } 20,60) \mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente, para leite proveniente de recirculação durante processamento UHT, apresentando-se 2,4 e 1,6 vezes maiores em comparação com amostras de leite sem recirculação. Os valores exibidos pela amostra 12 apresentam-se de acordo com esta abordagem, permitindo suspeitar *a priori* da ocorrência de recirculação durante o processamento desta amostra.

Quanto ao teor de lactulose, o comportamento foi similar para os dois métodos analíticos propostos, exibindo as maiores médias, com valores de 992,76 mg.L⁻¹ e 1119,95 mg.L⁻¹ para a determinação por HPLC e CZE, respectivamente. Desta forma, observa-se que a amostra apresenta teor de lactulose próximo a produtos esterilizados reportados pela literatura (834 ± 218,1) mg.L⁻¹ (FEINBERG *et al.*, 2006); (1121 ± 56) mg.L⁻¹ (MORALES *et al.*, 2000) e 886 mg.L⁻¹ (PEREDA *et al.*, 2009). Por se tratar de processamento UHT a estimativa de possíveis falhas de processamento torna-se pertinente, culminando na mesma hipótese gerada quanto à análise do índice de HMF: a ocorrência de recirculação do produto na linha de processamento.

A recirculação é um recurso usado em unidades de processamento UHT, ainda que absolutamente contraindicada e prejudicial ao produto, aos equipamentos e ao desenvolvimento da planta. Paradas não programadas do processamento para limpeza no sistema de envase e para ajustes e manutenção corretiva, quando acontecem, geram recirculação do produto ao longo de toda linha de processamento. A existência de tanque asséptico instalado entre as etapas de resfriamento e envase asséptico evita a recirculação do produto, sendo um recurso tecnológico útil a fim de se evitar intensificação dos danos causados pelo calor, embora não evite a recirculação.

Silva (2004) abordou o efeito da recirculação em leite UHT desnatado verificando o desenvolvimento de coloração amarronzada, caracterizada pela elevada formação de compostos formados por escurecimento não-enzimático além do aumento da taxa de sedimentação comparando com amostras provenientes de processamento sem recirculação.

A comparação e coerência nos resultados obtidos para os indicadores abordados no presente estudo foram capazes de identificar a ocorrência de um fenômeno tecnológico de grande importância tanto para o público consumidor quanto para a indústria.

Para o consumidor, a excessiva exposição do produto ao calor, como ocorrente durante o evento de recirculação, gera perdas do valor nutricional devido ao bloqueio de resíduos de lisina, formação de compostos tóxicos precursores dos AGE no organismo humano, e redução da digestibilidade do produto e da biodisponibilidade de minerais (FRIEDMAN, 1996; PEREDA *et al.*, 2009; BASTOS *et al.*, 2012). No âmbito industrial, a perda de estabilidade se manifesta na redução da vida de prateleira (*shelf-life*), ocorrência de *recall*, com a retirada do produto do mercado devido à incidência de sedimentação, havendo a consequente redução dos lucros e aumento dos gastos (SILVA, 2004). Todos estes fatores confirmam a importância do uso dos indicadores de tratamento térmico como ferramenta de controle de processo.

3. Avaliação dos métodos utilizados para determinação dos indicadores em estudo

Os métodos espectrofotométricos para determinação do índice de WPNI e HMF apresentaram resultados que possibilitam verificar a despadronização do processo e ocorrência de problemas no processamento, com consequente estimativa de possíveis defeitos associados no produto final. Apesar de métodos espectrofotométricos não apresentarem alta especificidade e seletividade para determinação e quantificação dos analitos, são métodos de fácil execução e baixo custo de análise sendo ferramentas importantes para avaliação do processamento o qual submete-se o produto. Além disso, o

estudo e ajuste do modelo de regressão proposto para ambos os métodos aplicados às amostras comerciais de leite UHT permitiu assegurar a capacidade dos modelos propostos em responder à matriz estudada oferecendo respostas confiáveis.

Para os métodos de separação propostos (HPLC-RI e CZE-UV indireto) verificou-se que ambos foram capazes de quantificar o teor de lactulose nas amostras comerciais de leite UHT. A validação dos métodos demonstrou total aplicabilidade dos mesmos para matriz láctea. Além disso, os métodos analíticos de separação possibilitaram inferir sobre a padronização do processamento UHT, demonstrando falta de uniformidade do produto comercializado no mercado nacional. Verifica-se, portanto, que estes métodos analíticos tendem a prever e controlar a incidência de problemas ou defeitos no produto final.

O uso de métodos analíticos capazes de oferecer resultados rápidos e precisos tem despertado o interesse da indústria a qual busca incessantemente por padronização de processo, manutenção e controle acurado da qualidade do produto e redução de custos. Neste sentido, os métodos analíticos de separação podem ser utilizados para controle no desenvolvimento de novos produtos, testes desenvolvidos em planta piloto para modificação ou adequação das variáveis de processamento térmico visando redução de custos e melhoria das características nutricionais, sensoriais e funcionais do produto; ou em atividades rotinas para controle de processamento.

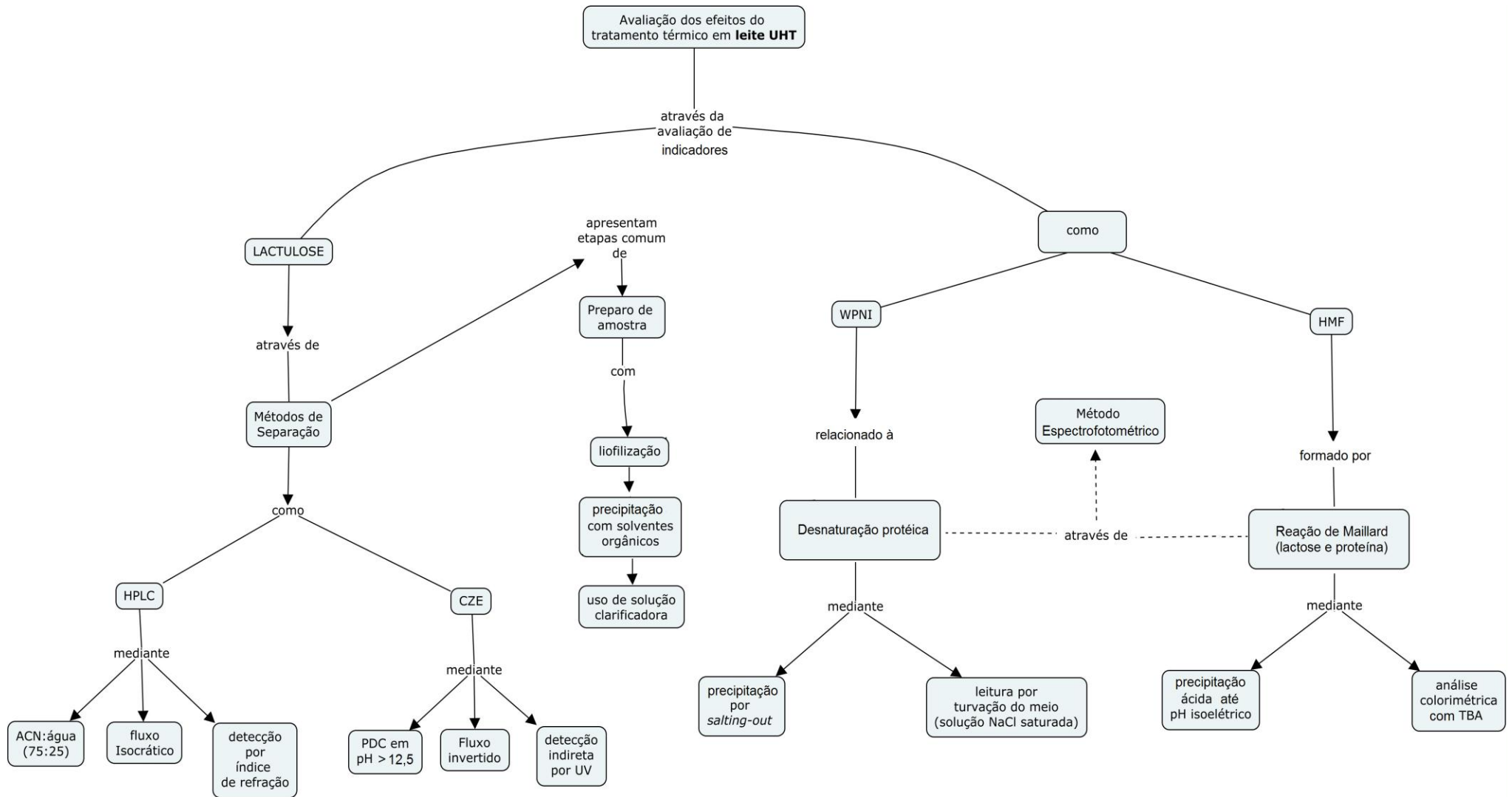
Em contrapartida, os métodos espectrofotométricos ganham maior espaço em atividades de controle de rotina por serem discriminatórios e apresentarem baixo custo de análise.

4. Elaboração de mapa conceitual para avaliação de indicadores de tratamento em leite UHT

Mapas conceituais são representações gráficas semelhantes a diagramas, que indicam relações entre conceitos ligados por palavras. Consentem uma visão geral do processo permitindo visualizar e avaliar de forma mais clara e objetiva as possibilidades disponíveis. Podem se tornar uma ferramenta bastante útil no âmbito industrial para tomada de decisões e difusão do conhecimento de forma simples e completa.

A Figura 24 abaixo mostra o mapa conceitual que representa as principais etapas e métodos que podem ser utilizados para avaliação dos efeitos do tratamento térmico em leite UHT via indicadores de tratamento térmico.

Figura 24. Mapa conceitual para determinação de indicadores de tratamento térmico em leite UHT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O mapa conceitual elaborado permite verificar com clareza as possibilidades analíticas para determinação de indicadores de tratamento térmico e suas peculiaridades como características intrínsecas de cada método bem como o nutriente diretamente associado a cada indicador.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os indicadores se mostraram eficazes para o controle analítico do processamento UHT, apresentando potencial para serem usados na distinção entre processos, entre equipamentos e entre diferentes binômios tempo/temperatura aplicados.

A determinação da lactulose como ferramenta para avaliação e controle de severidade de tratamento térmico pode ainda vir a ser usada para acompanhamento do processo de hidrólise da lactose, oferecendo um ganho para a indústria a qual apresenta uma demanda atual de ambas as informações.

Estudos sobre a influência da adição de soro de leite (adulteração ou produção de bebidas lácteas) sob o teor de lactulose do produto final podem ser conduzidos a fim de se verificar possíveis interferentes no uso da lactulose como indicador de tratamento térmico, ainda que se considere a cinética de reação de isomerização como de ordem zero. O efeito da adição de sais estabilizadores (como os fosfatos) sobre a formação de lactulose requer ser avaliado.

Todos os indicadores estudados foram capazes de inferir sobre eventos de não-conformidade no processamento, possibilitando estimar a ocorrência de defeitos no produto final.

O uso de diferentes tipos de indicadores de tratamento térmico permitiu identificar a ocorrência de despadronização do processamento do leite UHT atualmente comercializado no mercado nacional, sugerindo a necessidade de um maior controle do processo pelas indústrias processadoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 356-364, 2007.

ALPERT, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, v. 499, p. 177-196, 1990.

AMERICAN DAIRY PRODUCTS ASSOCIATION. **Standards for grades of dry milks.** . Bulletin 916. New York: American Dairy Products Institute 2009.

ANDREWS, G. R. Lactulose in heated milks. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 238, p. 45-52, 1989.

AOAC. **Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.** Maryland, USA. 2002.

BASTOS, D. M.; MONARO, E.; SIGUEMOTO, E.; SÉFORA, M. Maillard reaction products in processed foods: pros and cons. . In: VALDEZ, B. (Ed.). **Food Industrial Processes – Methods and Equipment.** 1ª, v.1, 2012. cap. 15, p.281-300.

BRASIL. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT).** DIÁRIO OFICIAL [DA] REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL. Brasília: Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n.370, de 4 de setembro de 1997, 1997.

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 231-247, 2012.

CASTRO, R. J. C. **Determinação do perfil de ácidos graxos em *Brachiaria* spp. por eletroforese capilar.** 2011. 69 Dissertação Mestrado (Mestrado). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

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.

CLAEYS, W. L.; LUDI KHUYZE, L. R.; HENDRICKX, M. E. Formation kinetics of hydroxymethylfurfural, lactulose and furosine in milk heated under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 287-301, 2001.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry. **Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. n. 4, p. 993-1014, 1998.

ELLIOTT, A. J.; DATTA, N.; AMENU, B.; DEETH, H. C. Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 442-446, 2005.

ERBERSDOBLER, H. F. Impact of UHT-treatment on nutritional value of milk proteins. **Nutrition Newsletter, International Dairy Federation**, v. 143, n. 4, p. 4-8, 1995.

FEINBERG, M.; DUPONT, D.; EFSTATHIOU, T.; LOUÂPRE, V.; GUYONNET, J.-P. Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. **Food Chemistry**, v. 98, p. 188-194, 2006.

FERRER, E.; ALEGRÍA, A.; COURTOIS, G.; FARRÉ, R. 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, p. 599-606, 2000.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacturing and ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry. Volume3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. Third. Ireland: 2009.

FRIEDMAN, M. Food browning and its prevention: an overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 33, p. 631-653, 1996.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6ª Edição. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2005.

IDF. **Milk - Determination of lactulose content - Enzymatic method**. ISO 11285 IDF 175. Brussels: International Dairy Federation: 8 p. 2004.

_____. **Heat-treated milk – Determination of lactulose content-Method using high-performance liquid chromatography**. ISO 11868 IDF 147. Brussels: International Dairy Federation: 10 p. 2007.

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, 1959.

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. 1, p. 171-179, 2013.

KONDO, I.; OJIMA, T.; NAKAMURA, M.; HAYASAKA, S.; HOZAWA, A.; SAITOH, S.; OHNISHI, H.; AKASAKA, H.; HAYAKAWA, T.; MURAKAMI, Y.; OKUDA, N.; MIURA, K.; OKAYAMA, A.; UESHIMA, H. Consumption of dairy products and death from cardiovascular disease in the Japanese general population. **Journal of Epidemiology**, v. 23, n. 1, p. 47-54, 2013.

KUHN, R.; HOFSTETTER-KUHN, S. **Capillary electrophoresis: principles and practice**. . 1st Edition. Universidade de Michigan: Springer-Verlag, 1993. 375

KURAMOTO, S.; JENNESS, R.; COULTER, S. T.; CHOI, R. P. Standardization of the Harland-Ashworth test for whey protein nitrogen. **Scientific Journal Series of Minnesota Agricultural Experiment Station**, n. 3975, p. 28-38, 1958.

LABORATÓRIO DE GLICOCONJUGADOS. Esquema de extração - aula prática de Bioquímica. **Universidade Federal de Juiz de Fora**, 2014.

LAN, X. Y.; WANG, J. Q.; BU, D. P.; SHEN, J. S.; ZHENG, N.; SUN, P. Effects of heating temperatures and addition of reconstituted milk on the heat indicators in milk. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. C653-C658, 2010.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2010.

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

LOUIE, J. C. Y.; FLOOD, V. M.; HECTOR, D. J.; RANGAN, A. M.; GILL, T. P. Dairy consumption and overweight and obesity: a systematic review of prospective cohort studies. **Obesity Reviews**, v. 12, p. e582-e592, 2011.

MARCONI, E.; MESSIA, M. C.; AMINE, A.; MOSCONE, D.; VERNAZZA, F.; STOCCHI, F.; PALLESCHI, G. Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay. **Food Chemistry**, v. 84, p. 447-450, 2004.

MARTÍNEZ-CASTRO, I.; CALVO, M. M.; OLANO, A. Chromatographic Determination of Lactulose. **Chromatographia**, v. 23, n. 2, p. 132-136, 1987.

MCGREGOR, R. A.; POPPITT, S. D. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. **Nutrition and Metabolism**, v. 10, n. 46, p. 13p., 2013.

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, p. 2995-2999, 2005.

MILKPOINT. Mercado lácteo em fase de crescimento. 2014. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/mercado-lacteo-em-fase-de-crescimento-92079n.aspx>>. Acesso em: 06/02/2015.

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, p. 193-200, 2000.

MORTIER, L.; BRAEKMAN, A.; CARTUYVELS, D.; VAN RENTERGHEM, R.; DE BLOCK, J. Intrinsic indicators for monitoring heat damage of consumption milk. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment (BASE)**, v. 4, n. 4, p. 221-225, 2000.

OLANO, A.; CALVO, M. M.; CORZO, N. Changes in the carbohydrate fraction of milk during heating processes. **Food Chemistry**, v. 31, p. 259-265, 1989.

PATEL, H. A.; ANEMA, S. G.; HOLROYD, S. E.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium- and high-heat skim milk powders. **Lait**, v. 87, p. 251-268, 2007.

PEREDA, J.; FERRAGUT, V.; QUEVEDO, J. M.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A. J. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1974-1979, 2009.

PERRONE, I. T.; OLIVEIRA, L. N.; FARIA, L. M. G. C. Aspectos tecnológicos da produção do leite em pó instantâneo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 361, n. 63, p. 35-37, 2008.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

RICE, B. H.; QUANN, E. E.; MILLER, G. D. Meeting and exceeding dairy recommendation: effects of dairy consumption on nutrient intakes and risk of chronic disease. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 4, p. 209-223, 2013.

ROBINSON, R. K. **Modern Dairy Technology – Advances in Milk Processing**. New York: Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1986. 438

SANTOS-NETO, A. J. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 71-81, 2010.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição. Campinas**, v. 24, n. 6, p. 895-904, 2011.

SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 1ª Edição. Juiz de Fora: Templo, 2004. 124

SKOOG, A. D.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, A. T. Princípios de Análise Instrumental. In: (Ed.). 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2006a. p.641-653.

SKOOG, A. D.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, A. T. Princípios de Análise Instrumental. In: (Ed.). 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2006b. p.31.

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

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.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova, São Paulo**, v. 19, n. 2, p. 173-181, mar/abr 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova, São Paulo**, v. 20, n. 5, p. 493-511, set./out 1997.

THERMO SCIENTIFIC. **HILIC Separations Technical Guide**. 2014.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. **Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 403-414, 1998.

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

WATERS. **Waters 2414 Refractive Index Detector. Operator's Guide**. Milford, MA 01757: Waters Corporation. 2008.

ZHANG, Z.; YANG, R.; WANG, H.; YE, F.; ZHANG, S.; HUA, X. Determination of lactulose in foods: a review of recent research. **International Journal of Food Science and Technology**., v. 45, p. 1081-1087, 2010.

APÊNDICES

Apêndice 1: Cromatogramas obtidos no estudo da FM.

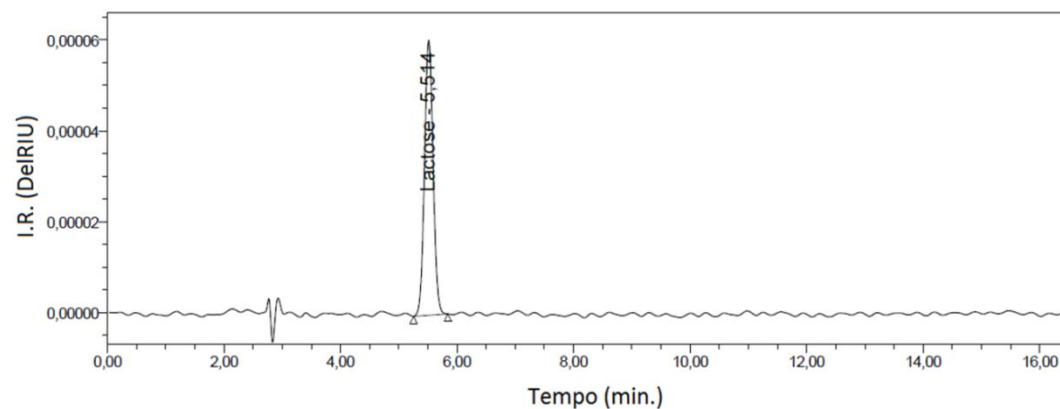
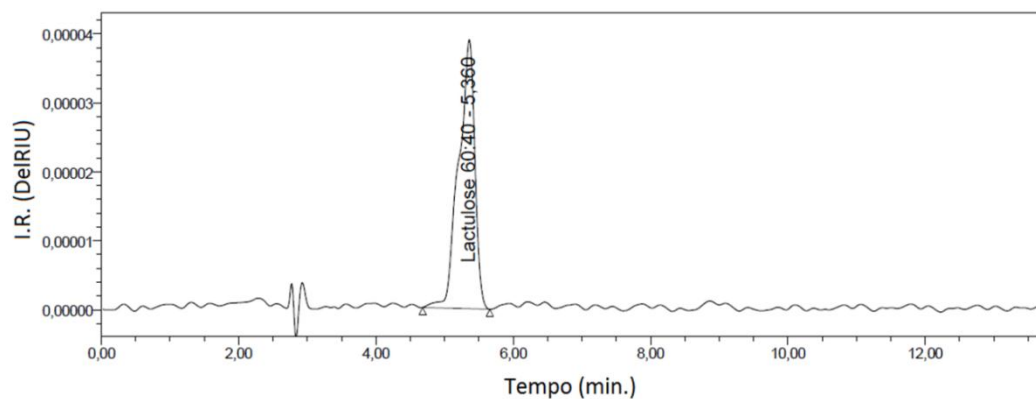


Figura 25. Cromatogramas para FM ACN-água (60:40) + 0,2%TEA para (a) padrão de lactulose $0,1 \text{ mg},\text{mL}^{-1}$ e, (b) padrão de lactose $0,1 \text{ mg},\text{mL}^{-1}$. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL},\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU.

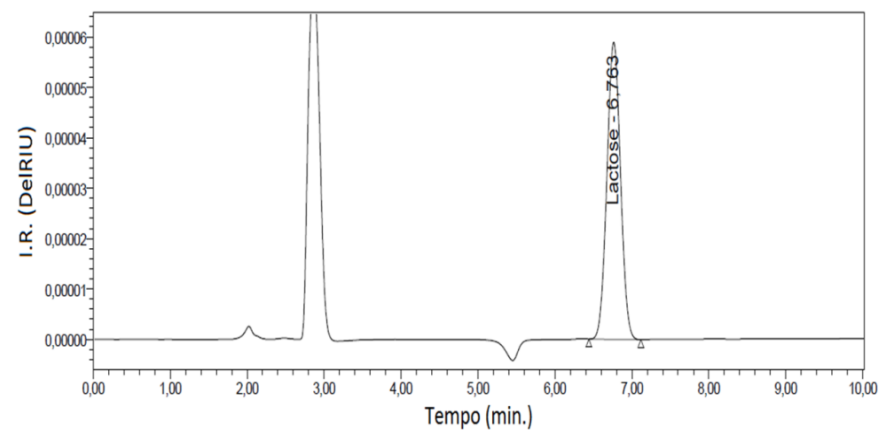
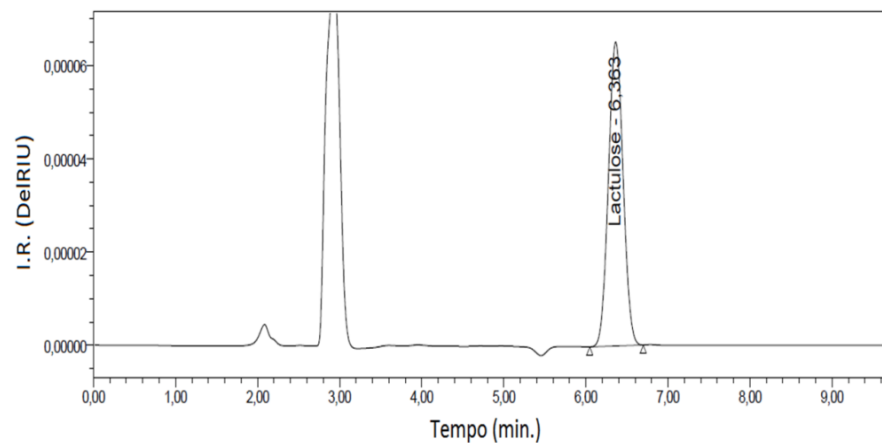


Figura 26. Cromatogramas para FM ACN-água (65:35) + 0,2%TEA para (a) padrão de lactulose $0,1 \text{ mg},\text{mL}^{-1}$ e, (b) padrão de lactose $0,1 \text{ mg},\text{mL}^{-1}$. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL},\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU.

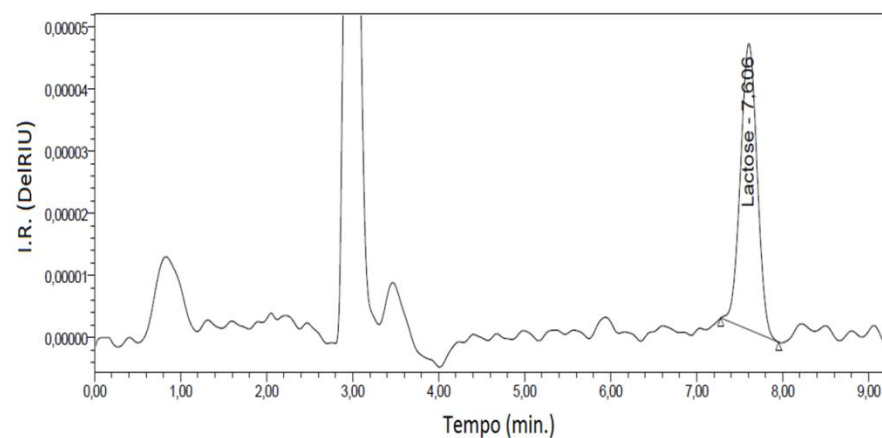
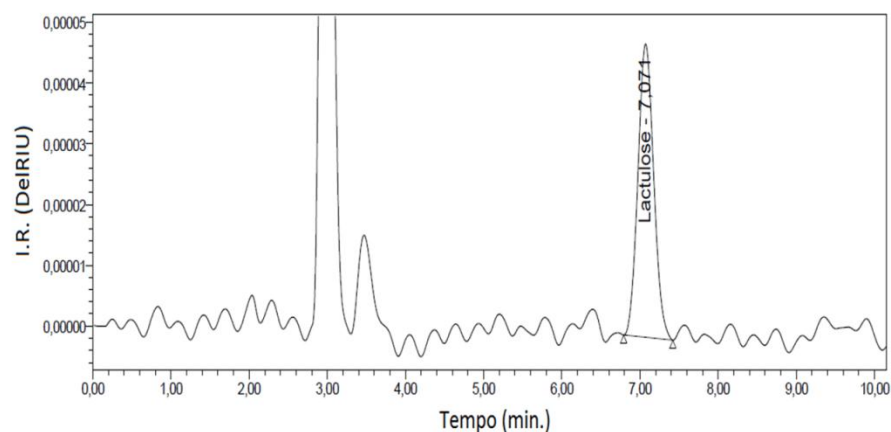


Figura 27. Cromatogramas para FM ACN-água (67:33) + 0,2%TEA para (a) padrão de lactulose $0,1 \text{ mg},\text{mL}^{-1}$ e, (b) padrão de lactose $0,1 \text{ mg},\text{mL}^{-1}$. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL},\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU.

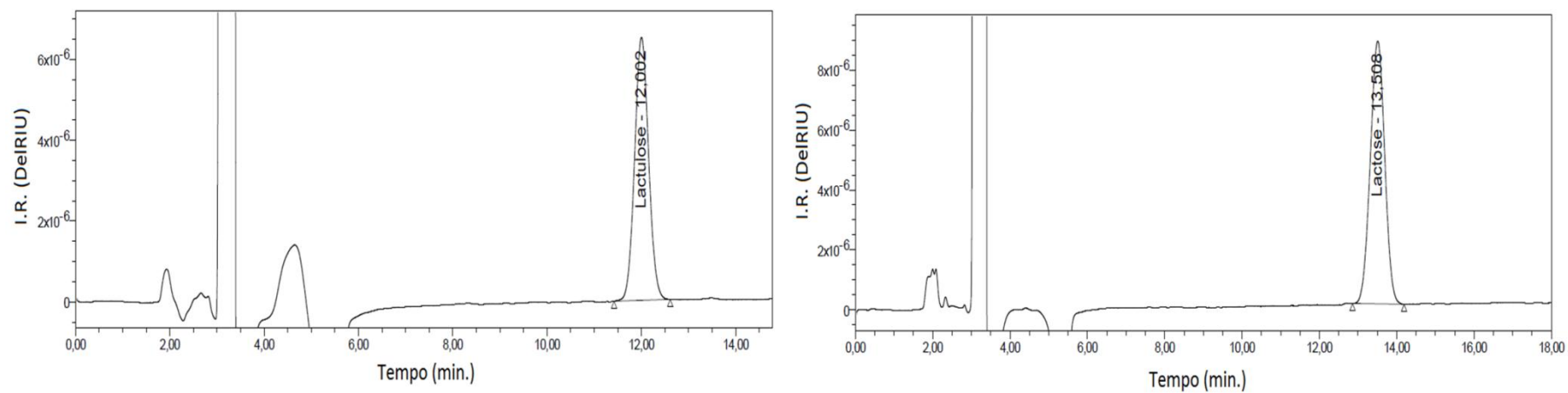


Figura 28. Cromatogramas para FM ACN-água (75:25) + 0,2%TEA para (a) padrão de lactulose $0,1 \text{ mg, mL}^{-1}$ e, (b) padrão de lactose $0,1 \text{ mg, mL}^{-1}$. Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL, min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU.

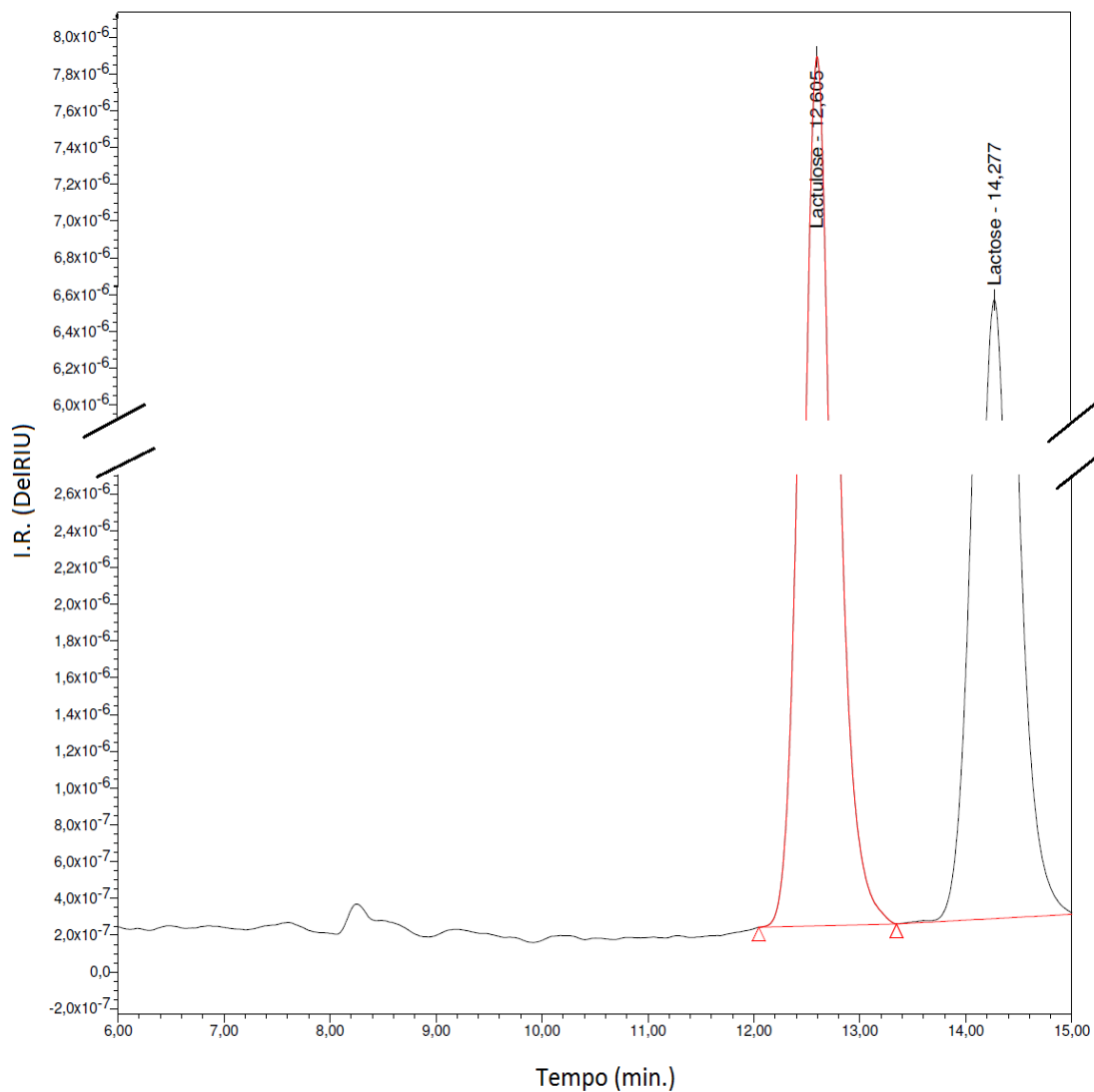
Apêndice 2: Cromatogramas obtidos no estudo do fluxo da FM.

Figura 29. Cromatograma de coinjeção de padrão de lactulose e lactose a $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeRIU, ACN-água (75:25)+0,2%TEA. $R_s = 1,76$

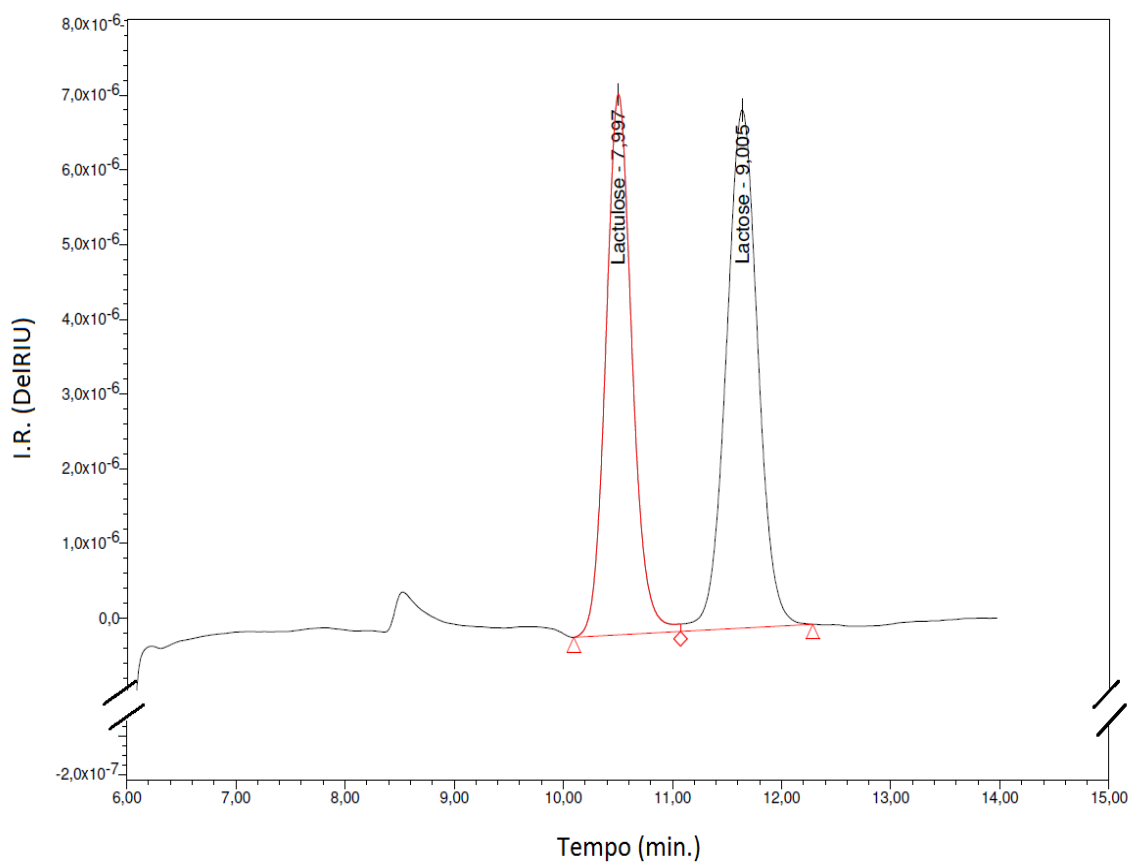


Figura 30. Cromatograma de coinjeção de padrão de lactulose e lactose a $0,1 \text{ mg, mL}^{-1}$ Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU , ACN-água (75:25)+0,2%TEA. $R_s = 1,74$.

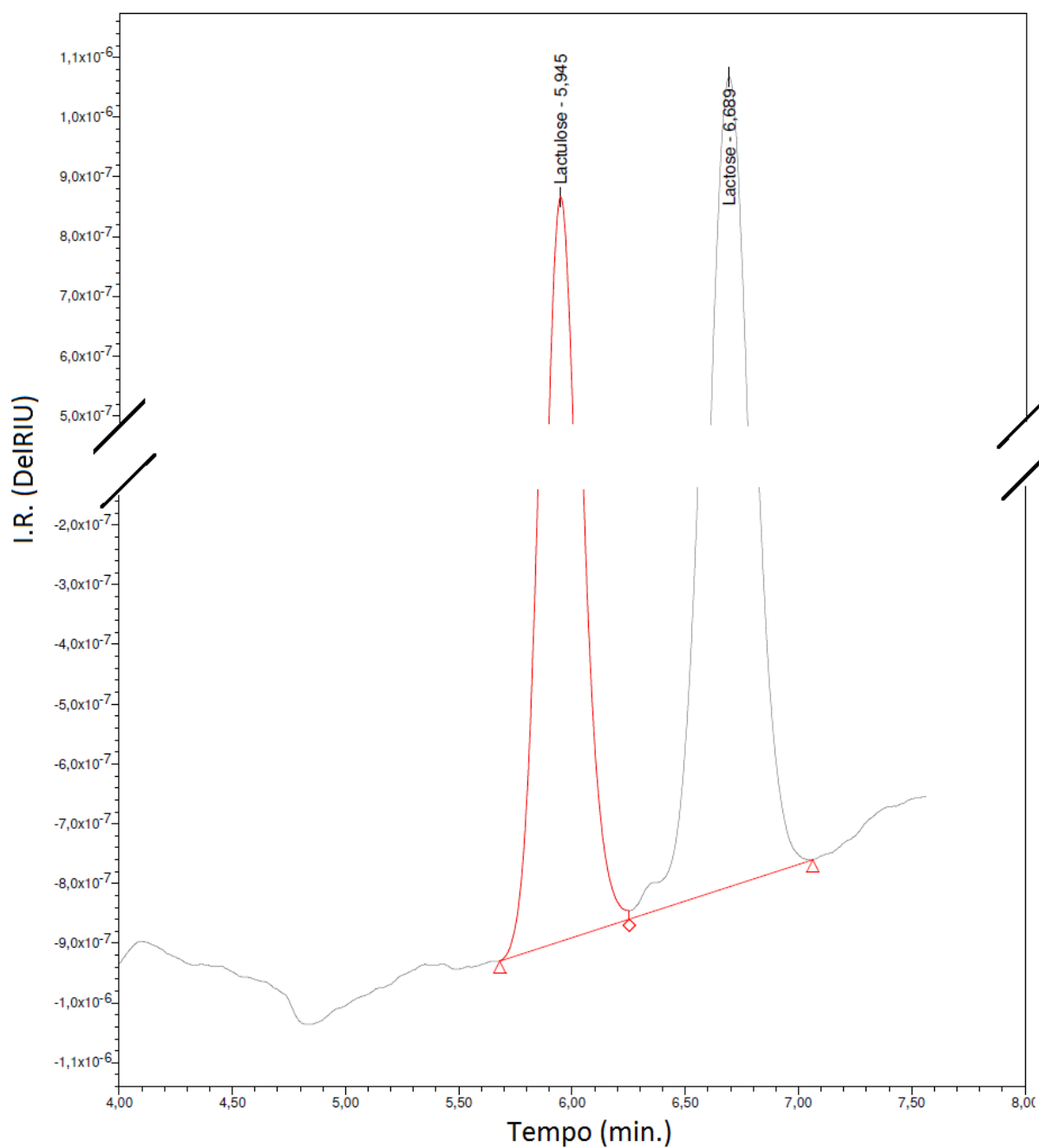


Figura 31. Cromatograma de coinjeção de padrão de lactulose e lactose a $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ Condições de injeção: fluxo isocrático de $2,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (75:25)+0,2%TEA. $R_s = 1,44$

Apêndice 3: Eletroferogramas obtidos no estudo das condições de injeção

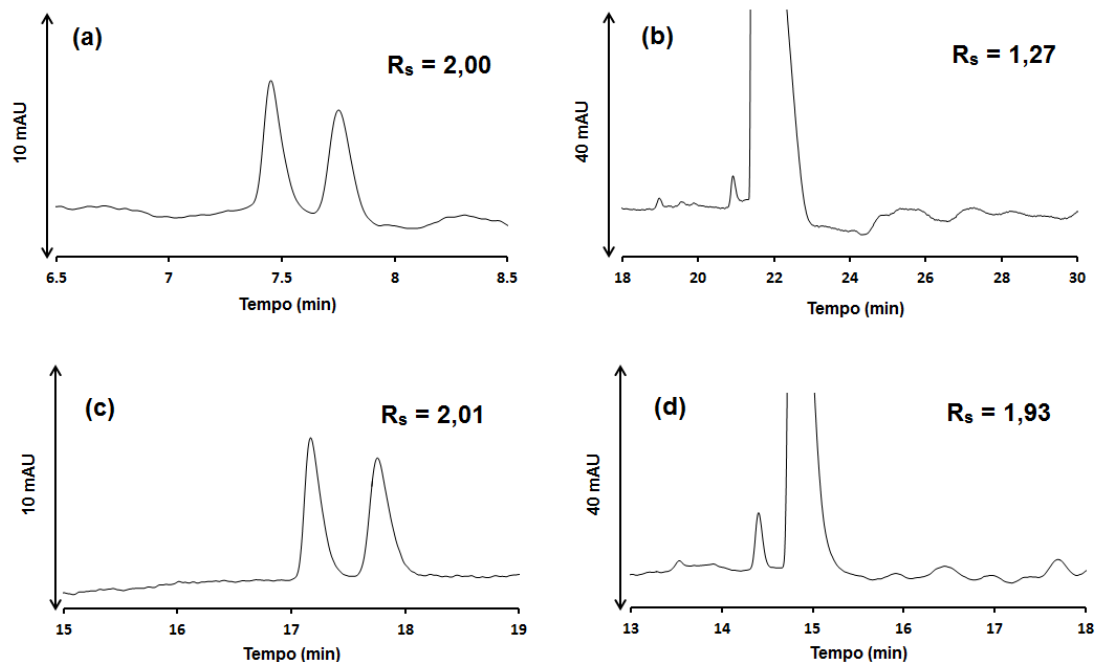


Figura 32. Eletroferogramas obtidos no estudo das condições de injeção (a) coinjeção de padrões 0, 5 mmol.L⁻¹ com capilar TSP 50,0 cm L_E, 50 mbar/6 s, -11kV; (b) amostra 01 com capilar TSP 50,0 cm L_E, 50 mbar/6 s, -11kV; (c) coinjeção de padrões 0, 5 mmol.L⁻¹ com capilar TSU 50,0 cm L_E, 10 mbar/1 s, -15kV; (d) amostra 01 com capilar TSU 50,0 cm L_E, 10 mbar/1 s, -15kV.

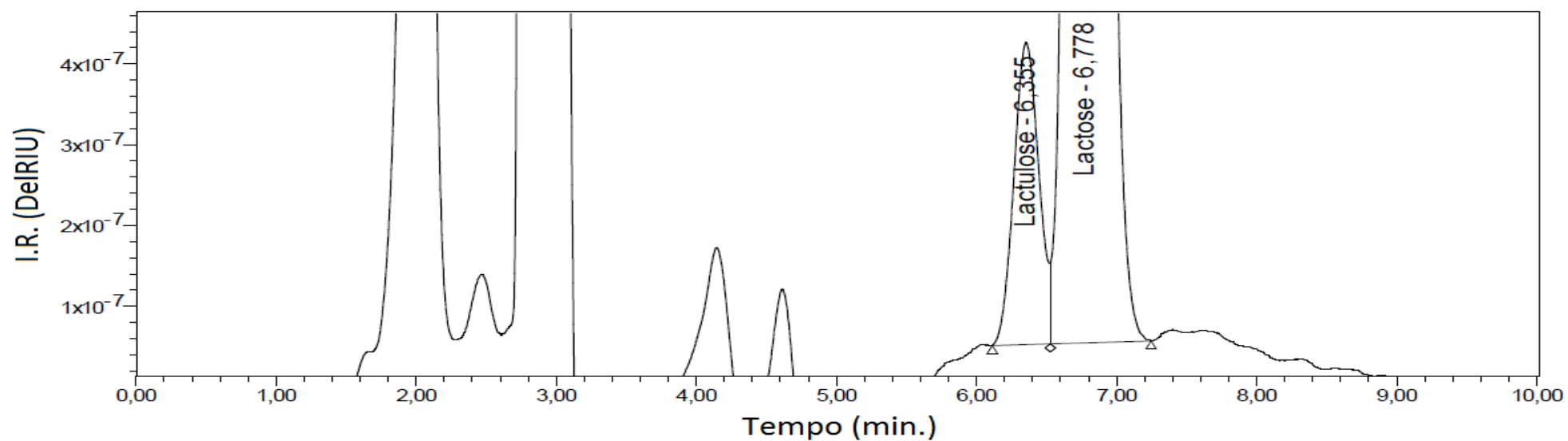
Apêndice 4: Cromatogramas e eletroferogramas obtidos no estudo do preparo de amostra

Figura 33. Cromatograma de amostra submetida ao processo de tratamento 1 (Tabela 24). Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (65:35)+0,2%TEA.

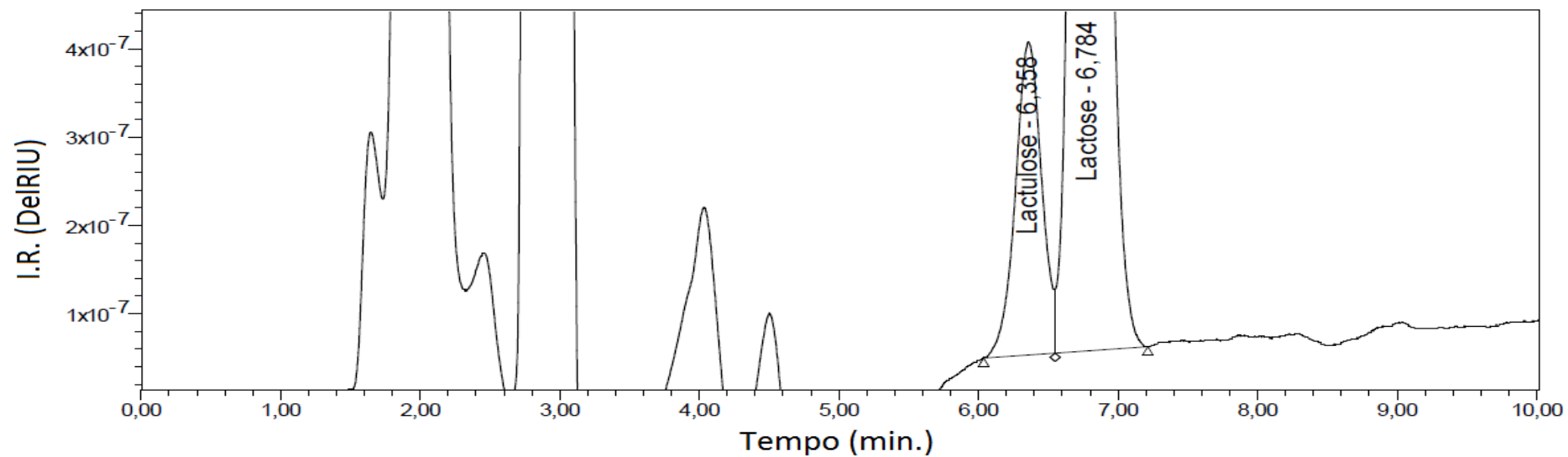


Figura 34. Cromatograma de amostra submetida ao processo de tratamento 2 (Tabela 24). Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU , ACN-água (65:35)+0,2%TEA.

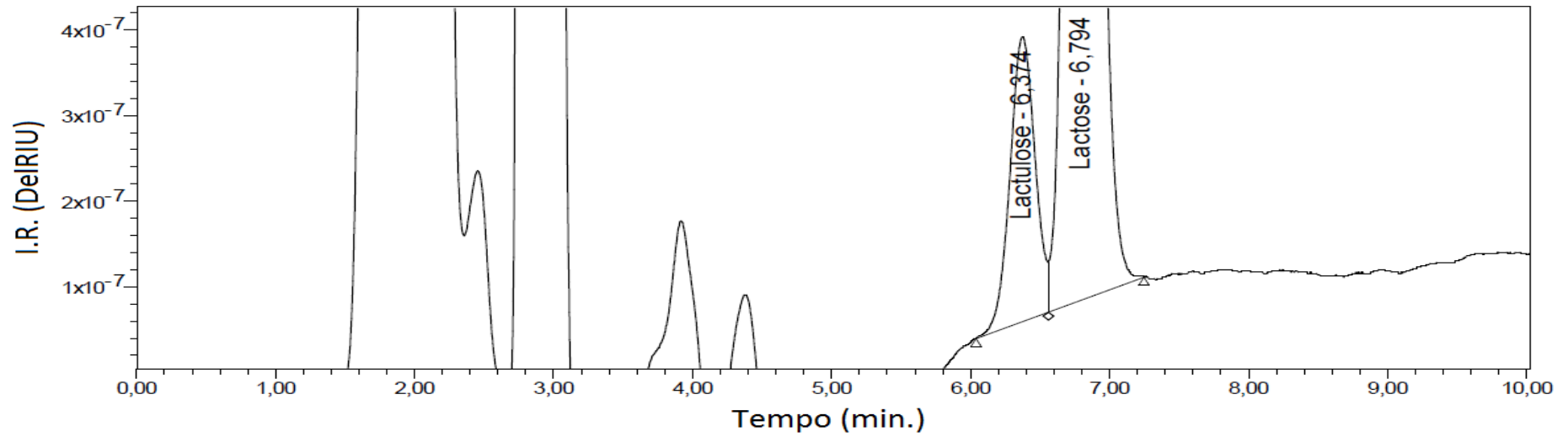


Figura 35. Cromatograma de amostra submetida ao processo de tratamento 3 (Tabela 24). Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (65:35)+0,2%TEA

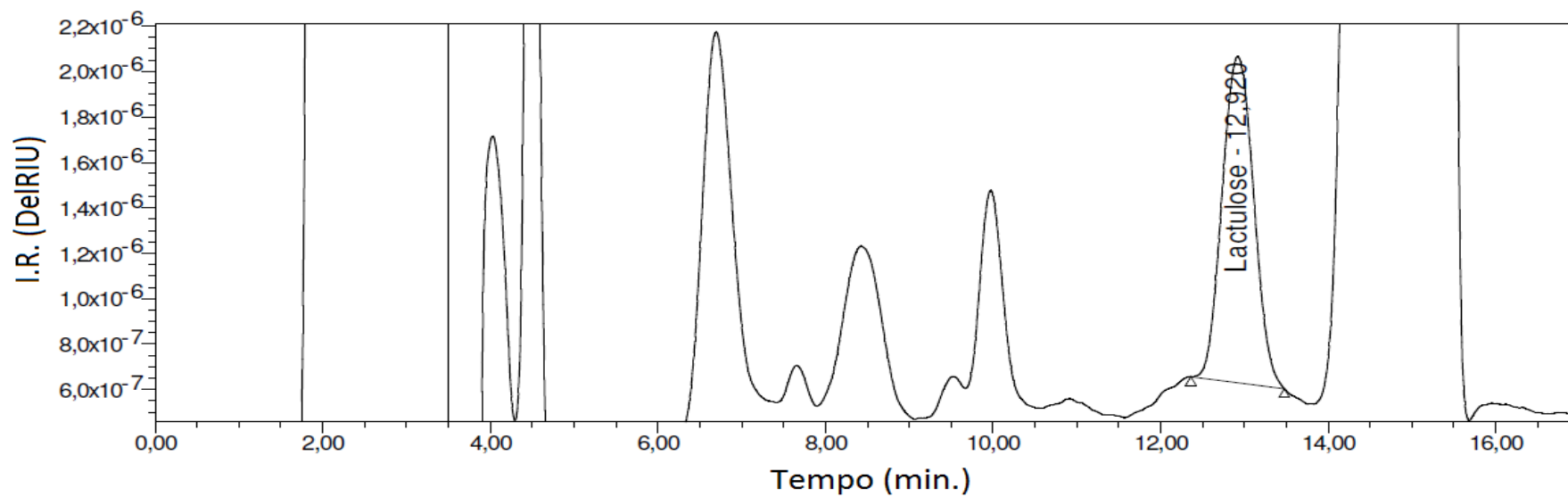


Figura 36. Cromatograma de amostra submetida ao processo de tratamento 4 (Tabela 24). Condições de injeção: fluxo isocrático de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, sensibilidade 512 DeIRIU, ACN-água (65:35)+0,2%TEA

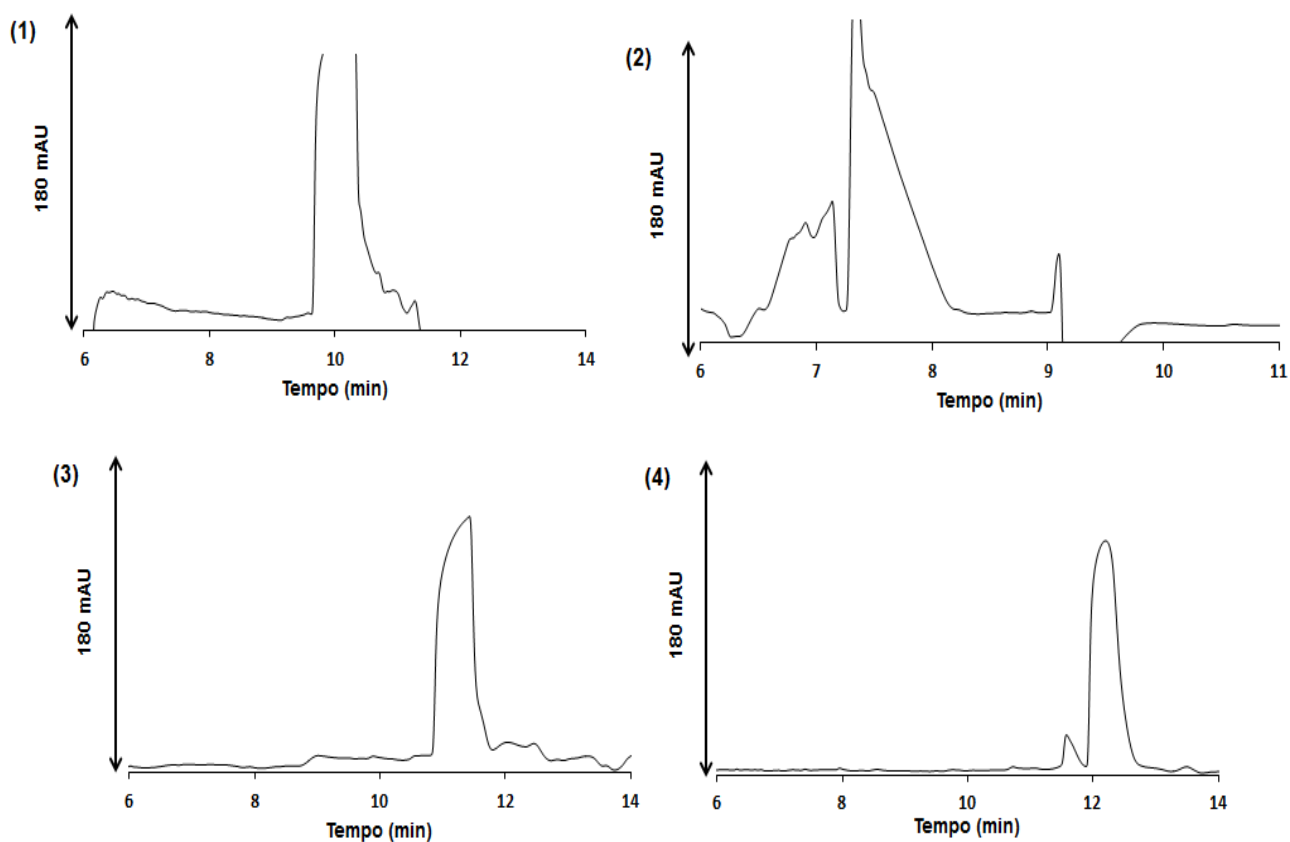


Figura 37. Eletroferogramas de amostras submetidas aos processos de tratamento (1) método 01, (2) método 02, (3) método 03 e (4) método 04 (Tabela 24). Condições experimentais: injeção 1 segundo a 10 mbar, voltagem de -15 kV, temperatura no cartucho de 20°C, detecção indireta em 350 nm, ref: 275 nm; capilar TSU com dimensões: comprimento total de 58,5 cm; efetivo de 50,0 cm; 75 μm de D.I. e 375 μm de D.E.

Apêndice 5: Preparo das soluções Carrez I e II

a) Solução Carrez I:

Pesou-se 21,9 g de acetato de zinco e procedeu-se na dissolução em água deionizada. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,00 mL. Adicionou-se 3 mL de ácido acético glacial e completou-se o volume com água deionizada.

b) Solução Carrez II:

Pesou-se 10,6 g de hexacianoferrato de potássio e procedeu-se na dissolução em água deionizada. Transferiu-se para balão volumétrico de 100,00 mL e completou-se o volume com água deionizada.

A validade das soluções é de seis meses estocadas à temperatura ambiente.