



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA - FEQUI
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CAMPUS PATOS DE MINAS**



CLEIVER JÚNIO MARTINS COSTA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DIRETO E INDIRETO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE LACTOSE EM LEITE UHT**

PATOS DE MINAS - MG

2019

CLEIVER JÚNIO MARTINS COSTA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DIRETO E INDIRETO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE LACTOSE EM LEITE UHT**

Artigo apresentado como requisito para
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
de Alimentos do curso de Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal de
Uberlândia, *campus* Patos de Minas.

Orientadora: Prof(a). Dra. Milla Gabriela dos Santos
Co-orientador: Amado Jesús Silva

PATOS DE MINAS - MG

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Faculdade de Engenharia Química

Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902

Telefone: (34) 3239-4285 - secdireq@feq.ufu.br - www.feq.ufu.br



HOMOLOGAÇÃO

CLEIVER JÚNIO MARTINS COSTA

Estudo comparativo entre métodos direto e indireto para quantificação de lactose em leite UHT

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado nesta data para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) - *campus* Patos de Minas (MG) pela banca examinadora constituída por:

Prof.^a Dr.^a Milla Gabriela dos Santos
Orientador(a) - UFU

Dr.^a Betânia Braz Romão
UFU

Prof.^a Dr.^a Djenaine de Souza
UFU

Patos de Minas, 20 de dezembro de 2019.



Documento assinado eletronicamente por **Milla Gabriela dos Santos, Presidente**, em 20/12/2019, às 18:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Djenaine de Souza, Membro de Comissão**, em 20/12/2019, às 18:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Betania Braz Romao, Membro de Comissão**, em 20/12/2019, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1707054** e o código CRC **3D4CA8CC**.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DIRETO E INDIRETO PARA QUANTIFICAÇÃO DE LACTOSE EM LEITE UHT

Cleiver Júnio Martins Costa^a, Milla Gabriela dos Santos^a, Ricardo Correa Santana^a, Amado Jesus Silva^a

^a Laboratório de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia, *campus*

Resumo: O leite é um tipo de alimento muito especial devido sua rica composição, sendo seus principais constituintes a água, proteína, gordura, sais minerais e também vitaminas. No cenário atual, muitos produtos têm sido formulados a fim de atender as necessidades dos diferentes tipos de públicos, um exemplo comum é a disponibilidade de leite sem lactose, criado especialmente ao público com intolerância à lactose. Existem diferentes maneiras de quantificar a lactose em produtos lácteos, dentre elas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC), que é um método preciso e seguro, porém de alto custo. Outra opção muito utilizada em laticínios é a crioscopia, equipamento que mede o ponto de congelamento do leite, o qual modifica ao diminuir ou aumentar a quantidade de componentes, em especial a lactose. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo correlacionar as duas análises com relação à quantificação de lactose em leite UHT. Para isso, leites UHTs diferentes foram submetidos à hidrólise da lactose, utilizando a enzima lactase. As amostras contendo diferentes concentrações de lactose foram analisadas por HPLC e por crioscopia. Observou-se que, quando em altas concentrações, a lactose pode ser analisada por crioscopia, porém, para baixas concentrações de lactose, a crioscopia não apresentou sensibilidade.

Palavras-chave: Crioscopia, CLAE, Lactose.

Abstract: Milk is a very special type of food due to its rich composition, its main constituents being water, protein, fat, minerals and also vitamins. In the current scenario, many products have been formulated in order to meet the needs of different types of public, a common example is the availability of lactose-free milk, created especially for the consumers with lactose intolerance. There are different ways to quantify lactose in dairy products, including High Performance Liquid Chromatography (HPLC), which is a precise and safe method, but at a high cost. Another option widely used in dairy products is cryoscopy, equipment that measures the freezing point of milk, which changes by decreasing or increasing the amount of components, especially lactose. Therefore, the present study aimed to correlate the two analyzes in relation to the quantification of lactose in UHT milk. For this, different milk samples were subjected to lactose hydrolysis, using the enzyme lactase. The samples containing different concentrations of lactose were analyzed by HPLC and by cryoscopy. It was observed that, when in high concentrations, lactose can be analyzed by cryoscopy, however, for low concentrations of lactose, cryoscopy did not present sensitivity.

Palavras-chave: Cryoscopy, HPLC, Lactose.

1. Introdução

O leite se apresenta como um dos alimentos mais completos em termos nutricionais, desta forma o monitoramento de sua qualidade é excepcional em todas as etapas em que ele está envolvido. As grandes preocupações quando se fala em sua qualidade físico-química, segundo Polegato e Rudge (2003), seria o estado de conservação, tratamento térmico e sua integridade física e química, principalmente os relacionados à adição ou remoção de substâncias químicas próprias ou estranhas a sua composição.

Diversos fatores podem interferir na composição do leite, no entanto, o leite de vaca apresenta como composição média 87,5 % de água e 12,5% de sólidos totais. Desse último, podem ser divididos em fração de gordura e sólidos não gordurosos. Dos sólidos não gordurosos, encontram-se as proteínas (caseína, albumina e globulinas), lactose, cinzas e vitaminas. A legislação brasileira estabelece o teor mínimo de lactose de 4,3g a cada 100g de leite (BRASIL, 2018).

Em relação aos carboidratos presentes no leite, a lactose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranosose) é a mais abundante e representa cerca de 70% dos sólidos do soro do leite. É formada por dois monossacarídeos, a glicose e a galactose (ANDRADE, 2005; VALSECHI, 2013). A lactose é um dissacarídeo que se origina da glicose do sangue do tecido mamário do animal que se isomeriza em galactose e, por fim, liga-se à glicose remanescente para formar a lactose (BEYER, 2002; MÜLER, 2002; ORDÓNEZ, 2009).

Diante de todas as vantagens do leite, vale salientar que quase 70% da população adulta mundial não consegue digerir a lactose (principal carboidrato do leite) e, por esse motivo, a hidrólise total ou parcial dela, a partir da enzima lactase, viabiliza o consumo de produtos lácteos. Esse distúrbio é conhecido como

Intolerância à lactose (INGRAM et al., 2009).

A enzima lactase é a responsável pela hidrólise da lactose, sendo ela encontrada naturalmente no organismo humano. No entanto, várias pessoas possuem deficiência em sua produção. Quando tal fato ocorre, o consumidor acaba não hidrolisando os produtos lácteos, ocorrendo retenção de água (pela pressão osmótica do intestino) e também, ao chegar ao intestino grosso, a lactose acaba sendo fermentada por microrganismos produtores de gases causando desconforto à pessoa (um dos sintomas característicos desse distúrbio). A lactase é o nome comum dado à enzima β -D-galactosidase, uma hidrolase que separa a lactose em β -D-galactose e α -D-glicose (CARMINATTI, 2001; FAEDO, 2013; TREVISAN, 2008).

De acordo com a RDC nº 135, de 8 de fevereiro de 2017 (BRASIL, 2017), que “aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre os alimentos para dieta com restrição de lactose”, o alimento pode ser declarado como isento de lactose quando apresentar quantidade de lactose não superior a 100 (cem) miligramas por 100 (cem) gramas ou mililitros do produto. Para declaração como baixo teor de lactose, a quantidade de lactose deve estar entre 1 (um) grama e menor 100 (cem) miligramas, considerando a mesma quantidade de alimento anterior. Já a RDC nº 136, de 8 de fevereiro de 2017 (BRASIL, 2007), que “estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos”, exige que todo alimento com quantidade de lactose superior a 100 (cem) miligramas por 100 (cem) gramas ou mililitros do alimento apresente em seu rótulo a declaração “Contém lactose”.

Os principais métodos empregados para quantificação de açúcares são a leitura do °Brix (método por refratômetro), Somogyi-Nelson, fenol-sulfúrico (métodos espectrofotômetros), Lane-Eynon ou reação de Fehling (método titulométrico) e

também uso de sensores eletroquímicos e métodos óticos (SILVA et al., 2003). No entanto, quando se trata de quantificação da lactose, principal açúcar presente no leite, o método mais difundido é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por índice de refração.

No cromatógrafo a amostra passa por uma coluna permeando uma fase estacionária, por intermédio de uma fase móvel. Os solutos possuem diferentes afinidades com a fase estacionária, dessa forma eles se distribuem entre as duas fases. As substâncias com maior afinidade com a fase estacionária movem-se mais lentamente na coluna, e as substâncias com menor afinidade movem-se com maior velocidade. Com o passar do tempo, ao sair da coluna, os açúcares passam por um detector, que emite um sinal, registrado em um cromatograma. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (ou HPLC, do inglês “High Performance Liquid Chromatography”) é o método de referência cromatográfico usado em análises de compostos não-voláteis, ou seja, quando a cromatografia gasosa não é aplicada (SKOOG, HOLLER E CROUCH, 2006). Os componentes de um HPLC são o reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel, sistema de introdução da amostra, coluna cromatográfica, detector de sinal e processador de sinal.

O índice crioscópico (IC) ou ponto de congelamento é empregado na detecção de fraudes envolvendo a adição de água ao leite ou mesmo como um indicativo da ineficiência do sistema de ordenha. A temperatura média de congelamento do leite é menor (devido à presença de lactose e sais minerais) que da água pura e corresponde a $-0,550^{\circ}\text{C}$ (FACHINELLI, 2010; RODAS et al., 2014).

Variações do percentual de água no leite podem ser diferentes conforme a raça do gado, sua alimentação, bem como o tempo de lactação (PINHEIRO, 2015).

Muitas indústrias de laticíneos tem utilizado a crioscopia (por ser uma

característica constante do leite e uma análise rápida e de fácil realização) como confirmação da hidrólise de lactose em produtos de baixo teor ou considerado isentos desse carboidrato. No entanto, não há confirmações na literatura que valida essa aplicação.

Os métodos envolvidos na detecção de carboidratos possuem princípios que os diferem completamente e a escolha de um método para cada situação deve-se levar em conta a amostra a ser analisada, a viabilidade técnica, o tempo de resposta, o custo empregado e a confiabilidade requerida.

O objetivo desse trabalho foi comparar dois métodos de quantificação de lactose, a crioscopia e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), verificando a sensibilidade de detecção, a fim de atender aos requisitos necessários aos produtos comercializados como isento ou baixo teor de lactose.

2. Materiais e Métodos

2.1 Equipamentos

2.1.1 Crioscópio

Primeiramente foi realizada a calibração do equipamento eletrônico com amostras padrão de ponto de congelamento (crioscópio eletrônico digital de bancada modelo MK 540 Flex) e coletados 2,5 mL de amostra, que foram colocadas em um tubo específico do crioscópio digital para medição. O valor foi lido diretamente no visor do equipamento, sendo expresso em escala Hortvet ($^{\circ}\text{H}$). Para conversão de $^{\circ}\text{H}$ para graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$) empregou-se a Equação 1.

$$T(^{\circ}\text{C}) = 0,9656 \times T(^{\circ}\text{H}) \quad (1)$$

2.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Primeiramente, cada amostra foi submetida a uma etapa de preparação, no qual são removidos componentes que não são lactose, tais como gordura e sais minerais, conforme item 2.2.1. Utilizou-se o cromatógrafo modelo LC-20 AT Prominence, com detector RID (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) e coluna Hi-Plex Ca 8 μ m (água ultrafiltrada como eluente, com vazão de 0,6 mL/min, pressão da coluna a 16 bar e volume de injeção de 20 μ L).

2.2 Reagentes e soluções

2.2.1 Hidrólise da lactose

Para a hidrólise da lactose empregou-se a enzima lactase pura (LACTLOW L, Granolab/Granotec) originária de *Bacillus licheniformis*. Colocou-se 600 mL de leite em banho ultratermostatizado a 40°C (temperatura ótima da enzima, segundo recomendações do fabricante), verificando com termômetro a estabilização da temperatura. A enzima foi adicionada na quantidade recomendada de 0,12% em relação ao volume de leite (separou-se uma quantidade de leite sem adição de enzima para análise) e, após 5 minutos de hidrólise, retirou-se uma alíquota de 60 mL em tubo de vidro e fez-se a inativação da enzima com imersão dos recipientes em água em ebulição por 3 minutos, seguido de banho em gelo para choque térmico. As amostras foram refrigeradas até o momento da análise seguinte. O mesmo procedimento foi realizado para as alíquotas retiradas nos tempos 20, 40, 60, 80, 100 e 105 minutos de hidrólise.

2.1.2 Extração e Clarificação da Amostra

Etapa para separação de componentes que não são lactose, como proteínas, gorduras e alguns sais minerais. Utilizou-se a metodologia de Cataldi et. al (2003) e a metodologia Internacional 997.05 da AOAC (2003), com algumas modificações em relação as proporções de reagentes, devido a característica da amostra

analisada. A amostra foi diluída na proporção ¼ (leite/água ultrafiltrada) e, para cada 100 mL de mistura adicionou-se 1mL de solução de Carrez I ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) e 1 mL de solução Carrez II ($Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$). Deixou-se sob agitação constante e em seguida passou por centrifugação (centrífuga modelo Neoguge 15R, Heal Force) por 30 minutos a 4°C e 4000 rpm. Feito isso, foram passados por um filtro específico (13mm de diâmetro e 0,22 μ m de porosidade) para o HPLC. Os resultados foram obtidos por leitura da área do pico da lactose e usado para cálculo da concentração de lactose por 100 mL de leite, levando em consideração o fator de diluição da amostra.

2.3 Amostra

Utilizou-se quatro amostras de leite UHT diferentes, repetindo-se três vezes o mesmo procedimento e análises para cada amostra.

2.5 Análise Estatística

Análise por meio do teste de *Kruskal-Wallis* (método não paramétrico empregado na comparação de três ou mais populações) a 5% de significância, comparando cada método com o tempo de hidrólise e Regressão Linear para comparação entre a CLAE e Crioscopia.

3. Resultados e Discussão

Os resultados da análise de concentração de lactose por CLAE e Índice Crioscópico foram agrupados na Tabela 1. Após aplicação do teste de *Kruskal-Wallis* a 5% de significância, verificou-se que o tempo de hidrólise exerceu influência na concentração de lactose no leite avaliado por HPLC, de tal forma que a concentração de lactose diminuiu com o aumento de tempo de hidrólise.

Na análise de crioscopia, o índice crioscópico foi influenciado pelo tempo de

hidrólise, sendo o primeiro menor quanto maior for o segundo. No entanto, em relação às quatro repetições realizadas, avaliando individualmente cada método e no mesmo tempo de hidrólise, a 5% de significância, constatou-se que os resultados são diferentes estatisticamente.

A utilização da crioscopia como medida indireta da hidrólise de lactose tem sido muito difundida na indústria de laticínios devido às baixas variações na resposta, conforme observado pelo desvio padrão da Tabela 1, e também por ser um equipamento já presente na indústria, uma vez que é uma das análises obrigatória para recebimento de leite, conforme legislação brasileira vigente (BRASIL, 2018). Sendo assim, torna-se economicamente mais viável o uso desse recurso, sem necessidade de custos com implementação e análises de baixo custo e de rápidas respostas.

Trevisan (2008) realizou um estudo comparando a análise de leite com e sem lactose, sendo empregado as análises de pH, acidez (°D), gordura, Extrato Seco Total (EST) e Extrato Seco Desengordurado (ESD), proteína, sólidos solúveis, densidade e crioscopia. Para o último, as amostras sem lactose

apresentaram uma diferença no índice crioscópico em mais de 30%, o que comprovou que a hidrólise da lactose promove a redução significativa do IC. Essa variação é decorrente ao aumento dos açúcares redutores no leite hidrolisado, bem como o consumo de água durante a reação. Em contrapartida, as demais técnicas não apresentaram resultados com variações superiores a 5%, o que inviabiliza o seu uso. O estudo foi realizado apenas no leite com e sem lactose, o que diferencia desse presente trabalho, no qual foi avaliado o IC para diferentes concentrações de lactose.

A legislação do Brasil estabelece a quantificação de lactose por CLAE como sendo a metodologia oficial (ISO 9622-IDF 141), no qual tem sido aceito o uso de analisadores de infravermelho que utilizam a cromatografia como parâmetro de calibração. Silveira et al. (2004) avaliaram o uso do método por infravermelho em comparação com o de referência (CLAE), as metodologias não apresentaram diferença significava.

Tabela 1

Resultados obtidos da análise de lactose por HPLC e Ponto de Congelamento por Crioscopia.

Repetição	Tempo de Hidrólise (min)	Lactose (g/100mL) ^a		Ponto de Congelamento (°C) ^b	
1	0	4,835	± 0,256	-0,525	± 0,001
	5	3,535	± 0,145	-0,615	± 0,001
	25	1,596	± 0,097	-0,748	± 0,001
	45	0,693	± 0,018	-0,820	± 0,001
	65	0,263	± 0,008	-0,852	± 0,001
	85	0,084	± 0,003	-0,863	± 0,002
	105	0,000	± 0,000	-0,873	± 0,001
2	0	4,401	± 0,138	-0,523	± 0,001
	5	3,533	± 0,06	-0,648	± 0,001
	25	1,690	± 0,012	-0,757	± 0,001
	45	0,569	± 0,014	-0,809	± 0,002
	65	0,238	± 0,031	-0,831	± 0,001
	85	0,087	± 0,002	-0,842	± 0,000
	105	0,000	± 0,000	-0,853	± 0,001
3	0	5,323	± 0,042	-0,525	± 0,001
	5	3,266	± 0,002	-0,657	± 0,000
	25	2,162	± 0,113	-0,760	± 0,001
	45	1,094	± 0,102	-0,803	± 0,000
	65	0,250	± 0,018	-0,829	± 0,001
	85	0,092	± 0,001	-0,846	± 0,017
	105	0,000	± 0,000	-0,875	± 0,001
4	0	4,727	± 0,142	-0,524	± 0,000
	5	4,078	± 0,041	-0,646	± 0,001
	25	1,845	± 0,008	-0,755	± 0,000
	45	0,765	± 0,036	-0,792	± 0,001
	65	0,350	± 0,249	-0,824	± 0,001
	85	0,075	± 0,002	-0,852	± 0,000
	105	0,000	± 0,000	-0,865	± 0,002
Média geral	0	4,822	± 0,372	-0,524	± 0,001
	5	3,584	± 0,323	-0,641	± 0,016
	25	1,823	± 0,233	-0,755	± 0,005
	45	0,780	± 0,208	-0,806	± 0,011
	65	0,275	± 0,117	-0,834	± 0,011
	85	0,085	± 0,007	-0,851	± 0,011
	105	0,000	± 0,000	-0,867	± 0,009

^a Quantificação de lactose por HPLC^b Ponto de Congelamento por Crioscopia

De acordo com a Tabela 1, pode se observar que a variação da concentração de lactose provocou a variação no ponto de congelamento (PC) do leite, tendo uma relação de linearidade entre ambas. Tronco (1997) relatou a variação do Índice Crioscópico (IC) como proporcional ao extrato seco, em especial a lactose e cloretos.

Observa-se também que a hidrólise da lactose provoca a diminuição do PC do leite, tornando tão distante de 0°C (ponto de congelamento da água a 1 atm) quanto menor for a concentração de lactose (nesse caso ocorre o aumento de concentração dos monossacarídeos glicose e galactose). Tal verificação confirma que a crioscopia pode ser empregada como método indireto para estimativa do teor de lactose. No entanto, deve se atentar que o leite necessita ser avaliado antes da hidrólise ou que se tenha conhecimento que o produto não se encontra adulterado, pois a presença de outros componentes, sejam eles sólidos ou líquidos, irão interferir nos resultados do índice crioscópico.

Ainda se tratando da Tabela 1, verificou-se que os lotes de leite avaliados apresentaram concentrações iniciais de lactose diferentes, sendo um ponto limitante no intercâmbio dos métodos, pois seria necessário o estudo do ponto de congelamento para cada concentração de lactose inicial, haja visto a diferença estatística supracitada. Tronco (1997) abordou sobre as influências que podem modificar a matéria inicial, sendo a alimentação do animal, período de lactação, raça, doenças, processo de pasteurização, estação no ano e nas condições de conservação.

As repetições realizadas foram plotadas e apresentadas nas Figuras 3-4, bem com a média geral. Esse último foi apresentado mesmo diante da diferença estatística relatado, pois ainda assim, de forma menos específica que os anteriores, pode se apresentar como estimativa da concentração de lactose em leite, uma vez que foi contemplado uma faixa de

concentração maior e mais condizente com a do dia a dia.

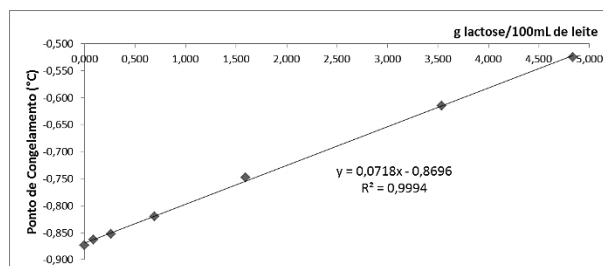


Fig. 1. Regressão linear dos resultados da repetição 1, comparando a resposta do HPLC (g lactose/100mL de leite) e Crioscopia (°C).

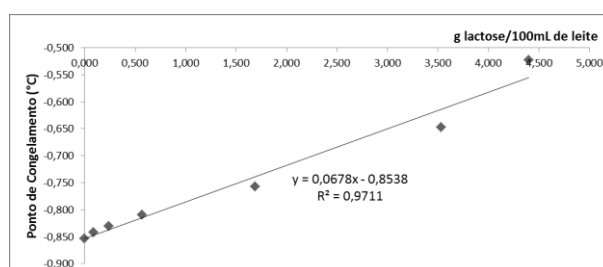


Fig. 2. Regressão linear dos resultados da repetição 2, comparando a resposta do HPLC (g lactose/100mL de leite) e Crioscopia (°C).

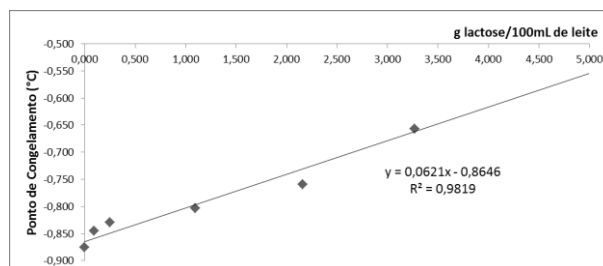


Fig. 3. Regressão linear dos resultados da repetição 3, comparando a resposta do HPLC (g lactose/100mL de leite) e Crioscopia (°C).

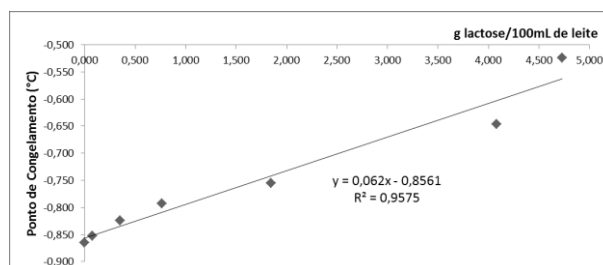


Fig. 4. Regressão linear dos resultados da repetição 4, comparando a resposta do HPLC (g lactose/100mL de leite) e Crioscopia (°C).

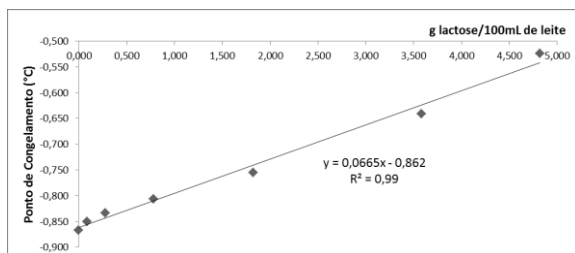


Fig. 5. Regressão linear dos resultados da média das quatro repetições, comparando a resposta do HPLC (g lactose/100mL de leite) e Crioscopia (°C).

Por aplicação do teste de *Kruskal-Wallis*, a 5% de significância, os valores de ponto de congelamento não variaram após 65 minutos de hidrólise, ou seja, a crioscopia perde sensibilidade para leites com baixas concentrações de lactose. Desse modo, nessas condições, a crioscopia não deve ser utilizada com o objetivo de avaliar a lactose residual, pois não atende aos preceitos da legislação vigente para produtos com baixo teor de lactose ou isentos.

4. Conclusão

No desenvolvimento e análise desses alimentos, a quantificação de lactose pelo método indireto de crioscopia pode ser usado quando existe a presença da lactose em altas concentrações, para baixas concentrações (abaixo de 0,5%) ela não apresenta um valor exato. Sendo assim, recomenda-se a análise por outros métodos, como o HPLC.

Agradecimentos

Aos técnicos do Laboratório de Engenharia de Alimentos por todo o apoio recebido.

Referências

ANDRADE, A. C. Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo utilizando lactase e a *Saccaromyces cerevisiae*. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, 2005.

AOAC INTERNATIONAL. Official Methods of Analysis (15 (rev 2)). Gaithersburg, MD: AOAC International, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº76 de 26 de novembro de 2018. Diário Oficial da União, 30 nov. 2018. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis >. Acesso em: 22 de setembro de 2019.

BRASIL, Resolução RDC Nº135, de 8 de fevereiro de 2017. Aprova o “regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre os alimentos para dieta com restrição de lactose”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis >. Acesso em: 22 de setembro de 2019.

BRASIL, Resolução RDC Nº136, de 8 de fevereiro de 2017. Estabelece os “requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: < www.anvisa.gov.br/legis >. Acesso em: 22 de setembro de 2019.

CARMINATTI, A. C. Ensaios de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando β -galactosidase *Kluyveromyces Lactis*. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2001.

CATALDI, T. R. I., ANGELOTTI, M., & BIANCO, G. Determination of mono- and disaccharides in milk and milk products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 485, 43–49, 2003.

FACHINELLI, C. Controle de qualidade do leite – Análises físico-químicas e microbiológicas. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Bento Gonçalves, RS, 2010.

FAEDO, R. Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associadas à hidrólise enzimática. *Revista CIATEC*. Passo Fundo, Rio Grande do Sul, v. 3, p. 44-54, 2013.

INGRAM C. J. E., MULCARE C. A., ITAN Y., THOMAS M. G., SWALLOW D. M. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum Genet* 2009; 124(6):579-591.

PINHEIRO, L. A. F. Detecção de fraude no leite com água pela capacidade térmica volumétrica.

- Dissertação (mestrado), Juiz de Fora, Minas Gerais, 2015.
- POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudos das características físico-químico e microbiológicos dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo/Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.
- RODAS, M. A. B. et al. Leite pasteurizado e ultra-alta temperatura (UAT): Avaliação do índice criscópico e valor de pH. *Bol. Inst. Adolfo Lutz*, v. 24, p. 57-57, 2014.
- SILVA, R. N. et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-341, dezembro de 2003.
- SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; CANÇADO, S. V.; FERRAZ, V. Comparison between standard methods and electronic analyses for measurement of the bovine milk composition. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n.6, dezembro de 2004.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Principles of instrumental Analysis*. 6ed., USA: Cengage Learning, 2006.
- TREVISAN, A. P. Influências de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2008.
- TRONCO, V. M.. *Controle Físico-Químico do Leite. Manual para Inspeção da Qualidade do leite*. Santa Maria, RS: UFSM, 1997. Cap. V, p. 103-105.
- VALSECHI, O. A. *O leite e seus derivados. Tecnologia de produtos de origem animal*, Universidade Federal de São Carlos. Araras, SP, 2013.