

# DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LACTOSA EN QUESOS DESLACTOSADOS

L. N. Gallelo <sup>(1)</sup>, P. F. Sánchez <sup>(1)</sup>, F. F. Raco <sup>(1)</sup>

[lgallelo@inti.gob.ar](mailto:lgallelo@inti.gob.ar)

<sup>(1)</sup>Dto. Red de Laboratorios Lácteos-DT Metrología Química-SOMCel-GOMyC – INTI.

Palabras Clave: Lactosa; Validación; Quesos; HPLC.

## INTRODUCCIÓN

La lactosa es un disacárido presente en la leche de los mamíferos y en alimentos o derivados lácteos, que puede generar intolerancias digestivas en algunos individuos. Como respuesta, hace unos años la industria ha impulsado el posicionamiento en el mercado de productos bajos, reducidos y/o libres de lactosa. En el año 2021, la Secretaría de Calidad en Salud y Secretaría de Alimentos, Bioquímica y Desarrollo Regional establecieron una resolución conjunta [1] para clasificar a los lácteos disminuidos en lactosa como: Bajos  $\leq 5$  %, Reducidos  $\leq 30$  % y Libres  $\leq 100$  mg, generando la necesidad del desarrollo de métodos analíticos capaces de cuantificar lactosa en estos niveles. En el presente trabajo se describe un método de análisis por HPLC-RID con un límite de cuantificación (LQ) alcanzado de 0,05 g lactosa/100 g de producto.

## OBJETIVOS

Desarrollar una metodología analítica sensible por HPLC-RID como alternativa de los métodos fisicoquímicos comúnmente utilizados para estimar la concentración de lactosa y, de este modo, brindar respuesta a las necesidades de la industria y asegurar la salud de la población.

## DESARROLLO

Se pesaron 10 g representativos de diferentes muestras de queso deslactosado, previamente rallado, en un vaso de precipitados de 250 ml y se fortificaron con solución patrón de lactosa de concentración conocida. Se agregaron 80 ml de agua destilada y se llevó a un pH de 4,6, manteniendo agitación magnética por 20 min. El precipitado fue separado por centrifugación a 5000 rpm por 5 min. El sobrenadante se pasó a un matraz aforado y se llevó a 100 ml con agua

destilada. Se tomaron 5 ml con pipeta aforada y se llevaron a un tubo falcon de 15 ml donde se mezclaron con 5 ml de acetonitrilo. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. Dicha solución se lavó con hexano, centrifugó nuevamente y se filtró por filtro de jeringa de PVDF de 0,45  $\mu$ m previo a su inyección en el HPLC-RID.

Las soluciones de calibración y los extractos de las muestras fueron inyectados (60  $\mu$ l) en un HPLC-RID Shimadzu RID-20A, equipado con una columna Agilent Zorbax NH2 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) termostatazada a 30 °C. La fase móvil aplicada fue una mezcla 65 % acetonitrilo y 35 % agua en flujo isocrático. Para la detección se utilizó un detector de índice de refracción de polaridad positiva a 30 °C.



Figura 1: Cromatógrafo líquido con detector de índice de refracción (HPLC-RID) Shimadzu RID-20A.

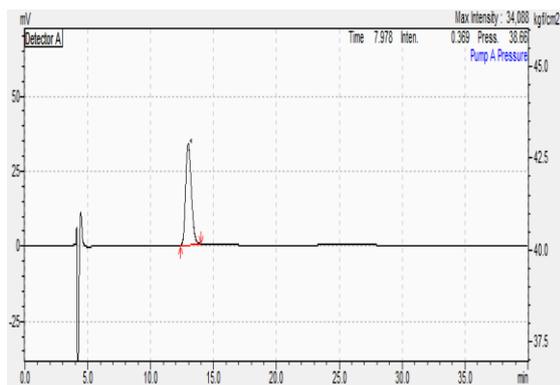


Figura 2: Cromatograma de una solución de calibración de lactosa de concentración 1 mg/ml.

### RESULTADOS

Se siguieron los lineamientos de la guía Eurachem[2] para la validación de la metodología propuesta. Se evaluó linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación, precisión intermedia, repetibilidad, sesgo (recuperación), selectividad e incertidumbre del método. Para la precisión intermedia y la repetibilidad se fortificaron muestras blanco en 4 niveles: 0,05; 0,1; 0,5 y 1 g lactosa/100 g producto, el ensayo fue llevado a cabo por triplicado (n=3). Los desvíos estándar relativos (RSD%) obtenidos para los niveles fueron < 13 %. El LD obtenido fue de 0,01 g/100 g producto. Para la estimación de la incertidumbre se consideraron las contribuciones de la precisión intermedia y la incertidumbre en la estimación del sesgo siguiendo los lineamientos de las guías NordTest y GUM[3].

Linealidad			
cc (mg/ml)	RSD% (CV%)	Regresión lineal	R <sup>2</sup>
0,013	1,47	y=1E+06x-2232,3	0,9999
0,026	0,52		
0,050	0,62		
0,126	1,59		
0,250	0,05		
0,503	1,04		
1,007	0,10		

Tabla 1: Resultados de validación (Regresión Lineal, factor R<sup>2</sup>).

Precisión intermedia				
	n=3	n=3	n=3	n=3
cc (g lactosa/100 g producto)	0,05	0,1	0,5	1
RSD%	12,81	1,83	1,50	2,24

Tabla 2: Resultados de Precisión intermedia (desvío estándar relativo porcentual evaluando triplicados de análisis).

Recuperación (Sesgo)			
	n=2	n=2	n=2
cc (g lactosa/100 g producto)	0,05	0,1	0,5
% Recuperado promedio	79,4	74,2	75,5

Tabla 3: Resultados de Recuperación (promedio de cada nivel por duplicado).

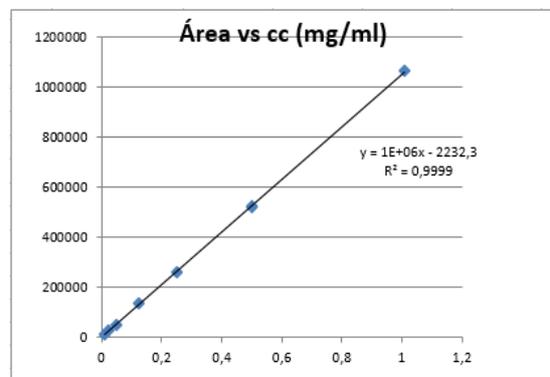


Figura 3: Gráfico de prueba de linealidad con los 7 niveles evaluados, regresión lineal y factor R<sup>2</sup>.

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La metodología resultó adecuada para confirmar la presencia de lactosa según las recientes exigencias reglamentarias. Esta nueva gama de productos deslactosados y/o reducidos en lactosa exigen el desarrollo de nuevas metodologías analíticas con la exactitud adecuada para controlarlos y velar por la salud de los consumidores. Por otro lado, disponer de métodos adecuados, es un paso previo necesario para avanzar en la producción de materiales de referencia de lactosa en productos deslactosados que ayuden a los laboratorios de análisis de alimentos a ofrecer resultados cada vez mas exactos y así mejorar sus técnicas analíticas, lo que les permitirá ajustarse a las nuevas exigencias del mercado y la regulación vigente.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Artículo 1372 – (Res 1505, 10.08.88). “Alimentos de Régimen o Dietéticos”. Código Alimentario Argentino, 2021.
- [2] Morillas, P.P; et al. “Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados”. Eurolab España. 1ª ed. 2016.
- [3] JCGM 100:2008 GUM 1995 with minor corrections. “Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement”. BIPM. First edition September 2008.