

Artigo

Utilização do Glicosímetro *Accu-Chek*[®] Para a Determinação de Lactose em Produtos Lácteos**Campos, N. S.; Stephani, R.; de Sousa, R. A.; Perrone, I. T.;* de Carvalho, A. F.; de Oliveira, L. F. C.***Rev. Virtual Quim.*, 2014, 6 (6), 1677-1686. Data de publicação na Web: 25 de dezembro de 2014<http://www.uff.br/rvq>**Lactose Quantification in Dairy Products by *Accu-Chek*[®] Glucometer**

Abstract: The *Accu-Chek*[®] glucose monitor was applied for lactose determination in milk, whey and for lactose hydrolysis in skimmed milk. This equipment was effective for determination of reducing sugars including lactose and it was possible to establish calibration curves for lactose and galactose. Whey, whole and skimmed milks samples were analyzed and the results were satisfactory. The presence of fat in the samples reduced the efficiency of the sugar determination but it was not a limitation.

Keywords: Enzymatic reaction; lactose; dairy products.

Resumo

Neste trabalho empregou-se o glicosímetro *Accu-Chek*[®] para a determinação do teor de lactose em leite, soro de leite e monitoração da hidrólise enzimática da lactose em leite desnatado. Este equipamento foi eficaz na determinação de açúcares redutores, entre eles, a lactose, sendo possível construir curvas de calibração para a quantificação de lactose e galactose. Amostras de soro de leite, leite desnatado e leite integral foram analisadas e os resultados obtidos foram satisfatórios. Observou-se ainda que a presença de gordura nas amostras diminuiu a eficiência do método, mas não constituiu uma limitação.

Palavras-chave: Reação enzimática; lactose; lácteos.

* Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, CEP 36570-900, Viçosa-MG, Brasil.

✉ italoperrone@ig.com.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20140108](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140108)

Utilização do Glicosímetro *Accu-Chek*[®] Para a Determinação de Lactose em Produtos Lácteos

Naira S. Campos,^a Rodrigo Stephani,^b Rafael A. de Sousa,^a Ítalo T. Perrone,^{c,*} Antônio F. de Carvalho,^c Luiz Fernando C. de Oliveira^a

^a Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química, Campus Universitário, CEP 36036-900, Juiz de Fora-MG, Brasil.

^b Gemacom Tech, Departamento de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, CEP 36092-050, Juiz de Fora-MG, Brasil.

^c Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Campus Universitário, CEP 36570-900, Viçosa-MG, Brasil.

* italoperrone@ig.com.br

Recebido em 16 de julho de 2014. Aceito para publicação em 20 de dezembro de 2014

1. Introdução

2. Experimental

2.1. Materiais

2.2. Construção das curvas de calibração para soro fluido

2.3. Avaliação da resposta do glicosímetro em relação à presença de frutose, galactose e glicose

2.4. Quantificação de lactose em leite fluido integral e desnatado

2.5. Acompanhamento da hidrólise enzimática da lactose em leite desnatado

2.6. Metodologias estatísticas utilizadas

3. Resultados e Discussão

3.1. Construção das curvas de calibração para lactose em soro fluido

3.2. Avaliação da resposta do glicosímetro em relação à presença de frutose, galactose e glicose

3.3. Quantificação de Lactose em Leite Desnatado e Integral

3.4. Acompanhamento da hidrólise enzimática da lactose em leite desnatado

4. Conclusões

1. Introdução

O leite é um dos alimentos mais

consumidos em todo o mundo, sendo considerado o melhor alimento natural. A composição média do leite de vaca varia bastante e consideram-se as seguintes

porcentagens em média: água 87,2%, gordura 3,6%, lactose 4,5%, proteína 3,0% e sais minerais 0,7%. Os carboidratos do leite de vaca estão representados, na sua maior parte, pela lactose, um dissacarídeo pouco solúvel, sintetizado pelas glândulas mamárias, que ajuda na absorção do cálcio e do fósforo.¹ Cada molécula de lactose é formada por uma molécula de galactose e por uma de glicose (Figura 1).

Alguns indivíduos possuem deficiência na produção da enzima lactase, responsável pela digestão da lactose. Esta deficiência é

conhecida como intolerância à lactose e pode causar alguns sintomas como flatulência, mal-estar e diarreia após a ingestão de certa quantidade de leite. Dependendo do grau de intolerância para alguns destes indivíduos, é indicado o leite com baixo teor de lactose, obtido através da hidrólise enzimática deste carboidrato.^{2,3} Os monossacarídeos resultantes de sua hidrólise, galactose e glicose, são absorvidos pelas células epiteliais por transporte ativo, evitando os inconvenientes de sua má absorção.⁴

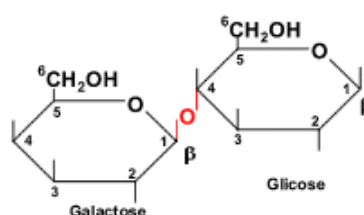


Figura 1. Estrutura química da molécula de lactose

Na indústria de laticínios, o teor de lactose no leite é determinado pelo método da Cloramina-T que envolve etapas de filtração e titulação, baseadas em reações de oxirredução deste dissacarídeo. Tal metodologia se mostra dispendiosa para as análises de rotina.⁵

A lactose, assim como a glicose, frutose e galactose são açúcares classificados como redutores, pois possuem grupos capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Esta propriedade é útil na análise dos açúcares.^{6,7} Por muitos anos, o conteúdo de glicose no sangue foi determinado pela medida da quantidade do agente oxidante presente na solução desse açúcar para o diagnóstico de diabetes. Atualmente, para a determinação de glicose no sangue são utilizados glicosímetros muito mais sensíveis que empregam enzimas e fornecem rapidamente o teor de açúcar do paciente.⁸

Os glicosímetros são aparelhos destinados à medição quantitativa de glicemia do sangue, muito utilizados por indivíduos

portadores de diabetes. Para realização do teste de glicemia, uma gota de sangue é aplicada sobre uma tira teste e, em poucos segundos, o resultado do teor de glicose é apresentado no monitor do aparelho (no qual a tira é inserida). O princípio de medição utilizado pelo glicosímetro *Accu-Chek*[®] baseia-se na conversão da glicose da amostra pela reação enzimática da glicose desidrogenase em presença da coenzima pirroloquinolina (PQQ), presentes na tira teste, a qual converte a glicose da amostra de sangue em gliconolactona. Esta reação cria uma corrente elétrica contínua interpretada como o índice de glicemia.^{9,10}

Os objetivos deste estudo foram, a partir da utilização do glicosímetro *Accu-Chek*[®], construir curvas de calibração para a lactose, determinar sua concentração no soro de leite e no leite fluído, e verificar a influência do teor de gordura na leitura do glicosímetro. Além disso, foram obtidas as leituras de outros açúcares redutores, como a frutose, galactose e glicose, as quais permitiram estabelecer as características de aplicação do método.

2. Experimental

2.1. Materiais

A enzima lactase e o soro fluido foram fornecidas pelo Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT). As amostras de leite UHT integral e desnatado foram adquiridas no comércio local.

Foi utilizado o glicosímetro *Accu-Chek*[®] e tiras teste (Modelo Performa, Marca Roche). Empregou-se os reagentes de grau analítico frutose, galactose e glicose (marca Vetec) pertencentes ao Departamento de Química da UFJF.

Os valores tomados como referência para o teor de lactose nas amostras de leite e soro

fluido foram determinados através do método da cloramina-T pelo ILCT e pela técnica de absorção no infravermelho médio na Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, MG.^{11,12}

2.2. Construção das curvas de calibração para soro fluido

Para a construção das curvas de calibração, utilizou-se o método da simulação de matriz.¹³ Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de lactose com concentração de 20 g/L em água destilada e, em seguida, preparou-se padrões contendo soro fluido e volumes crescentes da solução de lactose apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Preparo da curva de calibração para determinação de lactose em soro de leite fluido utilizando simulação de matriz.

Padrões	Volume de Soro Fluido (µL)	Volume da solução de lactose* (mL)
1	100	0
2	100	1
3	100	2
4	100	3
5	100	4

(*) Concentração de 20 g/L

As soluções das amostras de soro fluido adicionados de lactose (padrões 2 – 5) e o branco (padrão 1) foram lidos pelo glicosímetro após a preparação das mesmas. Para a construção da curva de calibração utilizou-se o sinal medido pelo glicosímetro versus a concentração adicionada de lactose, empregando o programa computacional *Origin Pro* (versão 8.0).

Para compensar a influência do teor original de lactose na amostra de soro utilizada e, assim, estabelecer uma relação

direta do sinal lido pelo glicosímetro e a concentração de lactose, foi calculado, através dos valores de referência obtidos pelo método de cloramina-T, o fator de correção (Fc). Assim sendo, a porcentagem massa/volume (% m/v) de lactose foi calculada a partir da equação 1.

$$\% \text{ m/v} = \text{sinal} \times \text{FD} \times \text{Fc} \quad (\text{equação 1})$$

Sendo,

sinal = valor lido no glicosímetro

FD = fator de diluição da amostra

Fc = fator de correção para o glicosímetro

2.3. Avaliação da resposta do glicosímetro em relação à presença de frutose, galactose e glicose

Inicialmente, preparam-se soluções estoque individuais para cada açúcar (frutose, galactose e glicose) a fim de se obter uma concentração final de 20 g/L. Posteriormente, a partir das soluções estoque, preparou-se soluções padrões de concentrações variadas, de acordo com a Tabela 2.

2.4. Quantificação de lactose em leite fluido integral e desnatado e em soro de leite

Para determinação da influência do teor

de gordura na determinação de lactose em leite fluido, foram feitas análises de amostras de leite integral e desnatado. Nos dois casos, preparou-se uma solução de leite a 10% (v/v) em água, a partir de três distintos lotes de leite UHT obtido no comércio, configurando três repetições para cada tipo de leite e, após homogeneização, foram feitas as leituras no glicosímetro, em triplicata, e os resultados utilizados para o cálculo da concentração de lactose. A diluição do leite em água para obtenção de uma solução em água com concentração de 10% (v/v) justifica-se pela concentração esperada de lactose no leite e a escala de leitura do glicosímetro, desta forma, fez-se uma diluição de dez vezes objetivando adequar o teor de lactose natural do leite à escala de leitura do equipamento. O cálculo da porcentagem (massa/volume) de lactose presente no leite desnatado e no leite integral foi feito seguindo a equação 1. Sendo o fator de correção utilizado o mesmo encontrado para o uso do glicosímetro na análise de soro fluido.

Tabela 2. Procedimento de preparo das soluções dos açúcares para leitura no glicosímetro

Açúcar	Padrão 1 (g/L)	Padrão 2 (g/L)	Padrão 3 (g/L)	Padrão 4 (g/L)	Padrão 5 (g/L)	Padrão 6 (g/L)
Frutose	1	2	3	4	20	40
Açúcar	Padrão 1 (g/L)	Padrão 2 (g/L)	Padrão 3 (g/L)	Padrão 4 (g/L)	Padrão 5 (g/L)	Padrão 6 (g/L)
Galactose	2	6	10	14	20	40
Açúcar	Padrão 1 (g/L)	Padrão 2 (g/L)	Padrão 3 (g/L)	Padrão 4 (g/L)	Padrão 5 (g/L)	Padrão 6 (g/L)
Glicose	0,5	1	3	4	5	6

Os resultados obtidos para o leite integral e desnatado foram comparados com os resultados fornecidos pela técnica de absorção no infravermelho médio. A determinação do teor de lactose em soro de

leite foi realizada a partir de amostras de soro de leite coletadas no Instituto de Laticínios Cândido Tostes, provenientes da produção industrial de queijo tipo coalho sem adição de fermento lácteo em quatro

diferentes dias de produção, configurando 4 amostras distintas de soro de leite. As amostras de soro imediatamente após a coleta foram mantidas sob refrigeração e levadas ao Departamento de Química da UFJF para a quantificação do teor de lactose empregando-se o glicosímetro *Accu-Chek*[®].

2.5. Acompanhamento da hidrólise enzimática da lactose em leite desnatado

Para o acompanhamento da hidrólise

enzimática da lactose, preparou-se uma solução de leite desnatado a 10% (v/v) em água, a partir de leite UHT obtido no comércio e, em seguida, realizou-se uma leitura desta amostra no glicosímetro. No próximo passo, transferiram-se seis alíquotas da solução de leite desnatado para diferentes béqueres e aqueceu-se as soluções em banho-maria até a temperatura de aproximadamente 38 °C.^{14,15} Posteriormente, adicionou-se diferentes volumes da solução da enzima lactase de acordo com a Tabela 3 e ao longo da hidrólise foram feitas leituras das amostras utilizando o glicosímetro.

Tabela 3. Volumes de amostra e enzima utilizados no processo de hidrólise da lactose pelo glicosímetro

Volume da solução de leite 10%(v/v) (mL)	Volume adicionado da solução da enzima lactase (µL)
5	2
5	5
5	10

2.6. Metodologias estatísticas utilizadas

Empregou-se o método dos mínimos quadrados para a construção das curvas de calibração para lactose em soro fluido, curvas de calibração obtidas com a leitura dos padrões de galactose e glicose no glicosímetro, sendo apresentadas as equações de ajuste, os valores do coeficiente de correlação (R) e a porcentagem dos erros associados ao ajuste dos coeficientes angulares e lineares ajustados pelo modelo, tendo sido empregado o *software Origin 8.0*. Objetivando comparar as leituras obtidas empregando o glicosímetro *Accu-Chek*[®] e os resultados obtidos pelo método de referência da Cloramina T, aplicou-se o teste t de Student com 95% de confiança para comparação das médias (por amostra) fornecidas pelo glicosímetro e pelo método da Cloramina-T.

3. Resultados e Discussão

3.1. Construção das curvas de calibração para lactose em soro fluido

A curva de calibração obtida em meio de soro de leite para as análises de soro fluido está apresentada na Figura 2.

Foi possível observar uma relação linear entre o sinal do glicosímetro e a concentração da lactose e com isso obter a concentração de lactose presente nas amostras por meio do uso do fator de correção, visto que a curva foi construída no mesmo meio daquele das amostras (simulação de matriz).

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram a eficiência do glicosímetro *Accu-Chek*[®] na determinação de lactose em amostras de soro, visto que os resultados concordaram com os valores de referência.

Para cada amostra, aplicou-se o teste t de Student com 95% de confiança para comparação das médias fornecidas pelo glicosímetro e pelo método da Cloramina-T.

Para as 4 amostras testadas não foram observadas diferenças significativas no nível estudado, validando os resultados obtidos pelo método proposto.¹³

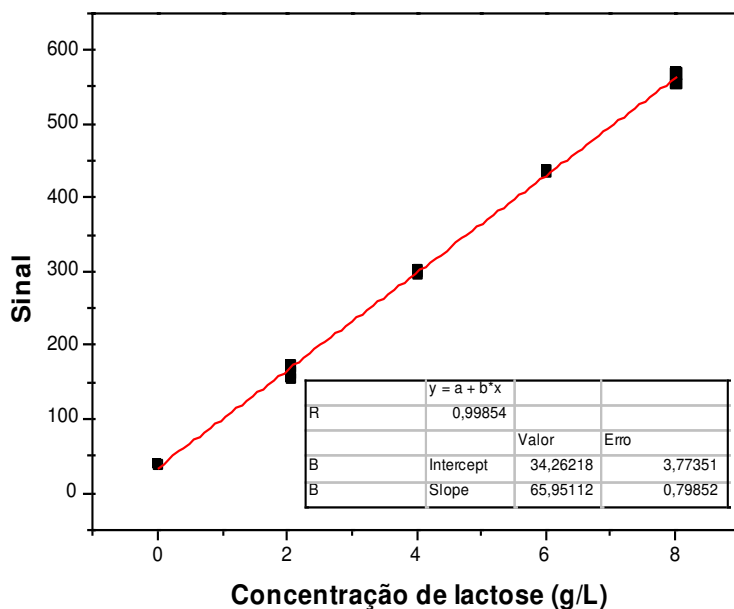


Figura 2. Curva de calibração para amostras de soro

Tabela 4. Concentração de lactose obtida nas amostras de soro fluido (n=4; replicatas autênticas) concordantes com valores de referência (95% de confiança) pelo teste Cloramina - T

Amostras de soro fluido	Valor teste de referência Cloramina T (%m/v)	Concentração de Lactose – glicosímetro (%m/v)*
A	5,25	5,41
B	5,57	5,66
C	4,96	4,80
D	5,20	4,98

*Os resultados obtidos para concentração de lactose empregando-se o glicosímetro apresentaram desvios inferiores a 2% para todas as amostras.

3.2. Avaliação da resposta do glicosímetro em relação à presença de frutose, galactose e glicose

Nas concentrações estudadas, o glicosímetro não realizou a leitura para as soluções de frutose, apresentando apenas o sinal de erro. Em contrapartida, respondeu

linearmente às concentrações de galactose e glicose, permitindo construir as curvas analíticas mostradas na Figura 3.

Diante dos resultados obtidos, vale ressaltar que existe uma diferença estrutural entre os açúcares estudados. A frutose é uma cetoexose (forma um anel furanosídico), enquanto a galactose e glicose são

aldoexoses (formam anéis de seis átomos chamados de piranosídicos) e tem caráter redutor.⁷ Logo, tanto a galactose quanto a glicose apresentam um carbono anomérico que pode sofrer desidrogenação, por meio da enzima glicose oxidase, levando a formação

de lactonas. Isso explica a resposta do glicosímetro frente à presença desses açúcares e da própria lactose, onde o carbono anomérico da unidade de glicose está livre e pode sofrer a reação enzimática.

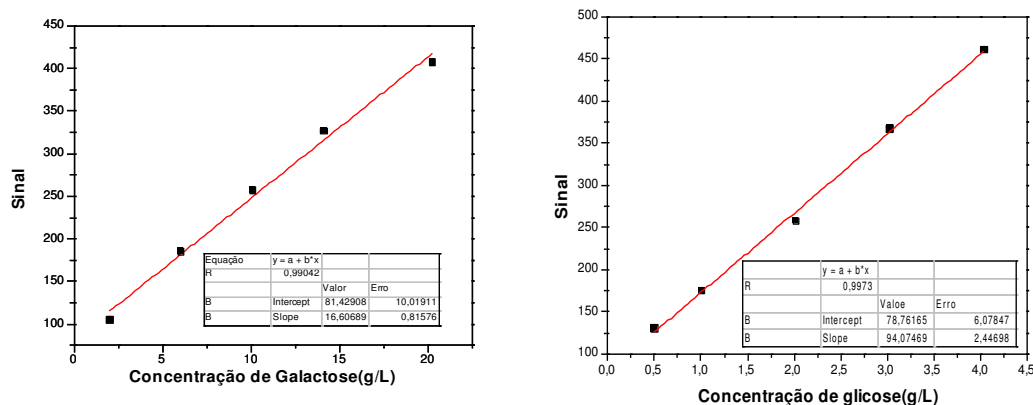


Figura 3. Curvas de calibração obtidas com a leitura dos padrões de galactose (esquerda) e glicose (direita) no glicosímetro

3.3. Quantificação de Lactose em Leite Desnatado e Integral

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados obtidos nas análises pelo glicosímetro das amostras de leite desnatado e integral e a concentração média de lactose presente nas mesmas.

Tabela 5. Resultados da análise pelo glicosímetro para amostras de leite desnatado (n = 3) e integral (n = 3; replicatas autênticas)

%m/v Lactose*			
Sinal analítico	Leite desnatado	Sinal analítico	Leite integral
388	4,77	345	4,24
377	4,64	356	4,38
372	4,58	345	4,24
Média	4,66 ± 0,09		4,29 ± 0,08

* %m/ v = Sinal × FD × Fc

A Tabela 6 mostra uma comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e os valores de referências. Aplicou-se o teste t de Student com 95% de confiança para comparação das médias fornecidas pelo glicosímetro e pelo método da Cloramina-T. Para as 4 amostras testadas não foram

observadas diferenças significativas no nível estudado, concordando com os valores de referência. Além disso, a gordura presente no leite integral provavelmente influenciou a leitura da lactose pelo glicosímetro, uma vez que o erro relativo dos resultados fornecidos pelo glicosímetro para o leite integral foi

maior do que o erro obtido nas análises de leite desnatado. Por outro lado, este erro é compreensível considerando-se a simplicidade do método e a complexidade da

matriz. O leite integral é uma emulsão e isto tende a afetar a homogeneidade das amostras, conferindo uma variação maior na resposta instrumental.

Tabela 6. Valores médios (%m/v) de lactose nas amostras de leite desnatado e integral pelos métodos de absorção em infravermelho e com o glicosímetro

	Desnatado	Integral
%m/v Embrapa	4,68	4,53
%m/v glicosímetro	4,66	4,29
Erro Relativo	-0,4%	-5,3%

3.4. Acompanhamento da hidrólise enzimática da lactose em leite desnatado

A Tabela 7 apresenta os teores de glicose medidos durante a hidrólise enzimática da

lactose, processo no qual, com base nos experimentos anteriores, era esperado um aumento no sinal analítico que correspondem à concentração de glicose e galactose que se formam com a hidrólise da lactose.

Tabela 7. Monitoração do sinal de glicose durante a hidrólise da lactose por lactase em leite desnatado

Volume de lactase adicionada (μ L)	Tempo (minutos)	Sinal analítico
0	0	421 \pm 10
	5	447 \pm 1
	10	458 \pm 2
	15	476 \pm 6
5	5	573 \pm 25
	10	Erro
10	5	Erro
	10	Erro

Os dados da Tabela 7 mostram que no decorrer da hidrólise enzimática da lactose houve um aumento do sinal fornecido pelo glicosímetro. Mas considerando-se os resultados obtidos, pode-se concluir que o glicosímetro respondeu ao aumento de espécies redutoras que se formaram com a “quebra” da molécula de lactose. Este fato indica que o método proposto, apesar de se mostrar adequado para a determinação de

lactose, não é seletivo para quantificar este analito na presença de glicose ou galactose. Portanto, o método pode ser empregado para as matrizes com baixos (ou nenhum) teor de glicose e galactose, como o leite e derivados lácteos *diet*.

4. Conclusões

A partir dos resultados obtidos com o uso de um glicosímetro *Accu-Chek*[®], em diferentes meios (contendo lactose ou frutose ou galactose), além da própria glicose, concluiu-se que o mesmo é um instrumento capaz de determinar a presença de açúcares redutores que possuam anéis piranosídicos, entre eles, a lactose. Desta forma, foi possível construir uma curva de calibração para quantificação deste açúcar e determinar satisfatoriamente a concentração do mesmo no soro de leite e no leite bovino (desnatado e integral). Observou-se ainda que a presença de gordura reduz a eficiência do método, no caso da determinação da concentração de lactose no leite integral, diminuindo a exatidão da análise mas, ainda sim, apresentando um erro aceitável de aproximadamente 5%.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG, CNPq e a Gemacom Tech.

Referências Bibliográficas

- ¹ Schaafsma, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition - Review Article. *International Dairy Journal* **2008**, *18*, 458. [CrossRef]
- ² Alais, C. *Ciencia de la Leche: Principios de Técnica Lechera*. Reverte: Barcelona, 1995.
- ³ Carminatti, C. A. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal de Santa Maria, 2008. [Link]
- ⁴ Ciência do leite. Disponível em, <<http://www.cienciadoleite.com>>. Acesso em: 12 janeiro 2014.
- ⁵ Evangelista, J. *Tecnologia de alimentos*, 2ª ed., Atheneu: São Paulo, 1998.
- ⁶ Campbell, M. K.; *Bioquímica*, 3a. ed., Artmed Editora: Porto Alegre, 2000.
- ⁷ Farrell, S. O.; *Bioquímica*, Cengage Learning Editora: São Paulo, 2009.
- ⁸ Teixeira, C. R. S.; Zanetti, M. L.; Landim, C. A. P.; Becker, T. A. C.; Santos, E. C. B.; Franco, R. C.; Citro, R. Automonitorização da glicemia capilar no domicílio: revisão integrativa da literatura. *Revista Eletrônica de Enfermagem* **2009**, *11*, 1006. [Link]
- ⁹ Junior, R. C. *Glicosímetro de Pulso*. Tese de doutorado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2010. [Link]
- ¹⁰ Roche Diagnostics. *Manual de Utilização do glicosímetro Accu-Chek® Performa*, 2007. [Link]
- ¹¹ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Brasília, DF, 2006. [Link]
- ¹² Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Coordenação Geral de Apoio Laboratorial-CGAL. Escopo do Credenciamento do Laboratório de Qualidade do Leite Professor José de Alencar – EMBRAPA GADO DE LEITE para realizar Análises de Controle de Qualidade do Leite. Lactose - Absorção pelo Infravermelho Médio (MID) .POP-OPE-00 / 01 Leite cru International Dairy Federation (IDF) 141C – Determination of milkfat, protein and lactose content – Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Brussels, Belgium, 2000.
- ¹³ Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*, 8a. ed., Editora Thomson: London, 2006.
- ¹⁴ Tomás, C. M. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, 1998. [Link]
- ¹⁵ Longo, G. *Influência da Adição de Lactase na produção de iogurtes*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2006. [Link].