



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

COORDENAÇÃO DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANTONINA MADALENA SANTANA PONTES

ESTUDO ECONÔMICO E CINÉTICO DE DUAS LACTASES COMERCIAIS

PALMAS – TO

2019

ANTONINA MADALENA SANTANA PONTES

ESTUDO ECONÔMICO E CINÉTICO DE DUAS LACTASES COMERCIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação,
apresentado ao curso de Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal do
Tocantins como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Tarso da Costa Alvim

PALMAS – TO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

P814e Pontes, Antonina Madalena Santana.
Estudo econômico e cinético de duas lactases comerciais. / Antonina Madalena Santana Pontes. – Palmas, TO, 2019.
65 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Engenharia de Alimentos, 2019.
Orientador: Tarso da Costa Alvim
Coorientadora : Patrícia Martins Guarda

1. Intolerância a lactose. 2. Delineamento Central Composto Rotacional. 3. Lactase. 4. Hidrólise. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o Trabalho de Conclusão de Curso.

ESTUDO ECONÔMICO E CINÉTICO DE DUAS LACTASES COMERCIAIS

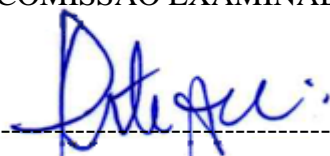
Elaborado por

Antonina Madalena Santana Pontes

Como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

DATA DA APROVAÇÃO 17/04/2019.

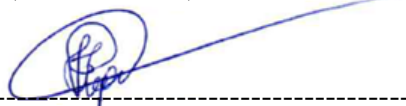
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. (o) Dr. Tarso da Costa Alvim
(Professor Orientador)



Prof. (a) Ms. Patrícia Martins Guarda
(Examinadora)



Prof. (o) Ms. Itamar Souza Reges
(Examinador)

“E acrescentou: Seja forte e corajoso! Mãos ao trabalho! Não tenha medo nem desanime, pois Deus o Senhor, o meu Deus, está com você. Ele não o deixará nem o abandonará até que se termine toda a construção do templo do Senhor”.

1 Crônicas 28, 20.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela permissão de alcançar os meus objetivos. Por me acompanhar, dar forças e persistência em todos os dias da minha vida. Pelo cuidado e proteção durante toda essa caminhada.

Ao meu querido orientador Tarso Alvim. Obrigada por todo o conhecimento transferido a mim, pela serenidade, cuidado, pela paciência, dedicação, sabedoria, competência e disposição constante para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha amável mãe Leane Cristina, minha base, que sempre ao longo dessa cansativa caminhada e cheia de obstáculos este ao meu lado. Por nunca me abandonar, por palavras de conforto, pelas orações ao meu favor, por conselhos para seguir o caminho certo, por acreditar que eu chegaria ao fim com êxito. obrigada mãe por tudo. Te amo!

Aos meus pais Jailson, Leandre e Evaldo, que cada um com suas diferentes formas esteve comigo, desde o início da minha vida até esse grande dia, obrigada pelo apoio incondicional.

Às minhas irmãs Ana Clara e Emannuella pelo amor e companheirismo dedicados a mim, que mesmo à distância, sempre me apoiaram.

Às minhas avós Leonilia e Terezinha, por nunca deixaram faltar amor, carinho e incentivos independente da distância, por ajudar no que podiam para a realização desse sonho.

À minha bisavó Olinda (*in memoriam*), por ter me ensinado valores que carrego comigo em todos os momentos. Obrigada por me olhar e proteger daí do céu. Saudades eternas!

Ao meu namorado Cristóvão Júnior, que jamais me negou apoio, por todo amor, dedicação, paciência, compreensão e companheirismo. Obrigada amor, por aguentar tantas crises de estresse e ansiedade. Por ouvir minhas lamentações e pelo suporte emocional. Agradeço a Deus por ter colocado você em meu caminho e que possamos continuar felizes para todo sempre, te amo!

Aos meus professores, por todo conhecimento e experiência repassada, sem vocês não estaria fechando esse ciclo, vocês são de suma importância para esse sucesso.

Ao casal Guarda, minha orientadora e meu co-orientador de iniciação científica, Patrícia e Emerson, pelo carinho, conhecimento, oportunidade e experiências na participação de projetos. Meu eterno obrigada.

Ao casal Reges, por serem meus tutores dentro da faculdade. Obrigada Itamar e Cilene, por todos os conselhos, conhecimento e direcionamento para o sucesso.

Aos meus amigos de turma “jiló doce”, em especial as minhas amigas, Ysnayla, Sara e

Lara, por todos os bons e difíceis momentos. Pessoas as quais me ajudaram muito nesses anos de convivência. Obrigada pelo companheirismo, carinho, por sempre estarmos juntas, por não medirem esforços para me ajudar.

Agradeço também, às minhas amigas Erika e Lara, principalmente nessa reta final, estando sempre tão perto de mim. Vocês me proporcionaram momentos incríveis. Obrigada por compartilharmos sorrisos, lágrimas, aprendizado e aflições. Obrigada pelos incentivos, conselhos e orações, sendo sinais de eternidade na minha vida. Assim como já dizia Padre Fábio de Melo “Quem tem amigo tem um anjo”. Infinita gratidão.

Agradeço imensamente a minha colega do LAPEQ e também mais uma amiga que Deus deu a honra de me conceder, Larissa Gualberto, o meu anjo! que desde do início sempre ficou ao meu lado, sendo na vida pessoal e na faculdade, sem você não conseguiria ter finalizado esse trabalho. Obrigada por sempre me acalmar, ou até mesmo por se desesperar junto comigo. Você viveu todas as alegrias e aflições nessa reta final junto comigo. Obrigada amiga, por nunca medir esforços para me ajudar.

Aos meus amigos dos extremos “pipoco do trovão”, parceria da fé até as festas. Obrigada por sempre me proporcionarem momentos de alegrias.

A toda equipe de trabalho do LAPEQ em especial ao Fabrício, Álvaro e Larissa, pelos bons momentos de aprendizados juntos, e por não terem medido esforços para me ajudar e, acima de tudo, por nossa amizade.

Aos colaboradores Dener, Danylo e Glêndara, pela ajuda e apoio durante o experimento, por todas as contribuições significativas e essenciais dadas a este trabalho.

Agradeço a minha supervisora do estágio curricular, Daphynni Moreira. Obrigada por todo conhecimento, experiência, dedicação, cuidado e paciência. Pelos momentos de alegria e descontração que vivemos nesse período. Levo comigo um exemplo de pessoa e profissional a se seguir.

À minha família do EJC, obrigada pelos momentos junto a Jesus, e por todas as orações.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A lactose é o principal açúcar do leite, sendo dividida em glicose e galactose por ação da enzima lactase. Algumas pessoas têm deficiência dessa enzima no organismo, portanto, ocasionando a intolerância à lactose. Nesse contexto, há a necessidade de se produzir alimentos zero lactose, tendo em vista a necessidade da otimização dos processos de fabricação, e também a produção de alimentos de qualidade e seguros ao consumidor. Neste trabalho, avaliou-se a hidrólise da lactose pelas enzimas comerciais β -galactosidase de origem de levedura *Kluyveromyces lactis*, e do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*. Nesse cenário, para o estudo da hidrólise da lactose foi empregado um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), analisadas em 5 níveis de variação para avaliar o efeito de diferentes fatores, sendo que concentração e tempo foram iguais para as duas lactases, e a temperatura partiu-se do ponto central, onde ocorre a maior atividade de cada enzima. Para a *K. lactis* utilizou-se temperaturas de 9,8; 20; 35; 50; e 60,2°C e para *A. oryzae* 29,8; 40; 55; 70; e 80,2°C. Após os ensaios serem executados conforme o delineamento, realizou-se a quantificação da lactose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com detector de índice de refração (CLAE-IR). Os resultados foram avaliados pela (ANOVA), e superfícies de resposta, com limite de significância de 5% ($p < 0,05$). Os modelos de regressão de hidrólise da lactose explicaram adequadamente ao nível de 95%, obtendo-se uma variação dos dados de $R^2 = 0,8159$, para a *K. lactis* e $R^2 = 0,8895$ para *A. oryzae*, levando em consideração que os termos lineares (temperatura e concentração) e quadráticos (temperatura) foram significativos nas duas enzimas. O máximo de hidrólise alcançado pelos experimentos foi de 98,59% para *K. lactis* a 35°C e 94,14% para *A. oryzae* a 55°C, para ambas, a concentração de 0,70%(v/v) e o tempo 195 minutos, foram os mesmos. Com essas variáveis, gerou-se gráficos de superfícies de resposta, para análise das melhores condições otimizadas segundo o modelo experimental, sendo de 145 minutos para as duas, uma concentração de 0,49%(v/v) a 30,80°C para *K. lactis* (100%) e concentração de 0,51%(v/v) a 41,40°C para *A. oryzae* (98,24%). Apesar dos altos valores de hidrólise obtidos, apenas a *K. lactis* consegue atender a RDC n°135/2017 para produtos zero lactose. Por conseguinte, o produto final apresentou 0,07 g/100 ml, resultado abaixo do exigido. Então, levando em consideração que as enzimas utilizadas foram adquiridas em comércio local, o intuito é levar ao consumidor a informação do custo-benefício do produto utilizado no controle da intolerância a lactose que nesse caso a *K. lactis* foi economicamente mais viável.

Palavras-chave: Lactase, hidrólise, intolerância a lactose, Delineamento Central Composto Rotacional.

ABSTRACT

Lactose is the main sugar in milk, being divided into glucose and galactose by the action of the enzyme lactase. Some people have deficiency of this enzyme in the body, therefore, causing lactose intolerance. In this context, there is a need to produce zero lactose foods, due to the need to optimize manufacturing processes, as well as the production of quality and safe food to the consumer. In this work, the hydrolysis of lactose by the commercial enzymes β -galactosidase of yeast origin *Kluyveromyces lactis*, and the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* was evaluated. In this scenario, a Rotational Composite Central Design (DCCR) was used to study the hydrolysis of lactose, analyzed in 5 levels of variation to evaluate the effect of different factors, and the concentration and time were the same for the two lactases, and the temperature the central point where the highest activity of each enzyme occurs. For *K. lactis*, temperatures of 9.8; 20; 35; 50; and 60.2°C and for *A. oryzae* 29.8; 40; 55; 70; and 80.2°C. After the tests were carried out according to the design, the quantification of the lactose was performed by High Efficiency Liquid Chromatography, with refractive index detector (HPLC-RID). The results were evaluated by (ANOVA) and response surfaces, with significance limit of 5% ($p < 0.05$). The regression models of lactose hydrolysis adequately explained at the 95% level, obtaining a variation of the data of $R^2 = 0.8159$, for *K. lactis* and $R^2 = 0.8895$ for *A. oryzae*, taking into account that the linear (temperature and concentration) and quadratic (temperature) terms were significant in both enzymes. The maximum hydrolysis reached by the experiments was 98.59% for *K. lactis* at 35 ° C and 94.14% for *A. oryzae* at 55 ° C for both the concentration 0.70% (v/v) and the time 195 minutes, were the same. With these variables, response surface graphs were generated to analyze the best optimized conditions according to the experimental model, with 145 minutes for both, a concentration of 0.49% (v/v) at 30,80°C for *K. lactis* (100%) and 0.51% (v/v) concentration at 41.40°C for *A. oryzae* (98.24%). Despite the high hydrolysis values obtained, only *K. lactis* can meet RDC No. 135/2017 for zero lactose products. Therefore, the final product had 0.07 g / 100 ml, a result below that required. Therefore, taking into account that the enzymes used were purchased locally, the purpose is to provide the consumer with the cost-benefit information of the product used to control lactose intolerance, which in this case *K. lactis* was economically more viable.

Keywords: Lactase, hydrolysis, lactose intolerance, Rotational Compound Central Design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação de formação da Lactose	17
Figura 2 - Hidrólise enzimática da lactose no intestino delgado	20
Figura 3 - Representação da hidrólise da lactose catalisada pela β -galactosidase	21
Figura 4 - Estrutura bidimensional da β -D-galactosidase do fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	22
Figura 5 - Curva padrão da lactose	32
Figura 6 - Gráfico de Pareto dos principais efeitos das variáveis segundo DCCR para <i>KL</i>	36
Figura 7 - Gráfico de Pareto dos principais efeitos das variáveis segundo DCCR para <i>AO</i>	37
Figura 8 - Superfície de resposta e curvas de contorno (a) e (b) para a <i>Kluyveromyces lactis</i>	39
Figura 9 - Superfície de resposta e curvas de contorno (a) e (b) para a <i>Aspergillus oryzae</i>	39
Figura 10 - Preparo das amostras para serem hidrolisadas.....	64
Figura 11 - Hidrólise do leite UHT na incubadora shaker	64
Figura 12 - Alíquotas dos ensaios hidrolisados pela <i>K. lactis</i> para quantificação da lactose por CLAE.....	65
Figura 13 - Equipamento de Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis de variação da lactase <i>Kluyveromyces lactis</i>	27
Tabela 2 - Variáveis independentes e níveis de variação da lactase <i>Aspergillus oryzae</i>	28
Tabela 3 - Matriz do planejamento 2 ³ (DCCR) para ação da lactase <i>Kluyveromyces lactis</i>	28
Tabela 4 - Matriz do planejamento 2 ³ (DCCR) para ação da lactase <i>Aspergillus oryzae</i>	29
Tabela 5 - Condições cromatográficas na determinação da lactose	30
Tabela 6 - Dados da curva padrão da lactose determinada por CLAE.....	32
Tabela 7 - Matriz dos ensaios do DCCR com as respostas da hidrólise da lactose por KL.....	33
Tabela 8 - Matriz dos ensaios do DCCR com as respostas de hidrólise da lactose da AO	34
Tabela 9 - Coeficientes de regressão do DCCR para ação da <i>Kluyveromyces lactis</i>	35
Tabela 10 - Coeficientes de regressão do DCCR para a ação da <i>Aspergillus oryzae</i>	35
Tabela 11 - Modelo de regressão para a hidrólise da lactose referente a cada lactase (Y1)	37
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para otimizar a produção de β -galactosidase (KL)	37
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) para otimizar a produção de β -galactosidase (AO).....	38
Tabela 14 - Resumo e relação entre a porção de lactose no alimento com a declaração obrigatória no rótulo do produto.....	40
Tabela 15 - Concentração de lactose das duas enzimas no limite exigido para produto com teor baixo de lactose conforme a RDC135/2017.....	41
Tabela 16 - Concentração de lactose da KL no limite exigido para produto zero lactose conforme a RDC135/2017.....	41
Tabela 17 - Relação de produtos e valores (R\$) utilizados para a execução do experimento..	43
Tabela 18 - Análise econômica das melhores condições para <i>Kluyveromyces lactis</i> e <i>Aspergillus oryzae</i>	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	Composição do leite	14
3.2	Lactose	15
3.3	Intolerância a lactose	17
3.4	Lactase	20
3.5	Métodos para hidrólise da lactose	23
3.5.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	23
3.5.2	Conjuntos enzimáticos	24
3.5.3	Índice crioscópico	24
3.6	Produtos lácteos sem lactose	24
3.7	Delineamento experimental	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Materiais	27
4.2	Métodos	27
4.2.1	Delineamento experimental do processo de hidrólise enzimática	27
4.2.2	Hidrólise da lactose	29
4.2.3	Amostragem	30
4.2.4	Quantificação do teor de lactose	30
4.2.5	Análise dos dados	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1	Determinação da lactose por Cromatografia líquida de alta eficiência	32
5.2	Ensaio de hidrólise da lactose	33
5.2.1	Análises dos coeficientes de regressão e gráfico de Pareto	35
5.2.2	Análise de variância ANOVA	37
5.2.3	Análise das Superfícies de resposta	38
5.2.4	Análise comparativa com a legislação	40
5.3	Estudo econômico das melhores condições	42

6	CONCLUSÃO	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	ANEXOS	55
	APÊNDICE A - FIGURAS OBTIDAS AO DECORRER DOS EXPERIMENTOS.	64

1 INTRODUÇÃO

O leite é apontado como um alimento rico, devido à diversidade dos componentes nutricionais em sua composição. É uma mistura homogênea de água, proteínas, cálcio, carboidratos, gordura, vitaminas, entre outros, sendo estes considerados indispensáveis na dieta humana (FERNANDES & MARICATO, 2010; RAMOS, 2016).

Dentre os carboidratos, o que se encontra em maior quantidade no leite, é a lactose, com uma concentração por volta de 5%. É um dissacarídeo formado por dois monossacarídeos, a glicose e galactose, que são unidas por uma reação glicosídica (CASSOLI et al., 2010; BRITO et al., 2015).

A separação da lactose em monossacarídeos pode ser realizada por enzimas chamadas lactases, sendo estas encontradas no intestino delgado. A lactase é encarregada por essa hidrólise, para que a glicose e galactose sejam mais facilmente absorvidas pela mucosa intestinal. Entretanto, muitas pessoas não sintetizam a lactase no organismo, ocasionando assim a intolerância a lactose. (PERATI et al., 2016; MATTAR et al., 2010; RAMALHO & GANECO, 2016).

Essa intolerância se dá pela incapacidade do organismo em digerir a lactose, isto devido à redução total ou parcial da ação da enzima lactase (BERNI, 2016). Cerca de 70% das pessoas ao redor do mundo apontam algum grau de intolerância à lactose, motivo esse relacionado à genética, idade ou doença (LULE et al., 2016; RAMALHO & GANECO, 2016).

Nesse contexto, há a necessidade de se produzir alimentos “zero lactose”, para que as pessoas intolerantes tenham uma alternativa de consumo de produtos derivados do leite e para as indústrias crescerem suas produções com novos produtos. Essa necessidade aumenta a importância a efetivação de procedimentos analíticos competentes, e de baixo custo, para a quantificação da lactose. Leva-se em consideração que essa hidrólise pode ser realizada de diversas maneiras, tais como: física, química e enzimática (PAIVA et al., 2018; RAMOS, 2016).

Visto que este mercado se amplia diariamente, a indústria de alimentos visualiza então a oportunidade de inovar, ampliar e aperfeiçoar produtos de forma que atendam a necessidade e a exigência tanto de consumidores com restrição ao consumo de lactose como aos que visam uma alimentação saudável (MARINHO, 2014).

Frente a essas circunstâncias, desenvolveu-se o presente trabalho com o propósito de colaborar com a segurança alimentar e nutricional de intolerantes à lactose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar a eficiência e eficácia de duas enzimas com potencial para hidrolisar a lactose, utilizando-se um planejamento estatístico do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), visando atender à RDC nº 135 de 08/02/2017.

2.2 Objetivos específicos

- Efetuar ensaios de hidrólise da lactase sob diferentes parâmetros.
- Acompanhar os resultados da hidrólise do leite integral UHT por meio da técnica CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).
- Submeter os resultados à análise pelo delineamento DCCR, visando à obtenção dos ótimos da atividade enzimática das referidas enzimas *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis* para produção de produtos zero lactose.
- Efetuar o estudo econômico das condições que atendem a RDC nº135/2017.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Composição do leite

A composição do leite pode sofrer alterações, mas uma referência padrão de leite é uma combinação homogênea de 87,1% de água, e demais substâncias que se diversificam em 3,4% de proteínas, 3,9 % de gordura, 4,9 % de carboidratos (açúcares) e 0,7 % de sais minerais, além de outras vitaminas (NOGUEIRA et al., 2018).

É um fluido branco-opaco, com poucas mudanças de cor, que são resultados da reflexão da luz nos glóbulos de gordura, dos fosfatos insolúveis e da caseína. Com um sabor moderadamente doce, sendo consequência do equilíbrio entre os diversos componentes, como a lactose, que determina o sabor doce, o NaCl (salgado), a gordura e as proteínas (TONETTI, 2015).

Os componentes do leite são muito influenciados pela dieta e metabolismo do animal, considerando que a síntese do leite nas glândulas mamárias exige fortemente do esforço metabólico. Os componentes desse fluido classificam-se em dois seguimentos, sendo que, os primários encontram-se a água, as proteínas, a gordura e a lactose, e os constituintes secundários então os minerais e as vitaminas (SILVA, 2015).

A água é o composto mais abundante no leite, encontrando-se em forma de água livre, contribuindo como solvente, e como água ligada, sendo adotado á substâncias insolúveis. De acordo com o tipo de raça do gado, tempo de lactação e alimentação, esses fatores levam a uma variação do teor de água no leite (BEHMER, 1999).

A gordura do leite é um conjunto de lipídeos, constituída principalmente por triglicerídeos, na sua maioria (97 a 98%), os principais ácidos graxos que contém na gordura do leite são de cadeia curta, média ou longa podendo ser identificados no leite em diversas quantidades. Esse é o componente energético fundamental, sendo responsável por boa parte das características sensoriais do leite (PELIZZA, 2015).

A gordura contida no leite auxilia no transporte de vitaminas lipossolúveis, colesterol e outras substâncias solúveis em gordura, como os carotenoides (provitamina A). O teor de gordura no leite varia geralmente entre 3,5 e 5,3%, em razão de diferenças entre raças, estágio da lactação e de acordo com a alimentação dos animais (BARBOSA, 2017).

Dentre os sólidos presentes no leite, as proteínas correspondem em torno de 3% e 4% dos constituintes desse fluido. Essa porcentagem de proteína varia de acordo com a raça, alimentação, clima e saúde do animal entre outros, sendo que estes fatores são proporcionais á quantidade de gordura encontrada no leite, significando que quanto maior a quantidade do teor gordura, maior será o teor de proteínas (BRITO et al., 2015; BARBOSA, 2017).

As proteínas mais importantes do leite são as caseínas e as proteínas do soro, ou soroproteínas. As caseínas correspondem a cerca de 80% das proteínas totais e dividem-se em várias frações alfa1-caseína, alfa2-caseína, beta-caseína, kapa-caseína e proteínas do soro, beta-lactoglobulina e alfa-lactoalbumina. Sendo assim, as proteínas do soro equivalem a 20% fechando assim, o total de proteínas do leite (SANTOS e FONSECA, 2007; BRITO et al., 2013; BELOTI et al., 2015).

O leite é uma ótima fonte dos principais sais minerais necessários para a evolução dos jovens e representam 0,6 a 0,8 %. O cálcio e o fósforo presentes no leite apresentam uma grande disponibilidade. À vista disso, o leite é a principal fonte de cálcio para o crescimento dos ossos dos adolescentes e para a manutenção da completude dos esqueletos dos adultos. Do mesmo modo, é importante fonte de vitaminas, parte dessas, se unem com a gordura sendo, vitaminas A, D, E e K, e parte fica na fase aquosa. Nesse alimento, são encontradas mais de dez vitaminas diferentes entre si, que fazem parte do complexo B, apesar disso, a vitamina B2 não está disponível, e as outras estão presentes, mas, em pequenas porções. Assim como, também é, uma fonte de vitamina C (ácido ascórbico), entretanto essa vitamina na presença do calor é eliminada (BRITO et al., 2015; KLOBITZ, 2014; GRANATO E NUNES, 2016).

3.2 Lactose

Os carboidratos fundamentais encontrados no leite são à lactose, a glicose e a galactose. Dentre estes, o que se encontra em maior quantidade é a lactose, sendo sintetizada pelas glândulas mamárias, vindo a ser o carboidrato de fonte de energia principal para os bebês (CASSOLI et al., 2010; BRITO et al., 2015). A lactose no leite tem uma concentração em torno de 5% (4,7 a 5,2%), é um dos componentes que menos se submete a alterações, sendo o mais estável (BRITO et al., 2015).

A lactose é definida como principal carboidrato do leite, tendo uma concentração variando de 0 a 10% em massa de açúcar, sendo que a menor concentração de lactose encontrada nesse alimento é no leite bovino, com uma variação de 4,4 a 5,2 % em massa, estando diretamente ligada com a dieta do animal, tempo de lactação, raça, tais como: Jersey

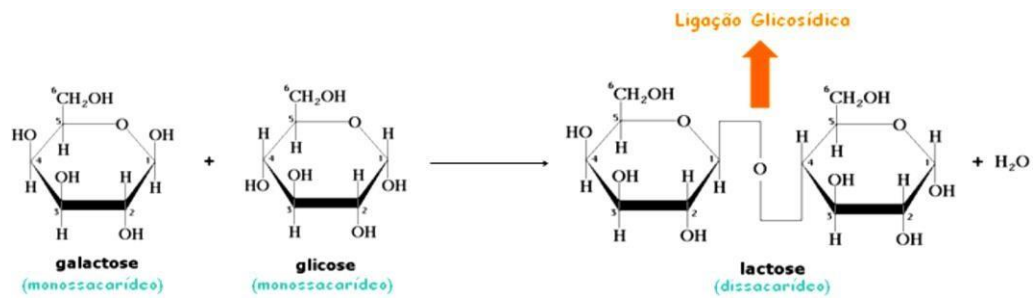
(5,1) e Zebu (5,1%) com maiores concentrações, holandês (4,6%) e Ayrshire (4,7%) com teores mais baixos de lactose (SGARBIERI, 2012; TONETTI, 2015; MORZELLE, 2016).

É um dissacarídeo higroscópico com o gosto adocicado (INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, 2018). Mas, de acordo com Gavilanes (2014) a sacarose é cinco vezes mais doce que a lactose e, ao ser associado com os sais existentes no leite são causadores pelo sabor exclusivo do leite. Com os dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2009), o ser humano pode conter em seu leite, até 6,5 % de lactose na sua constituição, enquanto os da vaca contem por volta de 4,8 %. Os recém-nascidos na maioria são capazes de consumir 60 a 70 g desse dissacarídeo por dia, o que corresponde mil ml de leite materno. Porém, com o passar do tempo, essa efetividade de absorver esse composto pode ser pouca pela menor geração de enzimas que hidrolisam este carboidrato, podendo desenvolver-se intolerância (INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, 2018).

A “quebra” desses dissacarídeos que se transformam em monossacarídeos é realizada por enzimas específicas detectadas no tubo digestivo e são ativas para absorção depois da hidrólise (VANDENPLAS, 2015). Esse carboidrato é hidrolisado pela enzima habitualmente chamada lactase, ou quimicamente falando a β -galactosidase. A lactase é encarregada pela hidrólise da lactose em dois açúcares pequenos, tais como: glicose e galactose, que serão eliminadas pela mucosa intestinal, entretanto, várias pessoas apresentam deficiência ou ausência da enzima lactase no organismo, ocasionando o que conhecemos como “intolerância a lactose” (PERATI et al., 2016; MATTAR et al., 2010; LULE et al., 2016).

A lactose pode sofrer reações de *Maillard*, proveniente de escurecimento não enzimático mediante aquecimento, essa reação é frequente em proteínas e açúcares redutores em alimentos (SGARBIERI, 2012). Em termos químicos, a lactose é um dissacarídeo composto por uma molécula β -D-glicose e uma de β -D-galactose unidas por uma ligação glicosídica β - 1,4 (SILVA, 2015). A figura (1) mostra a reação de formação da lactose a partir da ligação entre os monossacarídeos:

Figura 1 – Reação de formação da Lactose



Fonte: SILVA, 2015.

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 135, de 08/02 de 2017 (ANVISA, 2017) publicada no DOU n° 29, de 9 de fevereiro de 2017, altera a Portaria SVS/MS n° 29,a de 13/01/1998, regulamentando que a partir de 2019 os produtos, para regime com restrição de lactose são classificados como: produtos zero lactose e baixo teor de lactose. Os alimentos considerados “isentos de lactose” contêm quantidade de lactose igual ou menor a 0,1 g para cada 100g ou 0,1 g para cada 100 ml do produto para o consumo, enquanto que os produtos considerados “baixo teor de lactose” contêm quantidade de lactose maior que 0,1 g para cada 100g ou 100 ml e igual ou menor do que 1g para cada 100g ou 100 ml do alimento final. A RDC 135/2017 estabelece em conjunto que alimentos com essa restrição, que respeitam a classificação de “isentos de lactose”, devem conter na embalagem, próxima à denominação do alimento, a seguinte frase: “isento de lactose”, “zero lactose”, “0% lactose”, “sem lactose” ou “não contém lactose”. Da mesma maneira que os alimentos que respeitam a classificação de “baixo teor de lactose” devem conter a escrita “baixo teor de lactose” ou “baixo em lactose” próxima à denominação de venda (FREITAS et al., 2017). Esse grau máximo de 0,1% de lactose é consideravelmente seguro para essas pessoas, e sendo baseado na experiência de países da Europa (ANVISA, 2017). Nesse caso, a redução do nível de lactose nos produtos deslactosados cresce ainda mais a importância na aplicação de métodos analíticos eficientes e de baixo custo para a quantificação da lactose (PAIVA et al., 2018).

3.3 Intolerância a lactose

A intolerância a lactose é uma expressão frequentemente utilizada para descrever a incapacidade do organismo de digerir por toda a lactose. Ocasionado pelos baixos níveis e/ou até mesmo a inexistência da enzima β -galactosidase na mucosa intestinal (FISCHER, 2010).

Nos últimos anos, a lactase ganhou destaque entre os componentes do leite. Muitas crianças e adultos apresentam intolerância ou alergia á lactose e a indústria corre atrás de

soluções que possibilitem o consumo de leite sem o ingrediente causador desses sintomas (INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, 2018).

Neila Richards, professora do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, da UFSM, do Rio Grande do Sul, esclarece que a lactose é um carboidrato mais comum encontrado no leite, formada pela galactose e a glucose. Quando o intestino delgado não digere devidamente a lactose, passa para o intestino grosso onde é fermentada pela microbiota do cólon. É uma doença comum em que o organismo tem dificuldades de digerir a lactose, sendo a principal causa as baixas concentrações de beta-galactosidase na parede da mucosa do intestino delgado. Esse processo leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta, além de gases como H₂, CO₂, e metano, provocando sintomas que incluem dor abdominal, cólica, diarreia e náuseas (INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, 2018).

Cerca de 70% das pessoas do mundo apontam algum grau de intolerância ou irregular digestão à lactose. Em média, a comunidade caucasóide mostra o nível baixo de intolerância à lactose, e tratando-se dos povos negros apontam 50% e para outro lado, os asiáticos apontam cerca de 100% da sua comunidade (LOMER et al., 2008; LULE et al., 2016).

É de suma importância à compreensão em relação à distinção existente entre três reações orgânicas diretamente ligadas a lactose: sensibilidade, alergia, e intolerância, que normalmente são confundidas. A sensibilidade é um retorno incomum do organismo e seus efeitos são parecidos com os da alergia. A alergia é a reação do organismo ligada a uma resposta imunológica, ou seja, algum elemento alimentar comumente conhecidos como as proteínas do leite, causando sintomas como, edema, coceiras e vômitos. Por outro lado, a intolerância a lactose esta relacionado à digestão, absorção e o metabolismo de algum componente alimentar, nesse caso é relacionado com a não absorção da lactose, sendo que esta ligada a não produção da lactase (β -D-galactosidase) ou a diminuição da mesma no organismo (SOARES et al., 2016). De outro modo, na intolerância à lactose, a enzima encarregada por essa hidrólise apresenta uma redução parcial ou total de sua atuação. Por esse motivo, este estado clínico tem sido cada vez mais constante na população mundial, ocasionando sintomas que podem estar dentre um pequeno mal-estar até um choque anafilático. Nesse âmbito, a aceitação do leite e de seus derivados por pessoas que encontram se com essa deficiência enzimática pode variar de acordo com o nível de sua intolerância (BRANNON et al., 2010; BERNI, 2016).

Em vista disso, a intolerância a lactose pode ocorrer de três modos, sendo eles:

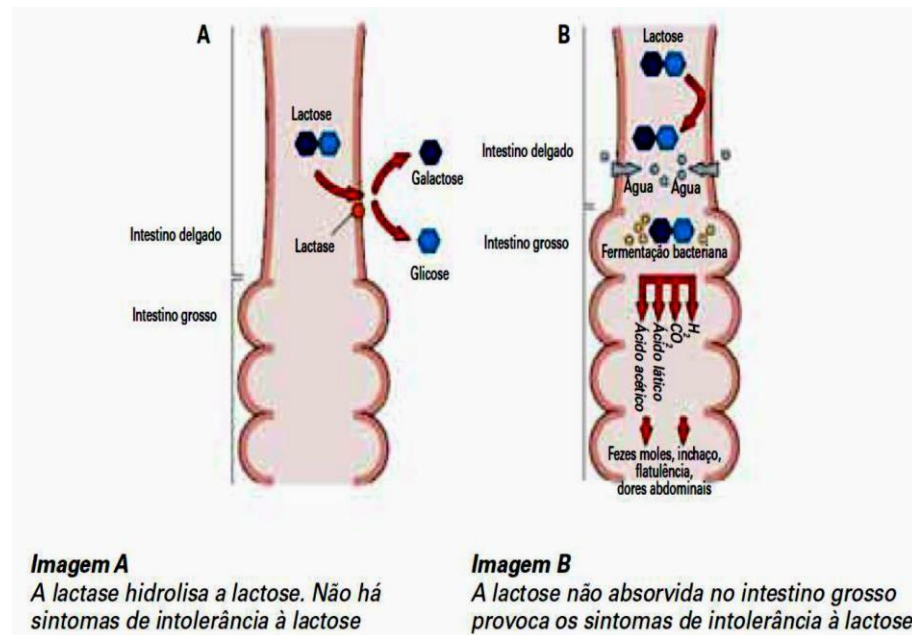
deficiências ontogenética, secundária e congênita da enzima (TORRES et al, 2016). A deficiência ontogenética ou hipolactasia primária adulta é normalmente a mais encontrada na população. A sua principal característica observada é a redução da ação enzimática depois do desmame, manifestando-se por cerca dos 2 aos 15 anos. Essa diminuição na produção de enzima frequentemente está correlacionada a fatores como a quantidade de lactose ingerida, idade, genética, taxa de digestão, etnia e cultura, condições que estão geneticamente determinadas e permanentes, sendo que qualquer adulto sem idade específica está sujeito a adquiri-la. (TORRES et al, 2016; SOARES et al., 2016; BRANCO et al., 2017).

A deficiência secundária ou adquirida pode ser temporária, provocada pela morte das células intestinais. Normalmente ocorre quando se tem diarreia, ou outras doenças como: doença celíaca, doença de Chron, gastroenterites, etc. Essas etiologias ocasionam lesão na mucosa do intestino delgado, que destroem essas células. Após o tratamento da doença ou da diarreia persistente, a mucosa intestinal se recompõe e volta a produzir a lactase normalmente. A diferença da hipolactasia secundária é que pode ser reversível (TORRES et al., 2016; RAMOS, 2016; SOARES et al., 2016; BRANCO et al., 2017).

Em contrapartida, a deficiência congênita é permanente, hereditária. Ela é identificada por uma imperfeição genética rara, na qual se manifesta em recém-nascidos, principalmente em prematuros, logo depois da primeira ou segunda ingestão de leite, ocasionando a incapacidade da criança de produzir a enzima. Isso exige a exclusão por completo desse carboidrato da dieta da criança, garantindo-se assim uma vida normal (BRANCO et al., 2017; SILVA, 2015).

Caso a lactose não for digerida, ou seja, hidrolisada pela enzima lactase, separando em seus compostos menores, que são a glicose e galactose, ela vai permanecer inteira no intestino não sendo absorvida (figura 2). Isso pode ocasionar uma drenagem de água para o tubo intestinal, resultando em diarreia. Ao mesmo tempo, acontece a fermentação bacteriana por bactérias da flora intestinal, produzindo gases e ácidos, fazendo com que gere efeitos colaterais como dor, inchaços e flatulência (FIGUEIREDO, 2014).

Figura 2 - Hidrólise enzimática da lactose no intestino delgado



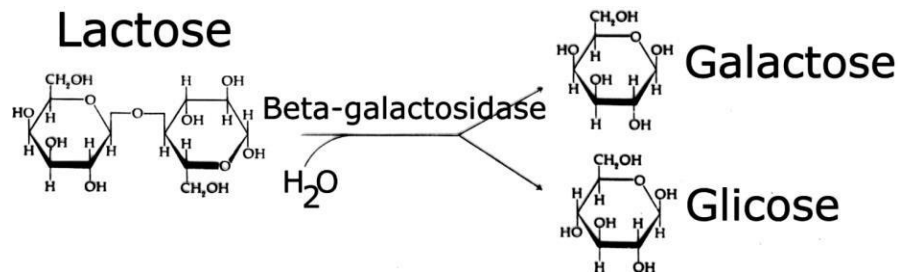
Fonte: FIGUEIREDO, 2014.

Os sintomas desse distúrbio podem ser facilmente eliminados, pela retirada parcial ou completa desse carboidrato do consumo de indivíduos intolerantes, ou seja, eliminação da digestão do leite e de produtos provindos do mesmo, levando-se em consideração o grau de intolerância (SILVA, 2015; FIGUEIREDO, 2014).

3.4 Lactase

De acordo com Gavilanes (2014), os dissacarídeos e polissacarídeos necessitam ser hidrolisados a monossacarídeos com a finalidade de uma fácil absorção na parede intestinal, destarte, são encaminhados até a corrente sanguínea, para realizar sua atuação metabólica. À vista disso, a enzima responsável por essa hidrólise enzimática da lactose é a lactase (β -galactosidase), uma enzima que provoca a “quebra” dessa ligação química, fazendo-se um dissacarídeo em duas moléculas menores de acordo com a figura 3 (BRANNON et al., 2010; MATTAR et al., 2010; LULE et al., 2016; BALIEIRO, 2014).

Figura 3 - Representação da hidrólise da lactose catalisada pela β -galactosidase



Fonte: GODOY, 2016.

A lactose hidrolisada tem um leque de aplicações nas indústrias de alimentos, para uma revolução de novos produtos, com a eliminação parcial ou total da lactose, direcionada a pessoas intolerantes. Essa enzima é classificada de suma importância nas indústrias no processamento de alimentos (HARJU et al., 2012). Além da vantagem de produzir um novo alimento, também leva a inclusão dessa parcela de intolerantes a usufruir de um produto digerível, aproveitando assim, os outros nutrientes presentes nesses alimentos, principalmente no leite, como a proteína, o cálcio, e vitaminas, evitando dessa forma, o desconforto, pela não digestão da lactose (FISCHER, 2010; GODOY, 2016).

Na indústria, as lactases mais aplicadas são obtidas a partir de fungos filamentosos, leveduras ou bolores. Essa enzima tem várias origens, tais como: plantas, órgãos animais e microrganismos. No ramo industrial os microrganismos são os mais utilizados, pois tendem a alta produtividade e rendimento de cultivo. Além do que, eles não produzem produtos considerados tóxicos para o ser humano (TREVISAN, 2008; OLIVEIRA et al., 2011; GODOY, 2016).

A redução do nível de lactose pode ser obtida por meio de alguns processos físicos usando procedimentos de separação por membranas, tais como: microfiltração, ultrafiltração, nano filtração e osmose inversa; processos químicos com a hidrólise ácida e os processos enzimáticos. O procedimento químico utiliza ácidos fortes como o clorídrico e o sulfúrico, juntamente com temperaturas entre 90 e 150°C por um tempo bem curto, tornando inviável sua aplicação na indústria de alimentos, por suas extremas condições, que por sua vez podem ocasionar alterações físico-químicas, nutricionais e sensoriais nos alimentos (SILVA, 2015).

Em concordância com Ramos (2016), a extração física da lactose gera alterações no gosto e em perdas de minerais, vitaminas e no valor energético do leite e seus derivados. Para esse alimento então, a catálise enzimática é o mecanismo mais vantajoso para redução de lactose. Nesse método, emprega-se a enzima β -D-galactosidase na forma livre ou imobilizada onde são encontradas em diversas fontes. Exemplos de fontes microbianas de β -D-

galactosidase, bactérias: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Streptococcus*, *Sulfolobus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Vibrio*, *Xanthomonas*. Leveduras: *Bullera*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*. Fungos (filamentoso): *Alternaria*, *Aspergillus*, *Auerobasidium*, *Beauveria*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizobium*, *Sacharopolyspora*, *Scopulariopsis*, *Streptomyces*, *Trichoderma* (GODOY, 2016; FISHER, 2010).

Encontram-se diversas fontes microbianas dessa enzima chamada lactase para o uso no ramo alimentício, reconhecida como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, 2018). As lactases tão somente, podem ser usufruídas na elaboração de alimentos, como assistente de tecnologia, quando reconhecida nas listas positivas determinadas nos regulamentos da Resolução nº 205/2006 e integrada com a resolução RDC nº 26/2009 (PEREIRA et al., 2012).

Alguns critérios são essenciais para a sua utilização em processamento industriais, dentre estes então: o intervalo do pH ótimo para a atividade enzimática, a estabilidade térmica e a eficiência real ao ser submetida a temperaturas baixas. Com o crescimento biotecnológico, têm sido disponibilizadas enzimas com a capacidade de agir em meios e em diversas características, possibilitando seu uso em alimentos em diferentes faixas pHs, de modo eficaz e seguro. De modo geral, as galactosidases de origem fúngicas trabalham com pHs por volta de 2,5 e 5,4, ao passo que as galactosidase bacterianas ou leveduras agem mais na neutralidade, em pHs entre 6,0 e 7,0. A maior parte dessas lactases, utilizadas em processos industriais, são originadas de *Kluyveromyces sp.* e *Aspergillus sp.* (INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, 2018; GODOY, 2016).

Figura 4 - Estrutura bidimensional da β -D-galactosidase do fungo *Aspergillus oryzae*



Fonte: PERISSINATO, 2016

3.5 Métodos para hidrólise da lactose

Nesse âmbito, a redução de lactose em produtos deslactosados aumenta mais ainda a importância na efetivação de procedimentos analíticos competentes, e de baixo custo para a quantificação da lactose (PAIVA et al., 2018).

O uso de equipamentos e técnicas sensíveis é necessário, sendo estes capazes de definir as quantidades desses carboidratos com rapidez, em leite e seus derivados lácteos (VASKOVA, BUCKOVA, 2016). Torres et al (2016), definiram que a identificação e quantificação da hidrólise pode ser realizada por métodos cromatográficos, enzimáticos, por cloramina T e por crioscopia (PROZYN, 2010).

O índice crioscópico é bastante aplicado para prever a porção da “quebra” da lactose (CZARNOBAY et al., 2017). Para identificar pequenas taxas de lactose com grande precisão, indica-se utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada (TRANI et al., 2017; PERATI et al., 2016; SCHEPPINGEN-VAN et al., 2017).

3.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Em tese, é um processo de separação físico-químico, baseado na migração prolongada da amostra a ser avaliada em uma fase estacionária por meio de uma fase móvel (SKOOG et al., 2006). A cromatografia líquida é uma maneira rápida e bastante eficiente para a separação de componentes. Esse método ocorre por dentro de colunas fechadas, onde a parte líquida se move, eluindo por uma fase estacionária (FIGUEIREDO, 2012).

As conclusões das análises são alcançadas rapidamente, por conta da alta pressão interna do sistema (FIGUEIREDO, 2012). Uma bomba garante uma vazão constante, isso fazendo com que a separação desses componentes e o caminho dos solventes sejam rápidos. Podem ser utilizados detectores de tipos variados, normalmente utilizando detectores ultravioleta, de polarimetria, índice de refração, de fluorescência, e eletroquímicos (DEGANI et al., 1998).

A cromatografia é extensamente usada em várias áreas, e em produtos lácteos, é o método mais recomendado na detecção do grau de lactose (MONTI et al., 2017). Dispõe de muitas vantagens na sua aplicabilidade, comparado a outros procedimentos, devido a sua capacidade de detectar carboidratos de modo concreto (PAIVA, et al., 2018). Dentre algumas desvantagens da CLAE, estão a utilização de reagentes de alto valor econômico e de boa qualidade (GAMBELLI, 2017), como também de equipamentos tecnologicamente automatizados e modernos (FIGUEIREDO, 2012), mas que além de possuírem um valor alto, exigem uma permanente assistência e operações especializadas (PAIVA, et al., 2018).

3.5.2 Conjuntos enzimáticos

Esses kits são fundamentados nessa transformação enzimática da lactose nas suas duas moléculas menores: galactose e glicose. Essa técnica é completamente pertinente para alimentos com a lactose com nível baixo. Caso a amostra apresente uma alta quantidade de galactose e glicose e baixo nível de lactose, é essencial o uso de procedimentos corretivos que estabeleçam o real nível de lactose, isso podendo incidir num aumento de erros analíticos (TRANI et al., 2017).

3.5.3 Índice crioscópico

A análise por esse método é um processo rápido, e por conta disso é bastante usado em indústrias de laticínios para constatar a quantidade da hidrólise da lactose (PROZYN, 2010). Sendo um modo indireto de quantificar a lactose, esse meio permite somente analisar a intensidade da reação de hidrólise, isso por meio do monitoramento do ponto de congelamento do leite (TONETTI, 2015). Esse índice está diretamente relacionado ao nível de sólidos solúveis encontrados na solução, definido principalmente pela concentração em solução de lactose e cloretos (TRONCO, 1997; PAIVA, et al., 2018). A hidrólise da lactose provoca um aumento na quantidade de açúcares redutores no leite, elevando a concentração dos componentes solúveis, levando à redução do índice crioscópico (TREVISAN, 2008). Para verificar o nível de hidrólise de acordo com Moreira et al. (2009), utiliza-se a equação 1:

$$GH^* = (350,877 \times \text{Crioscopia final}) - (\text{Crioscopia Inicial} / 0,00285) \quad (\text{Eq. 1})$$

*Grau de Hidrólise.

3.6 Produtos lácteos sem lactose

Diante desse cenário, há a necessidade de se produzir alimentos zero lactose, para que os consumidores intolerantes tenham uma alternativa e as indústrias pudessem crescer sua produção e lucratividade (RAMALHO & GANECO, 2016).

A quantidade de pessoas com essa deficiência de lactase só aumenta, gerando um alargamento no mercado produtos deslactosados (PERATI et al., 2016). Na atualidade, consegue-se encontrar nos mercados diversas marcas e tipos de produtos lácteos deslactosados (SHRESTHA et al., 2007; TORRES et al., 2017).

Esses produtos com a lactose reduzida também ajudam a diminuir problemas de cristalização em alguns produtos, tendo como exemplo certos alimentos congelados, o doce de leite e o leite condensado. Neila detalha que “na hidrólise da lactose há um crescimento no teor

de sólidos e no dulçor do leite, portanto, produtos lácteos com acréscimo de açúcar, tanto na fórmula sólida como na forma líquida, podem ter seu conteúdo reduzido sem perder qualidade e rendimento” (INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, 2018).

Dentre os produtos, têm-se os fermentados, o doce de leite, os queijos e os leites com baixa concentração de lactose. Estes alimentos possibilitam que as pessoas com intolerância tenham a ingestão correta de nutrientes, diminuindo os riscos à saúde (NATIONAL DAIRY COUNCIL; 2010).

Entre os alimentos fermentados, o iogurte se destaca apresentando a melhor tolerância. Isso é atribuído à alta atividade enzimática presente nos microrganismos utilizados na produção desse alimento, comparados com outros microrganismos secretores de ácido láctico. No processamento de iogurte para intolerantes, usando a lactase, observa-se baixa acidez e uma percepção grande de sabor doce, resultando no produto final característica de flavor bem suave (LONGO, 2006; RAMALHO & GANECO, 2016).

Outros produtos são os queijos duros, sendo os mais sugeridos para o consumo de intolerantes, sendo que no seu processamento, boa parte da lactose fica contida no soro, concentram-se os sólidos, e parte da lactose que ficará presente na massa foi transformada em ácido láctico (NATIONAL DAIRY COUNCIL, 2006; PEREIRA et al., 2012). O doce de leite com lactose hidrolisada é mais um produto lácteo encontrado no mercado (LONGO, 2006; RAMALHO & GANECO, 2016). Juntamente com esses outros, alternativas presentes nos mercados são os leites, alguns com redução quase 100% de lactose, são conhecidos como alimentos de alta digestibilidade. Essa boa digestão faz-se devido à hidrólise da lactose, sem diminuir a qualidade nutricional do leite (HOSHINO et al., 2009).

3.7 Delineamento experimental

Uma alternativa de maior eficiência para avaliação de sistemas com microrganismos é a utilização de métodos estatísticos, usando-se uma quantidade menor de grandezas e explorando-se espaço experimental por um todo (KIMURA, 2014). O Delineamento de Experimentos (DOE) consiste em ensaios feitos de modo planejado, onde os tratamentos são alterados para avaliar sua influência na variável resposta. Com isso, foi criada a técnica que utiliza os delineamentos compostos, que proporciona a análise dos resultados de cada variável, uma a uma, e de suas interações em certa resposta (RODRIGUES e IEMMA, 2009; KIMURA, 2014).

Esses delineamentos compostos foram criados, inicialmente, por Box e Wilson (1951) para estudo com finalidades polinomiais para uma resposta na indústria, com um erro experimental baixo, e com situações de fácil controle no experimento (RAMOS, 2005; MOURA, 2008).

Dentre os delineamentos, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é classificado um delineamento muito bom, no qual são necessários poucos ensaios para sua execução. Ele trabalha com condições consideráveis, em buscar-se o ponto onde se tem a resposta melhor, consistindo em menor número de tratamentos, comparando-se aos números de fatoriais completos, e de forma que possa ser feito em sequência, de modo a ser direcionado rumo á otimização do sistema, ou seja, por meio da realização de parte do experimento pela técnica do seguimento ascendente ótimo (steepest ascent) (MOURA, 2008).

Isso permite chegar à área que consiste no ótimo e, assim, comparar uma só parte do delineamento, entre os pontos axiais, com o intuito de analisar a parte curvilínea que existe, de modo a chegar à conclusão ótima, maximizando as respostas do sistema. No entanto, este tipo de delineamento, consiste a um planejamento fatorial com 2^k ensaios fatoriais (k = número de fatores) + $2k$ ensaios nos pontos axiais + um número arbitrário de repetições no ponto central (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de pesquisa em química ambiental e de biocombustíveis (LAPEQ) da Universidade Federal do Tocantins (UFT).

4.1 Materiais

Para a execução dos experimentos, utilizou-se leite UHT integral adquirido em comércio local de Palmas – TO. A lactase derivada de *Aspergillus oryzae* (AO) foi a Deslac, da empresa Maxinutri Laboratório Nutracêutico, de lote L0103 e a lactase derivada de *Kluyveromyces lactis* (KL) foi a Latolise da empresa Hipermercado S/A, lote L180397A. As duas disponíveis na forma de solução e adquiridas no comércio local da cidade de Palmas - TO. O armazenamento foi de acordo com a recomendação dos fabricantes, ou seja, preservar em temperatura ambiente (15 a 30°C), proteger da luz e manter em local seco.

4.2 Métodos

4.2.1 Delineamento experimental do processo de hidrólise enzimática

Para o estudo da hidrólise da lactose foi empregado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), utilizando o software Protimiza Experimental Design. Para investigar o efeito de três variáveis independentes, temperatura ótima (x1), tempo (x2) e concentração da enzima (x3), foram analisadas em cinco níveis de variação conforme tabela 1 e 2, e a única variável dependente (resposta) a ser analisada foi o percentual de hidrólise final. Sendo que a escolha das temperaturas partiu-se pelo ponto central, em uma temperatura onde ocorre a maior atividade enzimática de cada lactase com seu ponto ótimo de incubação de acordo com HARJU et al. (2012).

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis de variação da lactase *Kluyveromyces lactis*

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
x ₁ = Temperatura de reação (°C)	9,80	20,00	*35,00	50,00	60,20
x ₂ = Tempo de reação (min)	0,00	30,00	195,00	360,00	472,50
x ₃ = Concentração da enzima (%)	0,10	0,20	0,40	0,60	0,70

*HARJU et al. (2012)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 - Variáveis independentes e níveis de variação da lactase *Aspergillus oryzae*

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
x_1 = Temperatura de reação (°C)	29,90	40,00	*55,00	70,00	80,10
x_2 = Tempo de reação (min)	0,00	30,00	195,00	360,00	472,50
x_3 = Concentração da enzima (%)	0,10	0,20	0,40	0,60	0,70

*HARJU et al. (2012)

Fonte: Elaborada pelo autor.

O delineamento foi composto por 17 ensaios, para cada enzima, sendo oito nos pontos fatoriais (-1, +1), com três repetições no ponto central (0, 0) e seis pontos axiais (-1,68, +1,68), inteiramente aleatorizados. Os ensaios foram codificados sendo uma sequência de números seguidas com a letra “L” ou “o”, indicado que L = *Kluyveromyces lactis* e o = *Aspergillus oryzae*. Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas na matriz do planejamento estão apresentados na Tabela 3 e 4.

Tabela 3 - Matriz do planejamento 2^3 (DCCR) para ação da lactase *Kluyveromyces lactis*

Ensaio	Variáveis Independentes					
	Codificadas			Reais		
	X1	X2	X3	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (%)
1L	-1	-1	-1	20,00	30,00	0,20
2L	1	-1	-1	50,00	30,00	0,20
3L	-1	1	-1	20,00	360,00	0,20
4L	1	1	-1	50,00	360,00	0,20
5L	-1	-1	1	20,00	30,00	0,60
6L	1	-1	1	50,00	30,00	0,60
7L	-1	1	1	20,00	360,00	0,60
8L	1	1	1	50,00	360,00	0,60
9L	-1,68	0	0	9,80	195,00	0,40
10L	1,68	0	0	60,20	195,00	0,40
11L	0	-1,68	0	35,00	0,00	0,40
12L	0	1,68	0	35,00	472,50	0,40
13L	0	0	-1,68	35,00	195,00	0,10
14L	0	0	1,68	35,00	195,00	0,70
15L	0	0	0	35,00	195,00	0,40
16L	0	0	0	35,00	195,00	0,40
17L	0	0	0	35,00	195,00	0,40

*L = Ensaio com a lactase derivada da *Kluyveromyces lactis*

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Matriz do planejamento 2³ (DCCR) para ação da lactase *Aspergillus oryzae*

Ensaio	Variáveis Independentes					
	Codificadas			Reais		
	X1	X2	X3	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (%)
1o	-1	-1	-1	40,00	30,00	0,20
2o	1	-1	-1	70,00	30,00	0,20
3o	-1	1	-1	40,00	360,00	0,20
4o	1	1	-1	70,00	360,00	0,20
5o	-1	-1	1	40,00	30,00	0,60
6o	1	-1	1	70,00	30,00	0,60
7o	-1	1	1	40,00	360,00	0,60
8o	1	1	1	70,00	360,00	0,60
9o	-1,68	0	0	29,80	195,00	0,40
10o	1,68	0	0	80,20	195,00	0,40
11o	0	-1,68	0	55,00	0,00	0,40
12o	0	1,68	0	55,00	472,50	0,40
13o	0	0	-1,68	55,00	195,00	0,10
14o	0	0	1,68	55,00	195,00	0,70
15o	0	0	0	55,00	195,00	0,40
16o	0	0	0	55,00	195,00	0,40
17o	0	0	0	55,00	195,00	0,40

*o = Ensaio com a lactase derivada do *Aspergillus oryzae*

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Hidrólise da lactose

A hidrólise da lactose foi realizada adicionando-se concentrações de 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; e 0,70 % das enzimas β -galactosidase (*Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis*) em alíquotas de leite UHT integral. A escolha das temperaturas partiu-se pelo ponto ótimo de incubação de acordo com HARJU et al. (2012). Para *Aspergillus oryzae* utilizou-se temperaturas 29,8; 40; 55; 70; e 80,2°C, e a *Kluyveromyces lactis* temperaturas de 9,8; 20; 35; 50; e 60,2°C.

Os ensaios foram conduzidos em frascos estéreis (erlenmeyers), que foram dispostos em incubadora rotatória shaker, com agitação fixa, de 150 rpm. Os frascos continham 100 ml de leite integral UHT, aos quais foram adicionadas as enzimas lactase em proporções diferentes. As concentrações, tempo, e temperatura, foram definidos e executados conforme o planejamento experimental.

4.2.3 Amostragem

Ao final de cada tratamento conforme o tempo definido no planejamento estatístico, as amostras foram imersas em banho com gelo por cinco minutos, para inativação da atividade enzimática. Foram retiradas alíquotas de 10 ml, filtradas em filtro de seringa de membrana PTFE hidrofílico com diâmetro de 0,22 μ m. Posteriormente, colocadas em vials e submetidas à análise cromatográfica.

4.2.4 Quantificação do teor de lactose

A quantificação da lactose e o acompanhamento das reações de hidrólise foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE, em equipamento marca Agilent, modelo 1260 infinity II. A metodologia utilizada para a quantificação da lactose foi realizada de acordo com Naegele (2016), sendo que, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foi determinada pelo autor. As condições do método estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Condições cromatográficas na determinação da lactose

Fase móvel	Água milli-Q (eluição isocrática)
Fluxo (vazão da fase móvel)	0, 2mL.min ⁻¹
Tempo total de corrida	10 minutos
Temperatura de Forno	80° C
Tempo de retenção	7,4 minutos
Volume de injeção	10 μ L
Coluna Cromatográfica	Agilent Hi-Plex Ca USP L19 (250 x 4.0 mm)
Pré - Coluna	Hi-Plex Ca (5x3mm)
Detector	Índice de Refração (IR)
Temperatura do detector	40 °C
Limite de detecção	0,03 μ g.ml ⁻¹
Limite de quantificação	0,10 μ g.ml ⁻¹

Fonte: Adaptado de NAEGELE, 2016.

A lactose foi identificada pela comparação do tempo de retenção das amostras, que foi aproximadamente 7,4 minutos, com o tempo de retenção do padrão de 7,437 minutos. Construiu-se uma curva analítica de calibração com diferentes concentrações do padrão (0,0001, 0,0002, 0,001, 0,005, 0,010, 0,050, 0,10 0,15 g.ml⁻¹). Para construção da equação da reta, utilizou-se os valores das concentrações obtidas versus as áreas dos picos fornecidos pelo Cromatógrafo. A hidrólise da lactose (%) foi calculada de acordo com Bell et al. (2016), como descrito na equação 2:

$$\text{Hidrólise da lactose (\%)} = \left(\frac{\text{Lactose inicial da amostra} - \text{Lactose residual da amostra}}{\text{Lactose inicial da amostra}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

4.2.5 Análise dos dados

Para analisar estatisticamente o comportamento da lactase nas diferentes temperaturas, tempos e concentrações dadas pelo delineamento experimental e fazer análise gráfica dos resultados, utilizou-se o software Protimiza Experimental Design.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação da lactose por Cromatografia líquida de alta eficiência

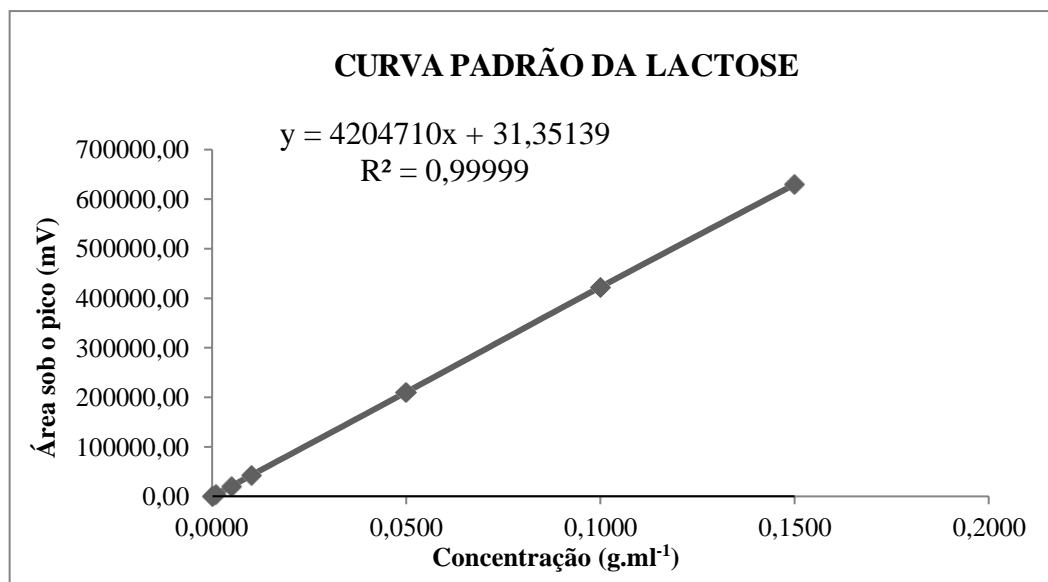
A Tabela 6 expressa os dados referentes à curva de calibração para o padrão de lactose, por meio dos quais foi gerada uma equação representada na figura 5. Utilizou-se essa equação para quantificar o teor de lactose através da substituição da variável **Y**, referente à área sob o pico. A curva analítica foi obtida por oito pontos de concentração sendo a uma faixa de 0,0001 a 0,1500 g.ml⁻¹, obtendo-se assim um coeficiente de correlação linear de 0,99999, para daí então, realizarem-se as análises do leite UHT. Ver anexos.

Tabela 6 - Dados da curva padrão da lactose determinada por CLAE.

Concentração (g.ml ⁻¹)	Área sob o pico (mV)
0,0001	633,38
0,0002	876,23
0,0010	4344,52
0,0050	20099,00
0,0100	42137,90
0,0500	210172,00
0,1000	422418,00
0,1500	629519,00

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5 - Curva padrão da lactose



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Ensaio de hidrólise da lactose

Os percentuais de hidrólise da lactose, dos 17 ensaios realizados para cada lactase (*KL* e *AO*), estão apresentados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Matriz dos ensaios do DCCR com as respostas da hidrólise da lactose por *KL*

Ensaio	Variáveis independentes			Variável dependente
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (%)	Hidrólise da lactose (%)
1L	20,00	30,00	0,20	78,16
2L	50,00	30,00	0,20	77,87
3L	20,00	360,00	0,20	89,39
4L	50,00	360,00	0,20	35,84
5L	20,00	30,00	0,60	91,57
6L	50,00	30,00	0,60	95,44
7L	20,00	360,00	0,60	97,21
8L	50,00	360,00	0,60	92,48
9L	9,80	195,00	0,40	83,84
10L	60,20	195,00	0,40	4,52
11L	35,00	0,00	0,40	85,14
12L	35,00	472,50	0,40	98,01
13L	35,00	195,00	0,10	49,45
14L	35,00	195,00	0,70	98,59
15L	35,00	195,00	0,40	93,62
16L	35,00	195,00	0,40	94,09
17L	35,00	195,00	0,40	93,64

Fonte: Adaptado de PROTIMIZA, 2014.

Como pode-se perceber na tabela acima, foi obtida uma variação da atividade enzimática de 4,52 a 98,59%, sendo que o máximo dessa atividade se deu na temperatura de 35°C, da *KL*, com concentração máxima de 0,70% (v/v). O mínimo de ação foi verificado na temperatura de 60,2°C, podendo-se concluir que houve inatividade da enzima nessa temperatura.

Dentre os resultados, verificaram-se três melhores pontos de atividade enzimática a 35°C (98,01 e 98,59%) e a 20°C (97,21%), chegando a quase 100% de hidrólise da lactose. Bosso (2012) trabalhou com diferentes temperaturas de reação (30, 35, 40 e 55°C), quando afirmou que obteve 100% de hidrólise do leite integral, a 35°C. Em um estudo semelhante ao de Bosso (2012), Campos et al. (2009) reforçaram a alta atividade dessa enzima quando obtiveram 90% da hidrólise da lactose, em leite, após 5 horas de experimento, a 35°C. Escobar et al. (2014) destacaram a conversão de 95% da lactose presente no permeado de soro, que foi obtida em 360 minutos de reação, á temperatura de 35°C.

Tabela 8 - Matriz dos ensaios do DCCR com as respostas de hidrólise da lactose da AO

Ensaio	Variáveis independentes			Variável dependente
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (%)	Hidrólise da lactose (%)
1o	40,00	30,00	0,20	54,66
2o	70,00	30,00	0,20	4,69
3o	40,00	360,00	0,20	75,28
4o	70,00	360,00	0,20	2,85
5o	40,00	30,00	0,60	73,91
6o	70,00	30,00	0,60	15,65
7o	40,00	360,00	0,60	93,45
8o	70,00	360,00	0,60	1,56
9o	29,80	195,00	0,40	74,40
10o	80,20	195,00	0,40	1,76
11o	55,00	0,00	0,40	64,78
12o	55,00	472,50	0,40	93,91
13o	55,00	195,00	0,10	17,92
14o	55,00	195,00	0,70	94,14
15o	55,00	195,00	0,40	82,23
16o	55,00	195,00	0,40	80,23
17o	55,00	195,00	0,40	82,22

Fonte: Adaptado de PROTIMIZA, 2014.

Para a enzima (AO), obteve-se uma variação da atividade enzimática de 1,56 a 94,14%, sendo que o máximo da ação dessa enzima foi a 55°C, com concentração máxima de 0,70%, e a atividade mínima se deu a 70°C, resultando na desnaturação da enzima.

Foram obtidas, três melhores pontos da reação enzimática: a 55°C (94,14 e 93,91%) e 40°C (93,45%). Bosso (2012) relatou baixa percentagem de ação da *Aspergillus oryzae*, com taxa máxima de 67,4% de hidrólise no leite integral, à temperatura de 55°C. No trabalho realizado por Oliveira et al. (2016) foram estudadas várias temperaturas de reação (45, 50, 55, 60 e 65°C) para a hidrólise com lactase (Sigma®). Relataram que nas temperaturas de 45 e 50°C foram obtidos valores próximos a 65% de hidrólise. Valores de 80% foram obtidos com as temperaturas de 55°C, em 10 horas de reação, e 60°C, em 8 horas. Para temperatura de 65°C, a maior taxa de hidrólise apresentada foi em torno de 77% sendo alcançada em 8 horas, mostrando daí em diante uma queda na eficiência da enzima, sendo ela inibida com temperaturas acima de 60°C.

Observando os resultados nos pontos centrais de cada enzima (experimentos 15, 16 e 17), percebe-se que não houve grande variação nos valores de atividade, indicando, portanto, uma boa reprodutibilidade nos dados do processo. No entanto, apenas o ponto central foi feito

em triplicata.

5.2.1 Análises dos coeficientes de regressão e gráfico de Pareto

A regressão estimada do modelo para o percentual de hidrólise da lactose a partir do leite integral UHT, pelas β -galactosidase *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*, foram determinados com limite de significância para as análises estatísticas de 5% ($p < 0,05$).

Analisando-se os coeficientes de regressão (Tabela 9 e 10) para as lactases *K. lactis* e *A. Oryzae*, respectivamente, pode-se visualizar para as duas enzimas que apenas os termos lineares (temperatura e concentração) e quadráticos (temperatura) foram significativos pelo nível de significância proposto ($p < 0,05$). No entanto, os termos lineares de concentração tiveram um efeito positivo para a *K. lactis* e *A. oryzae* (13,04 e 12,83) respectivamente, no aumento da atividade dessas enzimas, quando essa variável passou da condição mínima (-1,68) para a máxima (+1,68). Por outro lado, as temperaturas de termo quadrático e linear tiveram um efeito negativo, diminuindo a atividade enzimática de -13,77(Q) e -14,48(L) nessa ordem, para a *K. lactis*, e para *A. oryzae* de -28,90(Q) e -18,95(L), quando essa variável passou do ponto de (-1,68) para (+1,68), com nível estatisticamente de 95% de confiança.

Tabela 9 - Coeficientes de regressão do DCCR para ação da *Kluyveromyces lactis*

Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t calculado	p - valor
Média	92,90	9,70	9,57	0,0000
Temperatura (L)	-13,77	4,56	-3,02	0,0193
Temperatura (Q)	-14,48	5,02	-2,89	0,0234
Tempo (L)	-0,47	4,56	-0,10	0,9200
Tempo (Q)	2,28	5,02	0,45	0,6638
Concentração (L)	13,04	4,56	2,86	0,0243
Concentração (Q)	-3,93	5,02	-0,78	0,4589
Temperatura X Tempo	-7,73	5,95	-1,30	0,2352
Temperatura X Concentração	6,62	5,95	1,11	0,3027
Tempo X Concentração	4,19	5,95	0,70	0,5048

*(L): Efeito linear; (Q): Efeito quadrático; p: Nível de significância.

Fonte: PROTIMIZA, 2014.

Tabela 10 - Coeficientes de regressão do DCCR para a ação da *Aspergillus oryzae*

Fatores	Coefficiente	Erro padrão	t calculado	p - valor
Média	82,60	10,67	7,74	0,0001

continua

conclusão

Tabela 10 - Coeficientes de regressão do DCCR para a ação da *Aspergillus oryzae*.

Fatores	Coeficiente	Erro padrão	t calculado	p - valor
Temperatura (L)	-28,90	5,01	-5,77	0,0007
Temperatura (Q)	-18,95	5,51	-3,44	0,0109
Tempo (L)	5,36	5,01	1,07	0,3201
Tempo (Q)	-4,36	5,51	-0,79	0,4549
Concentração (L)	12,83	5,01	2,56	0,0375
Concentração (Q)	-12,61	5,51	-2,29	0,0561
Temperatura X Tempo	-7,01	6,55	-1,07	0,3197
Temperatura X Concentração	-3,47	6,55	-0,53	0,6126
Tempo X Concentração	-1,67	6,55	-0,25	0,8064

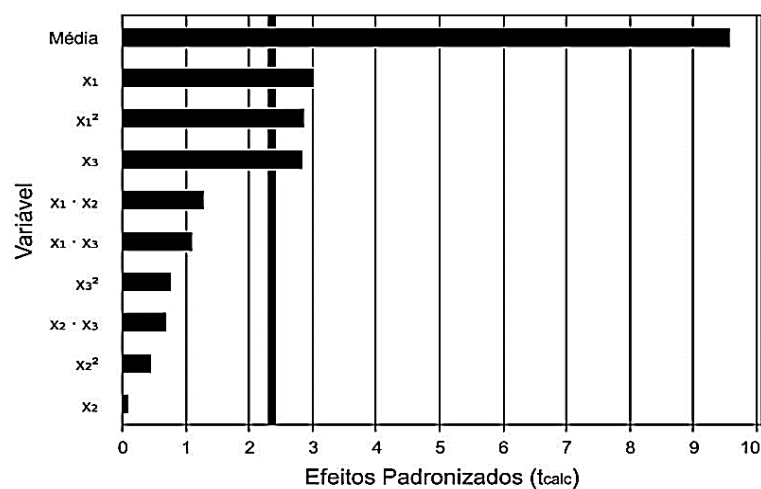
*(L): Efeito linear; (Q): Efeito quadrático; p: Nível de significância.

Fonte: PROTIMIZA, 2014.

Embora não se tenham obtidos resultados estatisticamente significativos para o tempo da ação enzimática, num limite de 95% de segurança, optou-se por considerar os valores obtidos pela regressão, incorporando-se as respostas não significativas aos resíduos, para o cálculo da ANOVA.

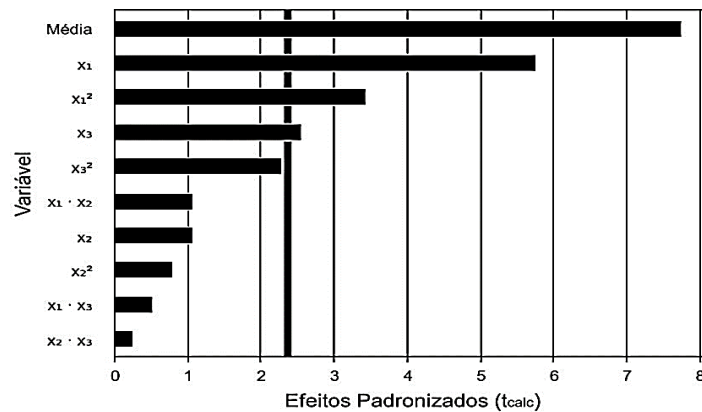
Uma maneira de se visualizar claramente, por meio de gráfico, a significância estatística do efeito de cada variável é analisando-se o gráfico de Pareto. Esse gráfico relaciona de forma ordenada as variáveis e os efeitos estimados para cada uma delas, sendo representado por meio de barras e uma linha na vertical correspondente ao valor de $p = 0,05$ que indica o quanto deve ser grande o efeito para se ter significado estatisticamente. As Figuras 6 e 7 apresentam os gráficos de Pareto e confirmam que a temperatura e concentração de enzima são significantes no aumento da hidrólise da lactose.

Figura 6 - Gráfico de Pareto dos principais efeitos das variáveis segundo DCCR para *KL*



Fonte: PROTIMIZA, 2014.

Figura 7 - Gráfico de Pareto dos principais efeitos das variáveis segundo DCCR para AO



Fonte: PROTIMIZA, 2014.

As equações de regressão de segunda ordem gerada pelo modelo de acordo com o DCCR estão indicadas na tabela 11.

Tabela 11 - Modelo de regressão para a hidrólise da lactose referente a cada lactase (Y₁)

Lactase	Modelo de regressão
<i>K. lactis</i>	$Y_1 = 92,90 - 13,77 x_1 - 14,48 x_1^2 - 0,47 x_2 + 2,28 x_2^2 + 13,04 x_3 - 3,93 x_3^2 - 7,73 x_1 x_2 + 6,62 x_1 x_3 + 4,19 x_2 x_3$
<i>A. oryzae</i>	$Y_1 = 82,60 - 28,90 x_1 - 18,95 x_1^2 + 5,36 x_2 - 4,36 x_2^2 + 12,83 x_3 - 12,61 x_3^2 - 7,01 x_1 x_2 - 3,47 x_1 x_3 - 1,67 x_2 x_3$

Autor: Elaborada pelo autor.

Onde Y_1 é a variável dependente, hidrólise da lactose (%) e X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis independentes, temperatura, tempo e concentração de enzima, respectivamente.

5.2.2 Análise de variância ANOVA

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), com limite de significância de 5% ($p < 0,05$), resultando, portanto, em um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para otimizar a produção de β -galactosidase (*KL*)

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F calc	p - valor
Regressão	8797,00	9	977,44	3,45	0,051
Resíduos	1985,07	7	283,58		
Falta de Ajuste	1984,93	5	396,99		
Erro Puro	0,14	2	0,07	5671,23	0,00020
Total	10782,05	16			

% da variação explicada (R^2) = 81,59; $F_{\text{tab } 9/7} 3,68$.

Fonte: PROTIMIZA, 2014.

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) para otimizar a produção de β -galactosidase (AO)

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F calc	p - valor
Regressão	19322,10	9	2146,90	6,26	0,012
Resíduos	2399,72	7	342,82		
Falta de Ajuste	2397,10	5	479,42		0,00276
Erro Puro	2,70	2	1,35	355,13	
Total	21721,84	16			

% da variação explicada (R^2) = 88,95; $F_{\text{tab } 9/7}$ 3,68.

Fonte: PROTIMIZA, 2014.

Para as enzimas *KL* e *AO* a análise de variância revelou que o coeficiente de determinação do modelo predito para atividade enzimática na hidrólise da lactose foi de $R^2 = 0,8159$ e $0,8895$, respectivamente, indicando que o modelo de regressão foi capaz de explicar 81,59% para *Kluyveromyces lactis* e 88,95% para *Aspergillus oryzae*, conforme a variação dos dados.

5.2.3 Análise das Superfícies de resposta

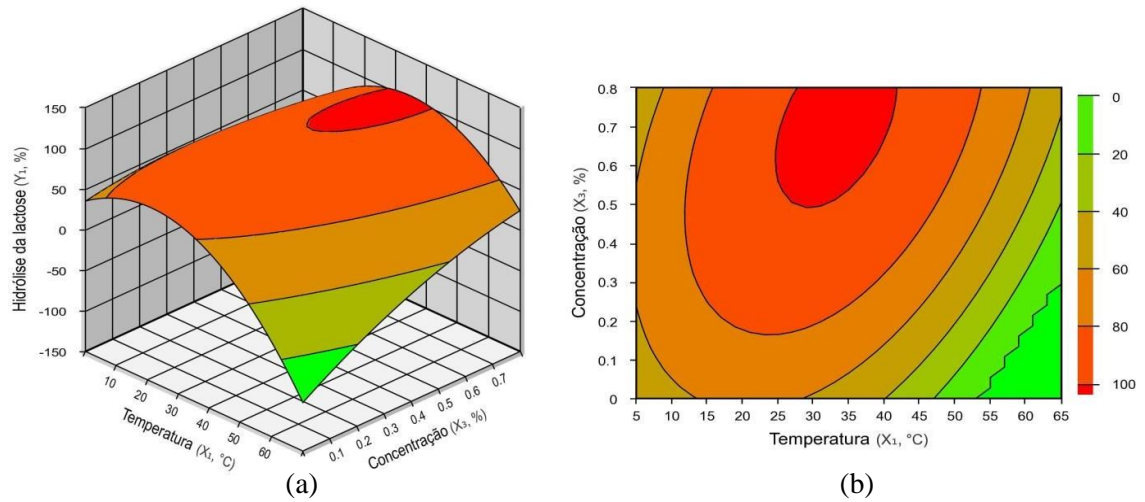
A metodologia do planejamento experimental fatorial associada à análise de superfície de resposta é uma ferramenta fundamental na teoria estatística, por fornecer informações muito mais seguras do processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativas e erro (Box et al., 1978).

As Figuras 8 e 9 mostram as superfícies de respostas e curvas de contorno geradas pela hidrólise da lactose obtida da interação de temperatura e concentração, sendo as variáveis significativas segundo o modelo experimental, e o tempo (195 minutos), fixado de acordo com o ponto central do delineamento. Nas figuras 8 e 9, nota-se que as combinações dos parâmetros nos níveis máximos e mínimos influenciaram fortemente o resultado da função resposta da conversão da lactose e que a região do ponto central é o ponto que maximiza a hidrólise. O critério para escolha da melhor condição na região otimizada foi à máxima porcentagem de hidrólise com a menor concentração de enzima, devido ao alto custo da enzima β -galactosidase. Hatzinikolaou et al. (2005), afirmaram que um processo eficiente e economicamente viável para a hidrólise da lactose depende fortemente da produção e do custo da enzima em combinação com uma cinética favorável e propriedades de estabilidade.

Para a *Kluyveromyces lactis* (figura 8a e 8b) a melhor condição definida para validação experimental foi numa região ótima, com a temperatura de 26,50 a 30,80°C, com concentração de enzima de 0,45 a 0,49%. Essas condições promoveram 98,23 a 100% de hidrólise.

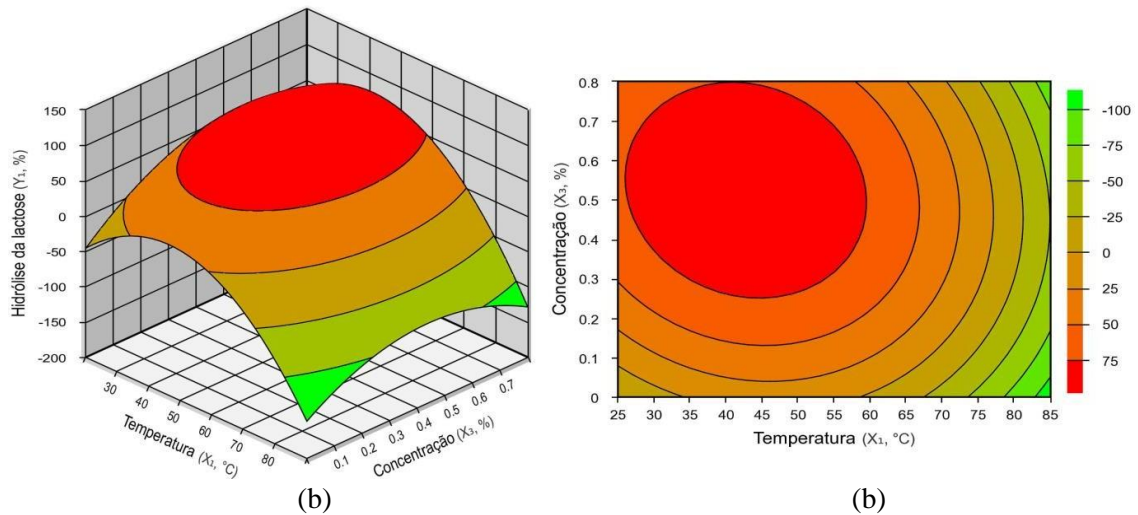
Observando-se as figuras 9a e 9b para a *Aspergillus oryzae*, a melhor condição experimental definida foi a uma temperatura de 41,40°C com uma concentração de 0,51% (v/v), sendo a maior hidrólise da lactose com a menor concentração de enzima. Nesse ponto chegou-se a 98,24% de hidrólise da lactose.

Figura 8 - Superfície de resposta e curvas de contorno (a) e (b) para a *Kluyveromyces lactis*



Fonte: PROTIMIZA, 2014

Figura 9 - Superfície de resposta e curvas de contorno (a) e (b) para a *Aspergillus oryzae*



Fonte: PROTIMIZA, 2014.

5.2.4 Análise comparativa com a legislação

Estão em vigor no Brasil duas resoluções que tratam de regras relacionadas a produtos que contém ou não lactose em sua composição. Uma trata de requisitos técnicos dos alimentos para dietas com restrição de lactose, e a outra para determinar os requisitos para a declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos demais alimentos. A primeira é a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 135, de 8 de fevereiro de 2017 (ANVISA, 2017) publicada no DOU n° 29, de 9 de fevereiro de 2017, que altera a Portaria SVS/MS n° 29, de 13 de janeiro de 1998, para regulamentação de alimentos com fins especiais, que inclui alimentos para dietas com restrição de lactose. Conforme essa RDC 135/2017, os alimentos para dietas com restrição de lactose são classificados como: baixo teor de lactose e isentos de lactose. A segunda se trata da Resolução da Diretoria Colegiada n° 136/2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017), que define que as informações de lactose devem ser colocadas no rótulo, independentemente do tipo de alimento. A declaração da presença de lactose se torna obrigatória nos alimentos incluindo bebidas, ingredientes, aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia, ou seja, qualquer alimento que contenha lactose em quantidade acima de 0,1% deverá trazer a frase “**Contém lactose**” em seu rótulo (BRASIL, 2017b). A tabela 14 resume e relaciona a quantidade de lactose presente no alimento com a declaração obrigatória no rótulo do produto.

Tabela 14 - Resumo e relação entre a porção de lactose no alimento com a declaração obrigatória no rótulo do produto

Quantidade de Lactose no produto final	Expressão no rótulo
Abaixo de 0,1g.100g⁻¹ ou ml	0% de Lactose Sem Lactose Não Contém lactose Zero Lactose Isento de Lactose
De 0,1g até 1g.100g⁻¹ ou ml	Baixo Teor de Lactose Baixo em Lactose
Igual ou acima de 0,1 g.100g⁻¹ ou ml	Contém Lactose

Fonte: Adaptado de Brasil (2017 a, b).

Com os resultados dos ensaios, de acordo com o delineamento experimental, obtiveram-se alguns pontos que chegaram ao nível de atendimento da legislação em vigor, tanto para produto zero lactose, quanto para produto com teor reduzido de lactose.

Pode-se observar na tabela 15, para as duas enzimas, pontos que, de acordo com a exigência da RDC n° 135/2017, estão dentro do limite para ser considerado um produto com

baixo teor de lactose. Para isso, analisando-se os dados, verificou-se que ocorreu de 83,84 a 95,4% da hidrólise da lactose na ação da *Kluyveromyces lactis* e de 80,23 a 94,14% na atividade da *Aspergillus oryzae*, sendo que o alimento deve conter de 0,1g.100ml⁻¹ até 1g.100ml⁻¹ de lactose no produto final para ser declarado produto com baixo teor de lactose.

Tabela 15 - Concentração de lactose das duas enzimas no limite exigido para produto com teor baixo de lactose conforme a RDC135/2017

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (%)	Hidrólise da lactose (%)	Concentração (g.100ml ⁻¹)
Leite in natura	-	-	-	0	4,92
<i>Kluyveromyces lactis</i>					
3L	20,00	360,00	0,20	89,39	0,52
5L	20,00	30,00	0,60	91,57	0,42
6L	50,00	30,00	0,60	95,44	0,22
8L	50,00	360,00	0,60	92,48	0,37
9L	9,80	195,00	0,40	83,84	0,80
11L	35,00	0,00	0,40	85,14	0,73
15L	35,00	195,00	0,40	93,62	0,31
16L	35,00	195,00	0,40	94,09	0,29
17L	35,00	195,00	0,40	93,64	0,31
<i>Aspergillus oryzae</i>					
7o	40,00	360,00	0,60	93,45	0,32
12o	55,00	472,50	0,40	93,91	0,30
14o	55,00	195,00	0,70	94,14	0,29
15o	55,00	195,00	0,40	82,23	0,87
16o	55,00	195,00	0,40	80,23	0,97
17o	55,00	195,00	0,40	82,22	0,88

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por outro lado, para produtos zero lactose, apenas a *Kluyveromyces lactis* mostrou eficácia para esse propósito, chegando ao atendimento do mínimo da legislação em dois pontos, em diferentes condições, como mostrado na tabela 16.

Tabela 16 - Concentração de lactose da KL no limite exigido para produto zero lactose conforme a RDC135/2017

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (%)	Hidrólise da lactose (%)	Concentração (g.100ml ⁻¹)
Leite in natura	-	-	-	0	4,92
<i>Kluyveromyces lactis</i>					
12L	35,00	472,50	0,40	98,01	0,10
14L	35,00	195,00	0,70	98,59	0,07

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em concordância com a tabela 16, obteve-se êxito na temperatura ótima de atividade dessa enzima (35°C), com menor tempo de 195 minutos a uma concentração da lactase de 0,70%. Da mesma forma, com um maior tempo (472,5 minutos) e uma concentração menor de enzima (0,4%), os dois pontos tiveram mais de 98% da lactose hidrolisada. Em trabalhos com a mesma finalidade, Nicoletti et al. (2016) conseguiram um valor menor que 0,1g de lactose por 100g de produto final, utilizando 0,1% de concentração de enzima, por 3 horas com a temperatura de 37°C. Skryplonek et al., (2017) com o mesmo objetivo, obteve sucesso com 3 horas de experimento, com valor menor que $0,1\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de produto preparado a uma concentração de enzima de 4000 NLU/L.

Esse índice máximo de 0,1% de lactose é considerado seguro para os consumidores intolerantes, e foi baseado na experiência de países europeus (ANVISA, 2017). Nesse cenário, a redução do nível de lactose nos produtos deslactosados aumenta ainda mais a importância na implementação de métodos analíticos eficientes e de baixo custo para a quantificação da lactose (PAIVA et al., 2018).

De acordo com Vinhal (2001) o grau de hidrólise no leite esta diretamente ligado a quantidade de lactase adicionada, da temperatura, do pH, da atividade enzimática e das condições de processamento. Para a indústria, quanto à velocidade de processo, é um resultado de maior êxito, pois quanto menor o tempo de hidrólise, maior é o favorecimento no processo produtivo (SILVA, 2016).

5.3 Estudo econômico das melhores condições

Conforme o objetivo do trabalho, a partir dos melhores pontos de hidrólise da lactose (tabelas 15 e 16), fez-se um estudo econômico e comparativo de cada ponto para verificar a viabilidade econômica, e assim então, escolher a melhor condição para a produção de produtos zero lactose e com teor baixo de lactose conforme a legislação vigente.

Para os cálculos de gasto de energia, pegou-se o valor da potência da incubadora shaker, junto com a quantidade de horas que foi utilizada, fez-se uma simulação pelo software da Energisa – simulador de consumo, e obteve se o preço com os impostos já embutidos de acordo com a quantidade de kWh utilizada para fazer em cada ensaio, sendo que a tarifa que está em vigor na cidade de Palmas – TO é de 0,605kWh. O preço cobrado considera a composição da tarifa somada a impostos como ICMS e PIS/COFINS (ENERGISA, 2019).

Os cálculos de gastos de enzima e leite fizeram-se de acordo com o valor de cada produto e a quantidade utilizada para cada ensaio. A tabela 17 mostra os valores (R\$) de cada produto utilizado para executar esse experimento.

Tabela 17 - Relação de produtos e valores (R\$) utilizados para a execução do experimento

Nome	Quantidade		Preço (R\$)	Preço (R\$)/ μ l, ml, kWh
Leite integral UHT	1000	ml	3,99	0,0040
Enzima <i>Kluyveromyces lactis</i>	7000	μ l	62,80	0,0090
Enzima <i>Aspergillus oryzae</i>	15000	μ l	65,30	0,0044
Energia	1	kWh	0,605	0,6050

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram feitos os estudos econômicos para cada ensaio. Os resultados (tabela 18) demonstram que as duas enzimas, provenientes de microrganismos diferentes, quando submetidas às mesmas condições de temperaturas ótimas para cada uma, de tempo, e de concentração de enzima, apresentaram comportamentos diferentes, destacando-se o desempenho superior apresentado pela enzima *Kluyveromyces lactis* no ensaio 11L, com temperatura de 35°C, tempo zero e concentração de 0,40% de enzima para elaborar produtos com teor baixo de lactose, e 14L com 35°C, tempo de 195 minutos e concentração de 0,70% na desenvolvimento de produtos zero lactose.

Levando-se em consideração que as enzimas utilizadas nesse experimento foram adquiridas em comércio local, onde qualquer consumidor tem acesso livre, um dos focos desse estudo foi o de levar ao consumidor a informação do custo-benefício do produto a ser utilizado no controle da intolerância a lactose. Por outro lado, a pesquisa também serve de embasamento para as indústrias alimentícias, com a intenção de desenvolver esse tipo de produto, sendo que em condições industriais, as concentrações, tempo e tipo de enzima seriam diferentes, haja vista que a enzima utilizada nesse experimento é comercial e não industrial, além das variações provenientes das diferentes escalas.

Tabela 18 - Análise econômica das melhores condições para *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus oryzae*

BAIXO TEOR DE LACTOSE											
Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	kWh	Concentração (%)	Concentração (µL)	Hidrólise da lactose (%)	Concentração (g/100mL)	Energia (R\$)	Enzima (R\$)	Leite (R\$)/100ml	Custo Total (R\$)
<i>Kluyveromyces lactis</i>											
3L	20,00	360,00	5,40	0,20	100	89,39	0,52	5,03	0,90	0,40	6,33
5L	20,00	30,00	0,45	0,60	300	91,57	0,42	0,42	2,70	0,40	3,52
6L	50,00	30,00	0,45	0,60	300	95,44	0,22	0,42	2,70	0,40	3,52
8L	50,00	360,00	5,40	0,60	300	92,48	0,37	5,03	2,70	0,40	8,13
9L	9,80	195,00	2,93	0,40	200	83,84	0,80	2,72	1,80	0,40	4,92
11L	35,00	0,00	0,00	0,40	200	85,14	0,73	0	1,80	0,40	2,20
15L	35,00	195,00	2,93	0,40	200	93,62	0,31	2,72	1,80	0,40	4,92
16L	35,00	195,00	2,93	0,40	200	94,09	0,29	2,72	1,80	0,40	4,92
17L	35,00	195,00	2,93	0,40	200	93,64	0,31	2,72	1,80	0,40	4,92
<i>Aspergillus oryzae</i>											
7o	40,00	360,00	5,40	0,60	300	93,45	0,32	5,03	1,32	0,40	6,75
12o	55,00	472,50	7,09	0,40	200	93,91	0,30	6,6	0,88	0,40	7,88
14o	55,00	195,00	2,93	0,70	368	94,14	0,29	2,72	1,62	0,40	4,74
15o	55,00	195,00	2,93	0,40	200	82,23	0,87	2,72	0,88	0,40	4,00
16o	55,00	195,00	2,93	0,40	200	80,23	0,97	2,72	0,88	0,40	4,00
17o	55,00	195,00	2,90	0,40	200	82,22	0,88	2,72	0,88	0,40	4,00
ZERO LACTOSE											
Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	kWh	Concentração (%)	Concentração (µL)	Hidrólise da lactose (%)	Concentração (g/100mL)	Energia (R\$)	Enzima (R\$)	Leite (R\$)/100ml	Custo Total (R\$)
12L	35,00	472,50	7,10	0,40	200	98,01	0,10	6,6	1,80	0,399	8,80
14L	35,00	195,00	2,90	0,70	368	98,59	0,07	2,72	3,31	0,399	6,43

*L = Ensaio com a lactase derivada da *Kluyveromyces lactis*

*o = Ensaio com a lactase derivada do *Aspergillus oryzae*

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 CONCLUSÃO

Com base nesse estudo, concluiu-se que a hidrólise da lactose foi diretamente influenciada pelas variações de concentração, temperatura e tempo. Levando-se em consideração essas condições, o máximo de hidrólise alcançado pelos experimentos foi de 98,59%, por meio da lactase derivada da levedura *Kluyveromyces lactis*, a 35°C, numa concentração de 0,70% (v/v) em 195 minutos de reação. O produto final apresentou 0,07 g.100 ml⁻¹, sendo que, apenas essa enzima conseguiu atender aos pré-requisitos da RDC n°135/2017, para produtos zero lactose. Visto que a enzima utilizada foi de natureza comercial varejista, e não industrial, as condições para sua aplicação em nível industrial tendem a ser parcialmente diferentes daquelas alcançadas nesta pesquisa, especialmente em função dos diferentes padrões de desempenho cinético das referidas enzimas e das diferenças de escala. No presente caso, alcançou-se o intuito de levar ao consumidor a informação do custo-benefício do produto a ser utilizado no controle da sua intolerância a lactose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 135, de 08 de fevereiro de 2017**. Alteração da Portaria SVS/MS nº 29, de 13 de janeiro de 1998, que aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre os alimentos para dietas com restrição de lactose. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 09 fev. 2017. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=44&data=09/02/2017>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

BALIEIRO, A. L. **Obtenção de leite com baixo teor de lactose utilizando matrizes hidrofóbicas**. Aracaju: UNIT, 2014. Tese (Doutorado em Engenharia de processos).

BARBOSA, G. H. V. **Características corporais e produtivas em fêmeas primíparas da raça Gir Leiteiro em prova de desempenho em pasto**. 2017. 62p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Zootecnia. APTA/SAA, Nova Odessa.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13. ed. São Paulo: Editora Noel, 1999.

BELL, JULIANA M.L.N. DE MOURA ET AL. **Modeling lactose hydrolysis for efficiency and selectivity: Toward the preservation of sialyloligosaccharides in bovine colostrum whey permeate**. Journal Of Dairy Science. v. 99, n. 8, p.6157-6163. 2016. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11065>.

BELOTI, VANERLI; TAMANINI, RONALDO. **Propriedades organolepticas e fisico-quimica do leite**. In: Vanerli Beloti (Org.). Leite: Obtenção, Inperção, e Qualidade. Led. Londrina. Editora Planta, 2015, v. 1, p. 51-107.

BERNI CANANI R, PEZZELLA V, AMOROSO A, COZZOLINO T, DI SCALA C, PASSARIELLO A. **Diagnosing and treating intolerance to carbohydrates in children**. *Nutrients*. 2016. 10;8 (3):157. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/3/157>.

BOSSO, A. **Atividade enzimática e estabilidade térmica da β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e *aspergillus oryzae***. 2012. Londrina. Dissertação de Mestrado.

BOX, G.E.P.; WILSON, K.B. **On the experimental attainment of optimum conditions**. Journal Royal Statistics Society, New York, B13, 1951. 38p.

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: An introduction to designs, data analysis and model building**. Wiley. New York, 1978.

BRANCO MSC, DIAS NR, FERNANDES LGR, BERRO E, SIMIONI PU. **Classificação da intolerância à lactose: uma visão geral sobre causas e tratamentos.** Rev Ciênc Méd. 2017;26(3):117-125. <http://dx.doi.org/10.24220/2318-0897v26n3a3812>.

BRANNON, P.M.; CARPENTER, T.O.; FERNANDEZ, J.R.NIH. **Consensus development conference statement: lactose intolerance and health.** NIH Consens State Science Statements, 27, 1-27, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde da criança: **Nutrição infantil, aleitamento materno e alimentação complementar.** Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de atenção à saúde. Departamento e atenção básica, 2009.

BRASIL. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 135, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017.** Altera a Portaria SVS/MS no 29, de 13 de janeiro de 1998, que aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre os alimentos para dietas com restrição de lactose. Brasília, DF, 08 fevereiro 2017Diário Oficial da União. 2017a.

BRASIL. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 136, DE 8 DE FEVEREIRO DE 2017.** Estabelece os requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos. Brasília, DF, 08 fevereiro 2017Diário Oficial da União, 2017b.

BRITO, MARIA APARECIDA; BRITO, JOSÉ RENALDI; ARCURI, EDNA; LANGE, CARLA; SILVA, MÁRCIO; SOUZA, GUILHERME. **Qualidade e segurança.** Embrapa, 2015. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_58_217200392359.html>. Acesso em: 28/02/2019.

BRITO., M. A. P. E; COSTA., F. F.; BRITO., J. R. **Aspectos associados á qualidade do leite: composição, saúde do úbere e resíduos químicos. Qualidade microbiológica do leite cru.** Viçosa, MG: EPAMIG Zona da Mata. p.272, 2013.

CAMPOS TCAS, D'ALMEIDA WK, ARAGON-ALEGRO LC, ROIG SM, **Sugimoto HH / UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde.** 2009;11(4):51-4.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A. **Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo.** Rev. Bras. Zootec., v.39, p.434-439, 2010.

CZARNOBAY, M. et al. **Cinética de hidrólise de lactose em leite de ovelha e leite de vaca.** Revista CIATEC – UPF, v. 9, n. 1, p. 15-24, 2017.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Classificação pela forma física do sistema Cromatográfico. Química Nova**, v. 7, n. 7, p. 21-25, 1998.

ENERGISA. **Tipos de tarifas**. 2019. Disponível em: <<https://www.energisa.com.br/Paginas/informacoes/taxas-prazos-e-normas/tipos-Tarifas.aspx>>. Acesso em 03 abr. 2019.

ESCOBAR, GUILHERME PRATES, SOUZA, CLAUZIA FERNANDA VOLKEN DE, LEHN, DANIEL NEUTZLING. **Avaliação de β -galactosidase livre e imobilizada na hidrólise da lactose do permeado de soro de queijo**. Caderno pedagógico, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 117-129, 2014. ISSN 1983-0882.

FERNANDES, V. G., MARICATO, E. **Análises físico-químicas de amostras de leite cru de um laticínios em Bicas -MG**. Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes, Jul/Ago, nº 375, 65, 3:10. 2010.

FIGUEIREDO, T. M. P. **Validação de métodos analíticos. Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar**. 2012. 104f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

FIGUEIREDO, R. **Lactose – Intolerância à lactose**. 2014. Disponível em: <http://virtualmarketingpro.com/blog/rochafigueiredo/lactose-intolerancia-lactose/>. Acesso em: 15 mar. 2019.

FISCHER, J. **Hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo**. Uberlândia, MG. 2010. Dissertação de mestrado.

FREITAS, MARIANA C. DE.; URREJOLA, LUCIA D. H.; DINIZ, MARIA C. T.; SILVA, VERA S. N. DA.; BAGGIO, SUELI R. **Desenvolvimento de metodologia para análise de amostras lácteas com teor reduzido de lactose utilizando hplc-elsd**. 11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017 02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo ISBN 978-85-7029-141-7.

GAMBELLI, L. **Milk and Its Sugar-Lactose: A Picture of Evaluation Methodologies**. Beverages, v. 3, p. 35, 2017.

GAVILANES, A. C. B.. **Diseño de modelos estandarizados de hidrólisis de lactosa como sustrato para fermentación láctica**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidad del Azuay.

GODOY, G. G. DE. **Estudo da produção de lactase por fungos filamentosos**. 2016, 37 p.

(Monografia). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016 Lorena, 2016.

GRANATO, Daniel; NUNES, Domingos Sávio. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas: Uma Abordagem Teórico-Prática.** ed 1. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. **Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects.** International Dairy Journal, v. 22, p.104-109, 2012.

HATZINIKOLAOU, D. G., KATSIFAS, E., MAMMA, D., KARAGOUNI, A. D., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., **Modeling of the simultaneous hydrolysisultrafiltration whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*.** Biochemical Engineering Journal, v. 24, pp.161- 172 (2005).

HOSHINO, L. K. O. et al. **Estudo da hidrólise na obtenção de leite lactose hidrolisado micro filtrado e avaliação de parâmetros físico-químicos para determinação da sua vida útil.** Congresso interinstitucional de iniciação científica, 3., 2009, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas: IAC, 2009 Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2009/Artigos/RE0901015.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS. **Ingredientes, aplicação da proteína.** Revista Indústria de Laticínios, n. 134, setembro/outubro 2018. ISSN 1678-7250. Disponível em: <http://www.revistalaticinios.com.br/download/edicoes_anteriores/IL-134-final-bx-site.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2019.

KIMURA, Giselle Kobata. **Investigação do potencial celulolítico de bactérias oriundas de processo de compostagem.** 2014. 62 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/316714>>. Acesso em: 24 jan. 2019.

KLOBITZ, Maria Gabriela Bello. **Matéria-prima Alimentícias: Composição e Controle de Qualidade.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

LOMER, M., PARKES, G., SANDERSON, J. Review article: **Lactose intolerance in clinical practice - Myths and realities.** Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 27:2 (2008) 93–103.

LONGO, GIOVANA. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. Curitiba, 2006.

xviii, 89 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

LULE VK, GARG S, TOMAR SK, KHEDKAR CD, NALAGE CD, NALAGE DN. **Food Intolerance: Lactose Intolerance. Encyclopedia of Food and Health.** p. 43-48. 2016.

MARINHO, R. **Sobremesa láctea sem lactose e sobremesa de soja enriquecidas com fibras e calda de morango.** Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, PR. 2014. Monografia.

MATTAR, R., FERRAZ, D., MAZ O, C. **Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular.** Rev Assoc Med Bras 56:2 (2010) 230- 236.

MONTI, L. et al. **Lactose, galactose and glucose determination in naturally “lactose free” hard cheese: HPAEC-PAD method validation.** Food Chemistry, v. 220, p. 18-24, 2017.

MOURA, KÁTIA REGINA MARQUES. **Otimização do processo de Produção de biodiesel metílico do sebo bovino aplicado um deliamento composto central rotacional (DCCR) e a avaliação da estabilidade térmica.** 2008. 126p. Tese (doutorado) – UFPB/CCEN.

MOREIRA, K. M. M.; COELHO, L. H.; PERINI, C. C.; RAPACCI, M.; KARAM, L. B. **Produção de doce de leite com teor reduzido de lactose por β -galactosidase.** Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais. Curitiba, v. 7, n. 4, p. 375-382, 2009.

MORZELLE, M.C. **Composição química do leite.** USP. Piracicaba, SP. 2016. Disponível em: <<https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=923423>>. Acesso em: 21 fev. 2019.

NAEGELE, E. **Analysis of Lactose Free Dairy Products using the Agilent 1220 Infinity LC with Evaporative Light Scattering Detection.** Agilente Technologies, Inc., 2013-2016. Published in USA, Published in the USA, October 1, 2016. 5991-2252EN.

NATIONAL DAIRY COUNCIL. Cow's Milk Allergy versus Lactose Intolerance. **Dairy Council Digest**, Rosemont, v. 77, n. 3, p. 13-18, 2006. Disponível em: <<http://www.nationaldairyCouncil.org/Research/DairyCouncilDigestArchives/Pages/dcd77-3Page1.aspx>>. Acesso em: 19 Fev 2019.

NATIONAL DAIRY COUNCIL. **Lactose Intolerance: new understandings. Dairy Council Digest**, Rosemont, v.81, n.4, p.19-24, 2010.

NICOLETTI, G.; VERDI, K. J.; ENDRES, C. M. **Development of cottage cheese lactose free with fiber addition and reduction of sodium and fat.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 71, n. 4, p. 186-196, 2016.

NOGUEIRA, Maíra Barreto et al. **Perfil da qualidade do leite em propriedade rural do município de Itaperuna, Rio de Janeiro, Brasil.** Acta Biomédica Brasiliensia, [s.l.], v. 9, n. 1, p.137-147, 10 abr. 2018. Universidade Iguazu - Campus V. <http://dx.doi.org/10.18571/acbm.162>.

OLIVEIRA, C.; GUIMARÃES, P. M. R.; DOMINGUES, L. **Recombinant microbial systems for improves β -galactosidase production and biotechnological applications.** Biotechnology Advances, v. 29, p. 600-609, 2011.

OLIVEIRA, M. S.; TEIXEIRA, R. F., ALMEIDA, L. S.; MORAES, C. C.; MANERA, A. P. **Influencia da temperatura na hidrólise enzimática da lactose.** In; 8º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE), 2016. Uruguaiana – RS.

PAIVA, V. N.; GOMES, E. R.; SANTOS, V. M. D.; STEPHANI R.; CARVALHO, A. F. D.; PERRONE, Í. T. **desafios tecnológicos na produção de produtos com baixo teor de lactose.** Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 73, n. 2, p. 91-101, abr/jun, 2018.

PELIZZA, ANGELA. **Características de produção e composição do leite e do perfil metabólico de vacas da raça holandês e mestiças holandês x jersey no período do parto.** 2015. p.126. Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

PERATI, P., DE BORBA, B., ROHRER, J. **Determination of Lactose in Lactose-free Milk Products by High-performance Anionexchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection.** Thermo Fisher Scientific, Application Note 248, 2016.

PEREIRA, M.C.S.; BRUMANO, L.P.; KAMIYAMA, C.M.; PEREIRA, J.P.F.; RODARTE, M.P.; PINTO, M.A.O. **Low-lactose dairy: a necessity for people with lactose maldigestion and a niche market.** Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes, n. 389, v. 67, p. 57-65, 2012.

PERISSINATO, A.G. **Formulações sólidas de lactase: estudos de estabilidade acelerada, liberação e sua quantificação por espectroscopia no infravermelho.** Universidade Federal de Alfenas. Alfenas, MG. 2016. Dissertação de mestrado.

PROTIMIZA. **Protimiza experimental design.** Campinas: PROTIMIZA, 2014. Versão 1. Disponível em: <experimental-design.protimiza.com.br>. Acesso em: 05 Mar. 2019.

PROZYN. **Produtos com baixa lactose**. Informação técnica. 2010. Disponível em: <<http://www.prozyn.com.br>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

RAMALHO, M.E. O.; GANECO, A.G. **Intolerância a lactose e o processamento dos produtos zero lactose**. 2016. Faculdade de Tecnologia de Taquaritinga – São Paulo – Brasil.

RAMOS, A.F. **Avaliação de aspectos físico-químicos, sensoriais e reológicos de sorvete gourmet elaborado com teor reduzido de lactose**. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juíz de Fora, MG. 2016. Dissertação de mestrado.

RODRIGUES, M. I., & IEMMA, A. F. (2009). **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2009. 2 ed. p. 358. Campinas: Cárita.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007. 314 p.

SCHEPPINGEN-VAN, W. B. et al. **Selective and sensitive determination of lactose in lowlactose dairy products with HPAEC-PAD**. Journal of Chromatography B, v. 1060, p. 395-399, 2017.

SGARBIERI, VALDEMIRO C. **Inovação nos processos de obtenção, purificação e aplicação de componentes do leite bovino**, São Paulo: Ed. Atheneu, 2012.

SHRESTHA, A. K. et al. **Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolysed skim milk powder**. LWT – Food Science and Technology, v. 40, n. 9, p. 1593-1600, 2007.

SILVA, ALAN CAMPOS DA. **Desenvolvimento de doce de leite sem adição de sacarose e sem lactose**. 2016. 75 p. 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, 2016.

SILVA, L.O.M. **Apresentação de propostas para a produção de sorvetes com baixo teor de lactose a partir de processos de separação por membrana (PSM)**. Universidade Federal de Uberlândia. Patos de Minas, MG. 2015. Monografia.

SOARES, L.F. et al. **Aspectos nutricionais e metabólicos da intolerância à lactose**. Revista Investigação Medicina Veterinária. 2016. v. 15, n. 4 (2016). Disponível em: <<http://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/1189>>. Acesso em 15 jan. 2019.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre : Bookman, 2006. 836 p.

SKRYPLONEK, K. Katarzyna, S. David, G. Jorge Viegas, Carlos Pereira, Marta Henriques. **Lactose-free frozen yogurt: production and characteristics**. Acta Scientiarum Polonorum-Technologia Alimentaria, v. 16, n. 2, p. 171-179, 2017.

TONETTI, D. **Leite semi-desnatado ultrapasteurizado com teor reduzido de lactose através do método enzimático**. 2015. 35 p. Monografia (Especialização em Gestão da Qualidade na Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2015.

TORRES, J. K. F. et al. **Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder**. Food Research International, v. 101, n. February, p. 45-53, 2017.

TORRES, J.K.F. STEPHANI, R.; TAVARES, G. M.; CARVALHO, A. F.; COSTA, R. G. B.;SCHUCK P.; PERRONE, I. T. **Hidrólise da lactose e produção de leite em pó: aspectos tecnológicos**. Revista Inst. Latic. “Cândido Tostes”. 2016. Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 94-105, abr/jun, 2016.

TRANI, A. et al. **Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk**. Food Chemistry, v. 233, p. 385-390, 2017.

TREVISAN, A. **Influência de diferentes concentrações de enzima lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado**. 2008. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

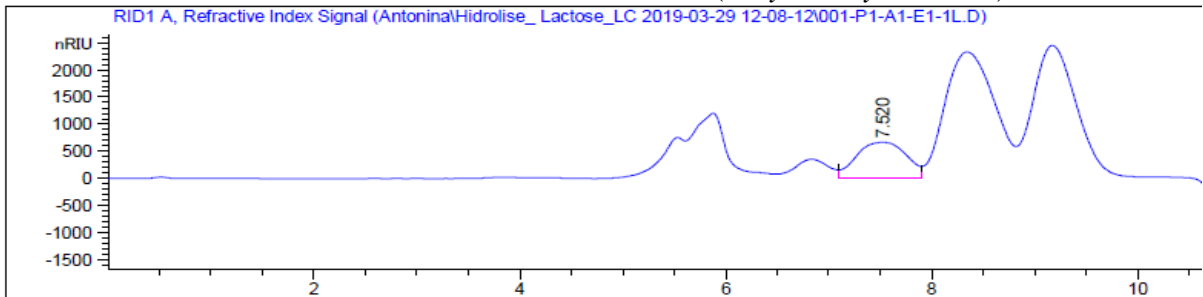
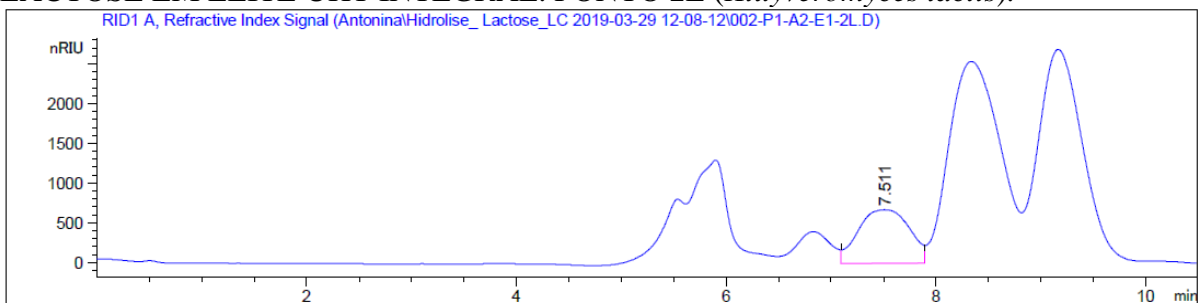
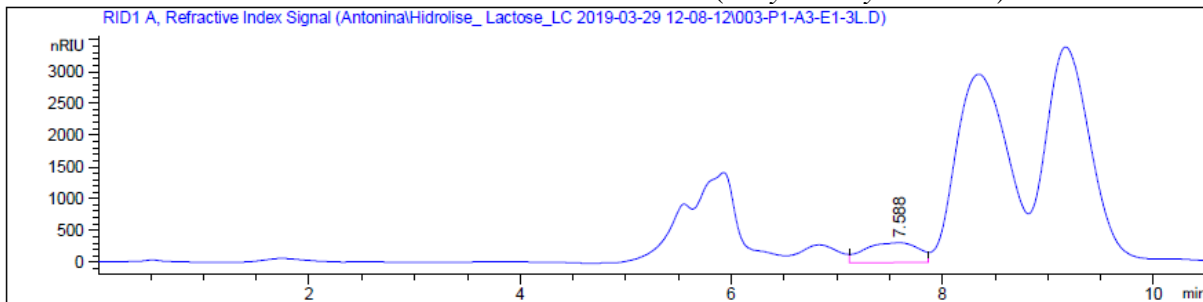
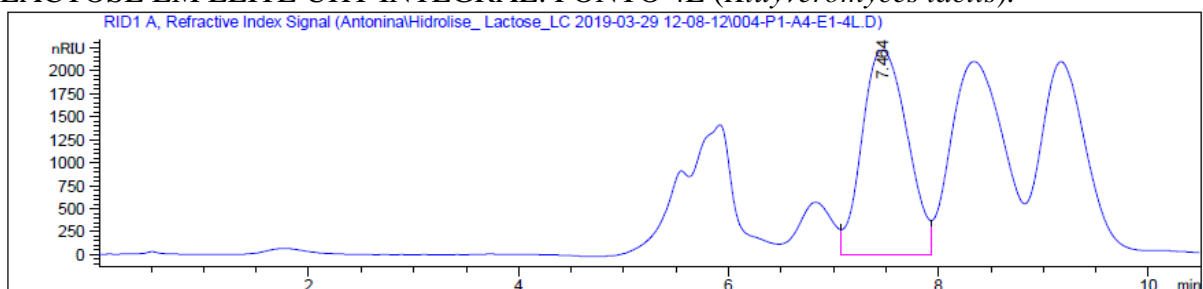
TRONCO, V. M. **Controle físico-químico do leite. Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: UFSM, 1997. 208p.

VANDENPLAS Y. **Lactose intolerance**. Asia Pac J Clin Nutr. 2015 [cited 2016 Nov 29];24:S9-13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pub. Med/26715083>.

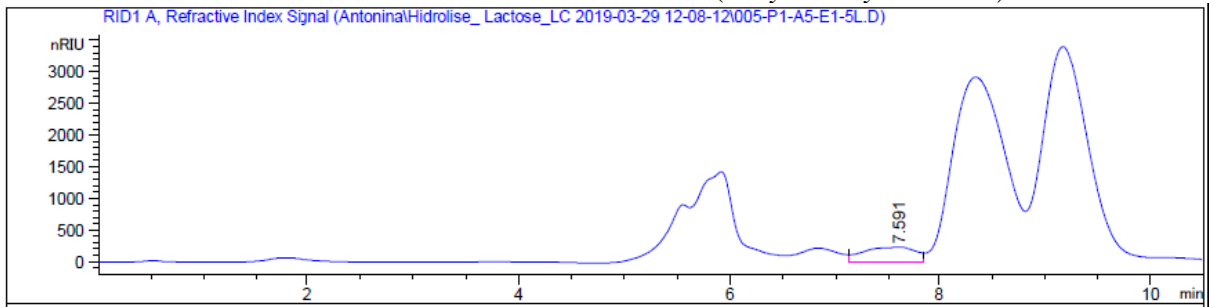
VASKOVA, H; BUCKOVA, M. **Measuringthe lactose content in milk**. MATEC Web of Conferences, 2016. Disponível em: <<https://www.matec->

conferences.org/articles/mateconf/abs/2016/39/mateconf_csc2016_05011/mateconf_csc2016_05011.html>. Acesso em: 13 Mar. 2019.

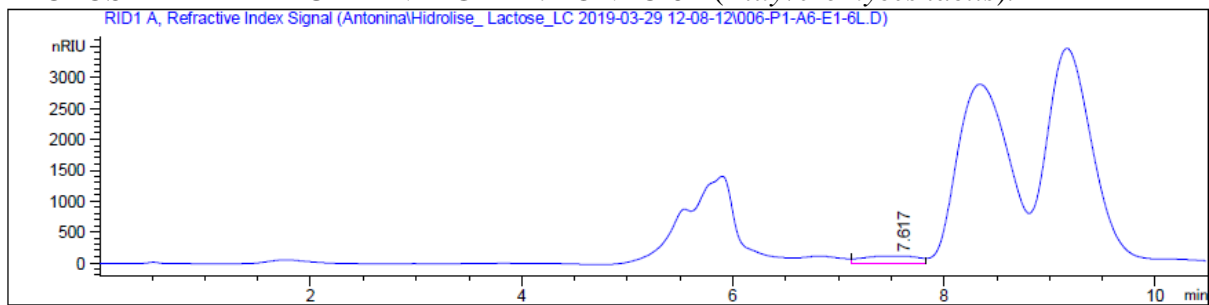
VINHAL, E. F. **Hidrólise da lactose no leite por β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis***. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 100p., 2001.

ANEXOS**I CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 1L (*Kluyveromyces lactis*).****II CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 2L (*Kluyveromyces lactis*).****III CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 3L (*Kluyveromyces lactis*).****IV CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 4L (*Kluyveromyces lactis*).**

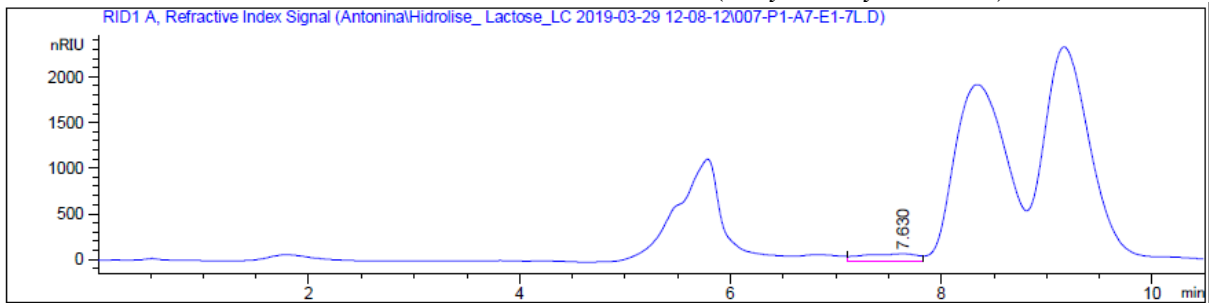
V CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 5L (*Kluyveromyces lactis*).



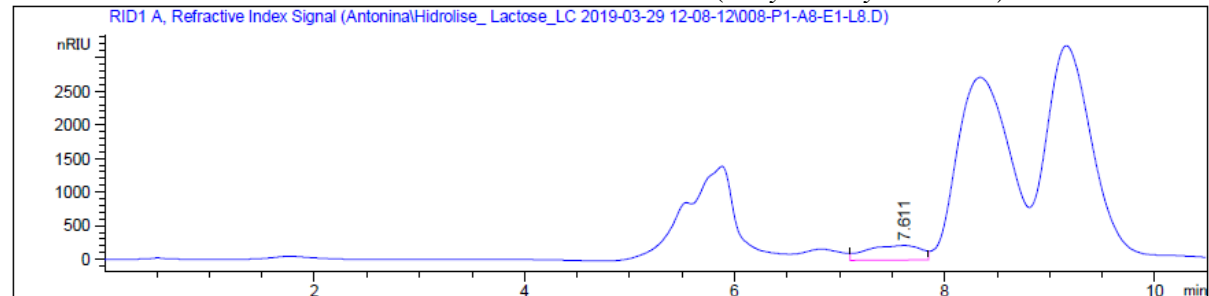
VI CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 6L (*Kluyveromyces lactis*).



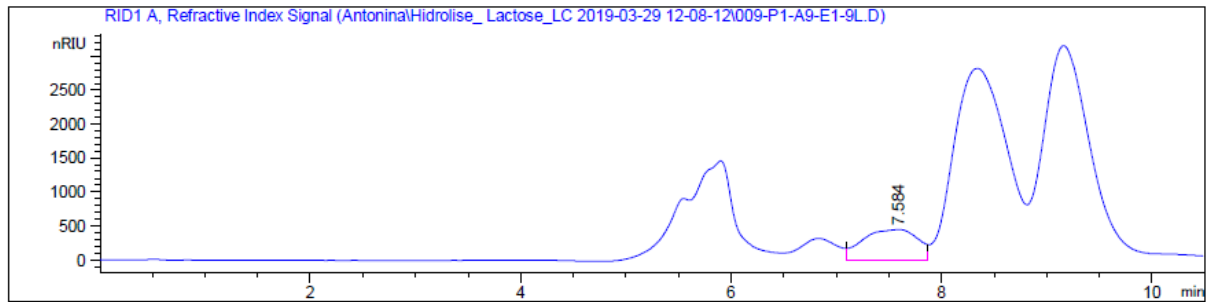
VII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 7L (*Kluyveromyces lactis*).



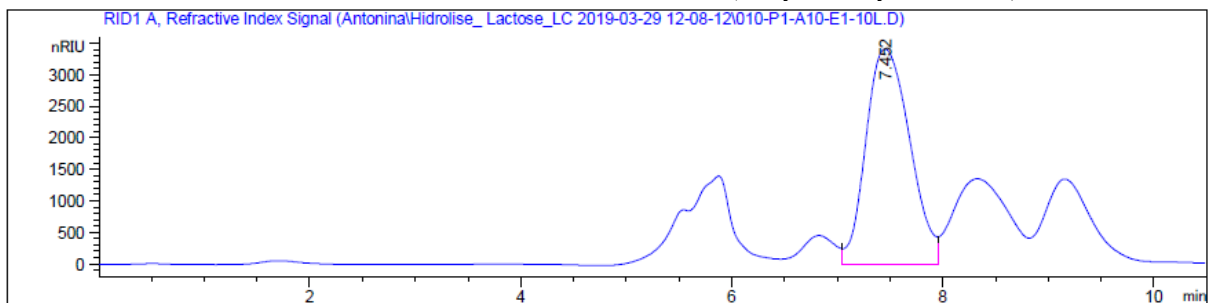
VIII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 8L (*Kluyveromyces lactis*).



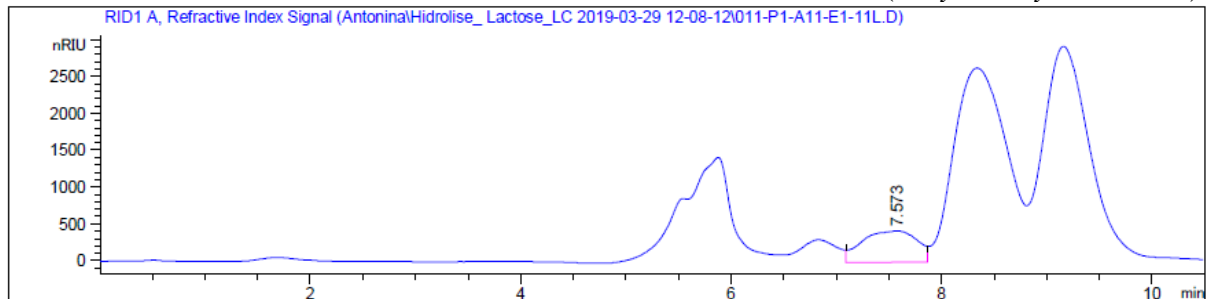
IX CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 9L (*Kluyveromyces lactis*).



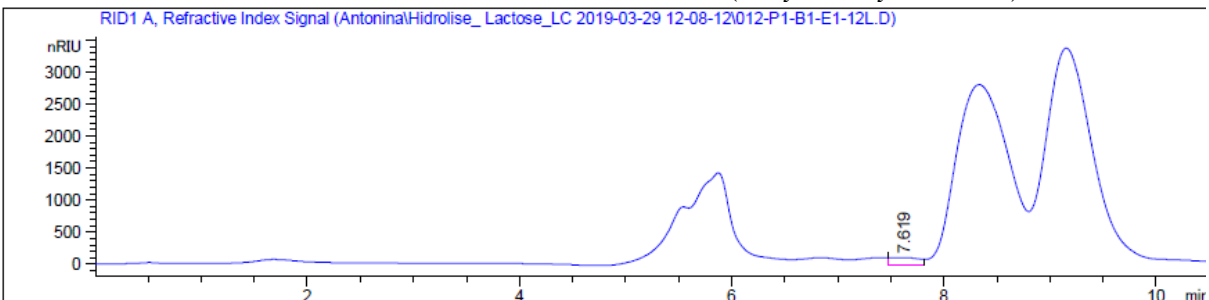
X CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 10L (*Kluyveromyces lactis*).



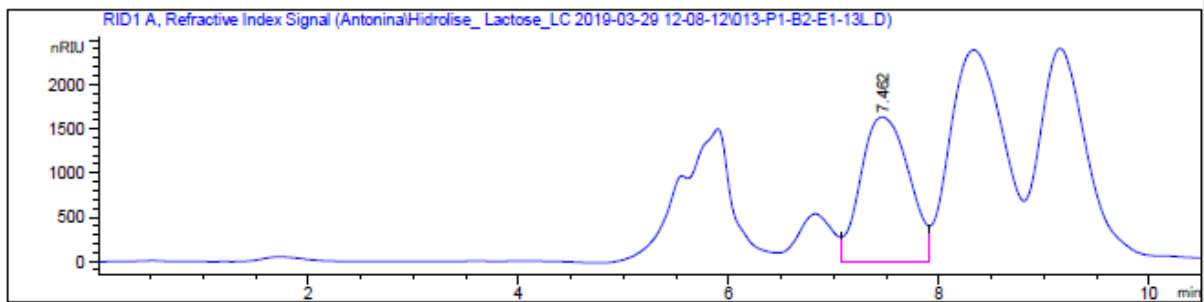
XI CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 11L (*Kluyveromyces lactis*).



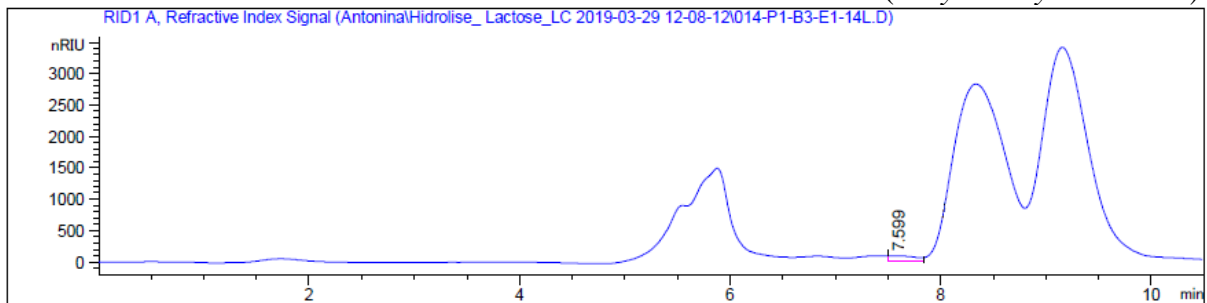
XII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 12L (*Kluyveromyces lactis*).



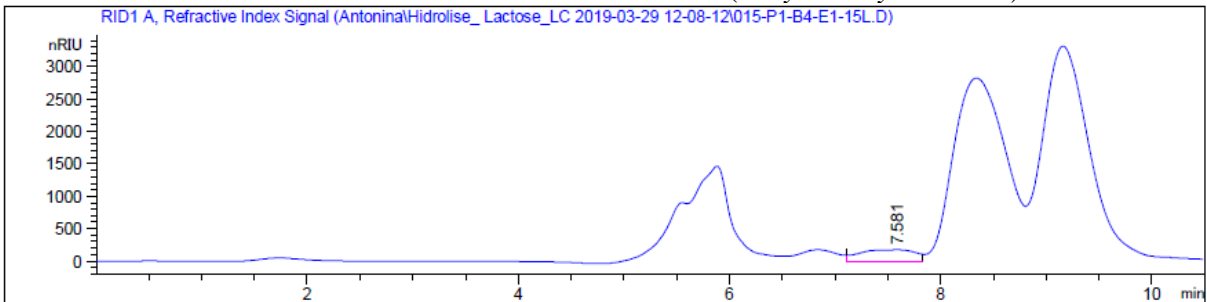
XIII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 13L (*Kluyveromyces lactis*).



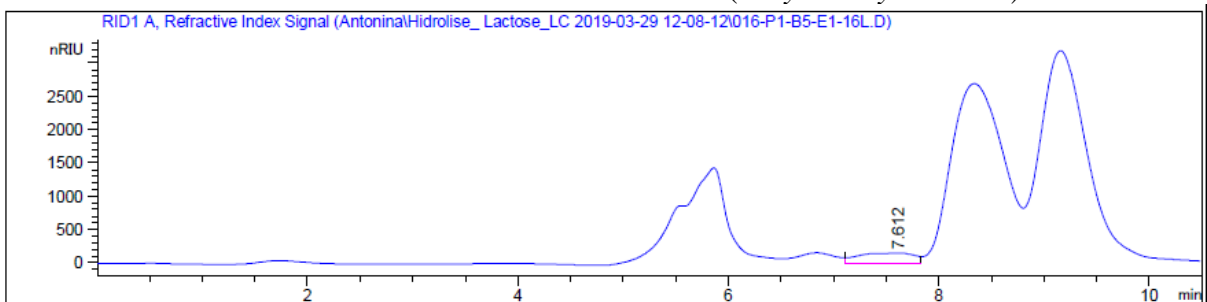
XIV CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 14L (*Kluyveromyces lactis*).



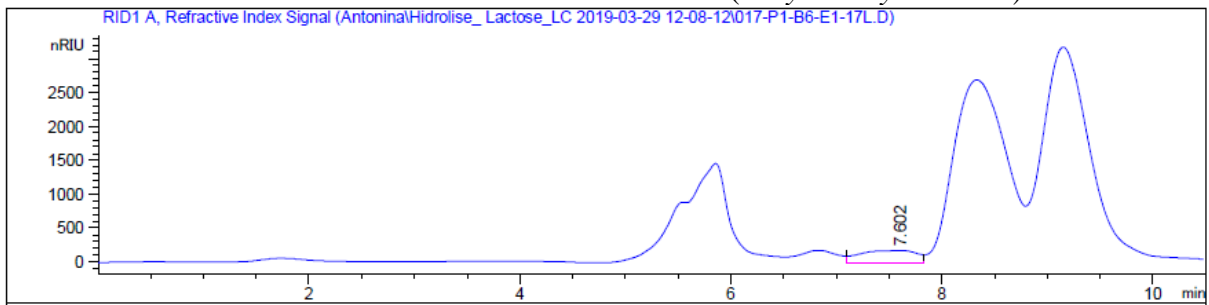
XV CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 15L (*Kluyveromyces lactis*).



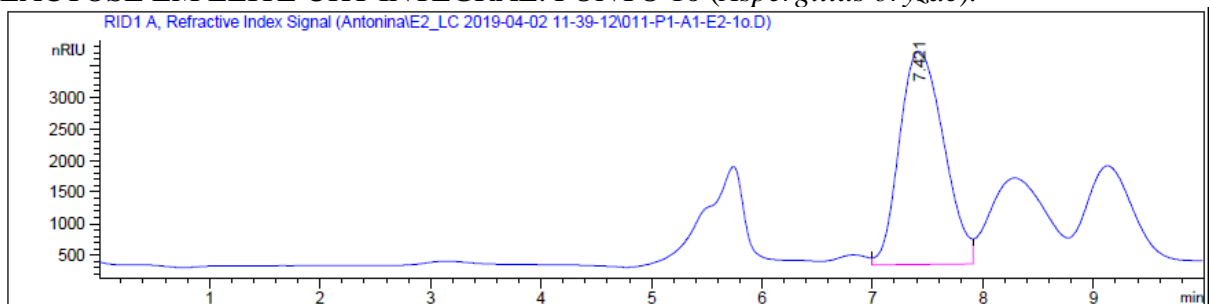
XVI CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 16L (*Kluyveromyces lactis*).



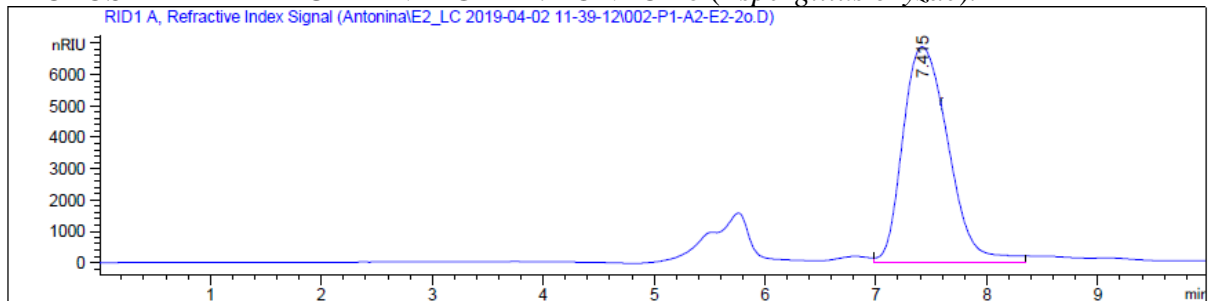
XVII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 17L (*Kluyveromyces lactis*).



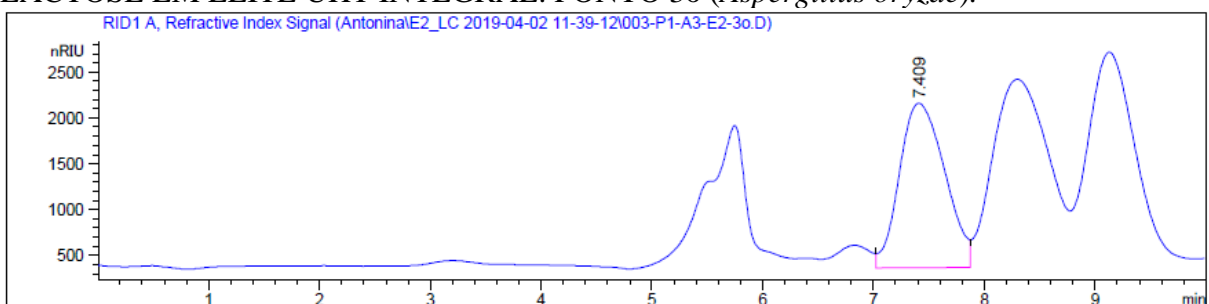
XVIII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 1o (*Aspergillus oryzae*).



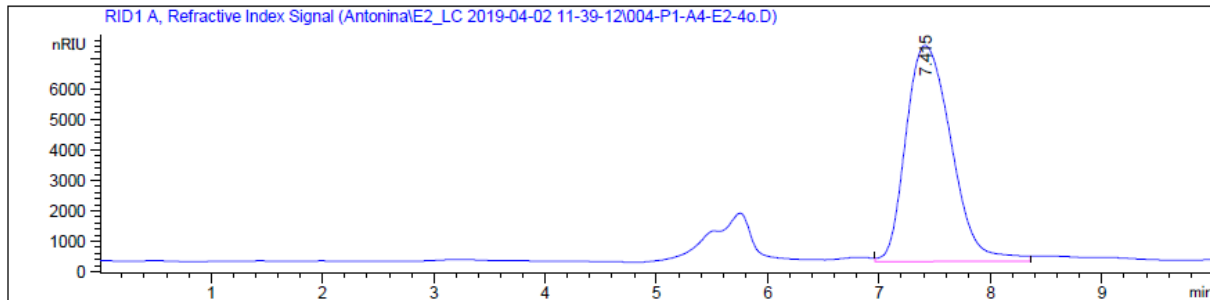
XIX CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 2o (*Aspergillus oryzae*).



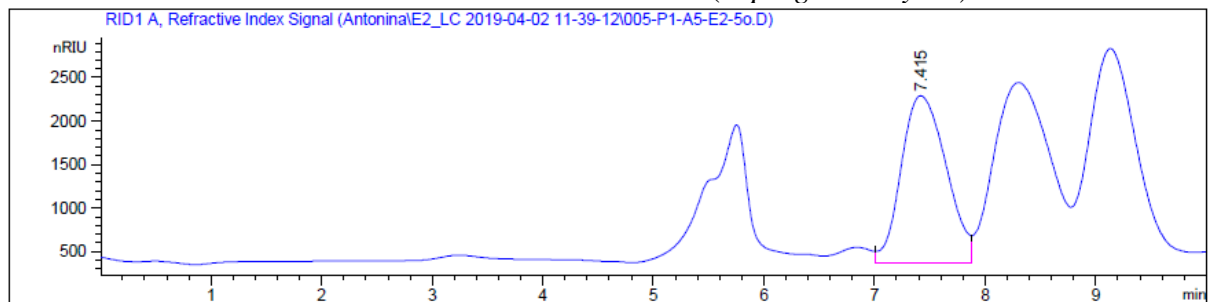
XX CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 3o (*Aspergillus oryzae*).



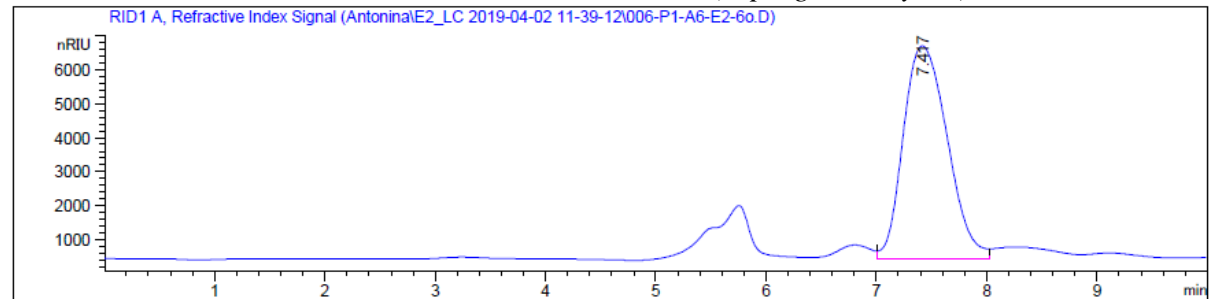
XXI CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 4o (*Aspergillus oryzae*).



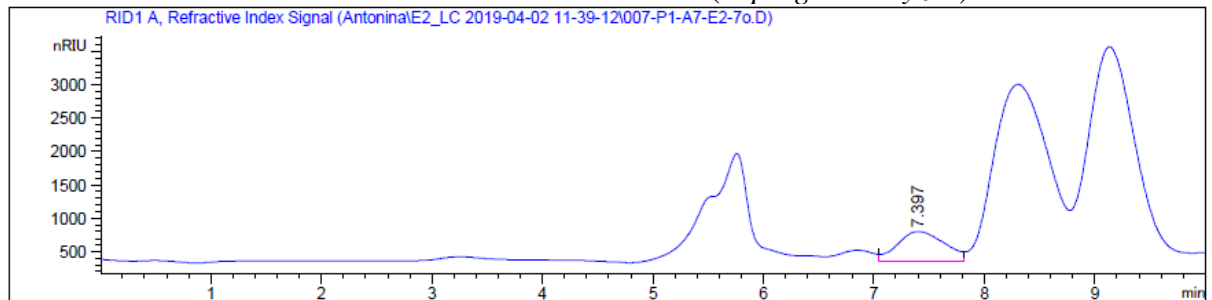
XXII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 5o (*Aspergillus oryzae*).



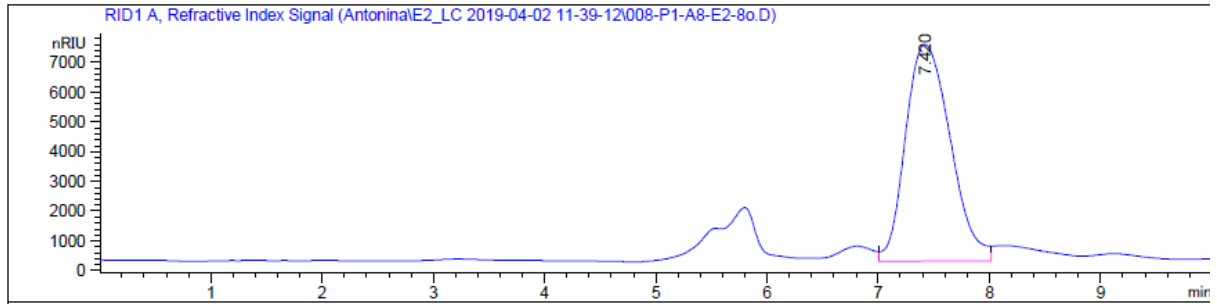
XXIII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 6o (*Aspergillus oryzae*).



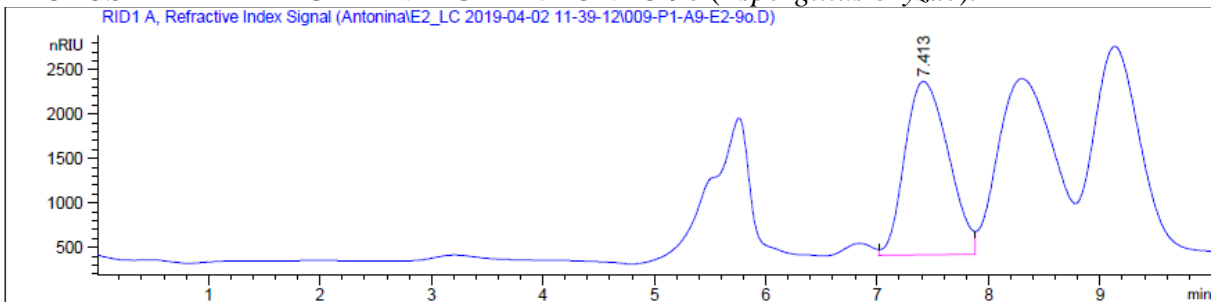
XXIV CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 7o (*Aspergillus oryzae*).



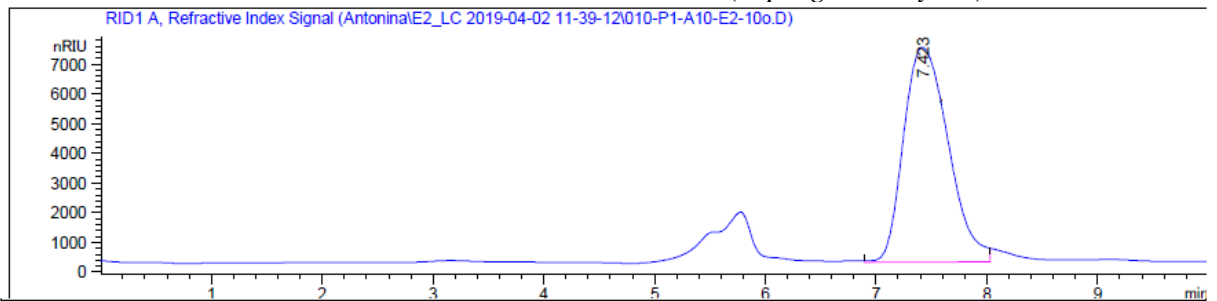
XXV CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 8o (*Aspergillus oryzae*).



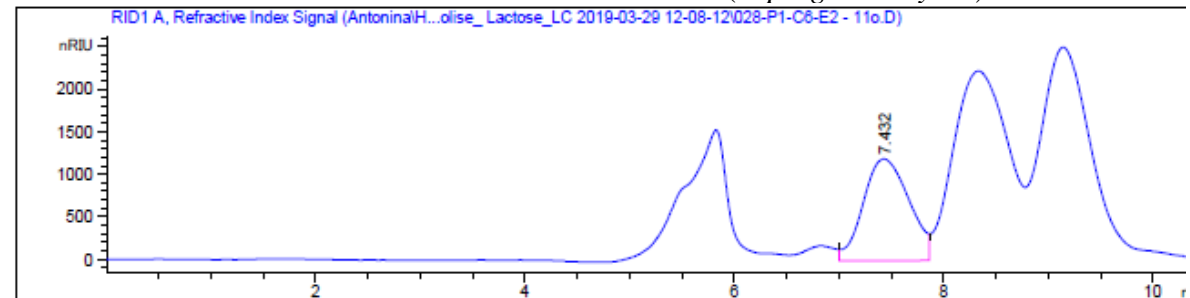
XXVI CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 9o (*Aspergillus oryzae*).



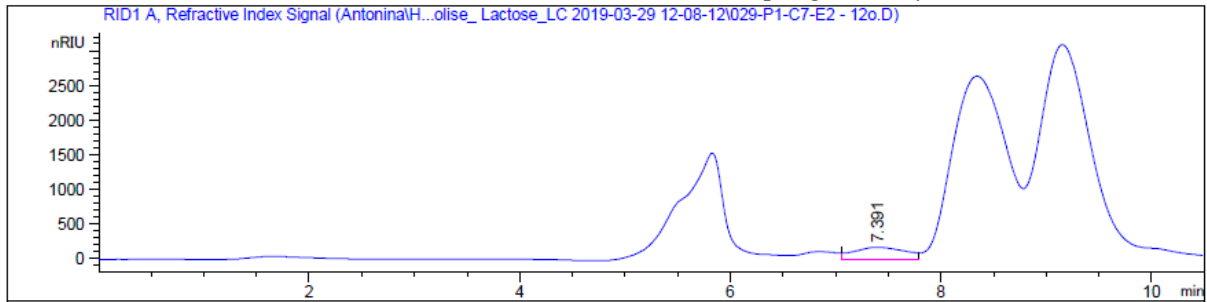
XXVII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 10o (*Aspergillus oryzae*).



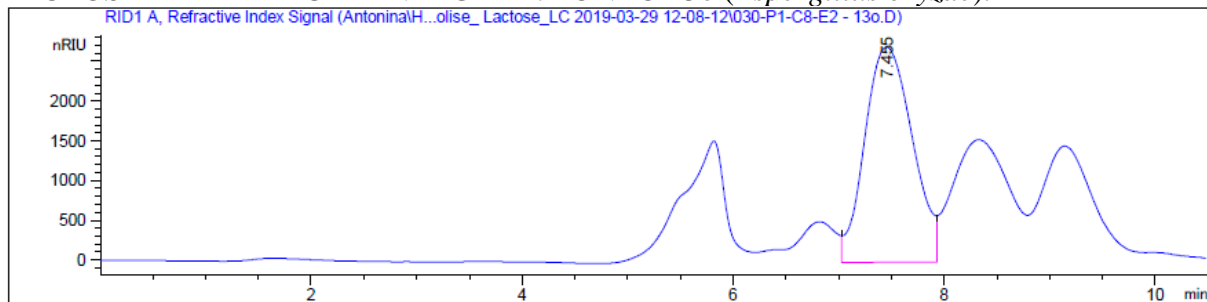
XXVIII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 10o (*Aspergillus oryzae*).



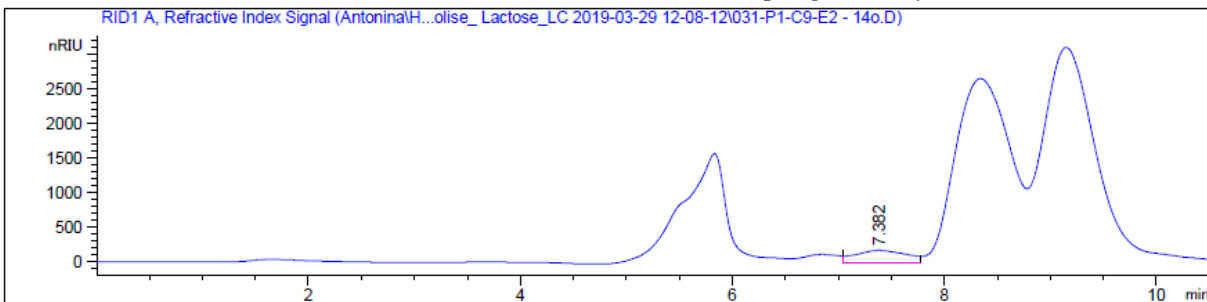
XXIX CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 12o (*Aspergillus oryzae*).



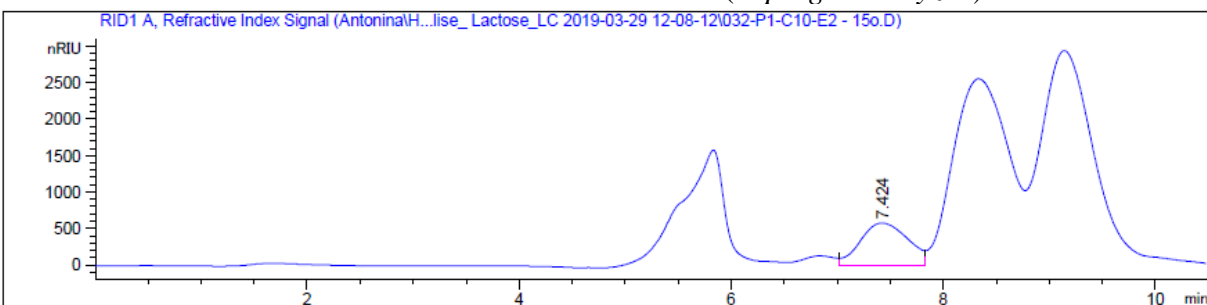
XXX CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 13o (*Aspergillus oryzae*).



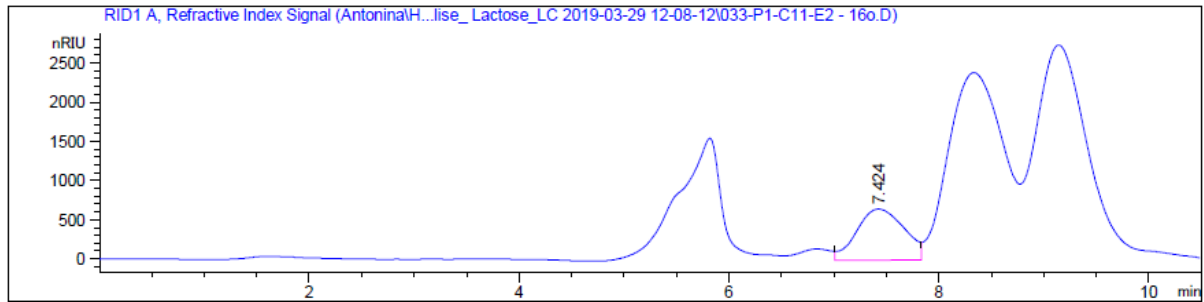
XXXI CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 14o (*Aspergillus oryzae*).



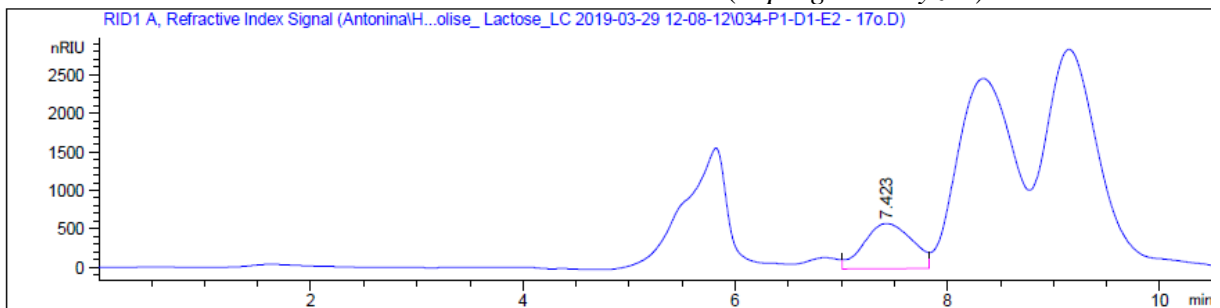
XXXII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 15o (*Aspergillus oryzae*).



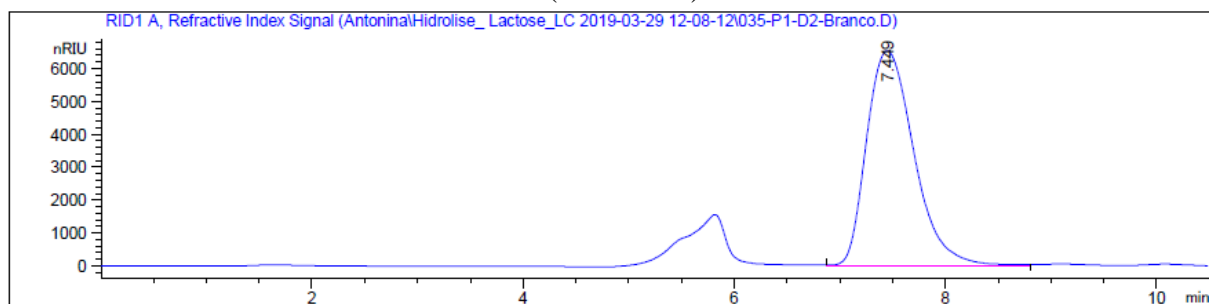
XXXIII CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 16o (*Aspergillus oryzae*).



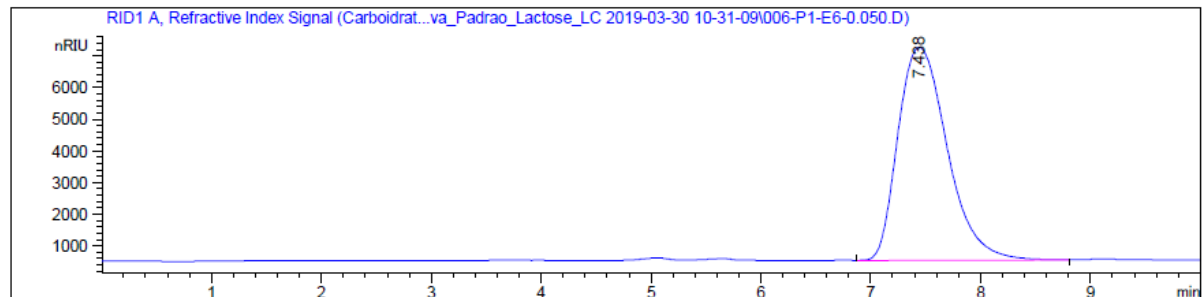
XXXIV CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL. PONTO 17o (*Aspergillus oryzae*).



XXXV CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE EM LEITE UHT INTEGRAL (BRANCO).

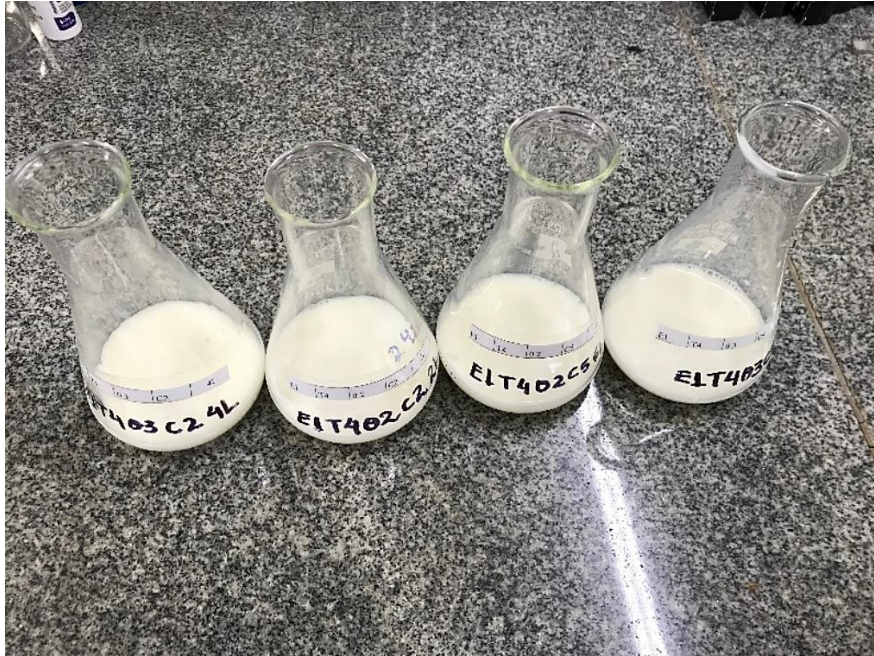


XXXVI CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DA CURVA PADRÃO DETERMINADA POR CLAE.



APÊNDICE A - FIGURAS OBTIDAS AO DECORRER DOS EXPERIMENTOS.

Figura 10 - Preparo das amostras para serem hidrolisadas



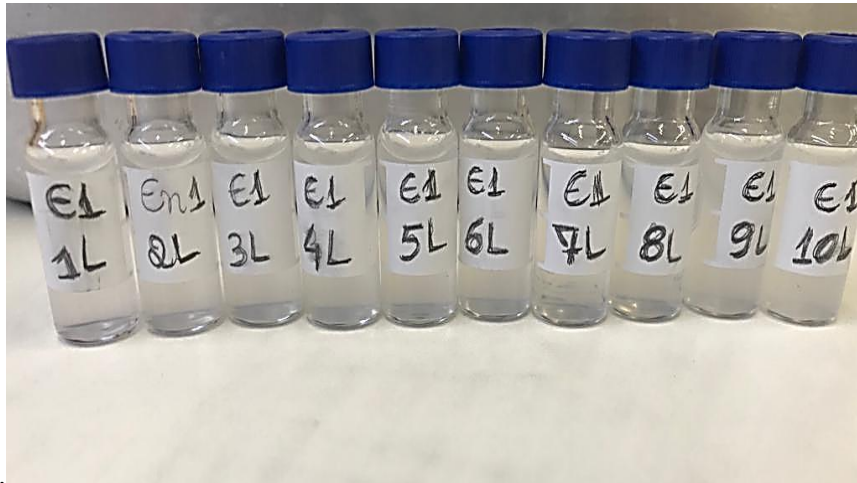
Fonte: Autor, 2019.

Figura 11 - Hidrólise do leite UHT na incubadora shaker



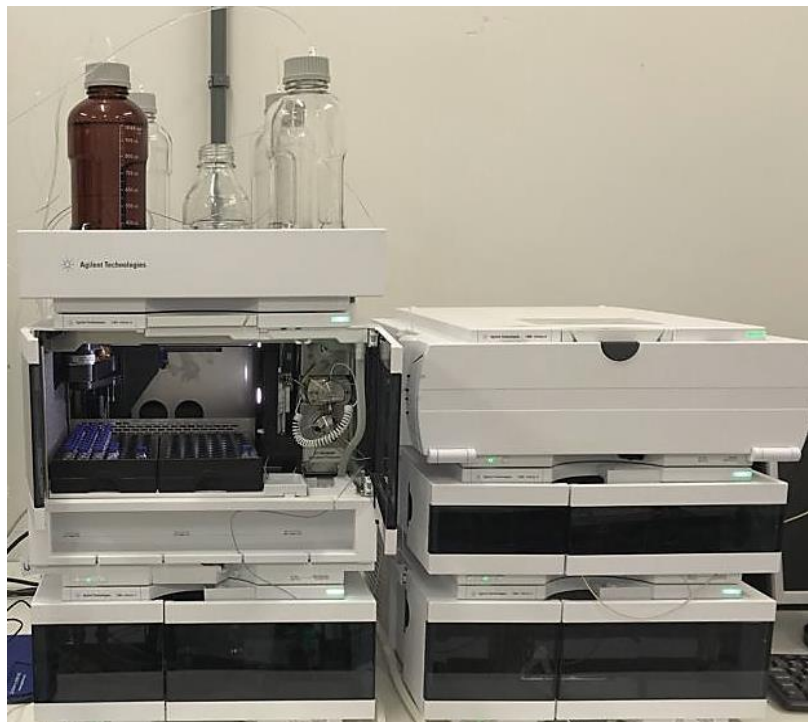
Fonte: Autor, 2019.

Figura 12 - Alíquotas dos ensaios hidrolisados pela *K. lactis* para quantificação da lactose por CLAE



Fonte: Autor, 2019.

Figura 13 - Equipamento de Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR)



Fonte: Autor, 2019.