

**EFEITO DA NUCLEAÇÃO SECUNDÁRIA
SOBRE A CRISTALIZAÇÃO DO DOCE DE
LEITE**

ÍTALO TULER PERRONE

2006

ÍTALO TULER PERRONE

**EFEITO DA NUCLEAÇÃO SECUNDÁRIA
SOBRE A CRISTALIZAÇÃO DO DOCE DE
LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora
Profa. Dra. Fabiana Queiroz Ferrua

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Perrone, Ítalo Tuler

Efeito da nucleação secundária sobre a cristalização do doce de leite / Ítalo
Tuler Perrone. -- Lavras : UFLA, 2006.
49 p. : il.

Orientadora: Fabiana Queiroz Ferrua.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Cristalização. 2. Lactose. 3. Doce de leite e soro. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-641.853

ÍTALO TULER PERRONE

**EFEITO DA NUCLEAÇÃO SECUNDÁRIA
SOBRE A CRISTALIZAÇÃO DO DOCE DE
LEITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva

EPAMIG

Prof. Dr. Fernando Antônio Resplande Magalhães

EPAMIG

Profª. Dra. Fabiana Queiroz Ferrua

UFLA
(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Dedico à minha família e a Ana Carolina.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realizar o mestrado, pela acolhida e pelo apoio ao projeto.

Ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes, por ser o alicerce dos meus conhecimentos laticinistas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Queiroz Ferrua, pelo apoio, ensinamentos, dedicação e honrosa orientação.

Ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu, pelos inúmeros ensinamentos e pela privilegiada amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela distinta amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando Magalhães, pelos ensinamentos estatísticos e pelo empenho ao trabalho.

À Profa. MS Danielli Chelini Braga, pela dedicação e apoio, fundamentais para a realização do experimento.

Ao Prof. Jansen Kelis, pela honrosa e duradoura amizade.

Ao Prof. Rodrigo Stephani, pelas inúmeras polêmicas e grande amizade.

A Profa. Eloá Corrêa, pela garra, apoio e pelas lições de vida.

Ao Prof. José Luis, pela empolgação, dedicação, apoio e pelas discussões sobre microscopia e física que possibilitaram a realização do trabalho.

A Verônica Teixeira, pelo empenho, dedicação e apoio ao experimento.

As colegas de laboratório Márcia e Alcy, pela inestimável colaboração na realização das análises.

Ao MS Éric Batista, pelas discussões estatísticas e pela grande contribuição para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Furtado, pelo estímulo e apoio ao trabalho.

Ao Prof. MS Ronaldo Ventura, pelo incentivo e pelas idéias.

Ao amigo Alison, pelos momentos de convivência e amizade.

Aos alunos do curso Técnico em Leite e Derivados, Raphael, Mollise, Pollyana, Simone, Livia e Raquel, pela grande ajuda prestada durante as fabricações e as análises.

À bibliotecária e amiga Raquel, pela paciência e apoio na realização das pesquisas bibliográficas.

À Dona Graça, pela ajuda e paciência durante a realização do trabalho.

Aos professores e funcionários do DCA/UFLA, pelo convívio e apreço.

Aos funcionários e professores do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, pela amizade e pelas contribuições ao trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Ao amigo Jean Faber, pelas contribuições filosóficas, quânticas, físicas e metafísicas à realização do trabalho.

Aos meus pais, pelo carinho, apoio e dedicação sem medidas.

Ao meu irmão Bruno, pelo respeito, amizade e carinho.

À minha querida Ana Carolina, pela cumplicidade e pelo amor.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Características da lactose.....	3
2.2 Características do doce de leite.....	10
2.3 Cristalização em doce de leite.....	14
2.4 Nucleação secundária.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Fabricações do doce de leite.....	23
3.2 Métodos analíticos	26
3.3 Análise estatística dos resultados.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Testes preliminares.....	29
4.2 Análise dos resultados do doce de nucleação primária.....	30
4.3 Tamanho dos cristais de lactose em doce de nucleação secundária.....	35
5 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

RESUMO

PERRONE, Ítalo Tuler. Efeito da nucleação secundária sobre a cristalização do doce de leite. Lavras: UFLA, 2006. 49p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos)¹

O intuito desta investigação foi estudar a cristalização da lactose em doce de leite, empregando soro e nucleação secundária no processo de fabricação. Este experimento foi realizado no Instituto de Laticínios Cândido Tostes EPAMIG, localizado em Juiz de Fora, no estado de Minas Gerais. Envolveu dois tratamentos, com e sem a semeadura de microcristais de lactose. Os ingredientes empregados na elaboração do doce de leite foram concentrados em tacho aberto com agitação mecânica até 70 % de sólidos totais. O produto foi resfriado a 65°C e realizada a semeadura com microcristais de lactose, para prevenir arenosidade durante a vida de prateleira. Para entender o efeito da nucleação secundária, o crescimento e o tamanho dos cristais foram determinados e calculados com o auxílio de um microscópio. Testes preliminares indicaram que a adição de amido na tecnologia inibiu a formação de cristais, impossibilitando a nucleação secundária. Cristais de lactose com tamanho superior a 180 μm foram detectados no doce de leite obtido sem nucleação secundária após 30 dias de estocagem. Para o doce de leite com semeadura de 0,05 % de lactose sobre a massa de doce, não foi observada variação no tamanho dos cristais durante a estocagem. O tamanho médio dos cristais foi 56,2 μm , com variação de 21,91 μm . O número de cristais de lactose por grama de doce variou de $2,16 \times 10^6$ a $8,92 \times 10^7$, tendo como valor médio $3,96 \times 10^7$.

Comitê Orientador: Profª. Dra. Fabiana Queiroz Ferrua - UFLA (Orientador), Prof. Dr.

Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA.

ABSTRACT

PERRONE, Ítalo Tuler. Effect of the secondary nucleation in the crystallization of “Doce de Leite”. Lavras: UFLA, 2006. 49p. (Dissertation - Master's degree in Food Science) ¹

The aim of this investigation was study the lactose crystallization on “doce de leite” using whey and secondary nucleation in the technology of production. This experiment was accomplished at Cândido's Tostes Dairy Institute EPAMIG, located in Juiz de Fora in the state of Minas Gerais. This experiment involved two treatments, with and without seeding of lactose micro-crystals. The employed ingredients in the elaboration of “Doce de Leite” was concentrated in an open kettle with mechanical agitation to 70% total solids. Then the product was cooled to 65°C and seeding with lactose micro-crystals to prevent sandiness during the stockpiling. To understand the effect of secondary nucleation, the crystal's growth and size was determined and calculated with an optical microscope. Preliminaries tests indicated that the addition of starch in the technology inhibited the formation of crystals, disabling the secondary nucleation. Lactose crystals above 180 µm was detected in “Doce de Leite” obtained without secondary nucleation after thirty days of stockpiling. For the “Doce de Leite” with sowing of 0,05% of lactose on the candy mass, variation was not observed in the size of the crystals during the stockpiling. The medium size of the crystals was 56,2 µm and the number of lactose crystals for gram varied from $2,16 \times 10^6$ to $8,92 \times 10^7$, tends as medium value $3,96 \times 10^7$.

Guidance Committee: Profa. Dra. Fabiana Queiroz Ferrua – UFLA, Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O processo de concentração de leite, com o intuito de conservar os nutrientes deste alimento, propicia a obtenção de produtos como queijo, leite condensado, leite em pó, leite evaporado e doce de leite. Na maioria dos produtos lácteos concentrados, existe o problema da cristalização da lactose, açúcar natural do leite, que se apresenta sob duas formas distintas denominadas alfa e beta. A presença de grandes quantidades de α -lactose em produtos lácteos acarreta o fenômeno da cristalização deste dissacarídeo, cujos cristais modificam a textura dos produtos e podem ser percebidos pelo consumidor. Muitos esforços têm sido despendidos para o entendimento e controle do processo de cristalização de lactose em produtos derivados do leite.

A inoculação de núcleos de cristalização, com posterior agitação, a soluções saturadas de açúcares, possibilita o controle do número e do tamanho dos cristais formados. O emprego de lactose em pó nas fabricações de leite condensado e doce de leite é uma técnica muito difundida para a obtenção de produtos que não apresentem cristais de lactose perceptíveis ao paladar. O processo de inoculação de lactose em pó, sob agitação e temperatura controlada, em produtos lácteos que se apresentam como uma solução saturada de lactose em água, é denominado nucleação secundária, induzida, forçada ou controlada.

O soro é um subproduto da fabricação de queijos, rico em proteínas de elevado valor biológico, lactose e sais minerais. O descarte do soro em lagos e rios é um grave problema ambiental e deve ser evitado pelos laticínios. Alternativas para a industrialização do soro consistem na produção de ricota, bebidas lácteas, soro em pó, concentrado protéico e lactose. Novas alternativas para o aproveitamento do soro são uma real necessidade dos laticínios, pois,

dessa forma, podem trabalhar dentro das exigências dos órgãos de proteção ambiental.

A concentração de uma mistura de leite, soro de leite e açúcar possibilita a obtenção de um doce de leite semelhante ao doce de leite tradicional, apresentando-se como uma alternativa para o aproveitamento do soro em fábricas de laticínios. Porém, como o soro de leite é rico em lactose, o processo de concentração acarreta textura arenosa no produto final, após alguns dias de fabricação.

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do processo de nucleação secundária, como ferramenta no controle da formação de cristais de lactose em um doce de leite obtido de uma mistura de leite e soro, acompanhando a variação do número e tamanho dos cristais de lactose com o tempo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características da lactose

O dissacarídeo lactose é o predominante e mais importante carboidrato do leite, no qual existem, também, concentrações muito baixas de outros monossacarídeos, incluindo glicose e galactose, oligossacarídeos neutros e ácidos e carboidratos ligados a peptídeos e proteínas (Robinson, 1981).

De acordo com Fennema (1996), a concentração de lactose no leite varia, conforme a origem, entre 2,0% a 8,5%. O leite de vaca contém, corriqueiramente, maior quantidade de lactose do que qualquer outro componente sólido, apresentando uma concentração quase constante entre 45 a 50 g/L (Walstra & Jenness, 1984). Os isômeros da lactose, estão mostrados na Figura 1.

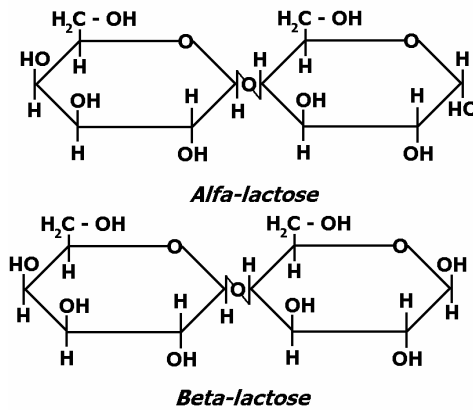


FIGURA 1 Estrutura química dos isômeros da lactose.

A lactose é composta por D-glicose e D-galactose, estando o grupo aldeído da galactose unido ao grupo C-4 da glicose mediante um enlace β -1-4-glicosídico (Walstra et al. 2001). Este enlace pode ser rompido pela ação enzimática. A β -galactosidase hidrolisa a lactose em seus monossacarídeos constituintes, glicose e galactose. Esta conversão é de considerável interesse, do ponto de vista tecnológico, pois os produtos da hidrólise, em combinação, são mais doces, mais solúveis, diretamente fermentados e imediatamente absorvidos no intestino do lactente (Morrissey, 1985). Segundo Bobbio (1992), a solubilidade média da lactose, a 20°C, é de 20 g/100 g água, enquanto que a solubilidade da glicose é de 107 g/100 g água e da galactose é 50 g/100 g água. A lactose não é tão doce quando comparada a outros açúcares, como sacarose, glicose e frutose e soluções aquosas de sacarose, com concentrações de 1%; 5%; 10% e 20% m/v, possuem o mesmo poder edulcorante que soluções aquosas de lactose com concentrações respectivas de 3%, 5%; 15%; 30% e 33% m/v (Walstra & Jenness, 1984).

O carbono do grupo funcional da glicose, dentro da molécula de lactose, recebe o nome de carbono anomérico. Bobbio (1992) enfatiza que o carbono anomérico da unidade de glicose está disponível para oxidação, portanto, a lactose é um dissacarídeo redutor. A adição de soro ao leite irá produzir uma mistura com maior concentração de lactose e, conseqüentemente, maior concentração deste dissacarídeo redutor. A reação entre um açúcar redutor e um grupamento amina é denominada de escurecimento não-enzimático. De acordo com Araújo (2004), a reação de escurecimento não-enzimático produz, sob condições favoráveis, “flavor” agradável, aroma e coloração característicos, porém, provoca significantes perdas de aminoácidos, como a lisina, além da diminuição da digestibilidade da proteína e, portanto, redução do valor nutritivo. Segundo Boekel (1998), as conseqüências da reação de escurecimento não enzimático no leite e seus derivados são:

- 1) diminuição do valor nutritivo devido ao bloqueio dos resíduos de lisina, a qual não fica disponível para a digestão;
- 2) produção de compostos que geram “flavor”;
- 3) formação de compostos antioxidantes nas etapas mais avançadas da reação;
- 4) compostos antibacterianos são formados;
- 5) desenvolvimento de coloração amarronzada, devido a melanoidinas.

As conseqüências da reação de escurecimento serão mais intensas numa mistura de leite e soro de leite do que somente em leite, fato este que predispõe o doce obtido desta mistura a ser mais escuro.

De acordo com Morales & Boekel (1998), o escurecimento oriundo da reação de escurecimento não enzimático é desejável em alguns tipos de produtos, como os de confeitaria, chocolate e café, porém, indesejável em leites esterilizados ou lácteos em pó. Segundo Bobbio (1992), os principais fatores que interferem na reação de escurecimento não enzimático são:

- 1) temperatura: a reação é lenta a temperaturas baixas e apresenta Q_{10} aproximadamente igual a dois;
- 2) pH do meio: a velocidade da reação é máxima em pH próximo da neutralidade;
- 3) atividade de água: quando a atividade de água é superior a 0,9, ou seja quando os reagentes estão muito diluídos, há diminuição da velocidade de escurecimento e essa velocidade tende a zero quando a atividade de água tende a um valor abaixo de 0,2;
- 4) natureza do carboidrato: a velocidade da reação é maior em monossacarídeos do que em dissacarídeos;
- 5) natureza do aminoácido: a estrutura da molécula dos aminoácidos é importante para a velocidade da reação, sendo decrescente na ordem do

aminoácido básico lisina, para o aminoácido ácido glutâmico e, posteriormente, para o aminoácido neutro glicina;

6) efeito dos catalisadores: a reação é acelerada pela presença de ânions como fosfato e citrato e, também, por íons cobre.

Os açúcares que possuem átomos de carbono assimétricos são opticamente ativos; suas soluções desviam o plano de vibração da luz polarizada que os atravessa. A α -lactose e a β -lactose diferem em sua rotação específica. Uma solução recém-preparada de qualquer uma delas mudará sua rotação com o passar do tempo à medida que tem lugar o equilíbrio com a outra forma. Segundo Holsinger (1997), a lactose pode ocorrer em duas formas cristalinas nos produtos lácteos, α -hidratada e β -anidra, ou como uma mistura vítrea amorfa de α e β -lactose. De acordo como o mesmo autor, a forma estrutural da α -lactose pode ser convertida na forma estrutural beta por meio da mudança na posição da hidroxila e do hidrogênio no grupo redutor. Esta mudança na rotação e a transformação em solução de uma forma na outra é denominada mutarrotação. De acordo com Whittier (1944), a mutarrotação é um fenômeno característico de todo açúcar redutor em solução aquosa e, em algumas instâncias, é atribuído a mudanças nas concentrações das formas alfa e beta. Haase & Nickerson (1966) estudaram o fenômeno da mutarrotação e demonstraram que ele pode ser expresso por:

$$[\alpha_{\infty}] = 55,23 - 0,01688c - 0,07283(t - 25);$$

Sendo, $[\alpha_{\infty}]$ = rotação específica no equilíbrio

c = concentração de lactose anidra na solução (g/100 mL),

t = temperatura, em graus Celsius.

Uma solução de lactose, em seu estado de equilíbrio, a 25°C, possui 62,25% de sua lactose na forma beta e 37,75% na forma alfa (Whittier, 1944). As formas beta e alfa possuem propriedades físicas distintas. Segundo Nickerson (1974), a α -lactose, a 20°C, possui rotação específica em água de $[\alpha]_D = 89,4^\circ$ e

possui um ponto de fusão de 201,6°C. Já a β -lactose possui, a 20°C, rotação específica em água de $[\beta]_D = 35^\circ$ e ponto de fusão de 252,2°C.

Para a mutarrotação, segundo Walstra & Jenness (1984), o coeficiente de temperatura Q_{10} é igual a 2,8 e a energia de ativação da reação é de 75 kJ/mol. Os mesmos autores relatam que, sob condições de elevada concentração de açúcares, como em leite condensado e doce de leite, ocorre uma diminuição significativa na taxa de mutarrotação.

As frações de α e β -lactose possuem solubilidades distintas e a mutarrotação torna-se um fator importante na cristalização (Holsinger, 1997). Segundo Whittier (1944), quando um excesso de α -lactose monoidratada é colocado em água a temperatura de 15°C, uma quantidade de aproximadamente 7g/100g, é dissolvida, sendo definida como a solubilidade verdadeira da forma alfa. O aumento da solubilidade, com o passar do tempo, deve-se à mutarrotação, pois, a forma alfa é convertida na forma beta, tornando a solução insaturada em relação à α -lactose. Dessa forma, maior quantidade de α -lactose pode ser dissolvida. O processo continua até que um ponto final de equilíbrio seja alcançado, aproximadamente 17g/100g, 15°C.

De acordo com Holsinger (1997), a β -lactose, sob condições similares, apresenta uma solubilidade inicial sensivelmente mais elevada, ao redor de 50g/100g, 15°C. Segundo Walstra et al. (2001), se é adicionada β -lactose em água, o processo de solubilização é mais rápido no início, tornando-se mais lento com o passar do tempo. Como consequência da mutarrotação, forma-se mais α -lactose do que se pode dissolver, acarretando em cristalização da forma alfa. Nessa condições, a solubilidade depende, em parte, do equilíbrio de mutarrotação, da velocidade de dissolução e da velocidade de mutarrotação. Os valores para solubilidade da lactose variam entre o valor inicial, o valor final e o de supersolubilidade (Tabela 1).

TABELA 1 Solubilidade das formas isoméricas da lactose a diferentes temperaturas

Temperatura °C	Solubilidade (g/100g água) α inicial	Solubilidade (g/100g água) β inicial	Solubilidade (g/100g água) final (α e β)
0	5,0	45,1	11,9
15	7,1	-	16,9
25	8,6	-	21,6
39	12,6	-	31,5
50	17,4	-	43,7
90	60,0	-	143,9
100	-	94,7	157,6

Fonte: Holsinger (1997)

De acordo com Walstra et al. (2001), quando a concentração de lactose na solução é 2,1 vezes o valor de saturação, produz-se rapidamente a cristalização espontânea, provavelmente porque a nucleação primária é homogênea. Quando a concentração de lactose é menor que 1,6 vez o valor da saturação, geralmente, é necessária a adição de sementes de cristais para induzir a cristalização, a não ser que se espere muito tempo. O teor de lactose em leite condensado é superior ao do doce de leite, devido a uma maior concentração.

O solvente e a presença de sais ou sacarose influenciam na solubilidade da lactose. Na Tabela 2 encontra-se a solubilidade relativa da lactose em soluções contendo sacarose. Segundo Whittier (1944), em uma solução contendo sacarose próxima ao seu ponto de saturação, a solubilidade da lactose é reduzida à metade do que seria em uma solução sem sacarose.

TABELA 2 Solubilidade relativa da lactose (SRL) em soluções com sacarose*

Solução	SRL	SRL	SRL	SRL	SRL	SRL
Sacarose	25°C	40°C	50°C	60°C	80°C	85°C
(m/v)						
40%	74,5	76,7	75,5	81,9	89,4	80,5
50%	63,0	64,8	64,9	71,9	76,7	73,0
60%	50,9	53,5	53,5	57,8	70,2	66,4
70%	42,1	44,3	43,2	54,3	63,9	62,7

* porcentagem de solubilidade de lactose em água à mesma temperatura

Fonte: Nickerson & Moore, 1972

Concentrações de sacarose entre 40% e 70% m/v produzem uma redução na solubilidade da lactose entre 40% a 80% do valor normal (Nickerson 1974).

Dados obtidos por Montes (2003) mostram que a solubilidade da lactose em solução aquosa varia de 14,61 gramas por 100 gramas de água a 156,96 gramas quando a temperatura varia entre 10°C e 90°C. Geralmente, a α -lactose cristaliza como hidrato, contendo quantidades equimolares de lactose e água, sendo seus cristais bastante duros e não higroscópicos (Walstra & Jenness, 1984). Os mesmos autores afirmam que, sob temperatura ambiente, a β -lactose anidra se dissolve mais rapidamente que o hidrato de α -lactose e sua solubilidade é, aproximadamente, dez vezes maior, sendo seus cristais menores, mas, com uma maior área superficial. Segundo Holsinger (1997), todos os hábitos de cristalização da lactose conhecidos em produtos lácteos são cristalograficamente equivalentes ao formato tomahawk, que se reporta a uma machadinha empregada por índios da tribo que tem esse nome.

Segundo Walstra et al. (2001), para evitar a agregação e o aparecimento de arenosidade nos produtos lácteos, os cristais de lactose não devem medir mais do que 10 μm , significando haver o mínimo de 10^{10} cristais de lactose cristalina por grama de produto. Holsinger (1997) afirma que, para os cristais produzirem uma textura arenosa, devem exceder o tamanho de 16 μm . De acordo com Nickerson (1954), na produção de sorvetes, cristais de lactose com tamanho maior que 14 μm produzem uma textura arenosa. Hunziker (1934) afirma que, em leite condensado, os cristais não devem exceder 10 μm e que, quando superam 30 μm , tornam o produto arenoso.

2.2 Características do doce de leite

O processo de concentração e evaporação do leite, por aplicação do calor, iniciou-se em 1856, por Gail Borden (Hall & Hedrick, 1971).

Segundo Walstra & Jenness (1984), as principais modificações causadas pela aplicação do calor ao leite são:

- 1) eliminação de gases, incluindo CO_2 . A diminuição do O_2 é importante para a velocidade das reações de oxidação durante o tratamento térmico e para o posterior desenvolvimento de algumas bactérias;
- 2) aumenta a quantidade de fosfato coloidal e diminui a concentração de $[\text{Ca}^{2+}]$, sendo modificações reversíveis após um longo período de tempo;
- 3) isomerização da lactose, que sofre uma degradação parcial, formando lactulose e ácidos orgânicos;
- 4) hidrólise dos ésteres fosfóricos, particularmente os da caseína;
- 5) diminuição do pH do leite e aumento do valor de sua acidez;
- 6) insolubilização de grande parte das proteínas do soro devido à desnaturação;
- 7) inativação de enzimas;

- 8) reação entre as proteínas e a lactose, especialmente a reação de Maillard, tendo como consequência a diminuição da lisina disponível;
- 9) formação de grupos sulfidril livres;
- 10) agregação das micelas de caseína, podendo ocasionar coagulação;
- 11) formação de lactonas e metilcetonas a partir da gordura;
- 12) degradação de algumas vitaminas.

Estas modificações geradas pelo calor, segundo o mesmo autor, têm como consequências:

- 1) modificação na cor;
- 2) pode ocasionar aumento de viscosidade;
- 3) mudança considerável no “flavor” do produto;
- 4) diminuição do valor nutritivo;
- 5) tendência à geleificação durante o armazenamento;
- 6) diminuição da aptidão a coagulação;
- 7) a tendência ao desnate espontâneo diminui.

De acordo com Walstra et al. (2001), a evaporação do leite e do soro é aplicada com as seguintes finalidades:

- 1) elaborar produtos concentrados como leite evaporado, leite condensado e iogurte concentrado;
- 2) como uma etapa intermediária na fabricação de produtos lácteos em pó, visto que a eliminação da água por evaporação requer um consumo energético muito menor do que a eliminação da água por dessecação;
- 3) para produzir lactose a partir da recristalização do soro.

O leite e os produtos lácteos são concentrados eliminando a água. Este método é empregado para aumentar a vida útil dos produtos concentrados e para diminuir seu volume (Walstra & Jenness, 1984).

Segundo Walstra et al. (2001), são as seguintes as modificações produzidas no leite como consequências da concentração:

- 1) diminuição da atividade de água;
- 2) aumento da higroscopicidade;
- 3) mudanças no equilíbrio salino;
- 4) modificação na conformação das proteínas;
- 5) aumento da pressão osmótica, diminuição do ponto crioscópico, aumento do ponto de ebulição, da condutividade elétrica, da densidade e do índice de refração;
- 6) aumento da viscosidade.

De acordo com Hall & Hedrick (1971), a concentração de sacarose em água, nos produtos lácteos concentrados, deve estar entre 62,5% e 64,5%, sendo esta faixa ideal para inibir o desenvolvimento de microrganismos e não propiciar a cristalização da sacarose no produto.

O Regulamento Técnico Mercosul para Fixação de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos de 1998 entende por doce de leite o produto, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor à pressão normal ou reduzida do leite ou leite reconstituído, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e ou creme e adicionado de sacarose, parcialmente substituída ou não por monossacarídeos e ou outros sacarídeos.

O doce de leite e o leite condensado açucarado são produtos semelhantes, provenientes da concentração do leite adicionado de açúcar. A principal diferença entre eles é resultante da tecnologia de processamento. O leite condensado exige equipamento mais sofisticado, pelo fato da sua evaporação se processar a vácuo, enquanto que na fabricação de doce de leite utilizam-se, na maioria das vezes, tachos abertos providos de aquecimento a vapor (Souza 1979).

De acordo com Perrone (2000), a padronização do leite para a fabricação de doce pode ocorrer empregando-se mistura de leite integral, leite desnatado e soro. O balanço de massa a ser empregado na padronização da matéria-prima,

com o intuito de determinar a composição da mesma, é demonstrado na fórmula baixo.

$$(VL \times SL) + (VS \times SL) = (VM \times SL)$$

Sendo: VL = volume de leite (L)

VS = volume de soro (L)

VM = volume de mistura

SL = teor de sólidos lácticos (% m/v)

Segundo Martins & Lopes (1981), a qualidade da matéria-prima empregada na fabricação do doce de leite está relacionada a:

1) atributos sensoriais: não deve apresentar anormalidades de cor, sabor, odor ou aparência;

2) acidez: normalmente, o leite apresenta acidez titulável na faixa de 0,015% m/v a 0,020% m/v de ácido láctico, que é elevada para a produção do doce, pois, durante a concentração, ocorre aumento da acidez titulável, podendo resultar na precipitação da caseína, conferindo ao doce o aspecto de coagulado. Costuma-se reduzir esta acidez pela adição de bicarbonato de sódio, até uma faixa de 0,012% a 0,013 % m/v de ácido láctico;

3) matéria gorda: é um componente importante para o rendimento e a textura do produto.

Terán-Ortiz (1998) afirma que a quantidade de açúcar a ser adicionada para a fabricação de doce geralmente varia de 15% a 20% sobre a massa de leite, e que menores concentrações de açúcar requerem maior evaporação e, conseqüentemente, um rendimento menor.

De acordo com Perrone (2000), a seqüência para a fabricação do doce de leite é:

1) selecionar o leite por meio de análises adequadas e medir corretamente o volume a ser trabalhado;

2) calcular a quantidade de bicarbonato de sódio, fazer minuciosamente a limpeza dos equipamentos e calcular o rendimento teórico, o fator açúcar e o fator de padronização;

3) acoplar o agitador, o duto do exaustor, a tampa traseira e certificar se o tacho está travado corretamente;

4) verter o leite no equipamento, tomando cuidado com as capacidades mínima e máxima do tacho;

5) iniciar a troca de calor. Para uma troca mais eficiente e para evitar problemas de elevada pressão na parede de aquecimento do equipamento, fazer o esgotamento do condensado da linha de vapor;

6) manter aquecimento constante até primeira fervura;

7) aquecer gradativamente até determinação do ponto;

8) resfriar a 75°C e proceder ao envase do produto final.

2.3 Cristalização em doce de leite

De acordo com Morrissey (1985), a concentração e a cristalização da lactose são de importância majoritária em uma gama de produtos lácteos, como leite condensado, produtos congelados e em leite e soro desidratados.

Walstra & Jenness (1984) definem o fator de concentração como a proporção entre o estrato seco do produto concentrado e do material original e, dessa forma, a massa de produto concentrado é a massa de produto antes da concentração, dividida pelo fator de concentração.

Segundo Walstra et al. (2001), durante a concentração, algumas substâncias entram em estado de supersaturação, podendo cristalizar e precipitar, sabendo-se que a lactose está saturada no leite, à temperatura ambiente, quando o fator de concentração do processo é de aproximadamente 2,8.

Santos (1976) afirma que o doce de leite, no final de seu processamento, constitui uma solução supersaturada de lactose e cristaliza-se com seu resfriamento e que a arenosidade é um problema de controle difícil nas condições normais de fabricação do produto, aparecendo, geralmente, no primeiro mês de armazenamento. Segundo Vargas et al. (1982), a cristalização da lactose em solução é um fenômeno inevitável, pois qualquer solução, ao ser concentrada, tende a tornar-se supersaturada, o que pode resultar na precipitação (cristalização) do soluto durante o resfriamento.

Silva et al. (1984) enfatizam que, entre as dificuldades técnicas que se têm apresentado na fabricação de doce de leite em escala industrial, talvez a mais difícil de vencer sejam os procedimentos seguidos para minimizar os efeitos da cristalização. Os cristais formados conferem ao doce uma textura arenosa, constituindo, assim, um importante problema tecnológico (Terán-Ortiz, 1998).

O problema da cristalização de lactose em doce de leite ou em sobremesas lácteas é muito acentuado devido à grande competição por água. Este fato é observado no trabalho de Nickerson & Moore (1972), os quais demonstraram que a solubilidade da lactose em solução aquosa decresce até 70% em presença de sacarose, em variações de temperaturas de 25°C a 85°C.

Vários processos têm sido empregados no controle da cristalização. Silva et al. (1984) utilizaram a enzima beta-D-galactosidade no processo contínuo de fabricação de doce de leite homogeneizado e concluíram que a adição de 40 mg da enzima, seguida de incubação a 8°C por 15 horas, sob contínua agitação, resulta em doce de leite com características de coloração, textura, sabor e aroma similares ao produto tradicional, não apresentando o defeito da arenosidade com 90 dias de estocagem. Isso se deve à hidrólise da lactose em dois monossacarídeos mais solúveis e, conseqüentemente, com menor propensão à cristalização.

De acordo com Coelho et al. (1982), o emprego de 20 mg de lactase por litro de leite é suficiente para evitar a cristalização do doce por um período de até 180 dias. Já o emprego de 40 mg por litro de leite é capaz de retardar a cristalização por um período de um ano de estocagem.

Sabioni et al. (1984) inocularam *Kluyveromyces lactis* no leite, objetivando a hidrólise da lactose e, conseqüentemente, a inibição da cristalização do doce de leite. O processo foi eficiente no controle da cristalização em doce de leite, porém, trouxe desvantagens, como aumento no tempo de processamento, pequena modificação no sabor devido à fermentação da levedura e riscos associados à contaminação do produto acabado.

Hosken (1969) empregou sete diferentes técnicas de fabricação de doce de leite e avaliou a cristalização dos produtos obtidos. As tecnologias testadas foram a tecnologia padrão, uma empregando doce de véspera como núcleo de cristalização, uma empregando lactose em pó, outra empregando glicose, uma utilizando amido em diversas concentrações, uma empregando açúcar invertido e a última empregando açúcar invertido e leite em pó. O autor concluiu que o emprego de amido entre 0,25% a 2% m/v, embora aumente o rendimento de fabricação e evite a cristalização, modifica radicalmente as características do doce. O processo de sementeira foi eficiente para evitar a cristalização perceptível, contudo, apresentou a desvantagem de aumento do tempo de processo. Os melhores resultados foram obtidos com o emprego da glicose, sendo a quantidade mais recomendável a de 2% sobre o volume de leite.

De Souza (1979) estudou o efeito da acidificação do leite sobre a cristalização do doce de leite e concluiu que a acidificação experimentada não foi suficiente para inibir o aparecimento de cristais de lactose no produto final.

Terán-Ortiz (1998) analisou o efeito da adição de gomas xantana e locusta na cinética de inibição de cristalização de açúcares em doce de leite e

percebeu dependência entre o efeito inibitório dos hidrocolóides com a concentração destes, a temperatura de armazenamento e o ponto de amostragem.

2.4 Nucleação secundária

De acordo com McCabe et al. (1993), a cristalização é a formação de partículas sólidas dentro de uma fase homogênea, podendo ocorrer a partir do vapor, de um líquido em fusão ou de uma solução. Jancic & Grootsholten (1984) afirmam que a cristalização é caracterizada pela formação de um espectro de partículas cristalinas de diferentes tamanhos e que o controle do tamanho dos cristais no produto é um problema cinético e não termodinâmico. Segundo Hartel (1993), na prevenção da cristalização de diversos produtos alimentícios, é necessário o conhecimento da cinética do processo, bem como suas interações com propriedades de transferência de massa, energia e momento durante a formação dos cristais e no armazenamento.

Segundo McCabe et al. (1993), na formação de cristais dois passos são requeridos: o surgimento de uma nova partícula, denominado nucleação e o crescimento desta partícula até um tamanho macroscópico.

Jancic & Grootsholten (1984) enfatizam que, para ocorrer uma mudança de estado, deve ser fornecida energia suficiente para romper a barreira deste estado e uma subsequente mudança para um estado de energia mais baixo deve acontecer. Os mesmos autores afirmam que, para a etapa de cristalização, a barreira de energia a ser vencida é a necessária à nucleação e que o estado de energia mais baixo é alcançado com o crescimento dos cristais.

McCabe et al. (1993) afirmam que a força motriz para os dois passos é a supersaturação e nem a formação e o crescimento dos cristais ocorrem em soluções saturadas ou insaturadas. Hartel (1993) define que a supersaturação está baseada no balanço das forças termodinâmicas entre a solução concentrada e a

concentração de equilíbrio e que a diferença de potencial químico entre os dois estados define o grau de supersaturação.

Jancic & Grootscholten (1984) definem a nucleação como o processo pelo qual pequenos agregados cristalinos estáveis se formam na solução e a dividem em duas etapas:

1) nucleação primária: um número de partículas em fluxo, de tamanho superior ao limite crítico, é gerado, em sua maioria, em regiões de elevada supersaturação, como ao redor das superfícies de resfriamento e nas zonas de ebulição;

2) nucleação secundária: uma quantidade de partículas geradas, como resultado da presença do crescimento de cristais matrizes, induz à formação de novos cristais.

Na nucleação primária, segundo McCabe et al. (1993), o surgimento de novas partículas, obrigatoriamente, ocorre sem a influência de qualquer interferente, como presença de sólidos diversos, contato com a parede do equipamento ou partículas diminutas de qualquer natureza. De acordo com Geankoplis (1993), a nucleação primária é resultado de flutuações locais, de dimensões moleculares, em uma fase homogênea e o seu acontecimento está baseado na união de moléculas ou partículas formando aglomerados.

Segundo Jancic & Grootscholten (1984), o que caracteriza a nucleação secundária é que a presença de um cristal, na solução supersaturada, induz à formação de mais cristais, os quais não se formariam espontaneamente. McCabe et al. (1993) abordam a importância da agitação na nucleação secundária. Hartel (1993) levanta fatores responsáveis pela taxa de nucleação de produtos alimentícios, enfatizando a supersaturação, a temperatura, a energia oriunda do processo de agitação e o nível e tipo de impurezas ou aditivos presentes na formulação do alimento.

McCabe et al. (1993) caracterizam o processo de crescimento de cristais como difusional, ou seja, moléculas solúveis ou íons alcançam as faces crescentes dos cristais por meio da difusão pela fase líquida. Segundo Jancic & Grootcholten (1984), após a barreira de energia para a formação de novo cristal ser vencida, todo o sistema espontaneamente se ajusta para um estado de grande estabilidade, que é manifestado pela deposição regular do excesso de soluto nas várias faces do cristal. De acordo com Hartel (1993), a taxa de crescimento de cristais de sacarose em alimentos depende de fatores como supersaturação, temperatura, viscosidade da solução, taxa de agitação, pH e da densidade dos cristais.

Segundo Jancic & Grootcholten (1984), o crescimento dos cristais a partir de solução é processo que ocorre em três estágios:

- 1) o transporte de soluto da solução supersaturada para a vizinhança da superfície do cristal;
- 2) alguns processos na superfície do cristal, provavelmente envolvendo a adsorção na camada superficial, seguido pela orientação de moléculas ao cristal;
- 3) dissipação de calor de cristalização liberada na superfície do cristal.

Hartel (1993) esclarece que, para alguns alimentos, como caramelos, é desejado que o produto possua muitos cristais pequenos de açúcar e que as formulações destes produtos devem favorecer a nucleação e o posterior crescimento dos cristais.

Muir (1990) esclarece que, para evitar uma textura arenosa em leite condensado, devido à formação de grandes cristais, deve-se semear cristais de lactose ao produto antes que a cristalização ocorra espontaneamente e, por meio do controle da temperatura de inoculação e da taxa de agitação, é possível obter cristais numerosos de tamanho mínimo. Hunziker (1934) ressalta que, durante o processo de resfriamento de lácteos concentrados, uma quantidade pequena de núcleos cristalinos é formada, sendo capaz de crescer na forma de grandes

agregados, originando grandes cristais e, inevitavelmente, ocasionando o defeito da arenosidade.

De acordo com Bolanowski (1965), para o controle da cristalização não basta simplesmente a redução da temperatura para solidificação do soluto, mas também uma série de outros controles. Hunziker (1934) afirma que quanto maior a quantidade de lactose em solução, maior é a temperatura necessária à saturação e maior é o risco da formação de cristais perceptíveis, mesmo procedendo a microcristalização.

Conforme Martinez et al. (1990), na produção de leite condensado, o defeito da cristalização é prevenido pela semeadura de microcristais de lactose, mas, na tecnologia de doce de leite, o processo não é empregado devido à elevada viscosidade e a problemas de contaminação oriundos da inoculação à temperatura de 30°C.

Segundo Bolanowski (1965), a nucleação secundária está inseparavelmente ligada a dois elementos temporais:

1) o tempo necessário para o abaixamento da temperatura do material até o ponto em que a cristalização ocorre. A taxa de resfriamento e a intensidade da agitação determinam o tamanho, a quantidade e a estabilidade dos cristais formados;

2) o tempo necessário para que o cristal cresça sob as condições de cristalização.

Conforme Whittier (1944), a cristalização da lactose a temperaturas de inoculação, com α -lactose, depende de dois fatores – o grau de saturação da solução e a velocidade de mutarrotação. De acordo com Hartel & Liang (1989), a formação de cristais somente ocorre sob determinadas condições de inoculação. Whittier (1944) descreve que a microcristalização ocorre melhor a 30°C do que a 25°C, o que indica a importância da viscosidade sobre a formação e o crescimento dos cristais de lactose. O autor enfatiza, ainda, que,

definitivamente, existe uma grande desvantagem de se microcristalizar o produto a temperaturas inferiores a 20°C. Kreveld & Michaels (1964) indicam que o melhor meio de preparar cristais de lactose é manter uma solução de lactose em água supersaturada inserida em um erlenmeyer, a uma temperatura de 30°C, por duas a três semanas para ocorrer a cristalização. Huzinker (1934) recomenda, para a fabricação de leite condensado, que a faixa de temperatura ideal para a microcristalização varie entre 24°C e 32°C.

Twieg & Nickerson (1968) descrevem que a taxa de cristalização não é diretamente proporcional à área superficial dos cristais semeados e que, provavelmente, o efeito limitante é a mutarrotação. Ferramentas de controle para o processo de microcristalização são fundamentais para a execução de um processo adequado.

Segundo Huzinker (1934), o tempo de nucleação secundária, com o objetivo de produzir pequenos cristais em um curto intervalo de tempo, deve ocorrer em uma faixa de temperatura que propicie uma grande supersaturação, mas que não permita um elevado aumento de viscosidade. Enquanto a supersaturação intensifica a velocidade de cristalização, a viscosidade elevada diminui a taxa de formação de cristais porque atrapalha a difusão das moléculas de lactose. Martinez et al. (1990) recomendam, para condições industriais de fabricação de doce de leite, que a temperatura mínima de microcristalização deve ser de 50°C, pois, abaixo desta temperatura, problemas microbiológicos são inevitáveis e a viscosidade torna-se elevada, dificultando o processo. Twieg & Nickerson (1968) afirmam que produtos submetidos à semeadura de cristais em temperaturas de até 30°C causam cristalização em um período inferior a 5 horas em soluções supersaturadas.

Martinez et al. (1990) estudaram o efeito da adição de lactose em pó em doce de leite sobre a cristalização deste produto. Concluíram que a adição de 6 g de lactose a cada 100 kg de doce de leite a 40°C, obtido em planta piloto com

capacidade para de 50 litros de leite e com agitação constante de 50 rotações por minuto, são suficientes para inibir a presença de cristais de lactose perceptíveis por seis meses. Também concluíram que a adição de 30 g de lactose em 100 kg de doce de leite a 54°C, após agitação de quinze minutos, é eficiente no controle da cristalização.

Hosken (1969) empregou 0,04% de lactose em pó sobre a massa de doce de leite, a 65°C, para avaliar o efeito da inoculação de núcleos de cristalização sobre o processo de cristalização. Concluiu que a adição dos núcleos foi eficiente no controle da cristalização por 120 dias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental empregado foi determinado após a realização de testes preliminares, que consistiram na produção de doce de leite com e sem a adição de 0,5 % de amido sobre o volume de mistura e a utilização de três distintas temperaturas de inoculação dos núcleos de lactose. Dessa forma, foram determinados dois tratamentos, um no qual foi realizada a nucleação secundária, por meio da adição de cristais de lactose em pó e outro no qual foi realizada a nucleação primária, podendo ser considerado o tratamento controle, pois não foi adicionada lactose em pó.

O tratamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, sendo realizadas cinco repetições para cada um dos dois tratamentos realizados durante o experimento.

Durante a análise dos resultados, foi empregado o balanço de massa como ferramenta para a determinação da composição teórica final da mistura de leite e soro de leite.

3.1 Fabricações do doce de leite

Foram realizadas dez fabricações de doce de leite, cinco para cada tratamento, seguindo uma tecnologia diferente da tradicional sugerida por Martins & Lopes (1981). As modificações realizadas na tecnologia tradicional foram efetuadas com o intuito de obter um doce com elevado teor de lactose. As principais modificações foram a utilização de soro de leite, oriundo da fabricação de queijos, na forma líquida e a adição de lactose em pó, após resfriamento parcial do doce.

O leite integral empregado na tecnologia foi oriundo da recepção diária da Usina Piloto do Centro Tecnológico/Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG, sendo previamente clarificado e pasteurizado.

O equipamento de fabricação consistiu de um tacho aberto de camisa dupla, com capacidade de trabalho de 25 litros de leite. As especificações de operação do equipamento foram 74 a 76 rotações por minuto, com pressão de vapor ao redor de 137,8 kPa .

Os ingredientes sólidos, coadjuvantes da tecnologia, foram pesados antes de cada fabricação e armazenados em recipientes apropriados. Dessa maneira, foram empregados citrato de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, açúcar e lactose em pó. O açúcar utilizado foi a sacarose em forma de cristal, na proporção estabelecida sobre o volume de leite de 20% m/v.

Na seqüência operacional adotada, inicialmente, o leite, o soro e a mistura foram analisados, medidos volumetricamente e pesados. Feita a mistura, esta foi dividida em duas partes, que deram origem a duas fabricações distintas, uma com nucleação primária e a outra com nucleação secundária.

O equipamento foi limpo e montado para receber o leite. Ligou-se a agitação e abriu-se a válvula de entrada de vapor, esperando-se o esgotamento do condensado da linha.

Durante o aquecimento, adicionaram-se a sacarose, o bicarbonato de sódio, o citrato de sódio e o cloreto de sódio. Manteve-se aquecimento até a fervura, momento no qual a válvula manual de saída de vapor da camisa de vapor foi aberta para evitar derramamento da mistura. Após a primeira fervura, foi mantido um aquecimento gradativo até a determinação do ponto do doce. Este foi realizado empregando-se refratômetro de Abbé, em leitura próxima de 70% de sólidos totais.

O fluxograma geral esquematizando as principais etapas da fabricação do doce de leite está representado na Figura 2.

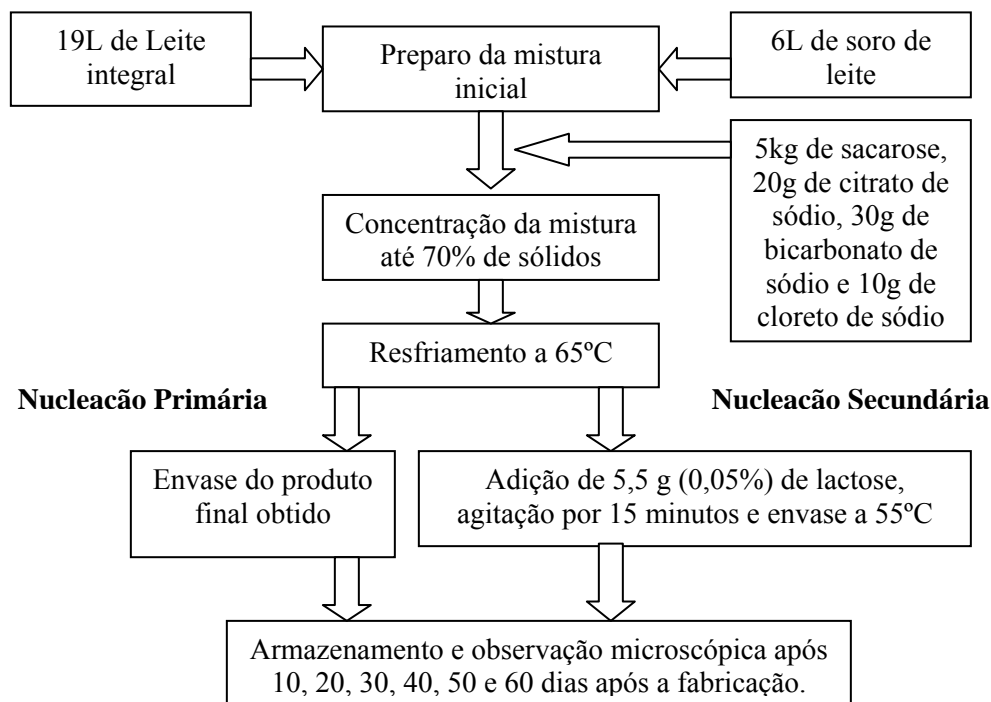


FIGURA 2 Fluxograma das etapas da fabricação do doce de leite

Logo após atingir 70% de sólidos totais, o produto foi resfriado, por meio da circulação de água à temperatura ambiente na camisa do equipamento, a uma temperatura de 65°C. Atingida a temperatura, realizou-se a adição da lactose em pó, mantendo-se a agitação por 15 minutos para propiciar a microcristalização. Durante a cristalização, a camisa do equipamento era esvaziada, de forma a evitar uma diminuição contínua da temperatura. A próxima etapa foi a embalagem do produto, a aproximadamente 50°C, em latas com capacidade para 800g de produto, as quais eram posteriormente estocadas à temperatura ambiente, por até 60 dias. Os lotes estocados foram divididos, de forma que uma lata foi destinada às análises físico-químicas e seis latas foram destinadas às observações microscópicas.

3.2 Métodos analíticos

As análises realizadas podem ser divididas em análises físico-químicas e microscópicas. As análises físico-químicas foram realizadas em duplicatas e consistiram, no leite, no soro e na mistura, da determinação dos teores de gordura, proteína, lactose e de extrato seco total. No doce de leite foram realizadas, no dia seguinte à fabricação, as mesmas análises do leite, acrescentando-se a determinação do teor de sacarose. As análises executadas estão especificadas na Tabela 3. Os procedimentos analíticos foram executados no Laboratório de Pesquisas Físico-Químicas do Centro Tecnológico/Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG.

Os métodos empregados para as análises laboratoriais foram:

- gordura, empregando método butirométrico (Pereira et al., 2000);
- proteína, empregando método Kjeldahl (International Dairy Federation 20B:1993);
- lactose e sacarose, segundo Wolfschoon-Pombo & Casagrande (1982).

TABELA 3 Relação das análises, por tipo de amostra

Análises (teores)	Leite	Soro	Mistura	Doce de leite
Gordura	X	X	X	X
Proteínas	X	X	X	X
Lactose	X	X	X	X
Extrato seco total	X	X	X	X
Sacarose				X
Análise microscópica				X

As análises microscópicas foram realizadas após 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias de armazenamento em embalagem hermeticamente fechada. O microscópio empregado foi o modelo Photo-Microscope III, da marca Zeiss. Amostras de cada tratamento, armazenadas à temperatura ambiente, foram abertas e analisadas quanto ao número e à quantidade de cristais de lactose presentes. A técnica microscópica utilizada foi a recomendada por Martinez et al. (1990).

Para a determinação do número de cristais, foram tiradas fotos dos campos microscópicos, com uma máquina digital modelo DSC-P93A, da marca Sony. A contagem dos cristais de lactose foi realizada com auxílio das imagens digitalizadas em computador.

A determinação do tamanho dos cristais foi realizada empregando-se lâminas e oculares graduadas. As medidas empregadas como referências para determinação da unidade de comprimento dos cristais foram obtidas de lâmina graduada, específica para este fim, da marca Zeiss. O tamanho medido foi o do comprimento mais longo do cristal, por ser o mais relevante.

De cada embalagem de doce de leite foram retiradas amostras de diferentes locais e preparadas seis lâminas para a visualização em microscópio. A quantidade de doce de leite colocada nas lâminas foi de 3 mg. Em cada lâmina foram determinados os vinte maiores cristais e fotografadas dez fotos de distintos campos microscópicos. Tanto a contagem microscópica quanto as fotos foram executadas no aumento de 400 vezes.

Uma marca comercial de doce de leite submetido à nucleação secundária foi analisada quanto ao número e ao tamanho dos cristais de lactose. Seis amostras do doce comercial foram analisadas após quatro meses de sua fabricação.

3.3 Análise dos resultados

A composição da mistura e do doce de leite foi analisada empregando-se o balanço de massa. A evolução da cristalização foi avaliada por meio da análise de regressão, em seis tempos ao longo da estocagem. Para a interpretação dos resultados experimentais foi empregada a análise de variância e o programa Origin versão 5.0 para a análise de regressão. Calculou-se o teor de lactose na solução aquosa para uma melhor interpretação da composição final. O teor de lactose na solução é definido como a quantidade percentual de lactose presente em uma solução de lactose mais água. Foram acompanhados o crescimento e o número de cristais de lactose no produto que sofreu nucleação primária e no que sofreu nucleação secundária.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da cinética de cristalização em um doce de leite oriundo de uma mistura de leite e soro de leite deve levar em consideração as propriedades físico-químicas da lactose, as características intrínsecas ao processo de fabricação e a composição do produto final obtido. Uma tecnologia de fabricação de doce de leite deve ser capaz de obter um produto estável durante todo o prazo de validade. O estudo do comportamento do doce de leite por sessenta dias, que consistiu da quantificação do número e do tamanho dos cristais, é uma ferramenta valiosa no entendimento das modificações sofridas pelo produto e na determinação do prazo de validade final.

4.1 Testes preliminares

Inicialmente, o objetivo do trabalho também contemplava avaliar o efeito da adição de amido durante a fabricação do doce na nucleação secundária, empregando-se, para todo o estudo, três diferentes temperaturas de nucleação, 50°C, 60°C e 70°C. Após a realização de quatro fabricações preliminares, foi constatada a dificuldade no controle da temperatura durante a nucleação. Por se tratar de um equipamento industrial no qual não existem controles apropriados, não era possível se atingir uma determinada temperatura de resfriamento e garantir sua constância com o passar do tempo. Com o intuito de não comprometer o rigor científico e se adequar a um processo industrial, foi escolhida somente uma temperatura inicial para a nucleação forçada. A temperatura inicial estipulada foi de 65°C.

Determinada a temperatura de nucleação, foram realizados mais quatro testes, sendo dois com a adição de 0,5% de amido sobre o volume de leite e dois

sem. Em ambas as fabricações foi realizada a nucleação secundária. Após dez dias de estocagem, foi constatado que os doces nos quais foi utilizado amido não havia presença de cristais de lactose, ou seja, a adição de amido impossibilitou a nucleação secundária. Este fato pode ser explicado pelo aumento da viscosidade nos doces devido à adição do espessante. Com o aumento da viscosidade, a movimentação das moléculas de lactose na solução supersaturada é dificultada, o que inviabiliza o processo de nucleação secundária. Após a realização e análise dos resultados dos testes preliminares, foi possível a determinação do delineamento experimental descrito no presente trabalho.

4.2 Análise dos resultados do doce de nucleação primária

A composição dos leites, soros e misturas utilizadas nas fabricações é um fator primordial no estudo da cristalização, pois é determinante no percentual de lactose do produto final. Conhecendo-se o teor de lactose, de sacarose e de água do doce, é possível determinar em que grau de saturação se encontra a solução final obtida e, dessa forma, tentar fazer uma correlação entre a composição do produto final e o aparecimento de cristais de lactose durante o armazenamento. Na Tabela 4 é possível verificar a composição média do leite, do soro e da mistura, para as cinco repetições, e comparar com os valores esperados com auxílio do balanço de massa.

As diferenças entre os valores calculados e os obtidos para a composição revelam uma boa concordância entre os dados, significando que os volumes empregados nas fabricações e as análises executadas foram realizados de forma rigorosa e confiável.

TABELA 4 Composição físico-química média do leite, do soro e da mistura das cinco repetições.

Teor	Leite	EP*	Soro	EP	Mistura	EP	Calculado	% erro
Sólidos	11,72	0,68	6,61	3,45	10,68	2,62	10,94	2,38
Lactose	4,92	0,81	5,11	1,76	4,94	1,01	4,96	0,40
Gordura	3,26	4,38	0,6	6,67	2,62	5,73	2,62	0,00
Proteína	2,76	1,09	0,73	0,55	2,26	1,77	2,28	0,88

*EP = erro padrão da média (%)

Um fator que favorecerá a maior incidência da cristalização no doce é o baixo teor de proteína encontrado na mistura inicial, já que estas influenciam diretamente na viscosidade do produto final. Uma menor viscosidade favorecerá a nucleação secundária. Doces de leite fabricados por meio da tecnologia tradicional, ou seja, empregando somente leite, sacarose e bicarbonato de sódio, apresentam um teor médio de proteínas de 6,0% m/v. É esperado que uma mistura de leite e soro de leite acarrete em um doce com teor mais reduzido de proteínas. Fatores como baixo teor de lactose e elevado de proteínas no leite mantêm o doce de leite fora da faixa em que se torna arenoso (Santos 1976).

A composição dos doces obtidos sem microcristalização é apresentada na Tabela 5.

As composições apresentadas demonstram que, de modo geral, não houve uma variação considerável na composição do produto final. O teor de sacarose no doce foi o que mais variou perante os demais, apesar de terem sido empregados os mesmos teores de adição de açúcar e a determinação do ponto ter sido realizada com o refratômetro.

TABELA 5 Análise da composição do doce de leite de nucleação primária

Constituinte	Média das repetições (%)	Erro padrão da média (%)
Sólidos	70,67	1,63
Sacarose	43,33	5,25
Lactose	10,87	4,08
Gordura	5,62	2,7
Proteína	5,97	8,98

Este fato pode ser atribuído às diferenças na composição da matéria-prima e ao fato de que a quantidade de sacarose adicionada a uma fabricação deve estar relacionada ao teor de sólidos lácticos do leite. Os teores de lactose no produto variaram entre 10,62% a 11,98%, apresentando valor médio de 10,87%, o que pode gerar a falsa impressão de que os doces com maiores teores do constituinte são mais susceptíveis à cristalização. Porém o estudo da cristalização baseado somente nos teores de lactose é incompleto, já que não considera os teores de água e de sacarose.

Segundo Hunziker (1934), os teores de lactose em solução variam de acordo com a composição do leite e com a tecnologia empregada e, para leite condensado, os valores variam entre 27% a 31% de lactose em solução. De acordo com Santos (1976), os valores de lactose em solução para doce de leite variam de 23% a 24,4%.

Os teores calculados de lactose e sacarose em solução são demonstrados na Tabela 6.

Baseado nos resultados apresentados na Tabela 6 e no trabalho de Santos (1976), depreende-se que o doce de leite produzido a partir de uma mistura de

leite e soro possui um teor de lactose em solução mais elevado do que um produto sem o emprego de soro na tecnologia. Este fato, associado ao menor teor de proteína, torna o doce de leite oriundo de uma mistura de leite e soro altamente susceptível ao aparecimento de cristais de lactose. Dessa forma, é de se esperar a formação precoce da cristalização neste produto, quando comparado com o doce produzido a partir de leite somente.

Segundo Hosken (1969), uma formulação tradicional para a produção de doce de leite possibilita a formação de grande número de cristais de lactose perceptíveis e visíveis ao consumidor ao final de sessenta dias de armazenamento.

Os teores de sacarose em solução encontrados neste doce não atingem o valor de saturação deste dissacarídeo que, segundo Hunziker (1934), é de 64,5% de sacarose em solução. Dessa forma, não é esperado o aparecimento de cristais de sacarose no produto final, pois o doce não representa uma solução saturada deste dissacarídeo.

TABELA 6 Teores calculados de lactose e de sacarose em solução em doce de leite de nucleação primária.

Teores	Valores	Erro padrão da média
%sacarose	43,33	5,25
%lactose	10,87	4,08
%água	29,33	3,93
%sacarose em solução	59,60	2,86
%lactose em solução	27,06	3,98

Em todas as repetições não foi observado o aparecimento de cristais de lactose após 20 dias de armazenamento. Com 30 dias de estocagem, as análises microscópicas não evidenciaram o aparecimento de cristais, excetuando uma repetição na qual foi detectado um cristal com 158 μm . Entretanto, ao se retirar o doce das latas, foi notada a existência de alguns poucos cristais visíveis a olho nu, principalmente na tampa e no fundo da lata, em todas as repetições analisadas. Estes cristais estavam presentes no doce, porém, ausentes nas alíquotas das amostras analisadas.

O comportamento dos doces com 40, 50 e 60 dias de armazenamento foi o mesmo. Observou-se a formação de uma quantidade considerável de cristais visíveis nos doces, porém, a quantificação por meio da metodologia analítica empregada não foi possível, já que o tamanho dos cristais formados não permitia a análise. O acoplamento da lamínula à lâmina com a amostra de doce acarretava em quebra dos cristais, devido ao seu tamanho e, quando estes não eram quebrados, acabava por não possibilitar o perfeito acoplamento e, por conseguinte, a leitura no microscópio. Algumas tentativas para a observação microscópica demonstraram que os cristais possuíam tamanho superior à leitura máxima da escala empregada, que era de 180 μm . Na Figura 3 é possível observar cristais de lactose em doce de nucleação primária, após 30 dias de estocagem.

Estes resultados podem ser relacionados ao elevado teor de lactose na solução destes doces, associado ao baixo teor de proteínas existente e ao fato de não ter sido empregado nenhum mecanismo de controle da cristalização, como utilização de lactase, espessantes ou nucleação secundária.

Dessa forma, a utilização de soro na fabricação de doce leite acarretou a formação de cristais de lactose de grande tamanho e em pequeno número. A fotografia de um grande cristal de lactose, característico desta formulação é apresentada na Figura 3.

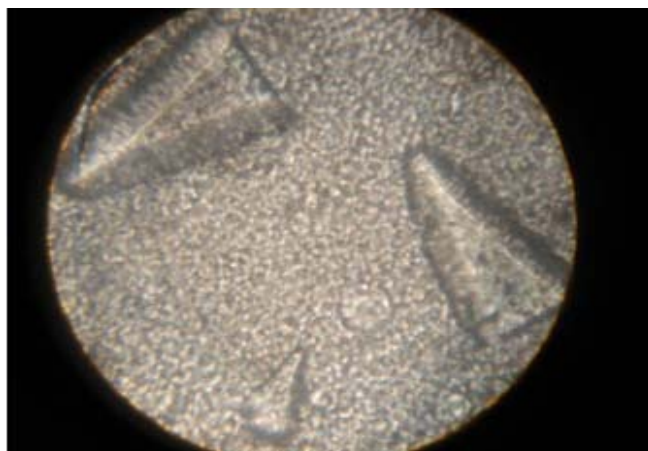


FIGURA 3 Fotografia de uma amostra de doce de nucleação primária (aumento de 400 vezes), com 30 dias de fabricação.

O excessivo tamanho dos cristais de lactose encontrados no doce impossibilitou a análise microscópica pelo método analítico adotado. Dessa forma, foi impossível a determinação da variação do tamanho dos cristais com o tempo, para a formulação de nucleação primária.

4.3 Tamanho dos cristais de lactose em doce de nucleação secundária

A composição do leite, do soro e da mistura empregados encontra-se na Tabela 4. A formação e o tamanho dos cristais de lactose oriundos da tecnologia de fabricação com o emprego da microcristalização foram estudados. Na Tabela 7 apresenta-se a composição dos doces de leite obtidos, sendo possível observar as médias e o erro padrão médio dos valores de composição do doce. Na Tabela 8 constam os teores calculados de lactose e de sacarose em solução.

TABELA 7 Composição físico-química do doce de nucleação secundária

Teor	(% m/v)	Erro padrão da média
Sólidos	71,99	3,21
Sacarose	47,11	5,44
Lactose	12,06	9,68
Gordura	5,36	11,79
Proteína	5,41	4,48

Com base nos estudos da Tabela 7, pode-se observar que ocorreu uma variação significativa na composição da maioria dos constituintes. Os teores de gordura, de lactose e de sacarose no produto final foram os que mais variaram, em comparação aos demais constituintes.

TABELA 8 Teores calculados de lactose e sacarose em solução

Valores	Repetição1	Repetição2	Repetição3	Repetição4	Repetição5
%sacarose	52,47	47,44	43,59	47,84	44,23
%lactose	9,52	14,37	11,68	12,39	12,34
%água	29,40	24,43	30,79	25,82	29,62
%sacarose em solução	64,09	66,01	58,60	64,95	59,89
%lactose em solução	24,46	37,04	27,50	32,43	29,41

A variação nos teores de gordura, lactose e sacarose enfatiza a necessidade da utilização de ferramentas de controle para a padronização do produto final. Nas repetições 2 e 4, de acordo com a Tabela 8, o teor de sacarose em solução superou o limite de saturação deste dissacarídeo em solução. Este dado indica que é possível o aparecimento de cristais de sacarose nestes doces. Porém, por meio das observações microscópicas, não foi observado cristal com geometria diferente da característica dos cristais de lactose. Pode-se, entretanto, considerar a possibilidade dos cristais de sacarose terem contaminado os cristais de lactose, ou seja, os cristais observados não são puramente de lactose, mas sim um híbrido entre os dois dissacarídeos. Esta hipótese não pôde ser comprovada pela metodologia analítica empregada.

Na Figura 4 observa-se a variação do tamanho médio dos cristais com o tempo.

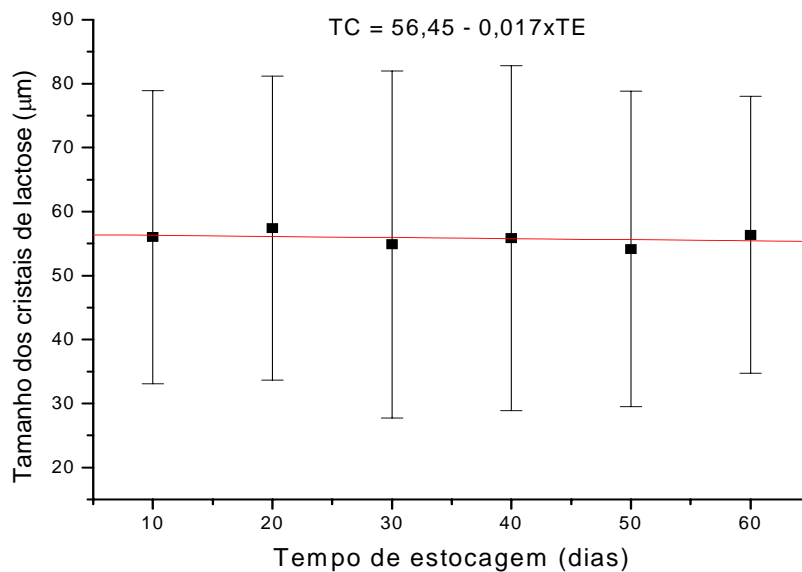


FIGURA 4 Variação do tamanho médio dos cristais, com o tempo, em doce de leite de nucleação secundária.

Na Figura 4 está representada, para a variação do tamanho médio dos cristais durante a estocagem das cinco repetições do experimento, a equação linear da reta, relativa à regressão linear dos dados, o gráfico e, em cada ponto, a variação determinada pelo desvio padrão. Pode-se observar, baseado nas barras paralelas ao eixo Y em cada ponto, que houve uma variação muito grande no tamanho dos cristais formados em cada repetição.

A análise das Figuras 5, 6, 7, 8 e 9 demonstra, para um mesmo aumento, que houve uma grande variação do tamanho dos cristais de lactose entre as repetições. Este fato pode ser atribuído à variação no teor de lactose na solução em cada doce obtido, que foi de 24,46% a 37,04%. Os valores encontrados para os teores da lactose em solução atingiram, nestes doces, valores superiores aos encontrados nas fabricações de nucleação primária, devido ao fato de terem apresentado menor teor de umidade, conseqüência de uma maior concentração durante a fabricação. O valor médio do teor de lactose na solução dos doces de nucleação primária foi de 27,06%, enquanto que, para os doces de nucleação secundária, foi de 30,17%. Este fato favorece a supersaturação da solução e, conseqüentemente, a formação dos cristais de lactose. Como o teor de lactose na solução é um fator fundamental na formação dos cristais, pois a força motriz desta etapa é a supersaturação, uma grande variação neste valor pode acarretar em modificações na formação dos cristais. Porém, ao se analisar a equação da reta, obtida por intermédio da regressão linear dos dados, nota-se que não houve variação significativa do tamanho dos cristais com o tempo, ou seja, a variável tamanho dos cristais independe da variável tempo de estocagem. Este fato é evidenciado pelo coeficiente angular da reta que se aproxima de zero, indicando que a equação encontrada é muito similar à equação de uma função constante e pela análise de variância. O comportamento observado foi o de que, independentemente do tamanho inicial dos cristais formados, ele não variou com o tempo de estocagem de até 60 dias.



FIGURA 5 Fotos dos cristais de lactose da repetição 1 (aumento de 400 vezes), com 10, 20, 30, 40 50 e 60 dias de fabricação.

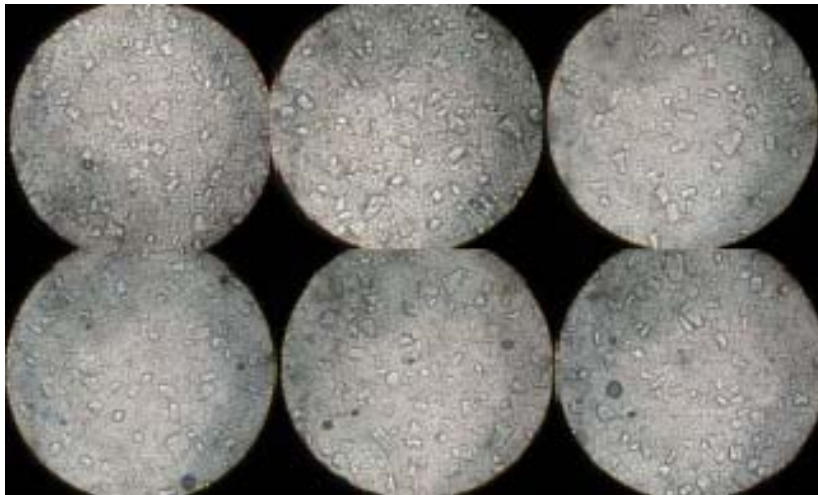


FIGURA 6 Fotos dos cristais de lactose da repetição 2 (aumento de 400 vezes), com 10, 20, 30, 40 50 e 60 dias de fabricação.



FIGURA 7 Fotos dos cristais de lactose da repetição 3 (aumento de 400 vezes), com 10, 20, 30, 40 50 e 60 dias de fabricação.

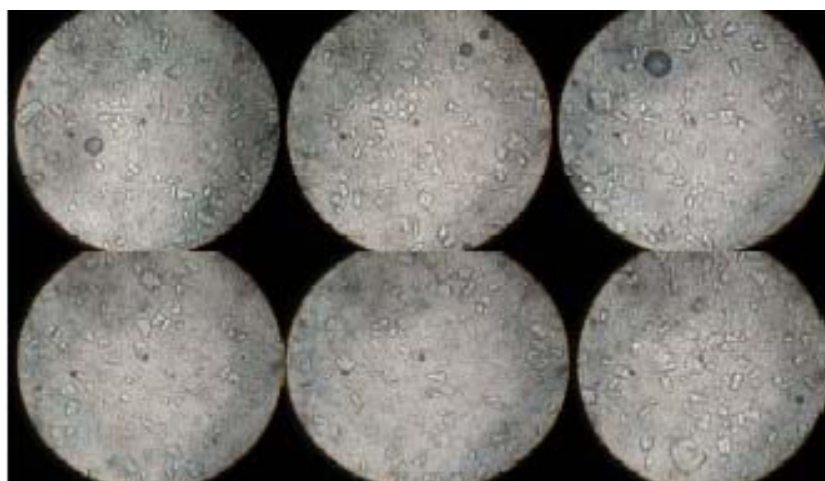


FIGURA 8 Fotos dos cristais de lactose da repetição 4 (aumento de 400 vezes), com 10, 20, 30, 40 50 e 60 dias de fabricação.



FIGURA 9 Fotos dos cristais de lactose da repetição 5 (aumento de 400 vezes), com 10, 20, 30, 40 50 e 60 dias de fabricação.

Durante os experimentos, foi realizada a análise microscópica de uma marca comercial de doce de leite, com quatro meses de fabricada, na qual foi empregado o processo de nucleação secundária. Na fabricação deste doce utiliza-se somente leite como matéria-prima e a concentração ocorre, inicialmente, em evaporadores a vácuo e, posteriormente, em tachos abertos. Após a determinação do ponto, os doces são resfriados a 39°C e enviados a tanques de cristalização, onde recebem a adição da lactose em pó e sofrem agitação pelo período de 30 minutos a uma hora. A temperatura de envase é ao redor de 30°C. Esta temperatura é exequível, pois, o envase é realizado de forma asséptica, prevenindo qualquer tipo de contaminação microbiológica. Os valores encontrados são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 Tamanho médio dos cristais em doces de nucleação secundária comercial e experimental.

Medidas	Doce de nucleação secundária em estudo	Doce de nucleação secundária do mercado
Tamanho médio dos cristais (μm)	56,2	68,0
Erro padrão da média	38,97	14,56

O tamanho dos cristais de lactose e a variação desta medida com o tempo são determinantes para a aceitação do doce de leite, pois, a percepção do defeito da arenosidade está diretamente relacionada ao tamanho dos cristais presentes no produto final. Pode-se observar, pelos dados da Tabela 10, que o tamanho médio dos cristais de lactose, presentes no doce de leite de nucleação secundária em estudo, é menor do que o da marca comercial analisado. A análise do desvio padrão indica que há uma maior variação no tamanho dos cristais no doce de leite de nucleação secundária em estudo.

Somando-se e subtraindo-se os respectivos desvios aos valores médios encontrados, tem-se que o doce de leite de nucleação secundária da marca comercial varia entre 58,1 e 77,9 μm , enquanto que o doce em estudo varia entre 34,3 e 78,1 μm . Os extremos encontrados anteriormente são muito próximos e a análise dos desvios somados e subtraídos das médias indica que 68,27% dos cristais, em ambos os doces, seguem a distribuição de tamanho apresentada pelos intervalos. Segundo Walstra et al (2001), em leite condensado, os cristais com tamanho superior a 8 μm causam uma textura desagradável. Já em doce de leite, de acordo com Hough et al. (1990), cristais com até 45 μm não causam textura arenosa, dependendo da quantidade encontrada. Terán-Ortiz (1998)

encontrou, em doce de leite de nucleação primária, cristais com tamanho superior a 200 μm e, ao utilizar gomas, com o intuito de inibir a cinética de cristalização em doce de leite, encontrou cristais com tamanhos variando entre 10 e 50 μm , porém, não foi realizada análise sensorial dos doces obtidos.

O tamanho dos cristais após a nucleação secundária é fundamental para o controle do processo, já que os mesmos apresentam a tendência de não crescerem durante o período de armazenamento. Dessa forma, pode-se concluir que o processo de microcristalização possibilita a manutenção dos cristais formados por todo o período de armazenamento e validade do produto. Hosken (1969) afirma que o processo de microcristalização do doce de leite é eficiente para evitar a formação de cristais perceptíveis no doce de leite.

Os valores médios para o tamanho e para o número dos cristais são apresentados na Tabela 11. De acordo com os dados da Tabela 11, o número de cristais de lactose por grama de doce variou de $3,65 \times 10^7$ a $4,38 \times 10^7$, tendo como valor médio $3,96 \times 10^7$. Resultado semelhante foi encontrado por Martinez et al. (1990) que, ao induzirem a nucleação secundária em doce de leite, encontraram um número de cristais por grama variando entre 5×10^4 a 8×10^8 cristais por grama de doce.

TABELA 11 Tamanho e número médio dos cristais de lactose

Dias	10	20	30	40	50	60
Número/g	$4,38 \times 10^7$	$3,91 \times 10^7$	$3,65 \times 10^7$	$3,78 \times 10^7$	$3,95 \times 10^7$	$4,38 \times 10^7$
Tamanho μm	56,00	57,42	56,02	55,86	54,78	56,37

A análise de variância para avaliar o efeito do tempo sobre o número de cristais formados não apresentou significância, ou seja, o tempo não interfere no número de cristais formados.

Isso demonstra que a utilização da temperatura inicial de 65°C não inibiu o processo de microcristalização. Dessa forma, o aumento na concentração de lactose no produto final, devido à utilização de uma mistura de leite e soro, possibilitou a utilização da temperatura de 65°C para o processo de microcristalização. Este fato permite a utilização do tacho aberto na tecnologia de fabricação de doce de leite. Empregando uma tecnologia tradicional, ou seja, tachos abertos e sem envase asséptico, é inviável o processo de microcristalização, pois a temperatura de inoculação é baixa, acarretando em problemas microbiológicos. O trabalho de Martinez et al. (1990), com doce de leite fabricado somente a partir de leite, confirma a impossibilidade da realização da microcristalização em tacho aberto, pois, a temperatura máxima alcançada para a microcristalização foi de 56°C.

5 CONCLUSÕES

Os testes preliminares realizados indicaram que a adição de amido na tecnologia de fabricação de doce de leite com nucleação secundária inibiu a formação dos cristais de lactose, nas condições empregadas.

No doce de leite elaborado com soro e sem sementeira de lactose ocorreu a cristalização primária da lactose durante o armazenamento após 40 dias, formando cristais visíveis a olho nu em pequeno número.

A utilização de uma mistura de leite e soro possibilitou que o processo de nucleação secundária ocorresse à temperatura de 65°C, o que possibilita a aplicação desta tecnologia em tachos abertos.

Durante o período de estocagem, não houve variação no tamanho dos cristais de lactose no doce de nucleação secundária, pois, a análise estatística demonstrou não existir correlação significativa entre o tempo e o tamanho dos cristais.

No doce de leite elaborado com soro e sementeira de lactose, ocorreu a cristalização secundária durante a fabricação, formando-se um grande número de cristais pequenos que, durante o tempo de armazenamento, foram estáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 307-324.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 151 p.

BOEKEL, M. A. J. S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. **Food Chemistry**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 403-414, Aug. 1998.

BOLANOWSKI, J. P. Controlled Crystallization – Key to product quality. **Food Engineering**, Philadelphia, v. 37, n. 12, p. 56-60, Dec. 1965.

COELHO, E. B. B.; COELHO, D. T.; PINHEIRO, A. J. R.; CHAVES, J. B. P.; PEREIRA, A. S. Utilização de beta-D-galactosidase no controle da cristalização do doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 37, n. 221, p. 7-11, maio/jun. 1982.

FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 157-223.

GEANKOPLIS, C. J. **Transport processes and unit operations**. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1993. 921 p.

HAAL, C. W.; HEDRICK, T. I. **Drying of milk products**. 2. ed. Westport: AVI Publishing, 1971. 323 p.

HAASE, G.; NICKERSON, T. A. Kinetic reactions of alpha and beta lactose: Crystallization. **Journal of dairy science**, Champaign, v. 49, n. 4, p. 757-761, Apr. 1966.

HARTEL, R. W. Controlling sugar crystallization in food products. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 11, p. 99-107, Nov. 1993.

HARTEL, Y. S. R. W.; LIANG, B. Formation and growth phenomena of lactose nuclei under contact nucleation conditions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 2906-2915, Nov. 1989.

HOLSINGER, V. H. Physical and chemical properties of lactose. In: FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1997. v. 3, p. 1-38.

HOSKEN, F. S. Doce de leite: durabilidade e cristalização. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 24, n. 147, p. 10-17, nov. /dez. 1969.

HOUGH, G.; MARTINEZ, E.; CONTARINI, A. Sensory and objective measurement of sandiness in dulce de leche, a typical argentine dairy product. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 3, p. 604-611, Mar. 1990.

HUNZIKER, O. F. **Condensed milk and milk powder**. 5. ed. La Grange, Illinois, 1934. 696 p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of milk proteins**. Brussels, 20B: 1993.

JANCIC, S. J.; GROOTSCHOLTEN, P. A. M. Nucleation: Mechanisms and sources of nuclei in industrial crystallizers. In: **Industrial crystallization**. Delft: Delft Universit Press, 1984. cap. 2, p. 15-37.

KREVEL, A. V.; MICHAELS, A. S. Measurement of crystal growth of α -lactose. **Journal of dairy science**, Champaign, v. 47, n. 3, p. 259-265, Mar. 1964.

MACCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. **Unit operations of chemical engineering**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1993. 1130 p.

MARGAS, M. M.; COELHO, D. T.; CHVES, J. B.; MARTYN, M. E. Influência da gordura, da glucose e do amido na cristalização do doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 37, n. 221, p. 25-30, maio/jun. 1982.

MARTINEZ, E.; HOUGH, G.; CONTARINI. Sandiness prevention in dulce de leche by seeding with lactose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73. n. 3. p. 612-616, Mar. 1990.

MARTINS, J. F. P.; LOPES, C. N. **Doce de leite**: aspectos da tecnologia de fabricação. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981. p. 1-37. (Instruções técnicas, n. 18).

- MONTES, E. J. N. Dados de solubilidade da lactose em diferentes temperaturas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n. 333, p. 259-260, 2003.
- MORALES, F. J.; BOEKEL, M. A. J. S. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 8, n. 10/11, p. 907-915, 1998.
- MORRISSEY, P. A, Lactose: chemical and physicochemical properties. In: FOX, P. F. **Developments in dairy chemistry**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. v. 3. p. 1-34.
- MUIR, D. D. Lactose. **Journal of the Society Dairy Technology**, Huntingdon Cambs, v. 43, n. 2, p. 33-34, May 1990.
- NICKERSON, T. A. Lactose crystallization in ice cream: Control of crystal size by seeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 37, n. 4, p. 1099-1105, Apr. 1954.
- NICKERSON, T. A. Lactose. In: WEBB, B. H.; JOHNSON, A. H.; ALFORD, J. A. **Fundamentals of dairy chemistry**. Westport: AVI Publishing, 1974. v. 1. p. 273-324.
- NICKERSON, T. A.; MOORE, E. E. Solubility interrelations of lactose and sucrose. **Journal of Food Science**. Chicago, v. 37, n. 1, p. 60-61, Jan. /Feb. 1972.
- PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; SILVA, P. H. F. da **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora, 2000. 190 p.
- PERRONE, I. T. **Tecnologia de fabricação de doce de leite: Instruções técnicas**. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Candido Tostes, 2000. 78 p.
- ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology: the microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. 258 p.
- SABIONE, J. G.; SILVA, D. O.; PINHEIRO, A. J. R.; BORGES, A. C.; CHAVES, J. B. P. Control of lactose crystallization in “Dulce de leche” by *Kluyveromyces lactis* fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 8, p. 1694-1698, Aug. 1984.

SANTOS, D. M. Arenosidade no doce leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 31, n. 185, p. 3-9, maio/jun. 1976.

SILVA, T. J. P.; PINHEIRO, A. J. R.; COELHO, D. T.; PEREIRA, A. S.; CHAVES, J. B. P. Utilização de Beta-D-galactosidase no processo contínuo de fabricação de doce de leite homogeneizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 39, n. 232, p. 19-30, mar./abr. 1984.

SOUSA, L. R. P. **Efeito da acidificação e do tratamento térmico do leite na qualidade do doce de leite**. 1979. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

TERÁN-ORTIZ, G. P. **Efeito de adição de gomas xantana e locusta na cinética de inibição de cristalização de açúcares em doce de leite**. 1998. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TWIEG, W. C.; NICKERSON, T. A. Kinetics of lactose crystallization. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 51, n. 11, p. 1720-1724, Nov. 1968.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M. A. J. S. **Ciência de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001. 729 p.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1984. 423 p.

WHITTIER, E. O. Lactose and its utilization: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 27, n. 7, p. 505-529, July 1944.

WOLFSCHOON-POMBO, A.; CASAGRANDE, M. Determinação simultânea de lactose e sacarose em doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 37, n. 222, p. 3-7, 1982.