



UNICAMP

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRICOLA

OBTENÇÃO DE LACTOSE DO  
SORO DE QUEIJO

Por

*Iñigo Verdalet Guzmán*

Orientador:

*Prof. Dr. Rodolfo D. Reyna B.*

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

1979  
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À minha esposa,

*Mara Cristina*

## AGRADECIMENTOS

O autor agradece sinceramente ao Prof. Dr. Rodolfo D. Reyna pela atenção e orientação deste trabalho; assim como à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas pelas facilidades proporcionadas para a realização do mesmo.

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia, do México, pelo apoio financeiro durante o curso de pós-graduação e à Universidade Veracruzana, desse país, pelo complemento econômico.

Ao Governo Estadual de Vera Cruz, nas pessoas do Lic. Emilio Gomez-Vives e Lic. Gerardo Guzmán-Araujo, pelo incentivo e apoio concedidos ao autor.

Ao Dr. Herbert G. Wirth e ao Dr. Leopold Hartman pelas valiosas sugestões na apresentação deste trabalho. À Maria Betânia Loureiro, Ana Lourdes Neves Gândara e José Pedro Toledo Leite pela colaboração prestada.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

Página

AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
SUMMARY	
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Soro de queijo	3
1.1. Aspectos gerais	3
2. Componentes do soro de queijo	7
2.1. Proteínas	7
2.1.1. Desproteínização	8
2.1.2. Separação das proteínas	9
2.2. Sais minerais	11
2.3. Lactose	11
2.3.1. Solubilidade	14
2.3.2. Mutarrotação	16
2.3.3. Cristalização	18
3. Recuperação da lactose do soro de queijo	24
3.1. Classificação da lactose	24
3.2. Manufatura da Lactose Bruta	24

	Página
3.3. Manufatura da Lactose Refinada	28
4. Propriedades e usos da lactose	32
4.1. Doçura relativa	32
4.2. Reação de escurecimento	33
4.3. Estabilizante de proteínas	33
4.4. Adsorção de "flavors"	34
4.5. Propriedades dispersivas	34
4.6. Propriedades emulsificantes	35
4.7. Fermentação seletiva	35
4.8. Propriedades nutricionais	35
III. MATERIAIS E MÉTODOS	37
1. Materiais	37
1.1. Matéria prima	37
1.2. Equipamentos	38
1.3. Aparelhos de laboratório	38
1.4. Reagentes	39
2. Métodos analíticos	40
2.1. Amostragem	40
2.2. pH	40
2.3. Acidez total titulável	40
2.4. Sólidos solúveis	40
2.5. Umidade	40
2.6. Gordura	41

	Página
2. 7. Nitrogênio total	41
2. 8. Cinzas	41
2. 9. Peso específico	41
2.10. Lactose	42
2.10.1. Método de o-Toluidina	42
2.10.2. Método de Fehling	43
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
1. Ensaio previos	45
1. 1. Separação do soro e caseína do leite	46
1. 2. Análise do soro	46
1. 3. Preservação do soro	53
1. 4. Estudo ao microscópio dos cristais de lactose	53
2. Desproteínização do soro	56
3. Concentração do soro	61
4. Cristalização da lactose	64
5. Separação e lavagem da lactose	66
6. Recristalização da lactose	71
7. Análise da lactose obtida	72
V. CONCLUSÕES	74
VI. BIBLIOGRAFIA	75

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
I. Produção leiteira no Brasil.	4
II. Produção de queijos no Brasil.	4
III. Composição do soro fresco.	5
IV. Importação de lactose.	6
V. Análises das proteínas do soro.	7
VI. Composição média dos sais no leite e no soro doce.	11
VII. Composição média de diferentes leites.	12
VIII. Solubilidade da lactose em função da temperatura.	14
IX. Propriedades físicas da lactose.	17
X. Análises típicas de diferentes graus de pureza da lactose.	31
XI. Doçura relativa dos açúcares.	32
XII. Especificações do evaporador Luwa.	63

## ÍNDICE DE QUADROS

	Página
I. Análises médias feitas aos soros de queijo utilizados.	47
II. Análises da lactose do soro obtido através da ação do coalho no leite.	51
III. Análises da lactose do soro de ricota fresca.	52
IV. Análise do soro de ricota fresca desproteïnizado e sem desproteïnizar.	56
V. Desproteïnização do soro de ricota fresca.	59
VI. Condições de operação do evaporador Luwa.~	63
VII. Tempo e temperatura na cristalização da lactose.	65
VIII. Análises feitas à lactose Bruta obtida.	66
IX. Análises feitas à lactose Refinada obtida.	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
I. Estrutura molecular da lactose.	13
II. Solubilidade da lactose em função do pH.	14
III. Velocidade de conversão alfa-beta lactose em função do pH.	18
IV. Curvas de solubilidade da lactose.	19
V. Formas cristalinas da alfa-lactose.	20
VI. Determinação do máximo de absorção.	49
VII. Relação entre concentração de lactose e absor <sub>u</sub> ância a 635 nm.	50
VIII. Testes de preservação do soro.	54
IX. Porcentagem de proteina residual no soro após a desproteïnização a diferentes pHs.	58
X. Evaporador Luwa.	62
XI. Lavagem da lactose Bruta em função da porcentagem da proteina.	68
XII. Lavagem da lactose Bruta em função da porcentagem de cinzas.	69
XIII. Micrografia de cristais de lactose, 600 X.	73

## RESUMO

Realizou-se um estudo para a recuperação da lactose do soro de queijo da fabricação de ricota. Na tentativa de preservar o soro, encontrou-se que, adição de 0,01% de peróxido de hidrogênio (70 volumes) e estocagem a uma temperatura de 4-6°C davam bom resultado. Após, encontrou-se também que, aquecendo o soro a 93°C e ajustando o pH a 4,7 com ácido acético, a desproteíntização foi maior que com outros reagentes. Já desproteíntizado o soro, foi concentrado até 65% de sólidos num evaporador de película rotatório e a lactose foi cristalizada em duas etapas: primeiro, rapidamente a 30°C e, depois, em forma gradativa até 15°C em 6 h. Os cristais foram separados em uma centrífuga de cesto e aí lavados, com aproximadamente 1,5 kg água/kg de lactose. Depois, foi secada a 80°C e denominada Lactose Bruta, obtendo-se um rendimento de 76,9%.

Para a obtenção de uma lactose refinada, a lactose Bruta foi dissolvida em água quente, agregando-se 3% de carvão ativo, filtrada e novamente cristalizada. O rendimento global da lactose, a partir do soro, foi de 62,3%.

Os resultados das análises mostraram que, a lactose obtida comparaou-se em qualidade com a lactose importada e, foi melhor que a lactose nacional.

## SUMMARY

A study of lactose recovery from whey resulting from ricotta cheese manufacture was carried out. Experiments aimed at the preservation of whey showed that addition of 0.01% of hydrogen peroxide (70 vol.) and storage at 4-6°C produced good results. It was also found that heating the whey to 93°C and adjusting pH to 4.7 with acetic acid made possible a greater degree of deproteinization than that obtained with other reagents. After deproteinization the whey was concentrated to 65% of solids in a rotating film evaporator and the lactose was crystallized in 2 steps: first, rapidly at 30°C and afterwards gradually till 15°C in 6 h. The crystals were separated in a basket centrifuge and washed with 1.5 kg of water/ kg of lactose. The product was dried at 80°C and denoted as Crude Lactose, its yield being 76.9%.

In order to obtain Refined Lactose, The Crude Lactose was dissolved in hot water, bleached with 3% of active carbon, filtered and re-crystallized. The overall yield of lactose on the basis of its contents in the whey was 62.3%.

Analytical results showed that the lactose thus obtained was comparable in quality with the imported product and of better quality than lactose produced locally.

## I. INTRODUÇÃO

Aproximadamente, 85% do leite usado na produção de queijo é constituído pelo soro, após a precipitação da caseína. No Brasil a produção de soro de queijo atingiu em 1977 a considerável quantidade de 500.000 t, das quais, a maior parte foi descarregada nas redes de esgoto das fábricas produtoras de queijo. Estas quantidades de soro produzido aumentam, ano após ano, pelo acréscimo da fabricação de queijo nacional. O soro, que é descarregado nas águas residuais, vem contaminar os rios e riachos causando graves problemas de poluição devido a sua alta DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) calculada em cerca de 50 g/l. Por outro lado, é lamentável que um produto que contém cerca de 7% de sólidos, dos quais, aproximadamente 5% são representados por lactose, 1% proteína e 0,8% sais minerais, que fazem um líquido com boas possibilidades de aproveitamento, venha a ser desperdiçado.

No Brasil, diversos estudos de aproveitamento das proteínas foram realizados mas, não conhecemos trabalhos com respeito à obtenção da lactose do soro de queijo. A lactose é um açúcar característico dos leites, o componente sólido mais abundante do leite de vaca e o mais constante, em proporção. É um dissacarídeo composto de galactose e glucose, menos solúvel e menos doce que outros açúcares comuns, existindo em duas formas isômeras: alfa e beta lactose. Por não ser higroscópica, a for-

ma alfa-lactose, é a mais comercializada e, é obtida por cristalização do soro de queijo previamente concentrado à temperatura inferior a  $93,5^{\circ}\text{C}$ . Os principais usos da lactose se fazem na elaboração de alimentos infantis, como por exemplo o leite materno e na elaboração de produtos farmacêuticos. Outros usos, aproveitando diversas propriedades da lactose estão sendo cada vez mais aplicados.

A lactose já é produzida, no Brasil, por uma indústria multinacional porém, utilizando "know-how" externo. A maior parte é importada da Alemanha, Holanda, Estados Unidos e Inglaterra na ordem de 450 t anuais.

Por tudo isto, pensou-se na realização de um estudo para a recuperação da lactose procurando um processo próprio, de características simples, estando a indústria nacional de equipamentos amplamente capacitada para a produção destes.

Principais objetivos do trabalho:

1. Adquirir experiência na obtenção da lactose do soro de queijo produzido no país, pois, a bibliografia cita somente experiências estrangeiras.
2. Propor um processo completo de elaboração desde a recepção do soro até a produção dos cristais de lactose, determinando seus parâmetros fundamentais, visto a informação parcial e discordante que deles se obtêm, na bibliografia internacional.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Soro de queijo

#### 1.1. Aspectos gerais

O soro ou lactosoro é a parte líquida do leite obtida após a precipitação da caseína, seja para a fabricação desta, seja para produção de queijo (8). Segundo o procedimento utilizado para separar a caseína distinguem-se: soro doce — obtido por coagulação pela ação do coalho e o soro ácido — obtido por acidificação fermentativa do leite (73). O soro obtido por acidificação contém lactato de cálcio. Uma classe mais, apresenta o chamado soro técnico, que resulta da precipitação de proteínas pela ação de outros ácidos (clorídrico, acético, etc.). O lactosoro tem sido considerado um subproduto indesejável (11), que é preciso descartar com os menores gastos possíveis, em particular, vertendo-o nas águas residuais das fábricas leiteiras. Um litro de soro tem uma Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) de 50 g (33) e a água usada por uma pessoa por dia tem uma DBO de 60 g. Considerando a produção de soro, isso significa que a DBO do soro ultrapassa aproximadamente 7 vezes a DBO da água utilizada por toda a população do país. O crescimento da produção leiteira (Tabela I) aumenta, ano após ano, a produção queijeira (Tabela II) tendo isto como consequência, um aumento do volume do soro. Aproximadamente 85% do leite aproveitado na produção de queijo é constituído pelo soro (22, 20), que é vertido pelas

fábricas em rios, riachos, lagos, etc., cujo volume de água permanece constante. Economicamente, não é viável, numa fábrica de pequeno porte, a construção de uma planta para o tratamento biológico do lactosoro (18).

TABELA I - Produção leiteira no Brasil (em 1.000 litros)

Região	Ano							
	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977
Norte	30.218	26.650	34.087	35.422	41.171	44.226	47.945	52.115
Nordeste	809.572	750.924	776.205	819.718	952.834	1.026.016	1.114.424	1.169.813
Sudeste	4.319.631	4.322.219	4.373.036	4.755.011	4.755.011	5.169.423	5.457.271	5.763.571
Sul	1.464.726	1.473.405	1.447.338	1.744.047	2.082.146	2.455.081	2.732.864	3.045.673
Centro-Oeste	501.095	536.232	510.941	659.707	929.554	980.812	1.036.510	1.095.463
Total	7.125.242	7.109.430	7.141.607	7.536.536	8.759.716	9.711.558	10.389.014	11.126.645

Fonte: Revista do I.L.C.T. - Janeiro-fevereiro de 1977.

TABELA II - Produção de queijos - Brasil (kg).

Espécies	Ano		
	1975	1976	1977
Queijos	99.288.789	115.335.524	113.631.457
Ricota fresca	788.533	948.940	964.369

Fonte: DIPOA - Ministério da Agricultura.

TABELA III - Composição do soro fresco.

	Soro obtido por coagulação %	Soro obtido por acidificação %
Água	93-94	94-95
Extrato seco	6-7	5-6
Lactose	4,5-5,0	3,8-4,2
Proteínas	0,8-1,0	0,8-1,0
Cinzas	0,5-0,7	0,7-0,8
Ácido cítrico	0,1	0,1
Ácido lático	vestígios	0,8
pH	6,45	ao redor de 5,0

Normalmente o soro contém aproximadamente 6% de sólidos e a Tabela III mostra a composição média de seus principais componentes (73). O conteúdo de gordura depende do leite utilizado. O soro possui, além disso, um elevado conteúdo de vitaminas A, B e C que fazem com que seja um produto muito nutritivo, sendo que a vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina e também chamada como lactoflavina) é a responsável pela sua cor amarelo-esverdeado. Também é uma excelente fonte de minerais, tais como: Ca, Mg, P e K (13). O soro de queijo, em países desenvolvidos, ainda é utilizado - principalmente como ingrediente em fertilizantes e rações animais (34, 74, 12, 61), embora uma parte seja destinada à alimentação humana (37).

Examinando as Tabelas II e III, vê-se que lamentavelmente no Brasil, continue-se vertendo nas redes de esgotos e rios quantidades consideráveis de proteína, sais minerais e lactose que poderiam ajudar na alimentação, principalmente da população de crianças de 0 a 6 anos de idade que segundo o I.B.G.E. Anuário Estatístico de 1974, representa 20,9% da população brasileira. Tomando em conta os valores de produção de queijo, o soro produzido deverá ser de aproximadamente 1.000.000 t, tendo em conta as perdas e dificuldades de recuperação, podemos supor que ainda haja 500.000 t de soro sem aproveitamento. Com 500.000 toneladas anuais de soro não aproveitadas, a economia nacional perde em:

- proteína - 8,0 g/l de soro - aproximadamente 4.000 t
- lactose - 48,0 g/l de soro - aproximadamente 24.000 t
- sais - 6,0 g/l de soro - aproximadamente 3.000 t

A lactose já é produzida no Brasil por uma indústria multinacional, mas, em sua maioria é importada, da maneira mostrada pela Tabela IV.

TABELA IV - Importação de lactose (kg).

	1975	1976	1977
Lactose quimicamente pura	244.656	253.307	418.484
Qualquer outra lactose, inclusive em forma de xarope	135.544	125.012	22.051
Total	380.200	378.319	440.535

Fonte: Comércio Exterior do Brasil - Importação.

## 2. Componentes do soro de queijo

### 2.1. Proteínas

Após a precipitação da caseína por meio de ácido ou coágulo, cerca de 20% das proteínas do leite permanecem no soro. Estas proteínas, chamadas comumente "Lactoalbuminas", junto com a lactose constituem a parte mais importante sob o ponto de vista nutricional. Considera-se que as proteínas do soro possuem um PER (Quociente de Eficiência Proteica) de 2,92 e assim superior ao da caseína que é de 2,5 (50). Utilizando eletroforese - foram feitas análises das frações proteicas do soro (38) e os resultados foram comparados com análises anteriores, os quais são mostrados na Tabela V.

TABELA V. Análises das proteínas do soro

Fração	Rowland	Rowland	Larson
	(g/100 ml leite)		% proteínas de soro
Proteína total	3,08		
Caseína	2,30		
Proteína de soro	0,54	100	100
Imunoglobulinas	0,08	15,2	13,0
Lactoalbuminas	0,36	66,1	66,1
Alfa-lactoalbumina			19,7
Beta-lactoalbumina			43,7
Soroalbuminas			4,7
Proteínas - Peptonas	0,10	18,7	18,9
P-1-3			4,6
P-1-2			8,6
P-1-1			5,7
Lactoglobulinas	0,18		

As proteínas do soro são utilizadas, industrialmente, na produção de "Lactoalbumina", constituída basicamente por alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina, que tem sido utilizada como complemento de proteína em produtos a base de carnes, em panificação e na fortificação de cereais (49, 32). Na própria indústria de laticínios, as proteínas do soro têm sido, tradicionalmente, utilizadas na fabricação de ricota ou queijo de albumina (67, 34), ou retornando-as aos tanques queijeiros para aumentar o rendimento (62, 63, 2). Tem-se obtido bons resultados na fabricação de confeitos, tais como: "mazapanes" (65), e sobremesas como pudins fortificados com Fe para crianças em idade escolar (10). Com o desenvolvimento dos processos de membrana, os que parecem ter o maior potencial imediato para obter, respectivamente, concentrados de proteína solúvel e reduzir a porcentagem de cinzas são: ultra-filtração e troca iônica (43, 27, - 70). Trabalhando com soro de queijo Minas desenvolveu-se por ultra-filtração um produto proteico, solúvel em bebidas ácidas de baixo custo, tipo refrigerante, indicado para crianças (50) e, ainda pelo processo de ultra-filtração foi desenvolvida uma tecnologia de fabricação de queijo tipo ricota (44), que visa aumentar o rendimento das proteínas do soro.

#### 2.1.1. Desproteínização

Muitos estudos mostram os efeitos do tratamento térmico sobre o soro de queijo. A estabilidade relativa das proteínas séricas varia individualmente, sendo algumas altamente sensíveis

ao calor (21). As frações mais afetadas são as imunoglobulinas, as quais, são completamente desnaturadas a  $70^{\circ}\text{C}$  (38). A alfa-lactoalbumina é menos sensível, não sendo completamente desnaturada a temperaturas menores de  $91^{\circ}\text{C}$ . Ao serem desnaturadas as proteínas (71), a fração coagulável é precipitada e isto depende do tratamento térmico utilizado e do pH do soro. Os processos mais usados consistem em aquecer a  $85-95^{\circ}\text{C}$ , seguido por acidificação a pH de 4,5 a 4,8 (21, 48, 71, 2, 10, 36). O ponto isoelétrico das proteínas do leite é de 4,65 (73), porém, as frações proteose-peptona permanecem no soro mesmo depois de aquecido a  $95^{\circ}\text{C}$  a pH 4,5, já que o seu ponto isoelétrico é de 3,7 (53). Valores de pH 4,5-4,8 favorecem a obtenção de um produto com baixo conteúdo de cinzas, principalmente fosfato de cálcio, as quais permanecem solúveis no soro (25), e para obter uma lactoalbumina com baixo teor de cinzas, lava-se com água a pH 3,5 o que diminui ao mínimo os sais e a lactose. As proteínas do soro podem ser precipitadas ajustando o pH a 6,3-6,5 com  $\text{CaO}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ou  $\text{CaCl}_2$  e aquecendo até a ebulição, sendo isto mais aplicado para soros ácidos (21, 19). Também podem ser precipitadas com sais metálicos de Al, Fe; Pb e consegue-se uma remoção excelente adicionando 30 ml de  $\text{AlCl}_3$  a 5 litros de soro, aquecendo 10 min e filtrando.  $\text{FeCl}_3$  também é bom precipitante - porém, menos eficiente (16).

### 2.1.2. Separação das proteínas

Tradicionalmente, a separação das proteínas precipitadas no soro tem sido feita por decantação (7). Esta separação

é aplicada na manufatura de lactoalbumina, onde se tem que remover a maior quantidade de soro possível, para reduzir o conteúdo de lactose e cinzas a níveis aceitáveis. A temperatura de precipitação afeta a natureza do grânulo precipitado (7). Acima de  $96^{\circ}\text{C}$  esse precipitado é firme e tem uma textura granular e abaixo de  $93^{\circ}\text{C}$ , a proteína é mais difícil de ser recuperada. Um certo grau de agitação é desejado na precipitação da lactoalbumina, mas, quando a agitação do soro é violenta a proteína precipita em partículas pequenas e de baixa densidade, o que a torna mais difícil de ser separada. O pH ótimo de sedimentação é 4,4-4,7 (71). A pH menores a lactoalbumina precipita em partículas finas dando ao soro aparência leitosa, não sendo possível separá-la por sedimentação. A pH maiores o precipitado produzido flutua na superfície, causando gastos consideráveis na decantação. A viabilidade de se usar uma força centrífuga como um processo de separação de proteínas precipitadas, foi estudada através de separadores centrífugos, relativamente caros, mas de separação rápida e eficiente. Foi demonstrado que a proteína do soro desnaturada pelo calor e precipitada com ácido, remove-se muito mais eficientemente por centrifugação do que por filtração ou por sifão (35). A filtração tem sido praticada usando-se filtros à vácuo rotativos, com descarga de sólidos e ajuda de filtração, a qual pode propagar uma contaminação microbiana.

## 2.2. Sais minerais

O conteúdo de sais minerais, no soro doce, obtido por coagulação do leite através da ação do coalho, é de aproximadamente 0,6% (55), como apresentado na Tabela VI.

TABELA VI - Composição média dos sais no leite e no soro doce. (mg/100 g de leite).

	Leite	Soro doce
Cálcio	114,2	39,9
Magnésio	11,0	7,8
Sódio	50,0	47,0
Potássio	148,0	143,0
Fósforo	84,8	37,4
Ácido cítrico	166,0	152,0
Cloretos	106,0	106,0

## 2.3. Lactose

Lactose ou açúcar do leite é o principal carboidrato - que se encontra no leite de todos os mamíferos, também encontrado em pequena porcentagem no sangue e na urina, principalmente durante a gravidez e a lactação, como resultado da migração da lactose formada na glândula mamária. Outras fontes são extremamente raras, mas, sempre como um constituinte de vários oligos-

sacarídeos (55).

No leite de vaca a lactose varia, geralmente, de 4,4 a 5,2% (55), constituindo cerca de 50% do extrato seco. O leite humano contém uma porcentagem maior de lactose (Tabela VII) e, é por isso que se pratica a adição deste açúcar, ou sacarose, ao leite de vaca para alimentação infantil .

TABELA VII - Composição média de diferentes leites.

	Sais %	Gordura %	Proteína %	Lactose %	Sólidos totais %
Vaca	0,8	3,7	3,4	4,8	12,7
Búfalo	0,8	7,4	4,1	4,8	17,4
Mulher	0,25	3,8	1,0	7,0	12,4
Egua	0,4	1,9	2,5	6,2	11,2
Cadela	1,2	12,9	7,9	3,1	23,5
Coelha	2,0	18,3	13,9	2,1	32,8

A lactose forma-se a partir da glucose do sangue, na glândula mamária (66). Parte da glucose é convertida a galactose, esta se une com a glucose e ao perder uma molécula de água forma a lactose, mediante uma ponte de oxigênio; trata-se de uma hexose (galactosido-1-4-glucose)  $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$  de peso molecular 360. A estrutura molecular da lactose é mostrada na Figura I.

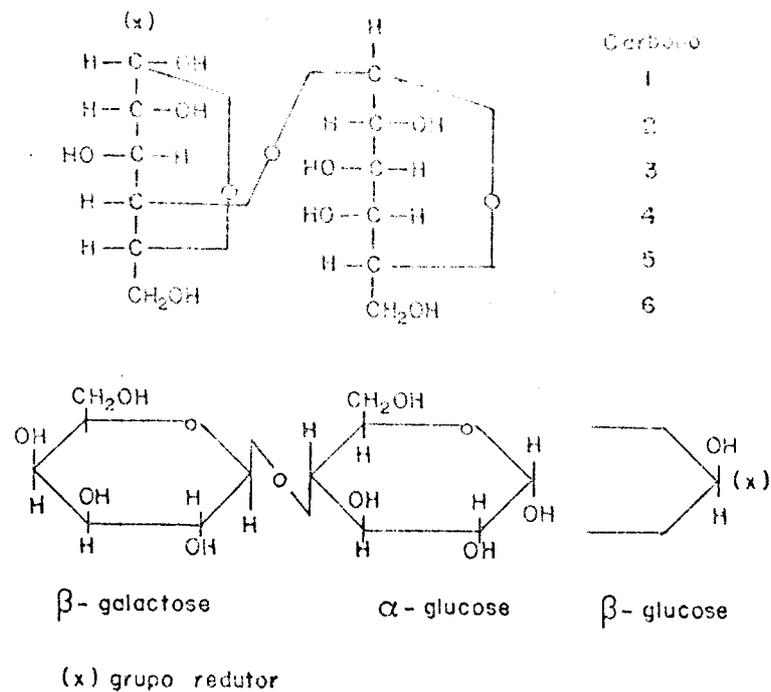


Fig.I. Estrutura molecular da lactose.

Durante a secreção láctea, o transudato que se separa do sangue tem a mesma pressão osmótica que a lactose, daí a importância desta na secreção do leite já que, a pressão osmótica é exclusivamente devida à lactose e sais solúveis do leite. A relação entre uma e outra é recíproca, a lactose aumenta quando os sais diminuem e vice-versa. A pressão osmótica do plasma e do leite têm aproximadamente 6,6 atm (66). A lactose é o fator que limita a produção de leite (1); a quantidade de leite produzido depende das possibilidades de síntese da lactose na mama. A lactose é o elemento solúvel mais abundante e sua atividade osmótica é muito mais elevada que a dos outros componentes lácteos.

### 2.3.1. Solubilidade

A solubilidade da lactose está fortemente afetada pela velocidade da mutarotação. Quando a alfa-lactose é adicionada em excesso à água, com agitação, uma quantidade definida se dissolverá rapidamente, depois da qual, uma quantidade adicional se dissolve mais lentamente, até que a solubilidade chega à saturação (55). A quantidade inicial corresponde à solubilidade real da forma alfa. O incremento da solubilidade com o tempo é devido à mutarotação da alfa-lactose convertida em beta-lactose, permitindo dessa maneira, dissolver-se mais alfa-lactose. A solubilidade final é atingida quando o equilíbrio alfa ↔ beta é estabelecido, onde nada mais da alfa-lactose pode dissolver-se, pois esta solução está saturada com respeito a alfa (60). Os valores de solubilidade para a lactose em função da temperatura são dados na Tabela VIII, e a Figura II mostra a solubilidade em função do pH.

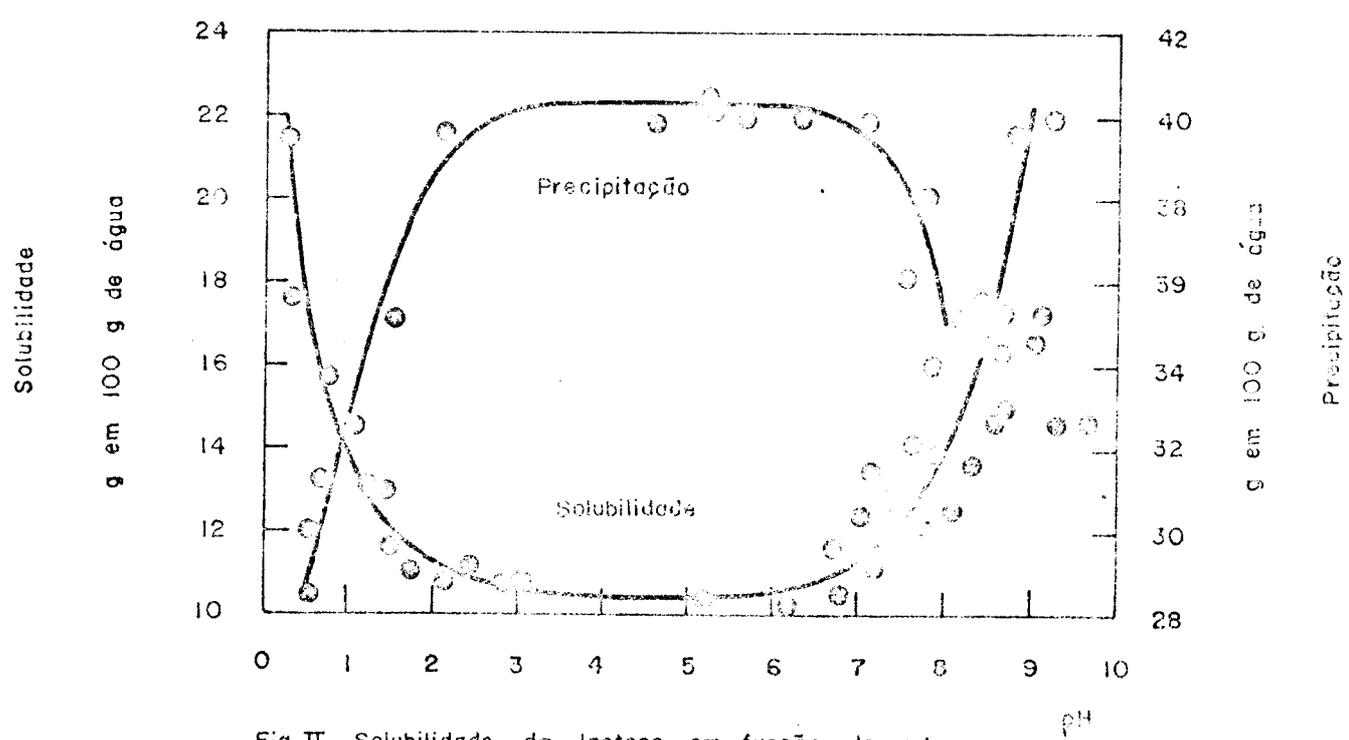


Fig.II. Solubilidade da lactose em função do pH.

TABELA VIII - Solubilidade da lactose (g/100 g de água).

°C	Inicial		Final	Super solubilidade
	alfa	beta		
0	5,0	45,1	11,9	25
10,0	5,8	-	15,1	-
15,0	7,1	-	16,9	38
25,0	8,6	-	21,6	50
30,0	9,7	-	24,8	-
39,0	12,6	-	31,5	74
49,0	17,8	-	42,4	-
50,0	-	-	43,7	-
59,1	-	-	59,1	-
63,9	-	-	64,2	-
64,0	26,2	-	65,8	-
73,5	-	-	84,5	-
74,0	34,4	-	86,2	-
79,1	-	-	98,4	-
87,2	-	-	122,5	-
88,2	-	-	127,3	-
89,0	55,7	-	139,2	-
90,0	60,0	-	143,9	-
100,0	-	94,7	157,6	-
107,0	-	-	177,0	-
121,5	-	-	227,0	-
133,6	-	-	273,0	-
138,8	-	-	306,0	-

Solventes e a presença de sais ou sacarose influem na solubilidade da lactose (55) que se eleva com o incremento de alguns sais de cálcio tais como: cloratos, bromatos ou nitratos. Foi demonstrado que o clorato de cálcio aumenta a solubilidade da lactose em metanol (15). Etanol e metanol reduzem a solubilidade e aceleram a cristalização, mas, influem na forma do cristal (55). A lactose e a proteína solúvel do soro foram separadas por extração alcoólica (40) e, ao estudar os efeitos dos álcoois na solubilidade da lactose, demonstrou-se que, a solubilidade decrescia quando a cadeia molecular do álcool era maior (42), mas, foi elevada quando incrementado o conteúdo de umidade (36). Acetona também reduz a solubilidade da lactose e um processo para recuperá-la do soro é baseado neste fato (56), adicionando acetona ao soro concentrado a 18-20% de lactose, em quantidades suficientes para precipitar as impurezas, as quais são retiradas. Depois da adição da acetona até cerca de 65%, conseguiu-se recuperar 85% da lactose em 3,5 h. O rendimento da lactose e a rapidez da cristalização são influenciados pela velocidade de adição da acetona.

### 2.3.2. Mutarrotação

A lactose existe em duas formas isômeras: alfa e beta (1), as quais diferenciam-se na posição de um grupo -OH no carbono 1 da glucose e por suas propriedades físicas, como pode ser observado na Figura I e Tabela IX, respectivamente.

TABELA IX - Propriedades Físicas da lactose.

	ISÔMEROS	
	alfa	beta
Poder rotatório	+89	+35
Temperatura de fusão	202°C	252°C
Composição de equilíbrio a 15°C	38%	62%
Cristalização das soluções saturadas:		
acima de 93,5°C	-	beta-anidra
abaixo de 93,5°C	alfa-hidratada	-
Solubilidade inicial a 15°C (% em água)	7	50
Solubilidade inicial a 100°C (% em água)	70	95

Quando se dissolve lactose em água a 20°C observam-se algumas modificações poder rotatório, até que as formas alfa e beta atinjam o equilíbrio; este fenômeno é conhecido com o nome de mutarrotação. No equilíbrio, a rotação é de +55,3°, isto equivale a 37,3% para a forma alfa e 62,7% para a forma beta (55). A proporção de equilíbrio da forma beta para alfa a 20°C é de  $62,7/37,3 = 1,68$ . Este valor é afetado pela variação da temperatura, mas não pelo pH.

Foram realizados estudos sobre a mutarrotação da lactose por métodos polarimétricos (23), e constatou-se que a sua cinética corresponde à reação de primeira ordem. A velocidade da mutarrotação aumenta 2,8 vezes por cada incremento de 10°C, e entre pH 4,0-6,5 a mutarrotação tem uma velocidade mínima (6) como mos

tra a Figura III.

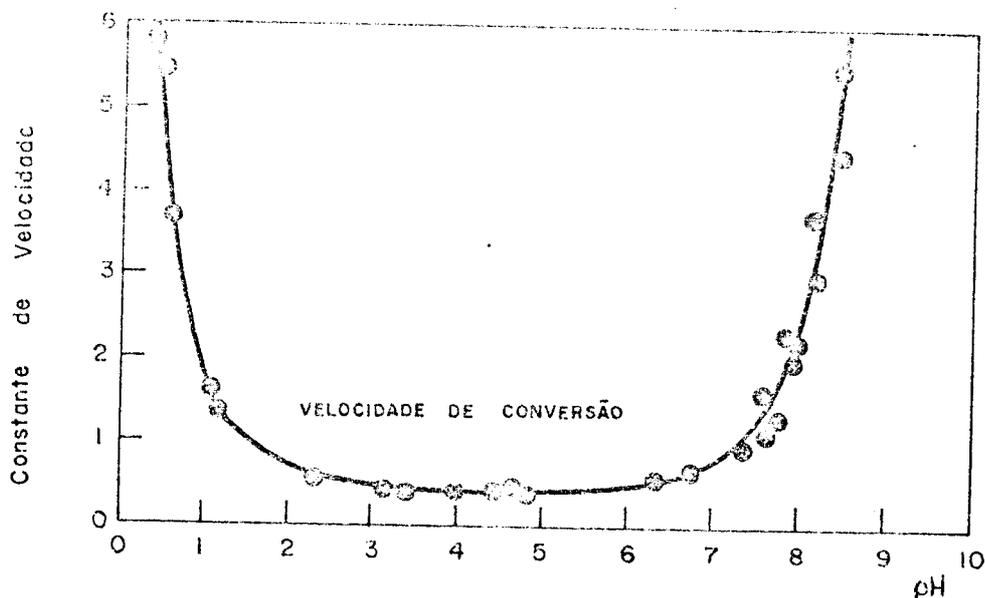


Fig. III. Velocidade de conversão ALFA-BETA LACTOSE em função do pH.

A velocidade de mutarrotação é influenciada pela temperatura e pH; é lenta a temperaturas baixas, mas se tornam rápida quando esta aumenta, chegando a ser quase instantânea a 75°C (56). A velocidade de mutarrotação foi depois de 1 hora a uma temperatura de 25°C de 51,1%; a 15°C de 17,5% e a 0°C 3,4% (55).

### 2.3.3. Cristalização

A lactose comercial mais comum que se produz por cristalização é a forma alfa lactose monohidratada  $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ , ou simplesmente alfa lactose. É obtida a partir de soluções saturadas, por cristalização, a temperaturas abaixo de 93,5°C (56). A forma alfa anidra obtem-se por desidratação da forma hidratada,

ã vácuo, com calefação moderada, mas é muito higroscópica e rapidamente absorve água quando exposta ao ar, formando a alfa hidratada novamente. Quando a cristalização se efetua acima dos  $93,5^{\circ}\text{C}$ , a forma beta-lactose anidra cristaliza. A forma beta hidratada não tem sido isolada (56). Se uma solução de lactose é submetida a uma secagem instantânea, encontram-se as formas alfa e beta (1).

Uma solução de lactose pode ser levada ao estudo de supersaturação por diminuição do conteúdo de água, por decréscimo na temperatura ou pela combinação de ambos. Quando se resfria uma solução de lactose, a solução permanece primeiro no estado de supersaturação, para depois cristalizar-se segundo um processo inverso ao da solubilidade (82, 60); inicialmente cristaliza-se a forma alfa e, simultaneamente, parte da forma beta transforma-se em alfa, pelo fenômeno de mutarrotação, para reestabelecer o equilíbrio da solução. Dessa maneira, a totalidade da lactose pode se transformar progressivamente em cristais de alfa-lactose.

O conceito de supersaturação entende-se para as áreas metaestável e lábil mostradas na Figura IV.

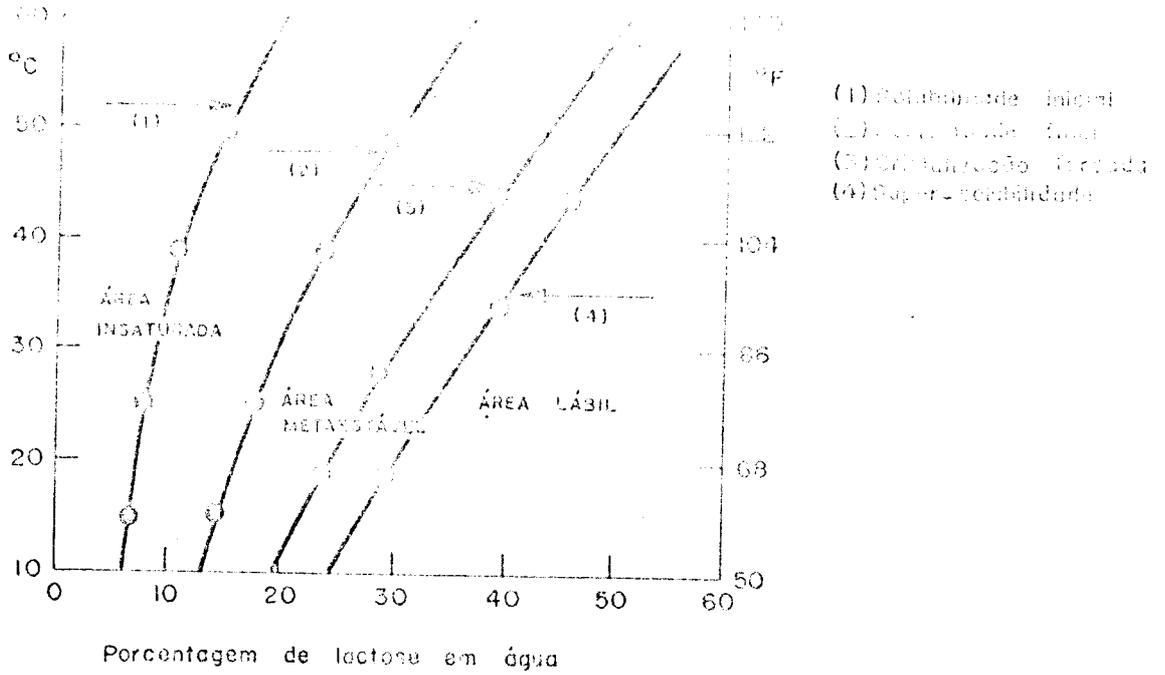


Fig. IV. Curvas de solubilidade da lactose.

Na área metaestável tem lugar o primeiro estágio da supersaturação, produzida por resfriamento da solução ou por evaporação - contínua depois da saturação, mas, não é aqui onde realmente acontece a cristalização. A área lábil encontra-se em altos níveis de supersaturação, e é onde realmente ocorre a cristalização (55). Na região insaturada nunca terá lugar uma nucleação ou crescimento dos cristais, o qual somente terá lugar nas regiões metaestável ou lábil, ou na área metaestável quando se se meiam cristais de lactose. Uma nucleação espontânea pode acontecer na área lábil, sem adição de material semeado.

A cristalização, em geral, envolve duas etapas (55): a) nucleação e b) crescimento dos núcleos. A nucleação envolve a ativação de pequenas partículas instáveis com suficiente excesso de energia de superfície para formar uma nova fase estável.

Isto também pode ocorrer em soluções supersaturadas como um resultado de choque mecânico, introdução de pequenos cristais, ou a presença de impurezas que podem atuar como o centro para o crescimento.

Observou-se várias formas de cristais de alfa-lactose, dependendo das condições de cristalização (55), concluindo que, os principais fatores que governaram a forma cristalina da lactose foram a pressão sobre os cristais e a proporção entre concentração e solubilidade. Quando a pressão é grande, a cristalização é rápida, produzindo somente cristais em forma de "prisma", quando esta pressão de saturação é menor, a forma dos cristais é a de um "diamante" plano, seguindo as formas de "pirâmide" e de "machado". Finalmente, em cristalizações lentas obtém-se o cristal "inteiro". Estes tipos de cristais estão ilustrados na Figura V. Outros estudos de cristalização e formas de cristais, conduziram às mesmas conclusões (81).

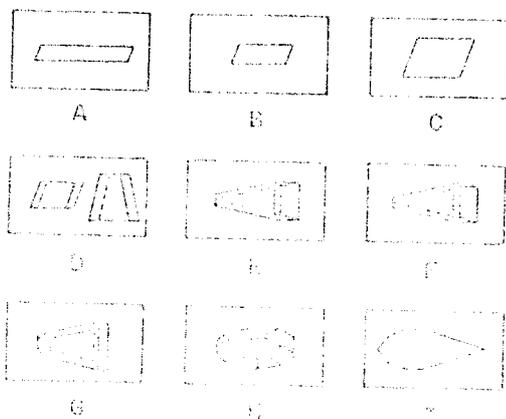


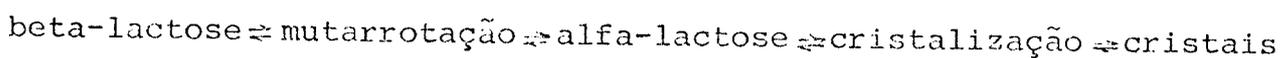
FIGURA V - Formas de cristais de alfa-lactose.

Legenda da Figura V :

- A - Prisma, formado quando a velocidade de crescimento é muito rápida.
- B - Prisma, formado quando a velocidade de crescimento é menor que em A.
- C - Transição entre as formas B e D.
- D - Pirâmide, formado ao aumentar a espessura de C.
- E - Machado, mais alto que D e com corte na face da base.
- F - Machado, com aparecimento de mais faces.
- G - Inteiro, desenvolvimento completo.
- H - Cristal contendo 13 faces.
- I - Cristal apresentando uma mistura de H e E.

A presença de outras substâncias numa solução de lactose pode afetar a velocidade de cristalização e a forma do cristal (80); geralmente outras moléculas interferem com o movimento e a orientação molecular, retardando a cristalização. Ácidos, bases e sais podem influir na reação de mutarotação (23) e, conseqüentemente, alterar a velocidade de cristalização, que é incrementada por um aumento da superfície de deposição, mas, isto é difícil de demonstrar experimentalmente, devido à tendência de formar-se novos cristais em soluções de lactose supersaturadas (79). Agitação também influi na velocidade de cristalização (24). Em recentes estudos, foram determinadas as velocidades de cristalização por unidades de área de superfície de cristal pelo incremento no peso de grandes cristais individuais (25). A temperatura ótima de cristalização, varia

na qual cristaliza-se uma maior quantidade de lactose por unidade de tempo, varia com o grau de supersaturação (79). Dependendo de outros fatores, uma variação na temperatura pode causar um decréscimo (79) ou, não mudar a velocidade de cristalização (24). A pH baixos, cerca de pH 1, a velocidade de cristalização aumenta bastante, como resultado do incremento da velocidade de mutarrotação (59); aumenta também quando a supersaturação é bem maior que 1 (81, 79). Esta velocidade é menor que a de mutarrotação (24), daí, não ser esta um fator limitante na seguinte reação:



Também a difusão pode ser um dos fatores que influem no processo anterior (81), mas, foram apresentados dados demonstrando que o crescimento cristalino da lactose não está governado pela difusão. Em altas viscosidades e baixas temperaturas a velocidade não foi influenciada por mudanças térmicas visto que, a cristalização é independente da difusão (24). A relação entre a cristalização e o tempo não é linear (24) e parece que segue uma tendência cinética química de primeira ordem, sendo igual para soro ou soluções aquosas de lactose. Diversos pesquisadores (64, 75, 76) desenvolveram, em estudos recentes, novas expressões matemáticas do crescimento dos cristais de lactose.

### 3. Recuperação da lactose do soro de queijo

#### 3.1. Classificação da lactose

O regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura do Brasil (47), cita no artigo 693: entende-se por lactose, o produto obtido pela separação e cristalização do açúcar do leite. Compreende: lactose "Bruta", lactose "Industrial" e lactose "Refinada". A lactose Bruta deve ter:

- a) lactose, no mínimo 60% (sessenta por cento)
- b) água, no máximo 8% (oito por cento)
- c) protídeos, no máximo 8% (oito por cento)

A lactose Industrial pode ser apresentada em solução - concentrada, em forma Bruta ou Purificada de acordo com o fim a que se destina. A lactose Refinada deve apresentar as características fixadas pela Farmacopéia Brasileira.

#### 3.2. Manufatura de alfa-lactose Bruta

O soro para a manufatura da lactose deverá ser pasteurizado e resfriado, caso contrário, incrementará consideravelmente o conteúdo de ácido lático (33), devido à transformação da lactose por bactérias lácticas. Nestas condições, não é conveniente neutralizar o soro, porque aumentará o conteúdo de sais a um nível indesejável. Os métodos que preservam o soro (6) de uma fermentação prematura mais usados são: a) resfriamento imediato a 4°C, que é suficiente por até 24 h; b) pasteurização, método não recomendável antes do processo de recuperação da protei

na e c) uso de oxidativos (peróxido de hidrogênio a 40 ppm, hidrossulfito de sódio ou magnésio a 0,5%). A combinação de a) e c) é provavelmente o método mais eficaz.

Os métodos utilizados para a recuperação da lactose do soro (56) classificam-se em dois grupos: a) recuperação da lactose cristalina sem separação das proteínas do soro; b) coagulação e separação das proteínas antes da cristalização. Em geral, as proteínas são coaguladas por tratamento térmico e ajuste do pH no seu ponto isoelétrico. Num processo (31), descreve-se como é obtida a lactose a partir do soro de caseína, onde depois de ajustar o pH a 6,8 com cal, é injetado vapor direto para precipitar as proteínas e o líquido claro é decantado e filtrado. Este filtrado é concentrado a 40% de sólidos em um evaporador de triplo efeito de aço inox e o xarope resultante é deixado em repouso durante a noite, reaquecido por injeção de vapor e filtrado, o qual é concentrado a 60% de sólidos em um evaporador à vácuo de simples efeito. Logo, é bombeado aos cristalizadores e esfriado a 13-16°C, onde mais de 60% da lactose cristaliza. Os cristais mais o xarope são centrifugados em uma centrífuga de cesto que reduz o conteúdo de água a 7-10% e a solução saturada separada é chamada de "água mãe". Esses cristais são lavados com água, até esta sair da centrífuga limpa ou com pouca coloração e a ela se denomina "água de lavagem". Normalmente são necessários 1,5-2,0 kg de água/kg de cristais. A água mãe e a água de lavagem retornam ao evaporador de simples efeito, são concentradas a 65% de sólidos e a lactose é cristalizada. Os

cristais podem ser secos num secador rotatório.

Numa patente, relata-se a obtenção da lactose (83), a partir do soro doce com pH maior que 5,4. O soro é neutralizado a pH 7,0-7,5 seguido por adição de 0,0025-0,063 de tetrafosfato de sódio ou magnésio para reduzir a viscosidade e estabilizar o conteúdo de proteína do soro, evitando a coagulação e conservando solúveis os íons de cálcio. O soro é concentrado a 60% de sólidos, e a lactose é cristalizada, lavada, centrifugada e secada. A lactose assim obtida contém um conteúdo baixo de cinzas.

Em outro método (36), o soro ácido é ajustado com cal a pH 6,2 e a maioria das proteínas e dos minerais é separada. O líquido limpo é concentrado num evaporador a 30% de sólidos, filtrado e novamente evaporado, agora, até 50% de sólidos. O xarope quente é colocado em tinas de cristalização onde é esfriado lentamente e é agitado para induzir à cristalização. A lactose é separada por centrifugação e lavada com água gelada.

Segundo uma patente dos E.E.U.U. (22), um processo para se recuperar a lactose do soro doce é o seguinte: o soro com não mais de 0,16% de acidez é concentrado a temperatura inferior a 74°C por 30 s até 58-62% de sólidos. A cristalização é feita por um período de 6 a 12 h onde deverá atingir 38°C. A mistura é centrifugada para separar os cristais, que depois são lavados e secados.

O grupo Alfa-Laval tem também um processo próprio para recuperar a lactose do soro (6), utilizando centrífugas, tipo

"decanter" para separar os cristais.

Um outro processo (80), mostra que o soro de leite refriado é ajustado a pH 7,8-8,0 antes de ser aquecido a 74°C. Posteriormente, é bombeado a um evaporador de múltiplo efeito, onde as temperaturas foram 70, 59, 49°C no primeiro, segundo e - terceiro efeitos, respectivamente. O soro concentrado a 42% de sólidos é então enviado para um evaporador descontínuo de simples efeito, operando a 50°C até atingir 61-62% em aproximadamente 1 hora/batelada. Bombeia-se o xarope a um cristalizador cônico com agitação contínua, onde a solução é esfriada a uma razão de 1,7°C/h e a velocidade de esfriamento é aumentada a 2,8°C/h continuamente, até o produto atingir 16°C. Este produto é passado a uma centrífuga tipo cesto para recuperar e lavar a lactose que é secada num secador rotatório com ar quente a contra-corrente, esfriada e embalada.

A obtenção da lactose Bruta é explicada da seguinte maneira (73): o soro desproteínizado é reduzido de volume até 55-60% e a cristalização efetua-se com lentidão a 30°C primeiramente. Depois de 3 h intensifica-se a 20°C e passadas outras 4 h a 10-12°C. Cada 2 ou 3 h tem-se que remover os cristais com cuidado. Na centrífuga, a parede do tambor é coberta com um pano filtrante para aumentar ainda mais o grau de separação e a massa concentrada mistura-se com água fria na proporção de 5:2 para fluidificá-la. Centrifuga-se, e, antes de serem retirados, os cristais são lavados com água fria. Sua umidade na saída da centrífuga deve ser de 8-12%. A lactose é secada com corrente

de ar quente a 70-80°C por 5-7 h e, por este método, obtém-se 60% da lactose original do soro.

Foram realizadas provas de cristalização para se obter uma lactose cujo tamanho dos cristais fôsse o mais uniforme possível (80). As temperaturas que deram melhores resultados para essa obtenção foram: decréscimo da temperatura de 60 a 54°C por "flash", de 48 a 30 em 8 h (2,3°C/h), de 30 a 23°C em 4 h (1,7°C/h), de 23 a 20°C em 3 h (1,1°C/h) e finalmente, de 20 a 18°C em 3 h (0,6°C/h). Os cristais apresentaram um rendimento de 3,31 kg/100 kg de leite processado e foram facilmente centrifugados e secados.

Para se obter a cristalização máxima da lactose é essencial resfriar o produto concentrado a 50% de sólidos em dois estágios (33): primeiro deve ser resfriado rapidamente a 28-30°C e depois, lentamente, até 15-18°C por 6-8 h com agitação de 10 rpm.

### 3.3. Manufatura da alfa-lactose Refinada

Quando o grau de pureza da lactose desejada deve ser alto, especialmente no caso de produtos farmacêuticos, ela deve rá ser refinada por recristalização (73). A finalidade da refi nação consiste em separar as substâncias não hidrogenadas presentes no açúcar Bruto, tais como: pigmentos, restos de protei nas, sais dissolvidos e cristalizados, ou reduzi-las a uma quan tidade mínima. Carvão ativo é usado para adsorver a cor (56,36) e, provavelmente remove outras pequenas impurezas. Adiciona-se

ácido clorídrico para facilitar a sua ação, proporcionar sais solúveis e também ajudar na remoção das proteínas. Logo após, usa-se cal para ajustar a reação e ajudar a precipitar as proteínas. O carvão e as impurezas precipitadas são separadas por filtração e as impurezas solúveis separadas juntamente com a água mãe e a água de lavagem dos cristais, na centrífuga. A lactose (seca ou diretamente da centrífuga) é dissolvida em água quente até 50-60% de concentração, dependendo da lactose Bruta. Para dissolver rapidamente (6), é preciso aquecer até o ponto de ebulição. Logo após, agrega-se carvão ativo, uma pequena quantidade de produtos químicos (superfosfatos) e adiciona-se uma ajuda de filtração. A mistura, nessa temperatura, passa através de um filtro, leva-se aos cristalizadores e semeia-se com pequenos cristais de lactose, esfriando até 20°C em 6 h. Os cristais são separados numa centrífuga de cesto e aí, lavados. A água mãe e a água de lavagem são usadas para lavar a lactose Bruta, ou são retornadas ao evaporador para a recuperação da lactose residual. Para secar a lactose, um secador de leite fluidizado dá bons resultados.

Outro processo explica, que, para refinar a lactose (31), prepara-se uma solução a 30-40% de concentração, a qual é tratada com carvão ativo em dois estágios e filtrada de início, num filtro prensa e, posteriormente, através de um papel-filtro. O xarope é concentrado a 65% de sólidos em um evaporador de simples efeito e, logo, transferido aos cristalizadores para depois serem passados na centrífuga e os cristais lavados

com água (1,0-1,5 kg de lactose) e açúcar.

A lactose Bruta, para ser refinada (31), deverá dissolver-se em água destilada a 50°C até aproximadamente 25% de sólidos, agregando-se então, 2% de terra diatomácea. A solução é filtrada através de filtro-prensa e concentrada a 62-65% de sólidos, é cristalizada a lactose, os cristais são separados por centrifugação, lavados com água destilada e secados em câmaras à vácuo a 55-60°C. Se a lactose final não apresentar os valores de pureza necessários deve-se repetir mais uma vez essa etapa de refinação.

Tem-se feito muitos ensaios para obter lactose por outros procedimentos (83). Esses métodos ensaiados baseiam-se essencialmente na separação das proteínas do soro e dessalinação, mas, não têm sido ensaiados o suficiente na prática.

A Tabela X mostra análises típicas de diferentes graus de pureza da lactose.

TABELA X - Análises de diferentes graus de pureza da lactose.

Análises	Referência	Lactose		
		Bruta	Refinada	U.S.P.
Lactose %				
(mínimo)	(55)	98,40	99,00	99,85
	(31)	97,50	98,50	99,50
	(73)	97,75	98,75	99,60
	(36)	96,00	-	99,50
Água %				
(máximo)	(55)	0,30	0,50	0,10
	(31)	0,50	0,15	0,10
	(73)	0,40	0,60	0,20
	(36)	1,00	-	0,20
Proteína %				
(máximo)	(55)	0,80	0,10	0,01
	(31)	0,75	0,25	-
	(73)	0,75	0,20	0,05
	(36)	1,10	-	0,05
Cinzas %				
(máximo)	(55)	0,40	0,20	0,03
	(31)	0,75	0,25	0,10
	(73)	0,65	0,15	0,03
	(36)	1,50	-	0,25

#### 4. Propriedades e usos da lactose

##### 4.1. Doçura relativa

A lactose é menos doce do que a sacarose, por isto, pode ser adicionada aos alimentos, seja como: ingrediente, em forma de recheados ou como coberturas (30, 4) e também para incrementar os sólidos, sem que provoque uma doçura excessiva. A doçura relativa dos açúcares foi descrita (52) pela equação empírica  $S = K C^n$ , onde,  $S$  é a magnitude da doçura estimada;  $C$  é a porcentagem de sólidos e  $K$  e  $n$  são constantes experimentais. As doçuras relativas dos açúcares são estimadas na base da concentração e estão mostradas na Tabela XI.

TABELA XI - Doçura relativa dos açúcares

Concentração	Doçura estimada		
	Sucrose $S = 0,041 C^{1,03}$	Lactose $S = 0,066 C^{1,21}$	Glucose $S = 0,0147 C^{1,31}$
0,5	0,020	0,003	0,006
1,0	0,041	0,007	0,015
2,0	0,083	0,015	0,036
5,0	0,215	0,046	0,120
10,0	0,439	0,107	0,300
15,0	0,667	0,175	0,510
20,0	0,897	0,248	0,744

onde:

$S$  = magnitude da doçura estimada;

$C$  = porcentagem de sólidos.

#### 4.2. Reação de escurecimento

A lactose é um açúcar redutor que se pode combinar com as proteínas, peptídeos e aminoácidos pela reação de Maillard (14), formando pigmentos escuros. A lactose é usada nas indústrias de alimentos, sendo controlado este escurecimento, especialmente na indústria de panificação. Como cobertura, no pão, produz uma cor dourada, de aparência atrativa e vistosa, mesmo quando há armazenamento prolongado, pois ela não fermenta por Saccharomyces cerevisiae. A lactose é também usada na confecção de balas, onde são desejadas as características que resultam do escurecimento de Maillard e da reação de caramelização às temperaturas elevadas (26). A lactose foi usada para produzir um escurecimento uniforme em batatas congeladas, durante a fritura (29). Uma mistura de lactose e proteína foi mais satisfatória, já que, o conteúdo de proteínas na batata é limitado.

#### 4.3. Estabilidade das proteínas

A lactose é um protetor da solubilidade do complexo de caseinato durante a secagem do leite por atomização (78), pois, na ausência da lactose o caseinato sofre a perda da metade de sua capacidade de dispersão. A adição de lactose a concentrados congelados de leite estabiliza as proteínas (77). O sistema coloidal caseinato é mais estável à temperatura de  $-29^{\circ}\text{C}$ , a lactose encontra-se aí de maneira fina e em estado amorfo. Porém, ao aumentar a  $-18^{\circ}\text{C}$ , a cristalização da lactose é acelerada significativamente provocando uma rápida floculação da pro-

teína. A flocculação não é uma consequência da intervenção física dos cristais de lactose na estrutura micelar da caseína, mas, resulta da alta concentração dos sais na fase não congelada do leite. A lactose estabiliza as proteínas ao sequestrar a maioria dos sais no produto (77).

#### 4.4. Adsorção de "flavors"

A lactose adsorve sabores, aromas e matéria corante mas, este efeito varia com a forma da lactose (54). A forma alfa-lactose anidra adsorve 156-305 mg de diacetil/kg, as outras formas adsorvem menos. A capacidade de adsorção da lactose anidra em alimentos é imensa, como no café torrado e extratos de café, onde se recomenda o uso da lactose para preservar o aroma. Uma patente japonesa, mostra o uso da lactose anidra para incorporar junto com o vinho dentro de uma variedade grande de produtos de panificação (72).

#### 4.5. Propriedades dispersivas

A forma alfa-lactose pode ser usada em produtos instantâneos para aumentar a dispersibilidade dos alimentos em pó (55) e, o processo, envolve a adição de 15-50% de lactose, seca por atomização, umedecida e ressecada. Este processo oferece uma imensidade de usos em produtos em pó que tenham que ser de rápida dispersão, incluindo: café, chá, sopas, etc.

#### 4.6. Propriedades emulsificantes

A incorporação de 8% de lactose, na base de açúcares totais, em panificação, fará com que o amassamento seja em menor tempo, e com menor esforço, dando ao produto final uma aparência melhor, maior volume e uma textura homogênea (84).

#### 4.7. Fermentação seletiva

A lactose não é fermentada pelos microrganismos comumente usados na panificação, pois, não é hidrolizada durante a fermentação de produtos de padaria (57). O fato da lactose resistir às fermentações contribui à doçura final do produto. Em alguns países, isto é usado na manufatura de cerveja porque, ao não ser fermentada, aumenta a aceitação do produto pelo consumidor (57). As fermentações da lactose não têm sido muito exploradas por causa de suas limitações econômicas.

#### 4.8. Propriedades nutricionais

O valor nutritivo da lactose é observado pelos seus efeitos fisiológicos mais importantes (5): a) ação plástica - intervem diretamente na constituição dos cerebrosídeos, gangliosídeos, mucopolissacarídeos, elementos do tecido nervoso, etc. qualificando-a como um carboidrato estrutural e não energético; b) papel acidificante - serve de substrato a bactérias acidófilas benéficas, com predomínio de pH baixo e efeito antagônico para as outras espécies putrefativas; c) absorção de cálcio - tendo uma ação positiva na assimilação do mesmo; d) ação

lipotrópica - favorece o metabolismo lipídico, como se fôsse um agente lipotrópico, dando firmeza aos músculos.

Os problemas de intolerância à lactose, diminuem a contribuição nutricional positiva (45). Um trabalho mostra a absorção e origens da intolerância à lactose (41).

A lactose é considerada como o carboidrato preferido para modificar o leite de vaca em formulações de alimentos infantis, simulando o leite materno, já que este contém 7% de lactose e o leite de vaca apenas 4,8% (36) e, provavelmente, - este seja o maior uso da lactose até o presente.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Materiais

##### 1.1. Matéria prima

A matéria prima, primeiramente utilizada, foi soro obtido através da ação do coalho no leite, escolhido pela facilidade da sua obtenção no laboratório. Com este soro, foram realizadas provas a nível de laboratório, tais como: análises químicas, desproteínização, concentração e cristalização da lactose em diferentes formas físicas.

Com a experiência adquirida no laboratório, pensou-se em trabalhar a nível de planta piloto e enfrentar o que seria o nosso objetivo: a recuperação da lactose do soro. Utilizamos, para este fim, soro de ricota fresca, tomando também, conhecimentos da obtenção, manipulação, transporte e preservação dele. Contou-se com o fornecimento do soro pela fábrica de Laticínios Umuarama, localizada na cidade de Joanópolis, estado de São Paulo. Este soro foi obtido, na fábrica, da seguinte forma: 50 l de leite foram adicionados a 500 l de soro de queijo Minas frescal. Esta mistura foi aquecida até 60°C em tanque de aço inox coberto com camisa de vapor. Logo a seguir, 5% de fermento de S. lactis foi adicionado continuando o aquecimento com vapor direto por meio de uma mangueira de borracha até 85°C. Após isto, aqueceu-se ainda até 92°C por meio da camisa de vapor, quan

do apareceu a proteína coagulada, em forma de flóculos. Esta -  
proteína foi retirada através de uma peneira para continuar a e  
laboração da ricota e, o soro residual, com aparência ainda leiu  
tosa, foi transportado em latões de plástico de 50 l para a -  
FEAA. Caso o processo demorasse mais de 24 h usava-se um preseru  
vativo e conservava-se o soro refrigerado a aproximadamente -  
12°C.

### 1.2. Equipamentos

- Evaporador de película descendente Gebrs H. J. Scheffers  
N.V.
- Evaporador centrífugo Centri-therm CT IB-2 Alfa-Laval.
- Evaporador Luwa L-82-500-14.
- Centrífuga de cesto - da máquina de soja construída pe-  
la ICMA S/A.
- Secador de túnel - equipado com resistências e termostau  
to para controle da temperatura do ar, projetado e consu  
truído na própria FEAA.
- Filtro - Funda Filter, Chemap A.G.
- Mono-Bomba - ST-421 London-Manchester.
- Centrífuga desnatadeira - De Laval Gyrotester.

### 1.3. Aparelhos de laboratório

- Evaporador Rotatório de vidro - RE Buchi Buchler Instruu  
ments, Inc.
- Agitador - modelo ELB, Bench Scale Equipment, Co. Inc.

- Espectrofotômetro de absorção - Carl Zeiss.
- Refratômetro - Carl Zeiss.
- Potenciômetro - Procyon PIN4.
- Microscópio - Carl Zeiss.
- Digestor Kjeldhal - modelo 175/E Ind. Folabo Ltda.
- Destilador.
- Balança Analítica - SAUTER modelo 414.
- Balança Semi-analítica - METTLER P1000.
- Estufa - FANEM Ltda. modelo retilínea.
- Estufa à vácuo - FANEM Ltda. modelo retilínea.
- Mufla - Folabo Ltda. modelo MR-SP.
- Lâmpada estroboscópica.
- Bicos de Bunsen.
- Materiais de vidro (dessecadores, pipetas, buretas, provetas, béquers, etc.).
- Recipientes diversos, usados para transporte ou recepção dos produtos, em materiais de plástico, aço inox e alumínio.

#### 1.4. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram puros pró-análise, obtidos das seguintes firmas: Carlo Erba, Merck, Doles, J.T.Baker, Polyfarma S/A., Ecibra, Fisher, etc.

## 2. Métodos analíticos

### 2.1. Amostragem

As amostras do leite e do soro foram retiradas diretamente dos recipientes após uma pequena agitação, visando homogeneizar o produto. Para o soro concentrado, as amostras foram retiradas na saída do evaporador; já no caso da lactose, o sistema de amostragem usado foi o de moer o produto num almofariz até que se formasse um pó uniforme, que, foi utilizado em diversas determinações.

### 2.2. pH

O pH do soro foi determinado através de um potenciômetro Procyon modelo PHN4.

### 2.3. Acidez total titulável

Estas determinações foram feitas segundo o método 16.228 descrito no AOAC (3).

### 2.4. Sólidos solúveis

As determinações foram feitas através de um refratômetro Carl Zeiss.

### 2.5. Umidade

As determinações de umidade do soro concentrado e da lactose foram realizadas em estufa à vácuo a 60-70°C, segundo o método 31.005 da AOAC (3) até que, a diferença de peso não fôsse - maior que 0,2 g.

## 2.6. Gordura

Para se determinar o teor de gordura presente no leite e no soro foi empregado o método Gerber. Foram utilizados butirômetros especiais para o soro.

## 2.7. Nitrogênio total

As determinações do teor de nitrogênio total nas amostras foram realizadas segundo o método micro-Kjeldahl, 47.021 descrito no AOAC (3). Usando mistura catalizadora composta por sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio. O valor obtido nas determinações dos produtos do soro de queijo foi multiplicado pelo fator 6,38 para a obtenção da proteína bruta. A quantidade de amostra, quando sólida, foi de 0,2-0,3 g e, quando líquida, de 5 ml.

## 2.8. Cinzas

Foram determinadas pelo método 31.013 descrito no AOAC (3). As amostras pesadas em cadinho de porcelana foram queimadas em bico de Bunsen e calcinadas em mufla durante 2 h a 550°C.

## 2.9. Peso específico

Foi determinado pelo método S10-a-c (39), usando picnômetro calibrado com água destilada, lavado primeiramente com água e, depois com éter. As determinações foram feitas a 20°C.

## 2.10. Lactose

A lactose foi determinada pelo método de o-Toluidina - (68,69) e os resultados foram comparados com os obtidos pelo método de Fehling (17). Estes métodos são descritos com pormenores por serem adaptados à determinação da lactose no soro de queijo.

### 2.10.1. Método de o-Toluidina

#### Reagentes:

A) Ácido acético glacial

B) Glucose Kit A-900 lab. Doles. Este reagente é uma formulação em ácido acético de o-Toluidina a 7%, estabilizado com Tio-carbamida e ativado com íons Borato. Tal condição permite a utilização de apenas 50  $\mu$ l de soro.

#### Técnica:

Pipetar 10 ml do soro em um erlenmeyer de 50 ml e adicionar 5 gotas de A. Completar com água destilada até 30 ml. Colocar em banho-maria fervente durante 10 min, esfriar e completar com água destilada em um balão volumétrico de 100 ml. Filtrar através de papel-filtro e, do filtrado, usar 50  $\mu$ l (aproximadamente uma gota) depositando-os num tubo de ensaio onde se adicionam 5 ml de B. Colocar a mistura em banho-maria fervente durante 7 min e resfriar, posteriormente, em água corrente durante 5 min. Ler o teste padrão a 635 nm num espectrofotômetro ajustando o zero com um branco de água destilada. Os resultados referem-se a uma curva de calibração realizada com soluções pa-

drões de lactose de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 g em 100 ml de água destilada.

Princípio do método:

Em solução de ácido acético quente, a o-Toluidina, uma amina aromática, condensa com o grupo aldeído da glucose, dando origem a uma mistura em equilíbrio de uma glicosilamina e a correspondente base de Schiff. A cor, azul-esverdeada produzida é proporcional à concentração de lactose.

#### 2.10.2. Método de Fehling

Soluções:

A) Dissolver 34,64 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) em água destilada e completar o volume para 1 litro em balão volumétrico.

B) Dissolver 346 g de sal de Rochelle (Tartarato de sódio e potássio) e 100 g de hidróxido de sódio em água destilada e acertar o volume para 1 litro em balão volumétrico.

C) Solução aquosa de azul de metileno a 1%.

D) Solução padrão de lactose a 0,5%.

E) Solução de acetato de chumbo a 10%.

F) Solução saturada de fluoreto de sódio.

Pesar precisamente 2,50 g de monohidrato de lactose p.a. em água num balão volumétrico de 500 ml e acertar o volume com água. Guardar esta solução em refrigerador e levar à temperatura ambiente antes do uso. Não guardar esta solução por mais de uma semana.

Pipetar 20 ml do soro em um balão volumétrico de 100 ml

e adicionar cerca de 30 ml de água, 5 ml de E, agitar e adicionar ainda 18 ml de F e agitar novamente. Completar o volume com água, tampar e agitar vigorosamente, deixar descansar por 20-30 min e filtrar através de papel-filtro.

Pipetar 25 ml da solução A em um erlenmeyer, adicionar 12,5 ml da solução B (proveta graduada). Pipetar a quantidade requerida do filtrato (20 a 25 ml), no frasco. Adicionar água, de tal maneira que, o volume do filtrado usado mais a água seja de 30 ml. Levar a mistura à ebulição, sobre chama, por aproximadamente 2 min. Ferver moderadamente por 2 min e, então, adicionar 5 gotas da solução C. Quando ainda em ebulição, adicionar D por meio de uma bureta, até que a cor azul desapareça completamente e torne-se vermelho-tijolo.

Essa titulação deverá ser repetida até que a diferença entre uma quantidade e outra seja inferior a 0,2 ml em três repetições.

Cálculos:

$$\text{Lactose \%} = 0,5 \times \frac{S - T}{F} \times \frac{100}{W}$$

onde,

S = Titulação padrão (aproximadamente 34,0 ml)

T = ml de solução de lactose 0,5% requerida para o teste

F = ml do filtrado utilizado

W = peso da amostra tomada para a precipitação da proteína

#### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, não só procurou-se mostrar os resultados finais obtidos ao longo do trabalho, como também, relatar as observações que julgamos importantes relacionadas com detalhes de cada estágio do trabalho. Procuramos ainda, evidenciar as razões que nos levaram a utilizar determinados equipamentos e comentar as dificuldades enfrentadas para a consecução dos objetivos propostos em nosso plano de trabalho de Tese, sendo que este, realizou-se nos seguintes estágios:

1. Ensaio prévios
2. Desproteínização do soro
3. Concentração do soro
4. Cristalização da lactose
5. Separação e secagem da lactose
6. Recristalização da lactose
7. Análises da lactose obtida

##### 1. Ensaio prévios

Os ensaios, abaixo relacionados, foram realizados para conhecer a matéria prima (soro de queijo) com a qual ia-se trabalhar, fazer também algumas análises, provas de preservação e cristalizar a lactose.

### 1.1. Separação do soro e caseína do leite.

Ao leite tipo "B", marca Leco, pasteurizado, foi adicionado 0,015% de coalho marca Estrela a uma temperatura de 31°C, produzindo-se uma coalhada firme em 40 minutos. Prosseguia-se cortando a massa com uma faca para ajudar o dessoramento. O soro, retirado aos poucos, conforme a massa ia dessorando, era claro, transparente e apresentava coloração amarelo-esverdeada, considerada normal.

### 1.2. Análise do soro

Estas análises foram simples, de rotina, as quais serviram para avaliar a composição da matéria prima. As análises sempre foram realizadas em triplicata, em dez amostras diferentes. Os resultados são mostrados no Quadro I.

#### 1.2.1. Análise da lactose

Os métodos clássicos de análise da lactose que durante muitos anos foram os únicos utilizados para a determinação dos parâmetros exigidos, não têm sido concebidos para a análise em série de um grande número de amostras. Eles necessitam de mão-de-obra excessiva, o que, devido ao seu custo cada vez maior, impede a sua aplicação rentável. Nos últimos anos, houve uma intensa investigação dirigida à criação de outros processos analíticos mais rápidos, mais automatizados e, assim, mais aptos para as características de trabalho em grande escala. Dos diferentes métodos para determinar a lactose, publicados nos últi -

QUADRO I - Análises médias feitas aos soros de queijo utilizados.

Análises	a	b
Brix refratômetro	6,20	6,40
pH	5,75	6,60
Gordura %	0,20	3,40
Proteína %	0,73	0,71
Lactose %	4,88	5,01
Cinzas %	0,50	0,68

onde:

a - soro de ricota fresca

b - soro obtido através da ação do coalho no leite.

mos anos, pode-se mencionar: gravimétricos, volumétricos, polarimétricos, enzimáticos e colorimétricos. Por ser um método que necessita de pouco tempo para realizar as determinações,

tenha calibrado o espectrofotômetro, o método colorimétrico da o-Toluidina foi testado na determinação da lactose no soro de queijo, embora anteriormente só tenha sido utilizado para determinar glucose no sangue (17) e lactose no leite (69). A Figura VI apresenta o espectro de absorção na região visível de 400 a 800 nm para a solução de lactose-o-Toluidina. O comprimento de onda de máxima absorção ocorreu aproximadamente a 635 nm com o espectrofotômetro Carl Zeiss, o que concorda com os comprimentos de onda reportados por outros pesquisadores (17, 69). O produto da reação nas concentrações utilizadas obedece à lei de Beer-Lambert (17), a qual estabelece que a absorbância de luz por uma substância, numa espessura determinada e a um comprimento de onda específico, é diretamente proporcional à sua concentração, que está apresentada na curva de calibração padrão a diferentes concentrações da Figura VII.

O cálculo da equação da curva se fez por regressão linear, obtendo-se:

$$\% \text{ de concentração de lactose} = \text{absorbância}/0,116$$

Foi aplicado outro método (51) fazendo determinações simultâneas àquelas feitas pelo método de o-Toluidina, com a finalidade de comparar os resultados obtidos. As determinações da lactose acusaram os valores apresentados nos Quadros II e III.

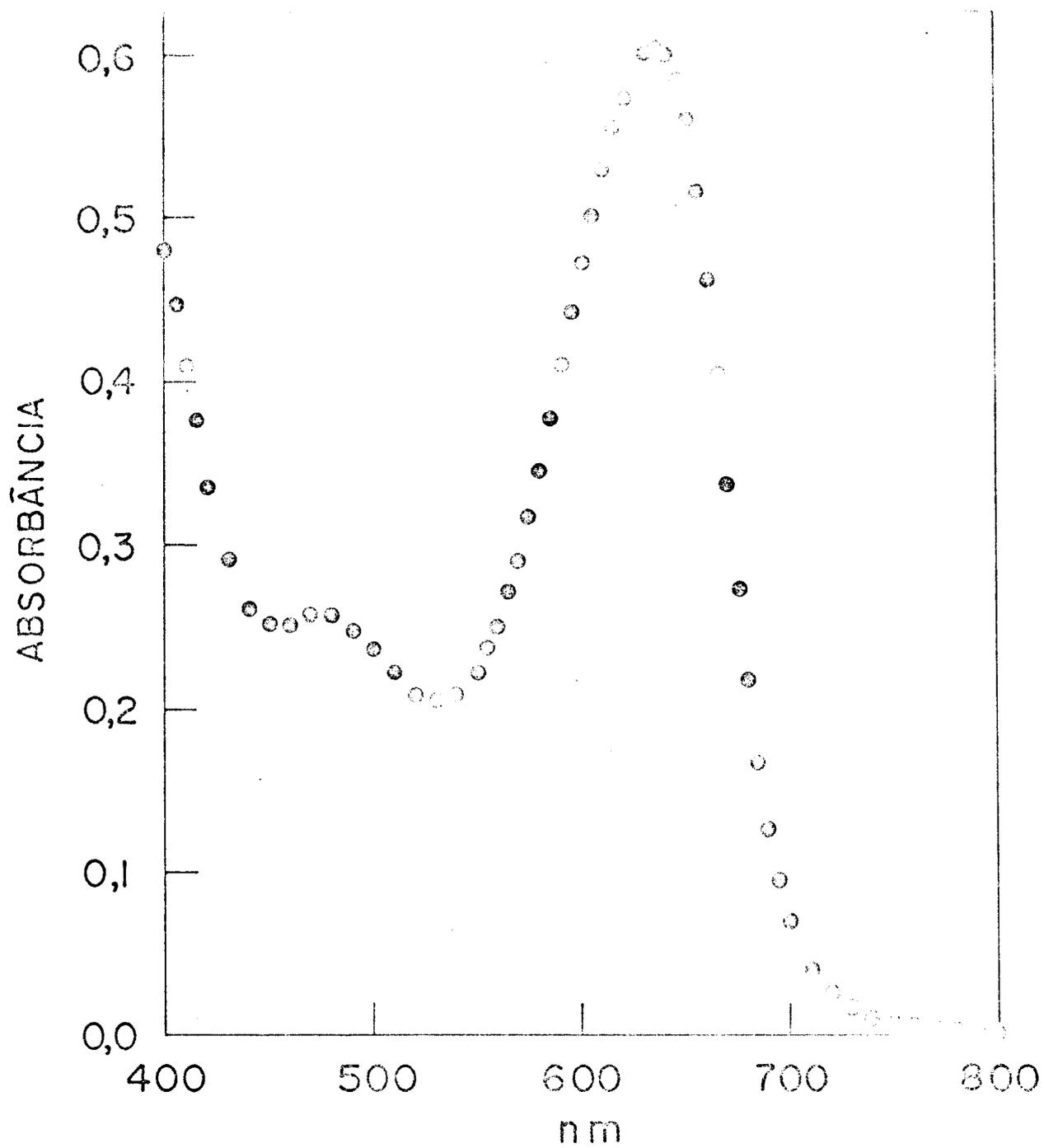


Fig.VI. Determinação do máximo de absorção.

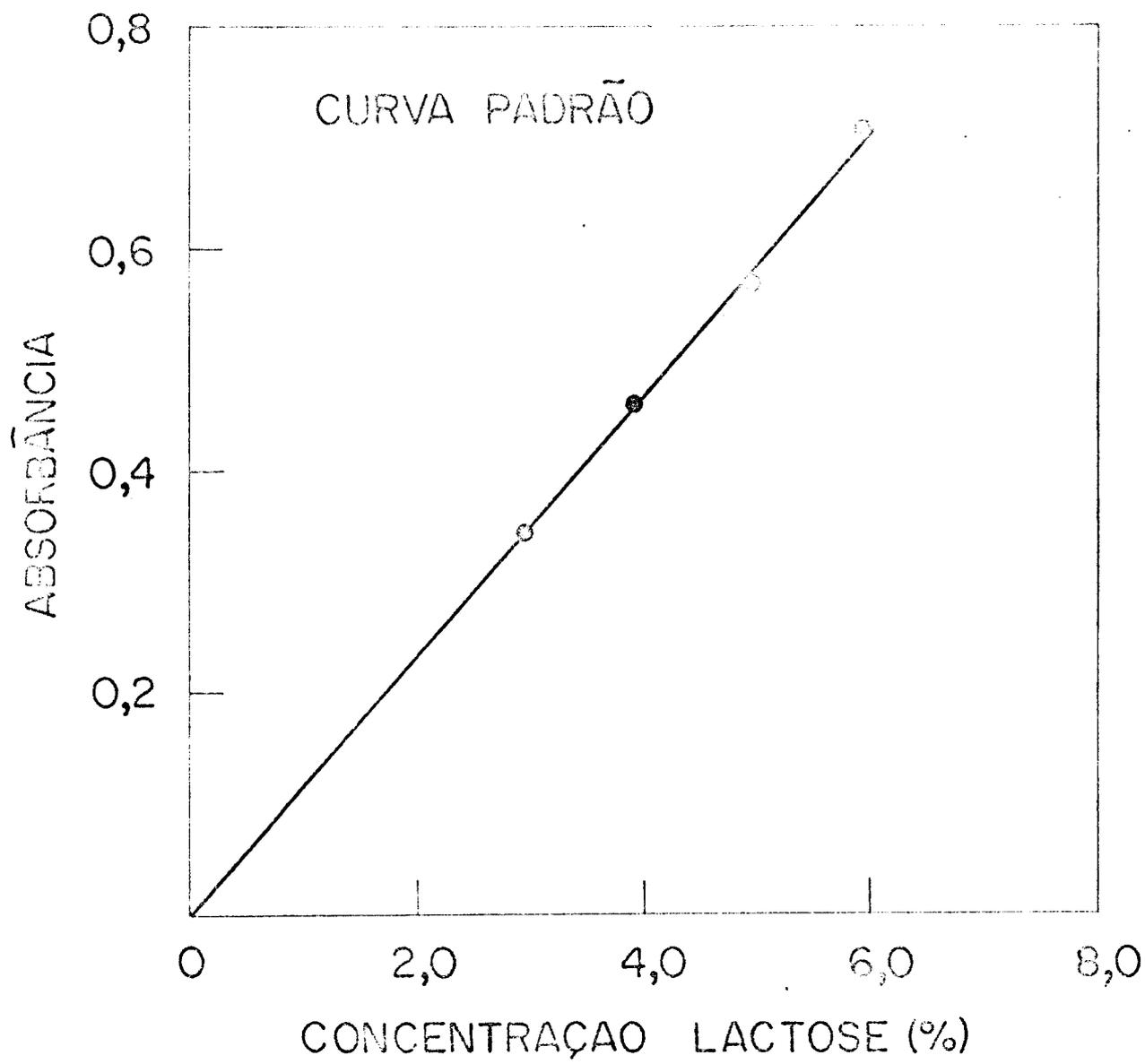


Fig.VII. Relação entre concentração de lactose e absorbância à 635 nm

QUADRO II - Análises da lactose do soro obtido através da ação do coelho no leite.

Repetições	Lactose %	
	Método	
	o-Toluidina	Fehling
2	5,66	5,43
	5,57	5,41
3	5,32	5,22
	5,26	5,21
	5,24	5,20
2	5,28	5,23
	5,36	5,19
3	5,12	4,82
	5,20	4,94
	5,16	4,82
2	5,22	4,88
	5,15	4,86
3	5,00	4,83
	5,18	4,86
	4,94	4,83
3	4,93	4,76
	4,88	4,72
	4,78	4,72
2	4,68	4,46
	4,71	4,46
2	4,86	4,64
	4,86	4,60
3	4,90	4,60
	4,93	4,66
Média	5,09	4,83
Desvio padrão	0,25	0,23
Variação	0,05	0,06

QUADRO III - Análises da lactose do soro de ricota fresca.

Repetições	Lactose %	
	o-Toluidina	Método Fehling
3	5,58	5,48
3	5,53	5,45
3	5,42	5,40
2	5,36	5,36
3	5,33	5,34
2	5,28	5,20
3	5,26	5,12
3	5,24	4,94
2	5,02	4,88
3	4,76	4,80
3	4,52	4,56
Média	5,21	5,14
Desvio padrão	0,32	0,31
Variância	0,06	0,06

### 1.3. Preservação do soro

Os tratamentos preservativos evitam que o produto se estrague, por um período maior, que aquele que seria possível sem o referido tratamento. As principais armas da tecnologia para preservação das matérias-primas alimentícias são: aplicação do frio, enlatamento, desidratação, vácuo, tratamentos térmicos diversos e uso de preservativos. Em laticínios, a pasteurização (tratamento térmico) é prática corrente. O uso de aditivos químicos, em alimentos, é prática muito antiga; o sal e/ou açúcar são usados como preservativos. Tratamentos com  $H_2O_2$  ao leite e soro de queijo têm sido prática recomendável (6), para evitar o incremento da acidez devido à transformação da lactose em ácido láctico.

Foram feitas provas de preservação do soro adicionando 0,01% de  $H_2O_2$  de 70 volumes (68) ou bissulfito de sódio em relação a 0,5% de sólidos séricos (6), usando-se temperaturas de 6 e 12°C. Esta última temperatura foi aplicada considerando - que nas fábricas produtoras de queijo a maioria das câmaras frigoríficas são simples câmaras de maturação de queijos. Os resultados são apresentados na Figura VIII.

### 1.4. Estudo ao microscópio dos cristais de lactose

Para a familiarização com as formas físicas da alfa e beta lactose (24) e assim, poder distinguir a forma do cristal de alfa lactose que se iria obter, julgou-se necessário fazer provas de cristalização. Com este objetivo, preparou-se duas

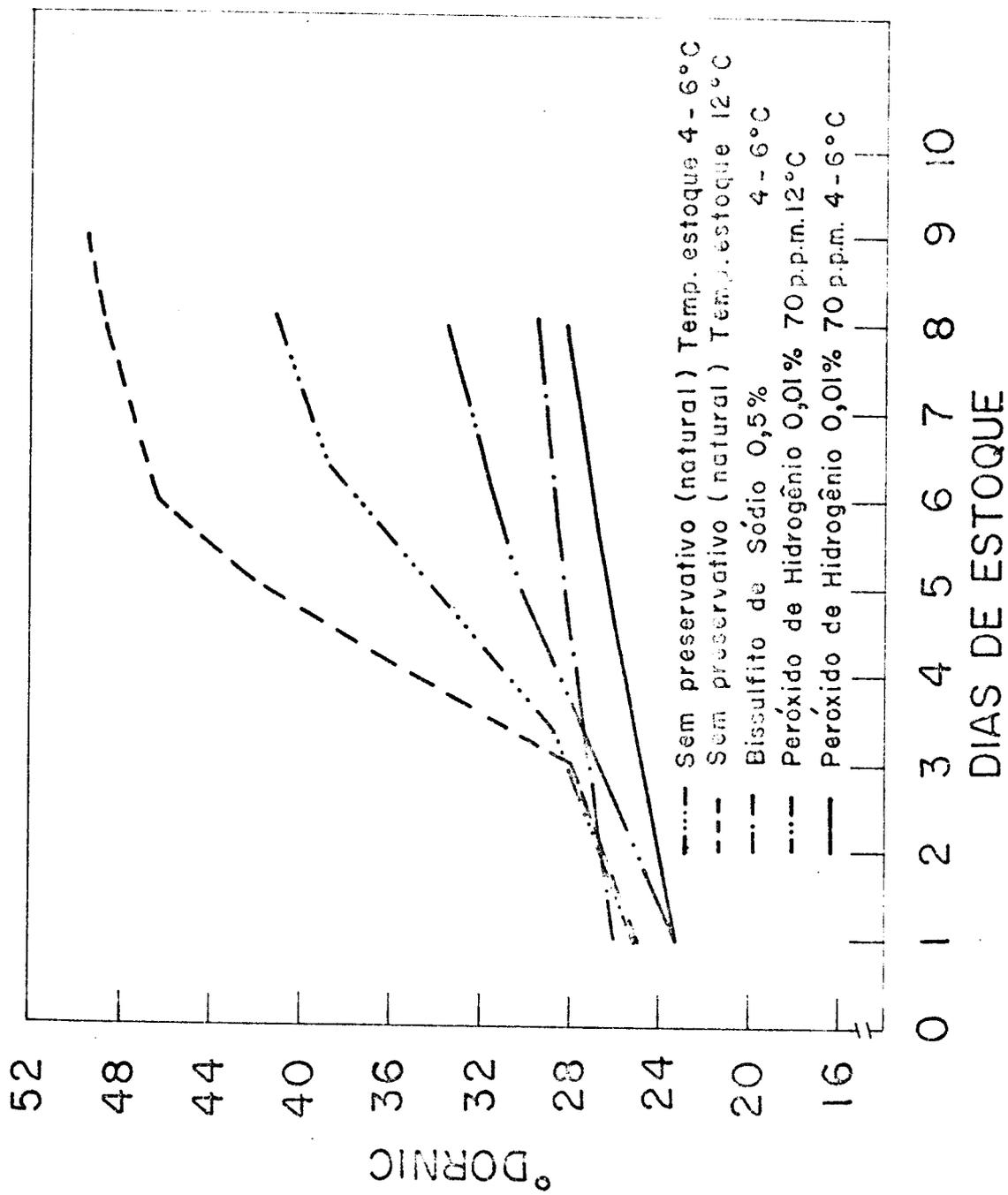
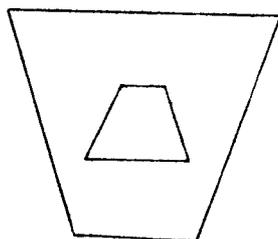


Fig.VI.II. Testes de preservação do soro.

soluções concentradas com alfa-lactose marca "Ciba". A primeira foi aquecida a  $94-95^{\circ}\text{C}$  e evaporada até cristalizar. A segunda, concentrou-se a 60% de sólidos, mas, controlando a temperatura para não ultrapassar os  $93,5^{\circ}\text{C}$  sendo depois, esfriada em geladeira para que cristalizasse. Uma vez formados, os cristais das duas soluções foram separados por filtração, através de papel-filtro, e secos em estufa a vácuo a  $60^{\circ}\text{C}$ . Já secos, colocou-se então, alguns cristais numa placa de vidro que foram observadas ao microscópio. Os cristais da primeira solução cristalizaram na forma beta-lactose e os da segunda, na forma alfa-lactose, concordando com os resultados já publicados (1, 55), indicando ser  $93,5^{\circ}\text{C}$  a temperatura crítica para a obtenção das duas formas de cristais de lactose.

Observou-se também que, alguns cristais mostravam seus núcleos de cristalização de igual conformação que os maiores formados, localizados na parte média dos mesmos e, com seu eixo longitudinal rotado  $180^{\circ}$ . A forma observada nesses casos foi a seguinte:



## 2. Desproteínização do soro

O primeiro passo no processamento do soro de queijo para obtenção da lactose, deve ser aquele que proporcione um soro com o menor número de impurezas possível, isto é, com a menor quantidade de sólidos, exceto a lactose. Um excesso de 0,3% de proteína pode produzir muita espuma, no evaporador, e tornar difícil a cristalização. Uma vantagem no soro de ricota é ser parcialmente desproteínizado, já que esta proteína forma a ricota e, além disso, a maioria dos sais solúveis precipitam junto com a proteína (25, 19, 21). Para realçar este ponto, análises foram feitas no soro de ricota fresco e no soro de ricota desproteínizado e desnatado. Os resultados são mostrados no Quadro IV.

QUADRO IV - Análise do soro de ricota desproteínizado e sem desproteínizar.

Produto	Proteína %	Cinzas %	Lactose %	Umidade %	pH	S.T. %	Peso desp.
Soro de ricota	0,73	0,50	5,02	93,70	5,75	6,30	1,025
Soro de ricota desproteínizado	0,28	0,30	5,18	94,40	4,70	5,60	1,023

Como foi observado no Capítulo II (2.1.1.), existem diversos métodos para separar as proteínas do soro de queijo. Neste trabalho optou-se pela desproteíntização por meio do calor ajustando o pH, para o qual, foram feitos ensaios de desproteíntização a diferentes pHs, mantendo uma temperatura de 93°C por 20 minutos.

A Figura IX mostra que os melhores resultados de desproteíntização foram obtidos a um pH 4,7. Para a realização destas provas, primeiramente o soro foi aquecido a 93°C e depois ajustado o pH desejado, conseguindo assim uma precipitação abundante e um precipitado que se separava facilmente por centrifugação. Testou-se outros processos para comprovar qual deles oferecia maiores proporções de desproteíntização e, encontrou-se que o ácido acético glacial dava melhores resultados, como apresentado no Quadro V.

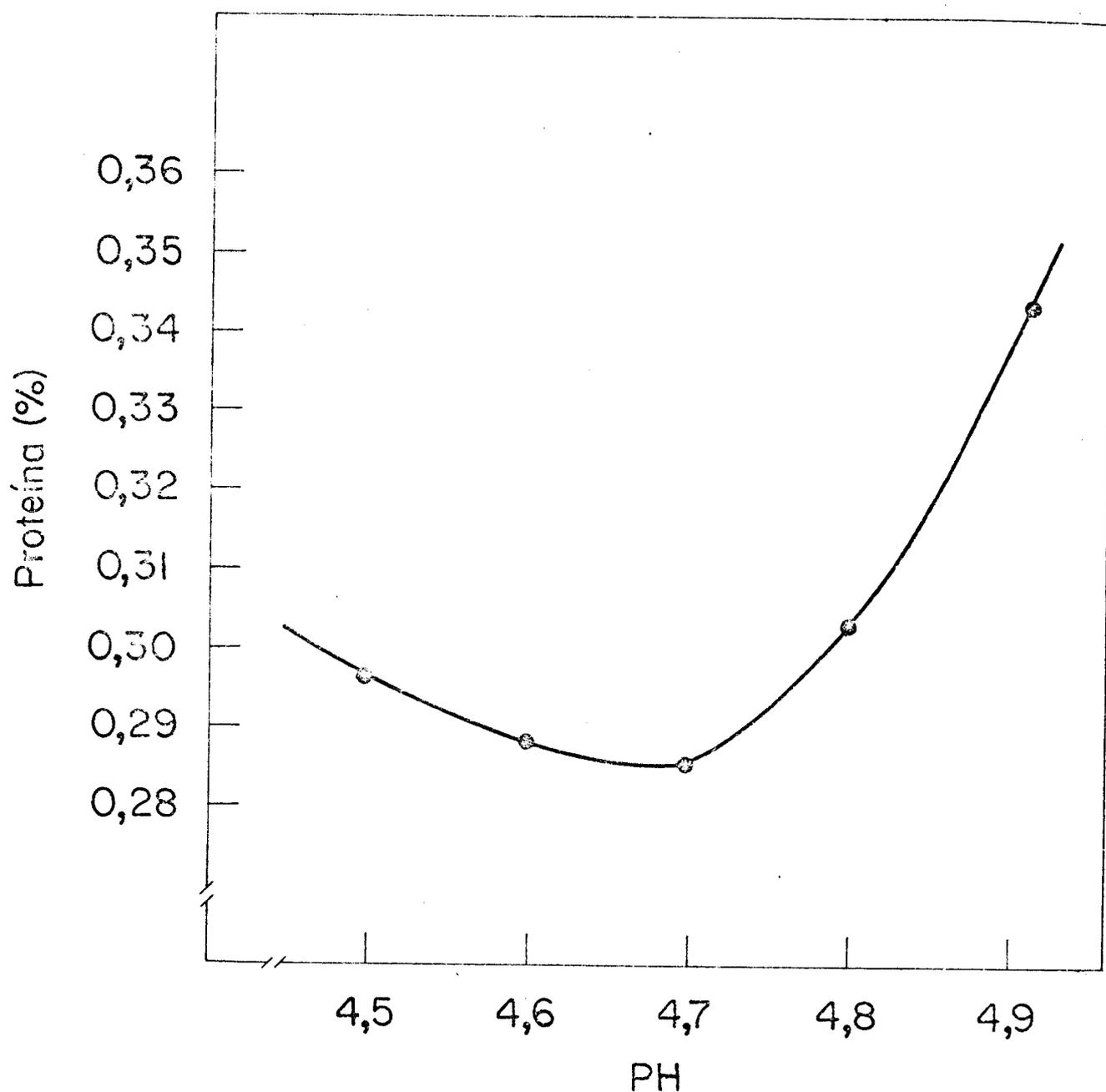


FIG.IX Porcentagem de Proteína residual no soro após a desproteinização a diferentes pHs. (93°C/20min)

QUADRO V - Desproteinização do soro de ricota fresca.

Processo (95°C/20 min)	N %	Proteína %
Ácido acético pH 4,7 + Ca(OH) <sub>2</sub> pH 6,3*	0,039	0,25
Ácido acético pH 4,7	0,044	0,28
Ca(OH) <sub>2</sub> pH 6,3 + ácido acético pH 4,7	0,046	0,29
Ca(OH) <sub>2</sub> pH 6,3	0,046	0,29
AlCl <sub>3</sub> + HCl pH 4,7	0,052	0,33
HCl pH 5,0 + KOH pH 7,0	0,052	0,33
Ácido tânico 0,1% + HCl pH 4,7	0,055	0,35
HCl pH 4,7	0,056	0,36
FeCl <sub>3</sub> pH 4,7	0,057	0,36
AlCl <sub>3</sub> pH 5,4	0,057	0,36
92°C/30 min	0,074	0,47

\* A adição de individuais reagentes foi seguida por separação de proteínas.

Soluções empregadas:

AlCl<sub>3</sub> a 5% (30 ul em 5 l de soro)

FeCl<sub>3</sub> a 30%

Ácido tânico 10%

HCl 50%

KOH 50%

Ácido acético glacial

Ca(OH)<sub>2</sub> 5%

Nos ensaios, onde foram processados lotes de 100 l de soro, notou-se que a agitação lenta e uniforme até o momento de ajustar o pH influiu bastante numa boa precipitação da proteína e, deixando-a repousar depois disto, a sedimentação foi completa. Quando a agitação foi rápida e sem controle, a proteína precipitou-se em grânulos pequenos e só parte dela sedimentou, dando ao soro aparência leitosa. Depois que a proteína precipitou, deixou-se repousar à mesma temperatura de  $93^{\circ}\text{C}$ , por aproximadamente, uma hora, o que ajudava a sua boa sedimentação. Depois o soro foi resfriado rapidamente até  $40^{\circ}\text{C}$  e a parte clarificada - foi separada por sifão. O resto do soro, aproximadamente 8%, com a proteína sedimentada foi jogado fora. Esse método de separação por sifão foi utilizado em virtude de não se dispor de uma centrífuga apropriada ao estudo. Deve-se fazer notar que, quando o soro foi resfriado rapidamente a  $40^{\circ}\text{C}$  logo após a precipitação das proteínas, o tempo de sedimentação foi maior.

### 3. Concentração do soro

Estando o soro desnatado e desproteínizado, foi levado ao evaporador e concentrado a 60-65% de sólidos. Os primeiros ensaios de concentração foram feitos em um evaporador de laboratório "Rotavapor" visando à familiarização com a matéria-prima concentrada, e também fazer cristalizações de lactose, o que resultou em rendimento baixo, cristais pequenos e mal formados devido à defeituosa operação. Os resultados destas provas não foram levados em consideração, por não serem representativos. A seguir, utilizou-se o evaporador centrífugo "Centri-therm" iniciando os ensaios de concentração a nível de planta piloto mas, antes de se conseguir o objetivo, o equipamento apresentou defeitos e o trabalho não foi concluído. Utilizou-se então, o evaporador de "película descendente" mas, este possuía demasiada capacidade. Por último, decidiu-se processar o soro no evaporador "Luwa", onde, do mesmo modo que nos outros evaporadores, teve-se que desmontar, lavar, lubrificar e corrigir alguns problemas que estava apresentando. Nele, chegou-se a concentrar o soro até 70% de sólidos sem ter problemas com a viscosidade, provavelmente devido a seu baixo conteúdo de proteína (56). Foram efetuadas as passagens necessárias até atingir a concentração desejada.

Na Figura X, observa-se um diagrama de fluxo do evaporador "Luwa". As especificações deste equipamento são dadas na Tabela XII e as condições de operação utilizadas no Quadro VI. Estas últimas consideram-se as melhores para este processamento - sendo o resultado de muitas experiências prévias.



TABELA XII - Especificações do evaporador Luwa.

Evaporador Luwa L-82-500-14	
Superfície de aquecimento	0,13 m <sup>2</sup>
Pressão máxima de trabalho	14 atm man/197°C
Pressão de operação	pressão atmosférica até 1 torr ab. de pressão
Força no motor	1,5 HP/1500 rpm
Velocidade do rotor	1000/1500/2000 rpm

QUADRO VI - Condições de operação do evaporador Luwa.

Concentração	5,5-5,8 a 60-65% sólidos totais
Alimentação do soro	60-70 l/h
Vácuo no sistema	130-160 torr ab.
Pressão do vapor usado	735 mm Hg man
Temperatura de evaporação	60°C máxima
Temperatura da água de condensação	20-22°C
Capacidade de evaporação	25 kg/h máxima
Velocidade do rotor	1000 rpm

#### 4. Cristalização da lactose

Retirando o soro concentrado a 60% de sólidos e a uma temperatura de 60°C à saída do evaporador, iniciou-se de imediato a cristalização. Esta foi feita de duas maneiras: a) "livre" e b) com controle de temperatura. No primeiro caso, colocou-se a solução concentrada num recipiente de vidro e deixou-se à temperatura ambiente durante 6 h (a temperatura final foi de 30°C) e, os cristais foram sendo removidos a cada hora, aproximadamente. No segundo processo, a cristalização efetuou-se em duas etapas: na primeira, um recipiente de aço inox, aproximadamente de base duas vezes maior que a altura, contendo o soro concentrado foi levado a um banho de água gelada, a fim de resfriar o produto até 30-31°C e, simultaneamente foi agitado por um agitador regulado a 60 rpm. Essa temperatura de 30°C foi escolhida por ser a melhor, na qual a beta-lactose, pela mutarrotação, é convertida em alfa-lactose (25), ocorrendo também uma cristalização abundante de pequenos cristais menores de 0,3 mm. Na segunda etapa do processo, o concentrado foi resfriado de forma gradativa até 15°C (3,0°C/h) e com agitação lenta de 16 rpm, cuja finalidade era manter os cristais em suspensão e induzir seu crescimento, estando numa solução super-saturada. O resfriamento, na cristalização, foi efetuado como se pode observar no Quadro VII.

QUADRO VII - Tempo e temperatura na cristalização da lactose.

Horas	°C
0	60
0,2	30-31
1	30
2	27
3	24
4	21
5	18
6	15

Quando a solução concentrada foi resfriada rapidamente a 15°C, a lactose cristalizava em cristais muito pequenos e com formas não bem definidas, defíceis de centrifugar e lavar, por formar uma massa que tampava os poros da malha da centrífuga. - Quando altas velocidades de agitação (> 300 rpm) foram utilizadas, a cristalização foi parcialmente inibida. Nas duas formas de cristalização efetuadas, observou-se a formação de cristais abundantes, de até 0,3 mm.

### 5. Separação e lavagem dos cristais de lactose

Ao término da cristalização, a mistura de cristais e água mãe, foi colocada numa centrífuga de cesto, adaptada de uma máquina de lavar roupa e provida de uma malha de nylon de 100 mesh. Provou-se também malhas de 70 e 80 mesh, as quais foram abandonadas por permitirem a passagem dos cristais menores. Centrifugou-se então, separadamente, os produtos obtidos nas duas formas de cristalização: livre e controlada, ficando os cristais com uma coloração amarelada. Os resultados das análises efetuadas nos cristais, de três cristalizações, estão resumidos no Quadro VIII.

QUADRO VIII - Análises feitas à lactose Bruta obtida.

Análises	Cristalização	
	Livre	Controlada
Umidade na saída da centrífuga %	20,00	18,00
Umidade após a secagem %	0,64	0,35
Proteína %	2,25	2,44
Cinzas %	2,18	2,25
Sólidos na água mãe %	34,00	32,00
Rendimento % (em base seca)	70,30	76,90

Nas duas formas de cristalização, o conteúdo de proteína e sais foi acima do normal, devido à contaminação dada pela presença de grande quantidade de água mãe nos cristais, à saída da centrífuga. Mediu-se as rotações da centrífuga por meio de uma lâmpada estroboscópica e foi observado que tinha 300 rpm aproximadamente, e as quais pensou-se, eram poucas para separar a água mãe. Depois de aumentar o número de rotações a 700 rpm, foram efetuadas outras duas provas de separação da lactose cristalizada com temperatura controlada e, assim, obteve-se melhores resultados, onde a umidade foi de aproximadamente 12%. Esta lactose foi então centrifugada com o objetivo de retirar o máximo de água mãe possível, a qual, foi eliminada por conter a maioria dos compostos solúveis indesejáveis, tais como: proteínas e sais minerais. Centrifugou-se novamente os cristais in troduzindo água resfriada a 15°C, através de uma mangueira de borracha, que foi pressionada em sua extremidade, visando que a água saísse em forma de chuva, até que os cristais apresentassem uma coloração branca e, a água de lavagem amarela-clara. - Continuou-se a centrifugação até sair o máximo de água. Com respeito ao rendimento, comprovou-se que a cristalização controlada apresentava a maior porcentagem.

A lactose foi colocada em peneiras de nylon, dentro de um secador de túnel com corrente de ar aquecido a 80-85°C por meio de resistências elétricas até que a umidade não ultrapassasse 0,5%. A esta lactose, denominou-se lactose "Bruta". Fez-se um cálculo da relação peso de água/peso de cristais lavados e, determinou-se o conteúdo de proteínas e cinzas. Os resultados estão nas Figuras XI e XII.

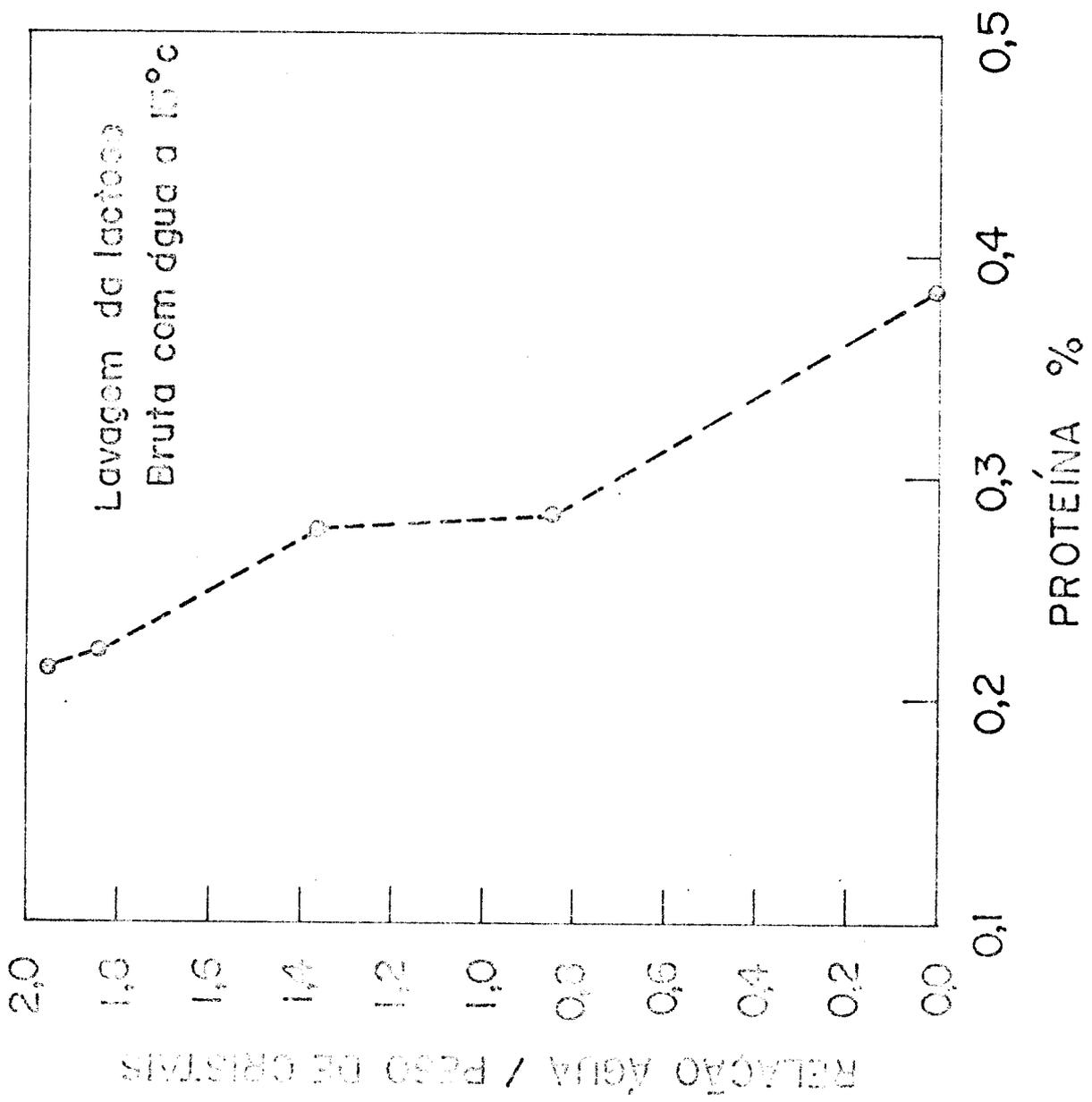


FIG.XI: Lavagem da lactose Bruta em função da porcentagem de proteína.

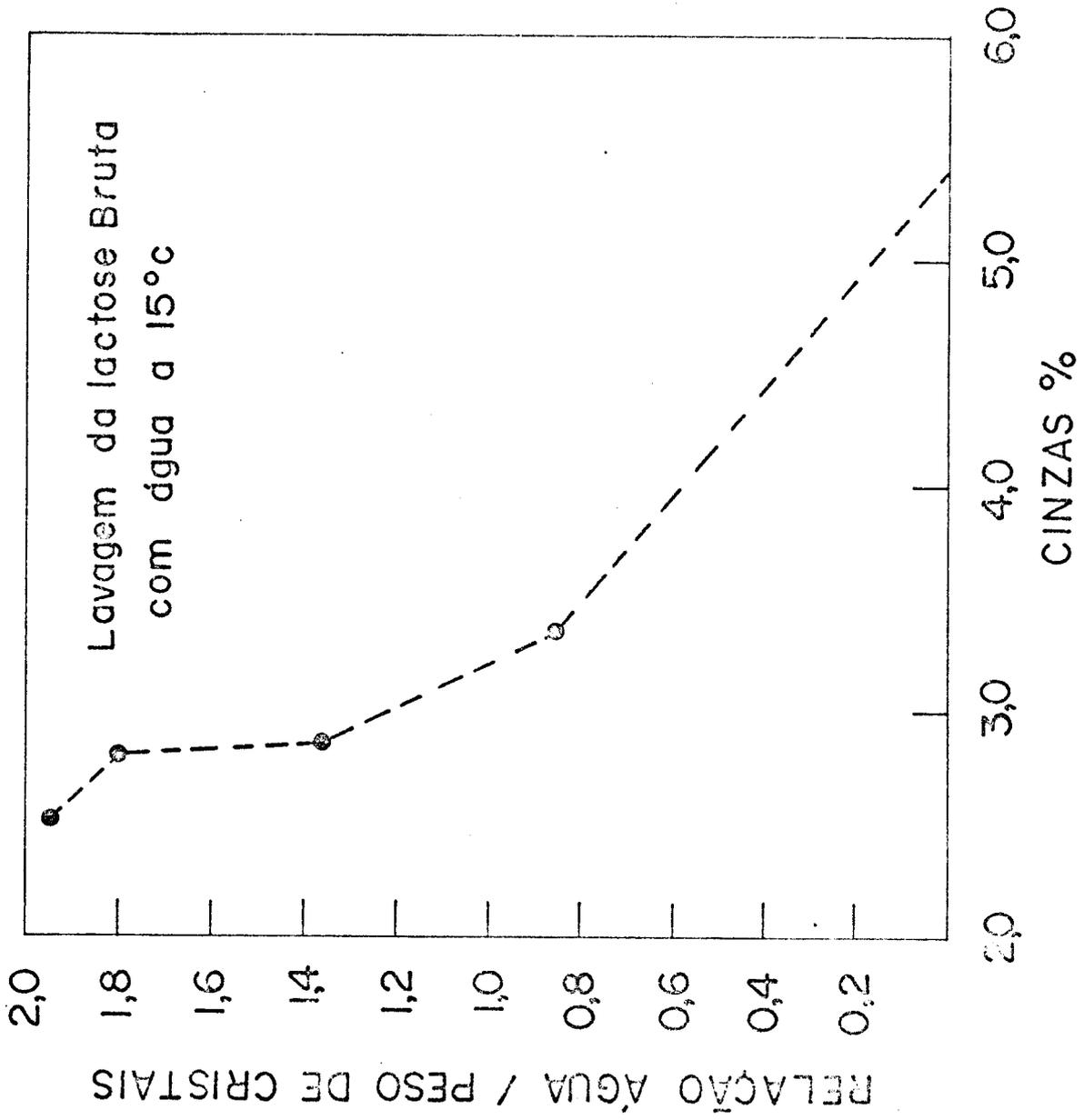


FIG.XII. Lavagem da lactose Bruta em função da porcentagem de cinzas.

Segundo as Figuras anteriores, pode-se notar que os melhores resultados de lavagem foram obtidos na relação de 1,5 kg água/kg de cristais de lactose. Visando evitar perdas por dissolução dos cristais de lactose, além da lavagem a 15°C, foi testada a utilização de água a 4°C e os rendimentos obtidos foram, respectivamente: 76,9% e 78,8%.

## 6. Recristalização da lactose

Como a finalidade era obter uma lactose Refinada, a lactose Bruta foi dissolvida até 60% de sólidos em água destilada, e um tanque de aço inox e aquecida 60-70°C. Estas são as condições de saída do evaporador facilitando assim a recristalização em termos de escala de equipamento. Agregou-se 3% de carvão ativo, com o objetivo de retirar a matéria corante. Em seguida, aqueceu-se a 90°C (aproximadamente 30 min) até que a lactose fôsse totalmente dissolvida, mantendo uma agitação contínua. Nessa temperatura a solução foi passada através de um filtro "Funda filter" onde havia sido colocada, previamente, uma solução de terra de diatomácea (Hy-flo), com o objetivo de retirar o carvão ativo e as impurezas. A solução ligeiramente amarelada, foi cristalizada da mesma forma anterior. Os cristais lavados com 1,0 kg de água/kg de lactose e secos no secador de túnel, até que a umidade não ultrapassasse 0,2%. Desse modo, obteve-se uma lactose refinada, branca e pura, apresentando um rendimento global de 62,3% sobre a lactose inicial no soro.

## 7. Análise da lactose obtida

Esta lactose foi comparada com cristais de lactose nacional e importados como mostra o Quadro IX, onde, a lactose UNICAMP foi o produto por nós obtido.

QUADRO IX - Análises feitas à lactose Refinada obtida.

Lactose	Unidade %	Proteína %	Cinzas %	Lactose (por diferença) %	Cor
1. Americana	0,09	0,17	-	99,74	branca
2. Holandesa	0,14	0,22	-	99,64	branca
3. Brasileira	0,12	0,22	0,07	99,59	menos branca que 1,2 e
4. UNICAMP	0,16	0,21	0,03	99,60	mais branca que 1,2 e

Por meio do Teste de Ordenação decrescente da cor branca (Ranking Test) com 10 observadores e 2 repetições, demonstrou-se que a amostra UNICAMP foi a mais branca das quatro, num nível de significância de 1% e a amostra brasileira foi a menos branca a esse mesmo nível. As amostras Holanda e Americana não diferiram entre si. Esta análise foi efetuada no Laboratório de Análises Sensoriais da FEAA.

FIGURA XIII - Micrografia de cristais de lactose, 600 X.



V. CONCLUSÕES

1. O processo proposto conseguiu produzir lactose de boa quali  
dade comparável à importada e melhor que a nacional.
2. O processo desenvolvido obteve rendimento, em produto final,  
maior que os comentados pela bibliografia.
3. O equipamento que poderá ser utilizado é de característica  
simples e de fácil fabricação.
4. A produção potencial de lactose supera comodamente as ci-  
fras atuais de importação do produto, levando-se em conta, a  
produção queijeira nacional.
5. Apesar deste trabalho sô ter como objetivo a recuperação da  
lactose, é coerente a sua utilização simultânea para separa  
ção e aproveitamento das proteínas solúveis contidas no so-  
ro.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. ALAIS, C. Ciencia de la leche, Cap. 4. Principios de Técnica Lechera. Barcelona, Compañía Editorial Continental, S.A., 1971.
2. ALMEIDA, L.E.de Proteínas do soro na fabricação de queijo Minas. Tese de Mestrado. UNICAMP, Campinas, S.P., 1978.
3. A.O.A.C. Official Methods of Analysis. Washington, Association of Official Agricultural Chemists. 1975.
4. ASH, D.J. Research on lactose indicates uses; limitations as a substitute for sucrose in bakery goods. Food Prod. Develop. 10(6): 85-88, 1976.
5. BORRÁS, G.A. Como comer y beber la leche, Cap. 3. Madrid, Comité Nacional Lechero. 1968.
6. BRIKMAN, G.E. New ideas for the utilization of lactose; - principles of lactose manufacture. J. of the Soc. Dairy Techn. 29(2): 101-107, 1976.
7. BURKEY, L.A. and WALTER, H.E. Isolation of whey protein and their conversion into food products. J. Dairy Sci. - 29 (8): 503-504, 1946.
8. BYLUND, G. Tratamento e utilização do soro. Revista do Inst. de Latic. C. Tostes. 30 (179): 29-43, 1975.

9. CALL, O.A. Utilization of lactose. J. Dairy Sci. 41: -  
332-334, 1958.
10. CAMPILLO, S.C. Elaboração e processamento de proteína de  
sêro de queijo fortificado com Fe. Tese de Mestrado.  
UNICAMP, Campinas, S.P., 1978.
11. CASALIS, J. Consideraciones sobre la utilización del  
lactosuero en la industria de la alimentación. Revista  
Española de Lecheria. 94: 221-223, 1974.
12. CERBULIS, J.; WOYCHIK, H.J. and WONDOLOWSKI, V.M. Composi-  
tion of comercial wheys. J. Agr. Food Chem. 20 (5): -  
1057-1059, 1972.
13. COX, C.A. Whey powder. Food Processing Industry. 11: 49  
-51, 1973.
14. CRAIG, T.W. and COLMEY, J.C. Milk and milk products for  
use in bakery products. Bakers Digest. 45 (1): 36- 39,  
1971. Citado em: Food Sci. and Tech. Abst. 3 (8): 8M994,  
1971.
15. DOMOOS, K.B. and FREUND, H.E. Methanol-soluble complexes  
of lactose and other carbohydrates. J. Dairy Sci. 43  
(9): 1216-1223, 1960.
16. DRABENT, Z. and ZOLTOWSKI, M. Deproteinization of whey  
with iron salt in lactose manufacture. Zesz. Nauk. Wyższ.  
Szk. Roln. Olsztyn. 21 (1): 65-71, 1966. Citado em: -

Dairy Sci. Abst. 20, 930, 1967.

17. DUBOWSKI, M.K. An o-Toluidine method for body-fluid glucose determination. *Clinical Chemistry*, 8 (3): 215-235, - 1962.
18. FOSTER, E.M.; NELSON, F.E.; SPECK, M.L.; DOETSCH, R.N. and OLSON, J.C. Dairy plant waste disposal and utilization of by-products. Cap. 15. In: *Dairy Microbiology*. Englewood Cliffs, Prentice - Hall, Inc., 1957.
19. FOX, K.K. Casein and whey protein. Em: WEBB, B.H. and WHITTIER, E.O., ed. — *By-products from milk*. Westport, The Avi Publishing Co. Inc., 1970.
20. GÉNIN, G. L'utilisation du sérum de fromagerie dans production des levures. *Le Lait*. 35: 421-422, 1963.
21. GORDON, G.W. and KALAN, B.E. Proteins of milk. Em: WEBB, B.H. ; JOHNSON, H.A. and ALFORD, A.J., ed. — *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Westport, The Avi Publishing Co. Inc. 1974.
22. GUILLIES, M.T. Proprietary processes for treating whey. - Pag. 55. Em: *Whey processing and utilization*. Park - Ridge, Noyes Data Corp., 1974.
23. HAASE, G. and NICKERSON, T.A. Kinetics reactions of alpha and beta lactose. I. Mutarrotation. *J. Dairy Sci.* 49 (2): 127-132, 1966.

24. HAASE, G. and NICKERSON, T.A. Kinetics reactions of alpha and beta lactose. II. Crystallization. J. Dairy Sci. 49 (7): 757-761, 1966.
25. HARWALKAR, V.R. and EMMONS, D.B. Low-ash lactalbumin as a by-products of lactose production. Can. Inst. Food Tech., 2 (1): 9-11, 1969.
26. HOLSINGER, V.H. New dairy products for use in candy manufacture. Manufacturing Confectioner. 56 (1): 25-28, - 1976. Citado em: Food Sci. and Tech. Abst. 8 (9): 9L688, 1976.
27. HORTON, S.B.; GOLDSMITH, L.R. and ZALL. R.R. Membrane processing of cheese whey comercial scale. Food Tech. 2: 30-35, 1972.
28. JELEN, P. and COULTER, T.S. Effects of supersaturation - and temperatura on the growth of lactose crystals. J. Food Sci. 38 (7): 1182-1185, 1973.
29. JELEN, P. and JADHAV, S.J. Color improvement of french-fried potatoes using lactose or cheese whey. J. Food Sci. 39 (6): 1269-1270, 1974.
30. JONAS, J.J. Utilization of dairy ingredients in other - foods. J. Milk and Food Tech. 36 (6): 323-331, 1973.
31. KASTENS, L.M. and BALDAUSKI, A.F. Chemicals from milk. - Ind. and Eng. Chem. 44 (6): 1257-1267, 1952.

32. KEYKAVOUS, N. The use of whey proteins as eggs substitute. The Milk Industry. 80 (4): 4-6, 1978.
33. KNIPSCHILDT, M.E. Utilization of whey. To avoid pollution and recover a valuable food product. American Dairy Review. 7: 52b-52f, 1977.
34. KOSIKOWSKI, F. Cheese and fermented milk foods, Cap. 16 : Michigan, Edwards Brotherds, Inc., 1970.
35. KOVALENKO, M.S. and KHRAMTSOV, A.G. Purification of whey to remove protein in lactose manufacture. Moloch. Prom. 28 (5): 25-27, 1967. Citado em: Dairy Sci. Abst. 29;3022.
36. LAMPERT, L.M. Lactose, Cap. 4. Em: Modern Dairy Products. New York, Chemical Publishing Company, 1975.
37. LANG, F. and LANG, A. New development in whey processing and use. The Milk Ind. 80 (3): 7-10, 1978.
38. LARSON, L.B. and ROLLERI, D.G. Heat denaturation of the specific serum protein in milk. J. Dairy Sci. 38 (4): - 351-360, 1975.
39. LEES, R. Food analysis: Analytical quality control methods for the food manufacturer and buyer. London, Leonard Hill Books, 1975.
40. LEVITON, A. Methanol extraction of lactose and soluble proteins from skim milk power. Ind. Eng. Chem. 41 (7): 1351 -1357, 1949.

41. LONTIE, R. La lactosa de la leche. Revista Española de Lecheria. 92: 81-97, 1974.
42. MAJD, F. and NICKERSON, T.A. Effect of alcohols on lactose solubility. J. Dairy Sci. 60 (10): 1544-1549, 1977.
43. MARSHAL, R.J.; SHORT, L.J. and DOUGHTY, K.R. The use of cation exchange in the production of traditional lactoalbumin from cheddar cheese whey. N.Z.J. Dairy Sci. - Tech. 11: 69-70, 1976.
44. MAUBOIS, L.J. and KOSIKOWSKI, V.F. Making ricotta cheese by ultrafiltration. J. Dairy Sci. 61 (7): 881-884, - 1978.
45. MC CORMICK, D.R. A nutritious alternative for the lactose-intolerant consumer. Food Product Development. 10 (5): 17-18, 1976.
46. MELACHOURIS, P.N. and TUCKEY, L.S. Denaturation of whey protein in milk heated at high temperatures for short time. J. Dairy Sci. 49 (9): 1154-1156, 1966.
47. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DO BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.
48. MODLER, W.H. and EMMONS, B.D. Properties of whey protein concentrate prepared by heating under acidic conditions. J. Dairy Sci. 60 (2): 177-183, 1972.

49. MOORE, K. Whey. Pardon me, you're in my whey. Food Product Development. 12 (1): 30-38, 1978.
50. MORETTI, R.H. Contribuição ao desenvolvimento de uma mistura proteica solúvel em pH ácido para crianças em idade escolar. Tese de Livre Docência. UNICAMP, Campinas, S.P., 1976.
51. MORETTI, R.H. Contribuição ao estudo do fracionamento de soro de queijo por ultrafiltração. Tese de Doutorado. FEAA-UNICAMP, Campinas, S.P., 1973.
52. MOSKOWITZ, R.H. and TOSCANO, A.V. Sweetness measurement and the economics of sweetener mixtures. Food Prod. Develop. 9 (6): 34-42, 1975.
53. NG, C.W.; BRUNER, J.R. and RHEE, K.C. Proteose-peptone fraction of bovine milk: Lactum serum component 3 - A whey glycoprotein. J. Dairy Sci. 53 (8): 987-998, 1970.
54. NICKERSON, T.A. Adsorption of diacetyl by lactose and other sugars. J. Dairy Sci. 54 (8): 1212-1214, 1971.
55. NICKERSON, T.A. Lactose, Cap. 6. Em: WEBB, B.H.; JOHNSON, H.A. and ALFORD, A.J., ed. Fundamentals of Dairy Chemistry. Westport, The Avi Publishing Co. Inc., 1976.
56. NICKERSON, T.A. Lactose, Cap. 12. Em: WEBB, B.H. and WHITTIER, E.O., ed. By-products from milk. Westport, The Avi Publishing Co. Inc., 1970.

57. NICKERSON, T.A. Symposium: use of milk derivatives in other foods. J. Dairy Sci. 59 (3): 531-587, 1976.
58. NICKERSON, T.A. and LIM, S.G. Effect of various alcohols on lactose J. Dairy Sci. 57 (11): 1320-1324, 1974.
59. NICKERSON, T.A. and MOORE, E.E. Factors influencing lactose crystallization. J. Dairy Sci. 57 (11): 1315-1319 1974.
60. NICKERSON, T.A. and MOORE, E.E. Alpha lactose and crystallization rate. J. Dairy Sci. 57 (2): 160-164, 1973.
61. NIELSEN, V.H. Whey utilization. American Dairy Review. 38 (9): 56-58, 1976.
62. PIEN, J. Étude de la récupération des proteines dans le serum de fromagerie. La Technique Laitière. 884: 17, 1976.
63. PIEN, J. Étude de la récupération des proteines dans le serum de fromagerie. La Technique Laitière. 887: 17, 1976.
64. PONCE-GOMEZ, L.A. and HERRERA, P.R. Cristalización de lactosa en suero de leche. Tecnología de Alimentos. México. 10 (3): 107-111, 1975.
65. RACOTTA, V. and RODRIGUEZ-ZENDEJAS, A.C. Recuperación de sueros de quesos coagulados con renina en forma de alimentos para niños (palestra). Tecnología de Alimentos. Mé

- xico. 10 (3): 113-114, 1975.
66. RAMOS, C.M. Lactosa, Cap. 13. Em: Leche, su producción - higiênica y control sanitario. México, Asociación Nacional de Productores de Leche Pura, 1969.
67. RETTI, C.; SGHEDONI, A. and PEIXOTO, S.G. Fabricação de ricota fresca. Revista do Inst. de Laticínios C. Tostes 33 (196): 33-34, 1978.
68. REYNA, R.D. Comunicação Pessoal. UNICAMP. 1978.
69. REYNA, R.D.; SBODIO, O.; CASTELAO, E.; BACCHETTA, R. and PERIN, O. Suero de quesería. Determinación de parámetros fisico-químicos. Rev. del Inst. de Tec. de Alimentos de la Univ. Nal. del Litoral. Argentina, Sept-Nov. 129-148, 1976.
70. ROBE, K. Expands whey ultrafiltration plant to . . . 600.000.000 lb/yr. capacity. Food Processing 6: 67, 1976.
71. ROBINSON, B.P.; SHORT, J.L. and MARSHALL, K.R. Traditional lactalbumin. Manufacture, properties and uses. N.Z.J. Dairy Tech. 11: 114-126, 1976.
72. SATO, J. Japanese Patent 21 615/70. Citada em: Food Sci. and Tech. Abst. 3 (5): M611, 1971.
73. SPREER, E. Lactosa, Cap. 10. Em: Lactología Industrial. Zaragoza, Editorial Acribia, 1973.

74. THURKLE, R.J. and MURRAY, R.J. Milk production on whey feeding to dairy cattle. *The Australian J. Dairy Tech.* 32 (3): 101-102, 1977.
75. THURLBY, J.A. Crystallization kinetics of alpha lactose. *J. Food Sci.* 41 (2): 38-42, 1976.
76. THURLBY, J.A. and SITNAI, O. Lactose crystallization investigation of some process alternatives. *J. Food Sci.* 41 (2): 43-47, 1976.
77. TUMERMAN, F.H. and CORNELLY, W.K. The effect of lactose crystallization on protein stability in frozen concentrated milk. *J. Dairy Sci.* 37 (7): 830-839, 1954.
78. TWEEDIE, L.S.; MACBEAN, R.D. and NICKERSON, T.A. Present and potential uses for lactose derivatives. *Food Tech. in Australia.* 30 (2): 57-62, 1978.
79. TWIEG, W.C. and NICKERSON, T.A. Kinetics of lactose crystallization. *J. Dairy Sci.* 51 (11): 1720-1724, 1968.
80. VALLE-VEGA, P.; NICKERSON, T.A.; MOORE, E.E. and CONZENBACH M. Variability of growth of lactose crystals under commercial treatment. *J. Dairy Sci.* 60 (10): 1544-1549 1977.
81. VAN KREVEL, A. and MICHAELIS, A.S. Measurement of crystal growth of alpha lactose. *J. Dairy Sci.* 48 (3): 259-265, 1965.

82. VEISSEYRE, R. Lactosa, Cap. 2. Em: Lactologia Técnica. Zaragoza, Editorial Acribia, 1972.
83. WEISBERG, S.M. Recent progress in the manufacture and use of lactose: a review. J. Dairy Sci. 37 (9): 1106-1115, 1954.
84. WELCH, D. New uses of lactose in food manufacture. Food Tech. Australian. 17: 318-321, 1965.