

Validação de método de CLAE-EM/EM para determinação de lactose em baixas concentrações em leite em pó a ser aplicado no estudo de viabilidade de um MRC

R B Jambo^{1,2}, R V Leal¹, E C Rego¹, J M Da Silva¹ e V Souza²

¹ Laboratório de Análise Orgânica, Inmetro, Duque de Caxias, 25250-020, Brasil

² Programa de Pós-graduação em Metrologia e Qualidade, Inmetro, Duque de Caxias, 25250-020, Brasil

rbjambo@colaborador.inmetro.gov.br

Resumo. Um método confiável e sensível de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (CLAE-EM/EM) foi desenvolvido e validado para determinação de lactose em amostras comerciais de leite em pó zero lactose, utilizando a sacarose como padrão interno. O procedimento de preparo das amostras envolveu somente a diluição das amostras de leite em pó no solvente acetonitrila/formiato de amônio (70:30, v/v), utilizando agitação em vórtex para homogeneização e centrifuga para separação. No estudo de seletividade, foi verificado o efeito de matriz para o método, através do teste *t* para inclinação das curvas, sendo necessário a utilização de curva por adição padrão para a determinação da fração mássica de lactose. O método foi linear ($r > 0,99$) e homocedástico (aprovado pelo teste de Cochran), dentro da faixa de trabalho (0,1 – 0,8 µg/g). O limite de detecção foi de 130 µg/g e o limite de quantificação foi de 390 µg/g para a amostra em sua forma original, atendendo a legislação brasileira que estabelece o limite permitido de lactose em produtos classificados como isento de lactose. A recuperação variou na faixa entre 97 % e 100 % e a repetibilidade (RSD ≤ 3,7%) foram adequadas para todos os dias de estudo. A precisão intermediária também foi satisfatória, comprovada pelo teste de variância. Os dados de LQ, recuperação e precisão confirmam a aplicabilidade do método proposto para a quantificação da lactose residual.

1. Introdução

Leite e produtos lácteos têm sido empregados na dieta humana devido à composição em macro e micronutrientes, como as suas proteínas de alta qualidade e o cálcio. O leite é um dos seis produtos mais importantes da agropecuária brasileira, estando à frente inclusive do café e suco de laranja [1]. Como parte do seu pacote rico em nutrientes, a lactose é o componente majoritário e o mais importante carboidrato e fonte de energia na maioria dos leites de mamíferos, com grande importância na dieta humana desde a origem da humanidade, sendo um dissacarídeo composto por dois monossacarídeos: galactose e glicose, conectados por uma ligação β-1,4 glicosídica. Essa ligação precisa de uma enzima específica para ser quebrada, chamada de lactase ou β-galactosidase, para a subsequente absorção dos monossacarídeos pelo intestino [2].

Intolerância à lactose é a incapacidade de digerir a lactose, que é resultado da deficiência ou ausência de uma enzima intestinal lactase [2]. Cerca de 75% da população mundial adulta tem algum grau de

intolerância à lactose, podendo estar fortemente relacionada à etnia. Os sintomas mais comuns são náuseas, dores abdominais, diarreia, flatulência, vômitos e desconforto. A intolerância à lactose não é uma doença e sim uma carência do organismo, que pode ser controlada com dieta e medicamentos. Alguns alimentos devem ser evitados em dietas com restrição a esse carboidrato, como leite de vaca, manteiga, requeijão e alimentos que possuem leite em sua composição [3]. Porém, a exclusão total desses alimentos da dieta tem as desvantagens nutricionais da ingestão reduzida de cálcio e vitaminas, podendo acarretar outras doenças [4]. Uma alternativa para que esses alimentos possam ser ingeridos, é a utilização de um medicamento que contenha a enzima lactase, onde ela fará o papel da enzima em deficiência no corpo. Outra opção seria ingerir alimentos para dietas com restrição à lactose [5].

Os alimentos para uma dieta com restrição à lactose podem ser classificados em duas categorias, segundo a RDC nº135, de 08 de fevereiro de 2017, os “isentos de lactose” e os “baixo teor de lactose”. Os alimentos, para serem classificados como isento de lactose, precisam conter uma quantidade de lactose igual ou menor a 100 mg/100g ou 100 mg/100mL do alimento pronto para o consumo, de acordo com as instruções de preparo do fabricante. Já para os alimentos de baixo teor de lactose, essa quantidade seria maior que 100 mg/100g ou 100 mg/100mL e igual ou menor do que 1 g/100g ou 1 g/100mL do alimento pronto para o consumo, de acordo com as instruções de preparo do fabricante [6].

Diversas técnicas para determinação de lactose vêm sendo reportadas há anos na literatura. As mais citadas são a titulação, cromatografia iônica, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência por detecção de índice de refração, ultravioleta e espectrometria de massas, ensaios enzimáticos, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), crioscopia e biossensores de lactose [7]. A escolha de métodos analíticos confiáveis de alta seletividade e sensibilidade é essencial para o desenvolvimento de um material de referência certificado (MRC), para que possam ser utilizados nas etapas de estudo da homogeneidade, estabilidade e caracterização. O MRC é uma das ferramentas metroológicas estabelecidas pela ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 para garantir a validade dos resultados [8]. Devido à importância dos materiais de referência, sua produção é uma atividade chave para a melhoria e manutenção de um sistema de medição coerente em todo o mundo [9]. Com esse tipo de material produzido e disponível no mercado, laboratórios de controle de qualidade terão acesso a ferramentas metroológicas adequadas para garantir a validade técnica e, portanto, a confiabilidade destes resultados. Com isso, assegura a confiabilidade das informações de rotulagem de laticínios considerando a alta ingestão diária de leite e a população intolerante à lactose.

A norma ABNT NBR ISO 17034:2017 estabelece que o produtor de material de referência (PMR) deve selecionar uma estratégia adequada para caracterização de um MRC, considerando-se o uso pretendido para este material. Esta norma sugere as seguintes abordagens para caracterização: (a) medição da propriedade de interesse a ser certificada por meio de um único procedimento de medição de referência por um único laboratório; (b) medição da propriedade de interesse a ser certificada por meio de dois ou mais procedimentos de medição independentes com exatidão demonstrada por um ou mais laboratórios competentes; e (c) transferência de valor de um MRC estreitamente semelhante usando um único procedimento de medição por um laboratório [10].

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas é uma técnica que possibilita a identificação inequívoca e na quantificação altamente sensível de produtos naturais em concentrações de rastreamento em matrizes complexas, como as lácteas [11]. A diluição isotópica utilizando um isotópologo é melhor padrão interno para ser utilizado com esse método, fazendo com que ele seja um método primário [12]. Essa técnica pode ser aplicada na quantificação de lactose com alta seletividade e sensibilidade, podendo ser empregada na etapa de caracterização da produção de um MRC. Empregando essa mesma técnica cromatográfica, mas utilizando um padrão interno comum, também seria uma técnica de alta sensibilidade, que poderia ser utilizada nas etapas de estudo de homogeneidade e estabilidade da produção de um MRC.

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de lactose em leite em pó, utilizando a técnica de CLAE-EM/EM com utilização do padrão interno (PI) sacarose, para ser empregado nas etapas dos estudos de homogeneidade e estabilidade de um lote

candidato a MRC. O desenvolvimento desta técnica analítica é uma peça-chave para o estudo de viabilidade da produção do MRC de interesse.

2. Materiais e Métodos

Para o desenvolvimento do estudo da viabilidade da produção do MRC e da metodologia a ser empregada nas etapas de homogeneidade e estabilidade, foi escolhida a matriz leite em pó zero lactose comercial como candidato ao MRC, por se tratar de uma amostra que já atenda o nível desejado do analito e por se tratar de um produto com validade mais adequada para o uso pretendido.

Foram adquiridos um leite em pó zero lactose e dois compostos lácteos zero lactose (cuja o ingrediente majoritário é leite em pó), para a realização dos estudos preliminares, onde será definido o mais apropriado a ser utilizado na produção do lote. Os estudos consistiram em analisar a presença de interferentes químicos presentes nas matrizes que possam interferir na determinação da fração mássica de lactose.

2.1. Reagentes e padrões

Água tipo I obtida pelo sistema Milli-Q modelo Gradient A10 (Millipore). Foram utilizados os reagentes acetonitrila grau CLAE com pureza 99,9 % (Biograde), formiato de amônio grau PA com pureza 97,0 % (Spectrum), maltose grau PA com pureza 92,0 % (Spectrum), glicose grau CG com pureza 98,0 % (TCI), frutose grau CLAE com pureza 99,0 % (TCI) e sacarose grau CG com pureza 99,5 % (Sigma-Aldrich), utilizada como padrão interno. O padrão de lactose (Chem Service) onde sua fração mássica é de $(99,21 \pm 0,49)$ g/100g (U; k = 2,00), cuja pureza foi determinada no Inmetro,

2.2. Equipamentos e materiais

Todas as soluções, amostras e curvas analíticas foram preparadas gravimetricamente utilizando as balanças analíticas modelo XS205 DualRange (Mettler Toledo) e XP205 (Mettler Toledo), de resolução de 0,00001 g.

Foram utilizados um Vórtex modelo MS 3 Digital (IKA) e uma centrífuga refrigerada, modelo NT 815 (Nova Técnica). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência, modelo Acquity UPLC I-CLASS, acoplado ao Espectrômetro de Massas em série, modelo Xevo-TQ (Waters). A coluna utilizada no sistema cromatográfica foi a XBridge HILIC 3,5 μ m 4,6x150 mm (Waters).

2.3. Materiais

Frascos de vidro de 10 mL de capacidade, seringas plásticas com 5 mL de volume, filtros de seringa PVDF (Filter Pro) com 13 mm de diâmetro e poro de tamanho 0,22 μ m e *vials* âmbar com capacidade de 1,5 mL para análise cromatográfica.

2.4. Ajustes dos parâmetros analíticos

Para a adequação do método de espectrômetro de massas, soluções de lactose e sacarose de fração mássica de 1000 μ g/g foram introduzidas no equipamento através de infusão direta e para a determinação das melhores condições cromatográficas para o método proposto, foram injetadas no sistema de CLAE-EM/EM soluções de $w = 100$ μ g/g dos mesmos açúcares, ambos parâmetros analíticos de partida foram baseados nas informações encontradas na literatura [13].

Um experimento preliminar para verificar os tempos de retenção de outros açúcares em conjunto com a lactose e sacarose foi conduzido a fim de determinar se há alguma sobreposição de seus picos. Foram preparadas soluções de maltose, glicose e frutose $w = 100$ μ g/g de cada um dos açúcares e uma solução da mistura de todos eles, obtendo-se uma fração mássica final de 100 μ g/g para cada um dos açúcares. Essas soluções foram injetadas no sistema cromatográfico e os sinais gerados foram analisados.

2.5. Preparo das amostras

O preparo das amostras foi adaptado de um artigo da literatura [14] e consiste em reconstituir os produtos em pó de acordo com as instruções do fabricante, na proporção de 0,25 g de amostra para 1,75 g de água do tipo I e homogeneizá-los em vórtex por 30 s à 3000 rpm. Então é adicionado o padrão interno de sacarose e, quando necessário, o padrão de lactose. Em seguida, a massa da solução é completada para 10 g com a adição do solvente acetonitrila:formiato de amônio 5 mM (70:30). A solução é homogeneizada em vórtex por 30 s à 3000 rpm e, em seguida, é centrifugada por 10 min à 4000 rpm. Uma alíquota de 0,05 g do sobrenadante é retirada e diluída para 5 g utilizando solvente. Mais uma vez a solução é homogeneizada em vórtex por 30 s à 3000 rpm e filtradas em filtro de seringa PVDF, onde 1,5 mL do filtrado é transferido para um vial âmbar, para que a amostra possa ser injetada no sistema cromatográfico. Os cromatogramas obtidos para as amostras foram comparados ao cromatograma do padrão de lactose, a fim de observar se houve uma boa separação desse analito para a amostra. Também houve a comparação com o cromatograma da sacarose, para verificar se haveria interferentes na amostra para esse tempo de retenção.

2.6. Preparo das curvas analíticas

A partir de soluções de lactose e sacarose $w = 150 \mu\text{g/g}$ foram preparados soluções-padrões variando a fração mássica da lactose (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 $\mu\text{g/g}$) e mantendo constante a fração mássica da sacarose (0,4 $\mu\text{g/g}$), utilizada como padrão interno, para a construção de uma curva analítica em solvente. A curva analítica em matriz também foi preparada utilizando as soluções de lactose e sacarose $w = 150 \mu\text{g/g}$, que foram adicionadas na primeira etapa do preparo da amostra, de acordo com o item 2.5. As frações mássicas finais dos padrões, após extração e diluição, são as mesmas da curva em solvente. Os picos obtidos nos cromatogramas foram integrados e áreas obtidas utilizadas para construir a equação da curva.

A curva de adição padrão foi preparada utilizando apenas 5 pontos, onde cada curva é utilizada para a determinação da fração mássica de lactose de apenas uma amostra. As soluções empregadas para o preparo dessa curva foram lactose $w = 500 \mu\text{g/g}$ e sacarose $w = 1000 \mu\text{g/g}$, sendo essas adicionadas na etapa inicial do preparo da amostra. As frações mássicas finais desses padrões são 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 $\mu\text{g/g}$ para a lactose e 0,4 $\mu\text{g/g}$ para a sacarose. Os picos obtidos nos cromatogramas foram integrados e áreas obtidas utilizadas para construir a equação da curva.

2.7. Avaliação dos parâmetros de validação

A avaliação do nível de desempenho do procedimento de medição de lactose foi conduzida por meio do processo de validação observando-se as orientações do documento DOQ-Cgcre-008 do INMETRO [15] e do Manual de Garantia da Qualidade Analítica do MAPA [16]. A definição dos critérios de aceitação foi realizada de forma que o procedimento de medição apresentasse um nível de desempenho adequado para ser empregado nos estudos conduzidos dentro do escopo do estudo de viabilidade.

2.7.1. Seletividade. Foi avaliado pelo estudo de efeito de matriz, onde foram preparadas as duas curvas analíticas, uma em solvente (curva I) e outra na matriz leite em pó zero lactose (curva II) com seis níveis de frações mássicas, preparados em triplicatas verdadeiras. Os resultados das curvas foram comparados através do teste t para inclinações das curvas.

2.7.2. Faixa de trabalho e linearidade. Foi avaliada por meio da curva por adição padrão. O primeiro fator avaliado para essa curva foi a verificação da existência de valores aberrantes que possam interferir na regressão, utilizando o teste de Grubbs ($G_{\text{calc}} \leq G_{\text{tab}}$ em 5%, não possui valores aberrantes). Também foi verificado a homocedasticidade da distribuição dos dados, utilizando o teste de Cochran ($C_{\text{calc}} \leq C_{\text{tab}}$ em 5%, os dados são homocedásticos). Aplicou-se a regressão linear adequada e calculou-se o coeficiente de correlação ($r > 0,99$).

2.7.3. *Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)*. O LD e LQ foram estimados através da relação sinal/ruído da amostra sem adição de padrão (branco), que foi analisado em oito replicatas de injeção. A fração mássica de lactose referente a um sinal/ruído 3:1 é o LD e um sinal/ruído de 10:1 é o LQ. Os valores obtidos para esses limites devem ser compatíveis com a legislação brasileira para produtos zero lactose.

2.7.4. *Tendência*. Foi avaliada por meio do estudo de recuperação analítica, onde foram preparadas amostras de leite em pó zero lactose fortificadas em diferentes níveis de frações mássicas, 0,2 µg/g, 0,4 µg/g e 0,6 µg/g. Para cada nível, foram preparadas três amostras independentes e cada uma destas foi injetada em triplicata no sistema cromatográfico. Uma amostra sem adição do padrão de lactose também foi preparada e injetada em triplicata no sistema cromatográfico, para ser utilizada como branco. Os critérios de aceitação de recuperação analítica média para cada nível de fortificação estabelecidos pela AOAC, que são sugeridos pelo documento orientativo do INMETRO [9], são de 95 % a 105 %, para valores de fração mássica do analito próximos de 0,1 µg/g.

2.7.5. *Precisão*. Este parâmetro foi avaliado em termos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada por meio da análise da amostra em replicata, onde foram preparadas três curvas de adição padrão com cinco pontos e cada ponto foi injetado em triplicata. O critério de aceitação para desvio-padrão relativo das frações mássicas obtidas estabelecido pela AOAC, que são sugeridos pelo documento orientativo do INMETRO [9], é ser menor ou igual à 3,7%, para valores de fração mássica do analito próximos de 0,1 µg/g.

A precisão intermediária foi avaliada comparando os resultados de amostras analisadas em dois dias distintos, usando as mesmas condições de análise. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para comparação dos resultados entre os dois dias distintos de estudo, onde se ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$) demonstra que não há diferença significativa entre os resultados.

3. Resultados e discussões

3.1. Ajuste dos parâmetros analíticos.

A análise por espectrometria de massas foi realizada por ionização por eletronebulização (*electrospray*) operando no modo negativo (ESI-). Os parâmetros ajustados foram: energia do capilar: 2,5 kV; energia do cone de amostragem: 20 V; energia do cone de extração: 3 V; temperatura da fonte: 150 °C; temperatura de dessolvatação: 350 °C; fluxo do gás de dessolvatação: 800 L/h; fluxo do gás do cone: 20 L/h.

Foram monitorados alguns fragmentos da lactose e sacarose na forma de adutos com ácido fórmico, $m/z = 387,4$ (lactose) e $m/z = 387,2$ (sacarose). O monitoramento de reações múltiplas (MRM) para as transições e as energias de colisão para quantificação foram $m/z = 387,4 > 161,4$ (12 V) para a lactose e $m/z = 387,2 > 341,2$ (12 V) para a sacarose. Já para a confirmação, as transições e as energias de colisão foram $m/z = 387,4 > 179,4$ (15 V) para a lactose e $m/z = 387,2 > 179,2$ (20 V).

Com os parâmetros do espectrômetro de massas ajustados, a próxima etapa foi ajustar os parâmetros cromatográficos, onde as melhores condições obtidas foram: fase móvel (B) acetonitrila / (A) formiato de amônio 5 mM; modo de eluição: isocrático (15 % A / 85 % B); temperatura da coluna: 30 °C; volume de injeção: 10 µL, fluxo: 0,8 ml/min; tempo de corrida: 8 min.

A partir das condições do CLAE-EM/EM definidas, soluções de diferentes padrões de açúcares foram injetadas no sistema cromatográfico a fim de determinar o tempo de retenção para cada um deles. Os cromatogramas obtidos no monitoramento do íon $m/z = 179$ (modo *Single Ion Recording* (SIR)) para a glicose e frutose, do íon $m/z = 161$ para maltose e lactose e do íon $m/z = 341$ para sacarose estão apresentados na figura 1(A). Todos os açúcares aparecem em tempos de retenção diferentes, com o grupo dos monossacarídeos (frutose e glicose) aparecendo na região entre 3,6 e 3,8 minutos e o grupo dos dissacarídeos (maltose, sacarose e lactose) na região entre 4,7 e 5,3 minutos. Pode-se perceber que

parte dos picos da frutose e glicose se sobrepõem e o mesmo acontece com os picos da maltose e sacarose. Contudo, o pico da lactose está bem separado dos demais açúcares, inclusive com uma boa separação do pico da sacarose.

Ao analisar o cromatograma desses açúcares em uma única solução, apresentado na figura 1(B), que foi monitorado no modo SIR, para os íons totais, pode-se perceber que o perfil cromatográfico se manteve em relação ao experimento anterior. Sendo assim, as condições ajustadas para o sistema de CLAE-EM/EM são eficientes para detectar o sinal da lactose frente a outros compostos de função similar como os açúcares estudados. Além disso, como os picos da lactose e da sacarose estão bem definidos e separados, a sacarose pode ser candidata à padrão interno para o método proposto.

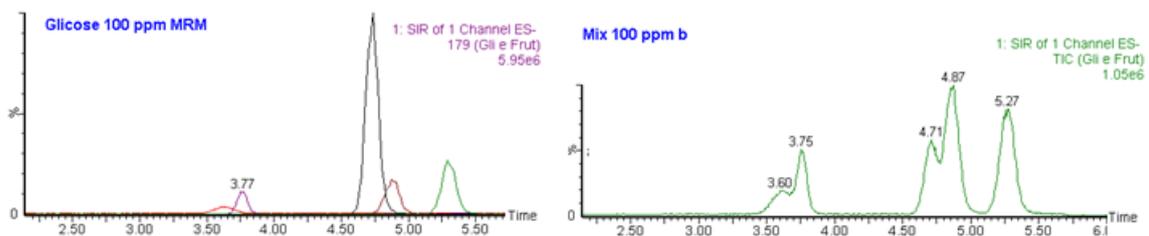


Figura 1. Análises dos açúcares frutose, glicose, maltose, sacarose e lactose, respectivamente, onde: (A) cromatogramas sobrepostos de cada uma das soluções separadas; (B) mistura dos açúcares em uma única amostra.

3.2. Preparo das amostras

Os cromatogramas obtidos para as três amostras que estão sendo estudadas, foram comparados com os cromatogramas das soluções de lactose e sacarose de $w = 100 \mu\text{g/g}$, utilizando o modo MRM para monitorar as transições utilizadas para quantificação da lactose $m/z = 387,4 > 161,4$ e da sacarose $m/z = 387,2 > 341,2$. O leite em pó foi a matriz que apresentou um pico de menor intensidade para lactose e não apresentou interferentes no tempo de retenção da sacarose, sendo um possível candidato a ser empregado na produção do MRC. Além disso, houve uma boa separação dos analitos de interesse para essa amostra, demonstrando que esse preparo de amostra é adequado para o uso pretendido.

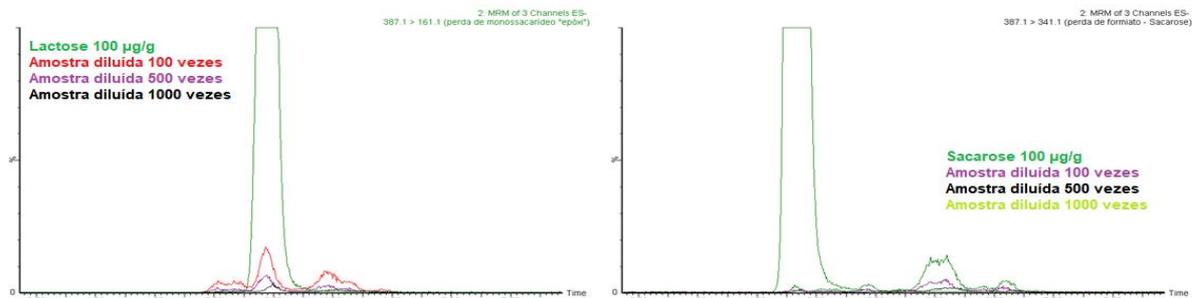


Figura 2. Cromatograma da amostra de leite em pó zero lactose comparado com os cromatogramas de lactose e de sacarose.

3.3. Avaliação dos parâmetros analíticos

3.3.1. Seletividade. Foram plotados os gráficos para as curvas analíticas em solvente e em matriz, com os dados obtidos dos experimentos para o efeito de matriz. Em seguida, o modelo de regressão linear simples foi aplicado e os coeficientes da equação de reta, coeficiente linear (a) e coeficiente angular (b), foram obtidos usando o método dos mínimos quadrados ordinário.

Para avaliação do efeito de matriz, as inclinações das curvas de calibração foram comparadas por meio do teste t de comparação de inclinações, com nível de confiança de 95 %. O $t_{\text{calculado}}$ (16,32) foi maior $t_{\text{crítico}}$ (2,04), comprovando que há efeito de matriz significativa nas condições avaliadas. Como foi verificado a presença de efeito de matriz para o método proposto, a linearidade, a precisão e a exatidão também serão estudadas na matriz.

3.3.2. Faixa de trabalho e linearidade. Como não temos disponível uma matriz sem a presença do analito de interesse, pois todas as amostras estudadas até o momento apresentaram pico no tempo de retenção da lactose, foi necessário realizar os demais experimentos utilizando a curva por adição de padrão. A faixa de trabalho selecionada foi de 0,1 a 0,8 $\mu\text{g/g}$ de fração mássica para a lactose, onde a fração mássica do padrão interno de sacarose foi fixada em 0,4 $\mu\text{g/g}$.

Primeiramente, foi avaliado a existência de valores aberrantes que pudessem interferir na regressão, utilizando o teste de Grubbs em 5 % e não houve valores aberrantes. A homocedasticidade da variância ao longo da curva foi avaliada por meio da aplicação do teste de Cochran, considerando-se um nível de confiança de 95 %. Neste teste, o valor calculado ($C_{\text{calculado}} = 0,652$) foi menor do que o valor crítico ($C_{\text{crítico}} = 0,684$), demonstrando que a curva apresenta um perfil homocedástico.

Considerando-se então que a curva de calibração construída apresenta um perfil homocedástico, o modelo de regressão linear simples foi aplicado e os coeficientes da equação da reta foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados ordinário. A curva analítica apresentou um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9929, que indicou boa aderência dos dados ao modelo linear, o que foi reiterado por um gráfico de resíduos livre de tendências, como demonstrado na figura 3.

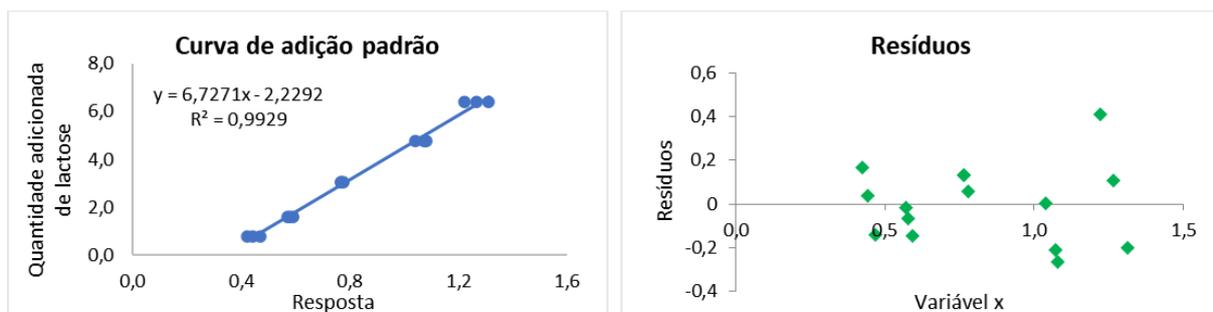


Figura 3. Curva de adição padrão para determinação de lactose e seu gráfico de resíduos.

3.3.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Foi então determinado o sinal/ruído referente à lactose em todos os cromatogramas obtidos das replicatas da amostra em branco e foi calculada a média aritmética desses valores, que foi de 30,1. Baseado no sinal/ruído de 1:10, o LQ da CLAE é o primeiro ponto da curva, ou seja, 0,1 $\mu\text{g/g}$. Já para o LD, o valor obtido foi de 0,03 $\mu\text{g/g}$, equivalente a um sinal/ruído de 1:3. Considerando as diluições do método, o LQ na amostra de leite em pó é de 130 $\mu\text{g/g}$ e o LQ é de 390 $\mu\text{g/g}$. Esses valores atendem ao limite de lactose determinado pela RDC N°135, de 08 de fevereiro de 2017, que classifica um produto como isento de lactose aquele que apresente uma quantidade de lactose igual ou menor a 1000 $\mu\text{g/g}$. Sendo assim, os valores de LD e LQ encontrados são adequados ao uso pretendido.

3.3.4. Tendência. A curva analítica para o estudo da tendência foi construída com os dados da curva empregada no estudo de linearidade, no item 3.3.2. Como não temos uma amostra isenta de lactose, foi considerado que a área referente à essa amostra seria o branco. Assim, a área referente à lactose do branco foi descontada da área da lactose obtida para a curva. A partir dessa curva analítica foram determinadas as frações mássicas das amostras. Com esses valores obtidos, foi calculado a recuperação para cada nível de fortificação, segundo a equação (1).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: C_1 = concentração lida do analito na amostra fortificada; C_2 = concentração do analito lida na amostra não fortificada; C_3 = concentração do analito adicionado à amostra.

Os valores percentuais de recuperação analítica médios encontrados variaram entre 97 % e 100 % nos estudos de recuperação, estando dentro da faixa de aceitação de 95 % a 105 % estabelecida. Desta forma, os valores médios de recuperação analítica obtidos nos diferentes níveis de fortificação foram considerados como sendo satisfatórios, demonstrando que o procedimento de medição proposto não apresenta tendência e, portanto, é adequado para aplicação nos estudos do lote de material candidato a MRC.

3.3.5. *Precisão.* Para a determinação da fração mássica de lactose nas amostras analisadas, foi utilizada a curva por adição padrão do estudo da linearidade, no item 3.3.2. Por se tratar de uma curva de adição padrão, ela foi plotada invertendo as coordenadas x e y, para simplificar significativamente a análise de dados, como proposto na literatura [17]. A fração mássica de lactose para as amostras em sua forma original, ou seja, em pó, foi calculada de acordo com a equação (2).

$$w_L = -b \cdot w_{\text{pad}} \cdot P_{\text{pad}} \quad (2)$$

Onde: w_L = fração mássica da lactose (mensurando); b = coeficiente linear da curva analítica; w_{pad} = fração mássica da solução padrão; P_{pad} = pureza do padrão.

Os resultados de medição obtidos para as replicatas foram testados para valores aberrantes através de teste de *Grubbs*, onde foi encontrado um par de valores aberrantes no segundo dia de análise. Após o descarte do par de valores aberrantes, os valores finais foram utilizados para o cálculo do desvio-padrão relativo à repetibilidade para cada dia de análise, conforme mostrado na tabela 1. A análise de variância (ANOVA) de fator único também foi empregada para a comparação estatística entre os diferentes dias de análise, empregando o teste F, apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Dados da curva de adição padrão para determinação de lactose e seu gráfico de resíduos.

Dia 1		Dia 2	
Fração mássica ($\mu\text{g/g}$)	DPR (%)	Fração mássica ($\mu\text{g/g}$)	DPR (%)
1313,1		1359,6	
1248,3		1344,6	
1348,0	3,5	-	0,5
1352,8		-	
1401,0		1342,4	
1339,6		1342,2	
ANOVA ($\alpha = 0,05$)		$F_{\text{calculado}} (0,264) < F_{\text{crítico}} (5,318)$	

Os valores de DPR (%) obtidos em ambos os dias de análise foram considerados como sendo satisfatórios (menores que 3,7%) e o procedimento proposto se mostrou adequado para aplicação nos estudos preliminares para avaliação da homogeneidade e estabilidade nas condições de transporte do lote candidato a MRC.

Para a avaliação da precisão intermediária foi aplicado o teste de variância ANOVA de fator único, para a comparação dos resultados entre os dias estudados. Como o $F_{\text{calculado}}$ foi menor do que o $F_{\text{crítico}}$, é aceita a hipótese de que as variâncias entre os dois dias de análise são estatisticamente iguais, comprovando a boa estabilidade do procedimento de medição.

4. Conclusão

O método CLAE-EM/EM utilizando a sacarose como padrão interno foi aplicado com sucesso na quantificação de lactose em amostras comerciais de leite em pó zero lactose.

Os parâmetros de validação confirmaram a aplicabilidade do método proposto, onde a seletividade, linearidade, precisão e recuperação foram satisfatórias. A calibração por adição de padrão mostrou-se adequada para compensar o efeito de matriz observado. O LQ de 390 $\mu\text{g/g}$ permite a quantificação de lactose residual em matriz classificadas como isentas de lactose pela RDC n°135, de 08 de fevereiro de 2017.

Este método então está adequado a ser empregado com segurança nas etapas de homogeneidade e estabilidade no estudo de viabilidade da produção de um MRC de baixo teor de lactose em leite em pó. Portanto, a validação desse método pode servir como base para o desenvolvimento de um outro método de CLAE-EM/EM com diluição isotópica, um método primário, que poderia ser empregado na etapa de caracterização do MRC. Como este método utiliza um padrão isotópico, que é extremamente mais caro que um padrão comum, o ajuste do método com o padrão de sacarose pode pular diversas etapas de desenvolvimento, diminuindo os gastos com o padrão isotópico.

Referências

- [1] Dantas A, Verruck S and Prudencio E 2019 Ciência e tecnologia de leite e produtos lácteos sem lactose *Atena Editora*
- [2] Toca M, Fernándezb A, Orsic M, Tabaccod O and Vinderolae G 2022 Lactose intolerance: myths and facts. An update *Arch Argent Pediatr* **120** 59-66
- [3] Varella D 2018 Intolerância à Lactose *Biblioteca Virtual em Saúde Ministério Da Saúde* Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/intolerancia-a-lactose/>. Acesso em: 25 ago. 2022
- [4] Da Cunha M, Suguimoto H, de Oliveira A, Sivieri K and Costa M 2008 Intolerância à lactose e alternativas tecnológicas *Journal of Health Sciences* **10**
- [5] Usai-Satta P, Lai M and Oppia F 2022 Lactose Malabsorption and Presumed Related Disorders: A Review of Current Evidence *Nutrients* **14** 584
- [6] Brasil Ministério da Saúde 2017 Resolução da Diretoria Colegiada n° 135, de 08 de fevereiro de 2017. Regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre alimentos para dietas com restrição de lactose. *Diário Oficial da União* 44
- [7] da Silva K, Netto G, de Souza L, Stephani R, de Carvalho A and Perrone Í 2020 Determinação da lactose ante às metodologias contemporâneas *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* **75** 59-71
- [8] Associação Brasileira de Normas Técnicas 2017 ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração
- [9] Associação Brasileira de Normas Técnicas 2020 ABNT ISO Guia 35: Materiais de referências – princípios gerais e estatísticos para certificação
- [10] Associação Brasileira de Normas Técnicas 2017 ABNT NBR ISO 17034: Requisitos gerais para competência de produtores de materiais de referência
- [11] Gross J H 2006 *Mass spectrometry: a textbook* (Cham: Springer Science & Business Media)
- [12] Rero E 2015 Produção de material de referência certificado (MRC) de cloranfenicol em leite

- [13] Trani A, Gambacorta G, Loizzo P, Cassone A, Fasciano C, Zambrini A and Faccia M 2017 Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk *Food chemistry* **233** 385-90
- [14] Chiavelli L, Galuch M, Senes C, Maia L, Lopes T, Rufato K, Santos O and Visentainer J 2022 Validation of UHPLC-MS/MS Method and Measurement Uncertainty Evaluation for Lactose Quantification in Lactose-Free and Regular UHT Milk *Food Analytical Methods* **15** 1418-31
- [15] Inmetro 2020 DOQ-Cgcre-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos
- [16] Ministério da Agricultura e Pecuária 2011 Manual de garantia da qualidade analítica: Resíduos e Contaminantes em Alimentos
- [17] Meija J, Pagliano E and Mester Z 2014 Coordinate swapping in standard addition graphs for analytical chemistry: a simplified path for uncertainty calculation in linear and nonlinear plots *Analytical chemistry* **86** 8563-67