



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA PAVÃO BATTAGLINI

**DIFRATOMETRIA DE RAIOS X COMO FERRAMENTA NA
DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE**

Londrina
2014

ANA PAULA PAVÃO BATTAGLINI

**DIFRATOMETRIA DE RAIOS X COMO FERRAMENTA NA
DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Profa. Dra. Vanerli Beloti

Londrina
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Battaglini, Ana Paula Pavão.

Difratometria de raios X como ferramenta na detecção de fraudes em leite / Ana Paula Pavão Battaglini. - Londrina, 2014.

84 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Leite - Adulteração e inspeção - Tese. 2. Lactose - Tese. 3. Raios X - Difração - Tese. 4. Ureia - Tese. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

ANA PAULA PAVÃO BATTAGLINI

**DIFRATOMETRIA DE RAIOS X COMO FERRAMENTA NA
DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal da
Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alexandre Urbano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Éder Paulo Fagan
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP

Profa. Dra. Kerli Cristina Médici
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Luciene Pretto Giordano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 5 de setembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Neusa, meus irmãos Gabriel e Marina, meus cunhados Mariana e Carlos Eduardo e minha sobrinha Julia;

À Professora Dra. Vanerli Beloti, pela orientação e dedicação durante toda minha formação de pós-graduação (residência, mestrado e doutorado), e também pela amizade e ensinamentos;

Ao Professor Dr. Alexandre Urbano, pela essencial colaboração principalmente na fase final deste trabalho;

Aos funcionários do DMVP/UEL, pelo apoio;

À todos os meus amigos, que me apoiaram nessa conquista;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram com a elaboração deste trabalho;

E, especialmente, ao meu namorado, Rafael, que me completa.

BATTAGLINI, Ana Paula Pavão. **Difratometria de raios X como ferramenta na detecção de fraudes em leite**. 2014. 84 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A adição de água ao leite é a fraude mais praticada e dificilmente é realizada de forma isolada. A detecção de fraudes em leite é uma tarefa difícil tanto para a indústria como para os órgãos de fiscalização. Assim, métodos alternativos para a inspeção de leite podem auxiliar na identificação de substâncias fraudulentas. A difração de raios X (DRX) é capaz de identificar substâncias quando presentes na forma de cristais, produzindo difratogramas com picos característicos. Substâncias intencionalmente adicionadas ao leite podem alterar os padrões cristalográficos e influenciar a cristalização da lactose do leite. O objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologia alternativa de detecção de fraudes em leite, verificando a capacidade da DRX em detectar alterações no perfil cristalográfico do leite. Para isso, substâncias adicionadas ao leite com a intenção de fraude, leite *in natura* e soluções padrão de lactose a 4,5% adicionadas de ureia, citrato de sódio e sacarose e foram submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e DRX. A MEV e a DRX mostrou a lactose como principal componente cristalizado no leite liofilizado. A intensidade dos picos de lactose do leite liofilizado variou dependendo da quantidade de sólidos e gordura naturalmente presentes no leite. A quantidade de sólidos totais do leite também influenciou a formação dos cristais de lactose. A técnica DRX foi capaz de detectar com precisão e rapidez o citrato de sódio e açúcar antes de serem adicionadas ao leite, ou quando adicionadas em altas concentrações. A DRX também foi capaz de identificar a presença de ureia em solução padrão de lactose a 4,5% nas três concentrações testadas. Porém, não foi capaz de detectar a presença de citrato de sódio e sacarose quando adicionadas em solução de lactose 4,5% nas concentrações comumente utilizadas na fraude de leite. A intensidade dos picos de lactose variou naturalmente no leite liofilizado, portanto não deve ser considerada quando se analisa alterações cristalográficas causadas pela adição de substâncias ao leite.

Palavras chave: Difração. Ureia. Citrato. Sacarose.

BATTAGLINI, Ana Paula Pavão. **X-ray difracction as a tool in cristallographic patterns changes of milk.** 2014. 84 p. Thesis (Doctor´s Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The addition of water to milk is the most widely practiced fraud, but this dilution is hardly added singly. Fraud detection in milk is a difficult task for industries and for regulatory agencies. Thus, alternative methods of milk inspection can assist in identifying fraudulent substances. The X-ray diffraction (XRD) is able to identifying crystallized substances, producing diffraction patterns with characteristic peaks. Intentionally added substances to milk may change its crystallographic pattern and influence the lactose crystallization. The aim of this study was to establish an alternative method of detecting fraudulent substances in milk, studding if XRD is able to detect changes in the crystallographic profile. The most common fraudulent substances urea, sodium citrate and sucrose, were added to fresh raw milk and to 4.5% lactose solution and then freeze-dried and analyzed by XRD and scanning electron microscopy (SEM). XRD and SEM showed lactose crystals as the main component in the freeze dried milk. The lactose solution intensity of the peaks was depending on the amount of solids and fat naturally present in milk. The amount of total solids also had influence on the formation of lactose crystals. The XRD technique was able to detect accurately and quickly sodium citrate and sucrose before being added to milk, or when added at high concentrations. XRD was also able to identify the presence of urea in the 4,5% lactose solution. However, it was not able to detect the presence of sodium citrate and sugcrose. The intensity of lactose peaks oscillated naturally in lyophilized milk and therefore should not be considered when analyzing crystallographic changes caused by the addition of substances to milk.

Key words: Diffraction. Urea. Citrate. Sucrose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – a) micro-estrutura de leite liofilizado – 1000x; b) setas contínuas indicam cavidades globulares da gordura na matriz proteica; setas pontilhadas indicam cristais de lactose – 4000x; c) glóbulo de gordura - 4000x; d) cristais de lactose - 12000x; e) glóbulos de gordura – 24000x; f) esferulitos de gordura – 50000x31
- Figura 2** – Somatória dos difratogramas de 20 amostras de leite liofilizado; picos representam a lactose32
- Figura 3** – Difratograma da substância em pó (substância A), identificada como citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (PDF number 00-016-1170). Linhas verticais sobre o gráfico indicam picos de citrato de sódio.....45
- Figura 4** – Difratograma da substância em gel (substância B), identificada como sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) (PDF number 00-0124-1977). Linhas verticais sobre o gráfico indicam picos de sacarose.....46
- Figura 5** – Difratogramas da solução padrão de lactose a 4,5% e desta solução com ureia 0,1%, ureia 0,5% e ureia 1,0%.....52
- Figura 6** – Difratogramas da solução padrão de lactose a 4,5% e desta solução com citrato de sódio 0,1% e citrato de sódio 0,25%52
- Figura 7** – Difratogramas da solução padrão de lactose a 4,5% e desta solução com sacarose 0,5% e sacarose 1,0%.....53
- Figura 8** – Difratogramas da solução padrão de lactose a 4,5% adicionada de 0,1, 0,5 e 1,0% de ureia54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Influência de diferentes substâncias na cristalização da lactose	15
Tabela 2	–	Mediana (<i>Mdn</i>) e desvio padrão (σ) e valores mínimos e máximos do pH, gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG) e ureia das 20 amostras de leite cru refrigerado.....	33
Tabela 3	–	Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) da intensidade dos picos de lactose que aparecem em mais de 80% das 20 amostras de leite liofilizado	34
Tabela 4	–	Índice de correlação (r) entre os componentes do leite e a intensidade dos picos de lactose de maior intensidade e a cristalinidade das 20 amostras de leite liofilizado.....	34
Tabela 5	–	Características físico-químicas da solução aquosa da substância A a 4% (Amostra A) e da substância B a 10% (Amostra B) enviadas para a rotina do laboratório de inspeção de leite da UEL	42
Tabela 6	–	Crioscopia e densidade do leite sem fraude e com adição de 4% da substância A e 10% da Substância com 10% de água	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRX	Difração de raios X
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
<i>Mdn</i>	Mediana
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
SNG	Sólidos não gordurosos
ST	Sólidos totais
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>r</i>	Índice de correlação
α	Alfa
β	Beta
κ	Kapa
\bar{x}	Média
g	Gramma
mg	Miligramma
L	Litro
dL	Decalitro

SUMÁRIO

1	ESTADO DA ARTE	12
1.1	INTRODUÇÃO	12
1.2	CRISTALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO LEITE	13
1.2.1	Cristalização da lactose.....	14
1.2.2	Cristalização da caseína	15
1.2.3	Cristalização da gordura do leite	16
1.2.4	Cristalização dos sais orgânicos e inorgânicos do leite.....	17
1.3	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)	17
1.4	FRAUDES EM LEITE	19
2	REFERÊNCIAS	20
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL	25
3.1.1	Objetivos específicos.....	25
4	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	26
4.1	CARACTERIZAÇÃO MICRO-ESTRUTURAL DO LEITE CRU LIOFILIZADO	26
4.1.1	Resumo	26
4.1.2	Abstract	27
4.1.3	Introdução	28
4.1.4	Material e Métodos	28
4.1.5	Resultados e Discussão	30
4.1.6	Conclusões.....	35
4.1.7	Referências	36
4.2	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X APLICADA À INSPEÇÃO DE LEITE NA DETECÇÃO DE FRAUDES.....	39
4.2.1	Resumo	39
4.2.2	Abstract	40
4.2.3	Introdução	41
4.2.4	Material e Métodos	41
4.2.5	Resultados e Discussão	42

4.2.6	Conclusões.....	46
4.2.7	Referências	47
4.3	ALTERAÇÕES CRISTALOGRÁFICAS DA LACTOSE PELA ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS EM FRAUDE NO LEITE: UREIA, CITRATO DE SÓDIO E AÇÚCAR.....	49
4.3.1	Resumo	49
4.3.2	Abstract	50
4.3.3	Introdução	51
4.3.4	Material e Métodos.....	51
4.3.5	Resultados e Discussão	52
4.3.6	Conclusões.....	55
4.3.7	Referências	55
5	CONCLUSÕES FINAIS	57
ANEXOS	58
ANEXO A –	Padrões e referências de lactose α -lactose β -lactose.....	59
ANEXO B –	Padrões de referência da ureia.....	66
ANEXO C –	Padrões de referência do citrato de sódio	68
ANEXO D –	Padrões de referência da sacarose	71
APÊNDICES	74
APÊNDICE A –	Difratogramas das 20 amostras de leite cru liofilizado.....	75
APÊNDICE B –	Difratograma da solução de lactose a 4,5% e desta solução adicionada de ureia, citrato de sódio e açúcar em diferentes concentrações.....	82

1 ESTADO DA ARTE

3 1.1 INTRODUÇÃO

5 O leite é constituído por mais de 100.000 estruturas moleculares,
6 sendo os principais constituintes a gordura, proteína (caseína e proteínas do soro do
7 leite), lactose, sais minerais, cinzas e água (HUI, 1993; VALSECHI, 2001). A maioria
8 destes constituintes se encontra na forma de grandes estruturas, complexas e
9 associadas.

10 O maior componente do leite, a água representa cerca de 87% da
11 sua composição. É o meio dispersante para formação de uma emulsão (gordura),
12 uma suspensão coloidal (caseína) e uma solução (lactose e sais) (HUI, 1993).

13 O leite bovino possui em média 3,5% de proteínas, sendo que a
14 caseína representa 75 - 80% das proteínas totais do leite e são compostas
15 essencialmente pela α 1-caseína, α 2-caseína, β -caseína e κ -caseína. A estrutura
16 interna da micela de caseína é constituída predominantemente por α 1-, α 2-, β -
17 caseína e nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto que a κ -caseína
18 está localizada preferencialmente na superfície da micela (FOX; McSWEENEY,
19 1998). Os outros 20 - 25% são compostos por proteínas do soro do leite, que são a
20 β -lactoglobulina (9,5% do nitrogênio total do leite), a α -lactoalbumina (3,5%), as
21 imunoglobulinas (2%) e a soralbumina bovina (1%). Além destas, há diversas outras
22 espécies proteicas distintas, em quantidades muito pequenas (ORDONEZ, 2005).

23 A lactose é o principal carboidrato do leite e sua concentração varia
24 conforme a espécie, com média de 4,5% para leite bovino. Em solução, pode ser
25 encontrada sob a forma de α (61,5%) e β -lactose (38,5%), os quais são anômeros
26 (BRITO, 2007).

27 No leite fluído, a gordura está distribuída em glóbulos que variam de
28 0,1 à 15 μ m e em quantidades médias de 4,5% (FOX; McSWEENEY, 2006). A
29 gordura do leite contém mais de 400 diferentes ácidos graxos, dos quais 12 estão
30 presentes em proporções superiores a 1% (JENSEN, 2002). A gordura do leite é o
31 componente que mais sofre variação, sendo influenciada pela raça, idade,
32 alimentação e estágio de lactação. No Brasil existe uma enorme variação na
33 quantidade de gordura encontrada no leite.

1 Os sais presentes no leite representam uma pequena parte dos
2 sólidos, cerca de 8-9 g/L. Essa fração contém cálcio, magnésio, sódio e potássio
3 como principais cátions e fosfato inorgânico, citrato e cloreto como os principais
4 anions. No leite, esses íons podem estar associados com maior ou menor
5 intensidade entre eles e entre as proteínas. Dependendo do tipo de íon, eles podem
6 estar difusos (sódio, potássio e cloreto) ou parcialmente associados com moléculas
7 de caseína (cálcio, magnésio, fosfato e citrato), formando grandes partículas
8 coloidais chamadas de micelas de caseínas. A fração mineral do leite tem sido
9 objeto de estudo por mais de 60 anos. A maioria dessas pesquisas podem ser
10 separadas em 2 categorias: (1) pesquisas aplicadas estudando o comportamento
11 dos minerais durante processos industriais ou sua influência na tecnologia de
12 produtos lácteos; (2) pesquisas básicas estudando a características físico-químicas,
13 como concentração, solubilidade e associações, especialmente para fosfato de
14 cálcio (GAUCHERON, 2005).

16 1.2 CRISTALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO LEITE

18 A cristalização é um processo físico de transformação de compostos
19 químicos em cristais. Quando a cristalização é induzida, as propriedades dos cristais
20 dependem da supersaturação, concentração dos reagentes, temperatura, taxa de
21 agitação e dos processos de nucleação, crescimento, envelhecimento,
22 amadurecimento, agregação dos cristais e transição de fase (KEDWARD et al.,
23 2000). Geralmente, a cristalização é um processo composto de dois principais
24 passos: a nucleação e o crescimento do núcleo.

25 A nucleação é a primeira etapa do processo de cristalização,
26 envolvendo a formação de cristais a partir de uma solução supersaturada. A
27 nucleação ocorre devido à aglomeração ou agregação de moléculas ou íons
28 (HARTEL; SHASTRY, 1991).

29 Na segunda etapa, o mecanismo de crescimento de um cristal é
30 constituído por três fases sucessivas: (1) transporte da massa (difusiva ou
31 convectiva) do centro para a superfície do cristal, (2) reação/interação da superfície
32 com o centro, (3) transporte de calor latente durante o crescimento dos cristais
33 (NICKERSON; MOORE, 1974; HARTEL; SHASTRY, 1991).

34 Segundo Mullin (1993), a morfologia de um cristal depende das

1 taxas de crescimento nas diferentes faces cristalográficas. Algumas faces crescem
2 mais rápidas e apresentam um pequeno ou mesmo nenhum efeito sobre a forma de
3 crescimento, já as faces que apresentam maiores influências são as que crescem
4 em uma menor velocidade.

5 Já a agregação é a formação de agrupamento de cristais unidos por
6 forças físicas ou pontes cristalinas que contribui para o aumento médio do produto
7 cristalino durante a cristalização em massa (NÝVLT, 1985; LINNIKOV, 2008). Esses
8 agregados geralmente são formados quando há um crescimento rápido de cristais
9 em contato um com o outro (SHI; LIANG; HARTEL, 2006).

10 Vários fatores podem alterar a formação de cristais. A composição
11 estrutural, o pH, a temperatura e a velocidade durante a formação dos cristais, a
12 atividade de água e a quantidade de oxigênio são alguns dos fatores que
13 influenciam o processo de cristalização (VEGA; ROOS, 2007; SOMOLI; DAS;
14 LANGRISH, 2013). Aditivos e impurezas, intencionalmente adicionadas ou
15 naturalmente presentes na solução, também podem influenciar o padrão cristalino de
16 um composto (WONG; HARTEL, 2014).

17 18 1.2.1 Cristalização da Lactose

19
20 O padrão cristalográfico da lactose, seus anômeros, cristais e
21 precipitados pode ser avaliado pela difratometria de raios X (DRX), tanto no leite
22 integral liofilizado, como em solução alcoólica, revelando possíveis semelhanças e
23 diferenças entre os picos de difração de leites normais e fraudados (NIJDAM et al.
24 2007).

25 Em imagens microscópicas, os cristais de lactose podem apresentar
26 diversas formas, dependendo dos tipos e condições de cristalização (NICKERSON
27 et al., 1974). A cristalização da lactose é influenciada por diversos fatores, como a
28 variação da velocidade e da temperatura durante a cristalização. Isto significa que a
29 forma e ordem dos cristais dependem das condições de cristalização (SOMOLI;
30 DAS; LANGRISH, 2013). Por exemplo, na cristalização lenta, a α -lactose
31 monohidratada apresenta cristais na forma de *tomahawk* (ou cunha/machadinho),
32 enquanto os cristais de β -lactose apresentam uma forma de diamante irregular
33 (LISTIOHAD et al., 2005).

34 Além disso, a presença conjunta de outras substâncias durante a

1 cristalização da lactose afeta seu hábito cristalino. Essas substâncias podem:

- 2 1) Reduzir a solubilidade da lactose, levando a um maior grau de
- 3 supersaturação e, em consequência, a um aumento na taxa de crescimento;
- 4 2) Retardar o crescimento dos cristais (CLYDESDALE; ROBERTS; DOCHERTY,
- 5 1994);
- 6 3) Criar pontos de supersaturação de lactose, favorecendo a nucleação, a
- 7 promoção de pequenos cristais/núcleos e retardando o crescimento dos
- 8 cristais (MIMOUNI; SCHUCK; BOUHALLAB, 2005).

9 Na Tabela 1 estão listadas as principais substâncias que podem
10 influenciar a cristalização da lactose e seu impacto na formação dos cristais de
11 lactose.

12
13 **Tabela 1.** Influência de diferentes substâncias na cristalização da lactose.

Substâncias	Impacto
Proteína do soro do leite	Retém água e cria pontos de supersaturação de lactose que são favoráveis para a nucleação, resultando na produção de pequenos cristais/núcleos e retardando o crescimento do cristal.
Gordura do leite	Atua como barreira hidrofóbica e limita o crescimento dos cristais de lactose.
Riboflavina	Retarda o crescimento do cristal na direção de um eixo, formando faces trapezoidais.
Sais minerais	Podem aumentar ou diminuir a taxa de crescimento, promover ou inibir o crescimento dos cristais e reduzir o rendimento da cristalização da lactose, dependendo do tipo de sal e suas combinações.
β -lactose	Influencia o tipo de cristais produzidos. Inibe o crescimento de cristais do tipo agulha ou formam cristais do tipo prismas.
Sacarose	Evita o desenvolvimento completo dos cristais de lactose, produzindo cristais curtos e grossos com pouco desenvolvimento do ápice e da base. Nenhum efeito sobre o cristal de α -lactose.
Álcool	Reduz a solubilidade da lactose e a nucleação espontânea.

14 Fonte: adaptado de WONG; HARTEL, 2014.

15 16 1.2.2 Cristalização da Caseína

17
18 A cristalografia da caseína aparece em pesquisas não envolvendo o
19 setor alimentício, no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis (VAZ et al.
20 2003).

21 Em relação à caseína, a difratometria tem seu uso limitado. A sua
22 estrutura micelar possui grande variabilidade e a organização espacial não se repete
23 em padrões. Ainda, há discordância entre autores sobre os diferentes tamanhos que
24 a micela pode assumir. Outras variações estruturais podem ser consideradas: entre

1 as micelas de uma única vaca e entre as micelas de lotes de diferentes animais
2 (WALSTRA; KLOEK; VAN VLIET, 2001). Todas essas características fazem a
3 caseína ser amorfa, inviabilizando estudos sobre seu padrão cristalográfico em leite
4 e derivados.

5 Porém, há estudos sobre DRX em polímeros industriais que utilizam
6 caseína em sua composição, como colas, adesivos e vernizes. Nesses casos há um
7 rearranjo estrutural com outras moléculas, fazendo com que o composto possua
8 uma relativa ordenação e repetição molecular (JIA; DU, 2006).

10 1.2.3 Cristalização da Gordura do Leite

11
12 Triglicerídeos têm a capacidade de cristalização, porém, a ampla
13 diversidade de compostos presentes na sua composição resulta em diferentes
14 padrões de cristalização. Vários fatores afetam a cristalização de lipídeos, como o
15 resfriamento, temperatura final e agitação (HERRERA; HARTEL, 2000). O rápido
16 resfriamento sob agitação intensa forma cristais menores e mais uniformes (TIMMS,
17 1995; WRIGHT et al., 2001; CAMPOS et al., 2002; WIKING et al. 2009). Por outro
18 lado, o resfriamento lento sob agitação suave leva à formação de cristais grandes,
19 visíveis a olho nu. Com agitação suave, os cristais podem formar aglomerados de
20 esferulitos com tamanhos de centenas de micrômetros (WRIGHT et al., 2001;
21 TIMMS, 1995). Segundo Walstra; Kloe; Vliet (2001) existem dois tipos de
22 cristalização de gordura. A primeira é a cristalização do creme e está relacionada à
23 processos tecnológicos na sua transformação em manteiga e sorvetes. O segundo
24 tipo é a cristalização da gordura em um glóbulo de gordura, ocorrendo em
25 temperaturas menores, próximas a zero grau centígrado. O arranjo desses cristais
26 também é diferente e se houver cristais suficientes em um glóbulo, pode haver
27 floculação, o que é responsável pela rigidez do mesmo, influenciando na sua
28 coalescência e separação da gordura do leite fluído.

29 A raça e alimentação do animal também exercem influência sobre a
30 composição dos ácidos graxos, que tem impacto direto sobre sua cristalização (SHI;
31 SMITH; HARTEL, 2001; BERTRAM et al, 2005).

32 Os cristais de gordura podem ser classificados de acordo com sua
33 estrutura em α , β' e β . A forma polimórfica β' é a mais comum na gordura do leite,
34 com forma de esferulito (ROUSSEAU; HILL; MARANGONI, 1996). Várias

1 organizações cristalinas diferentes podem ser encontradas simultaneamente na
2 gordura do leite (LOPEZ et al., 2005).

3 Mazzanti et al. (2004) analisaram a gordura do leite por difração de
4 raios X e observaram que o resfriamento da gordura do leite a altas velocidades e
5 baixas temperaturas resultou na formação de cristais na forma α metaestável, que
6 posteriormente resultaram na formação de uma mistura de cristais dos tipos β' e β .
7 Ao contrário, a cristalização realizada a baixas velocidades de resfriamento e altas
8 temperaturas finais de cristalização resultou na formação de cristais apenas do tipo
9 β' , sem a presença de cristais dos tipos α ou β .

11 1.2.4 Cristalização dos Sais Orgânicos e Inorgânicos do Leite

13 Sais orgânicos e inorgânicos também podem ter seu padrão
14 cristalográfico explorado pela técnica de difração de raios X.

15 Nem todos os sais estão em solução ou ionizados e quando se
16 apresentam dessa forma são chamados de coloidais. As moléculas de caseína
17 contém fosfato de cálcio coloidal, além Mg, citrato, Na e K, os quais são amorfos,
18 sem capacidade de trocas iônicas e de composição variada (CULLITY, 1978).

19 Os sais solúveis estão no soro do leite e apresentam padrão
20 cristalográfico definido. Esses elementos podem estar sob a forma de cátions (K^+ ,
21 Na^+ , $CaCl^+$, etc), ânions (Cl^- , Citrato⁻³, SO_4^{-2} , etc) ou neutros (KCl, NaCl, $CaSO_4$, etc).

22 No estudo da cristalografia do leite integral *in natura*, os sais tem
23 fundamental importância devido à sua interferência na formação dos cristais de
24 lactose.

26 1.3 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

28 A difração de raios X (DRX) representa o fenômeno de interação
29 entre o feixe de raios X incidente e os elétrons dos átomos de um material,
30 relacionado ao espalhamento coerente. Quando os átomos que geram o
31 espalhamento dos raios X estão arranjados de forma simétrica, como em uma
32 estrutura cristalina, verificam-se padrões e periodicidade na intensidade de difração.
33 No difratômetro tradicional a captação do eixo difratado é feita por meio de um
34 detector, segundo um arranjo geométrico conhecido como a geometria Bragg-

1 Brentano, que habilita a obtenção do ângulo 2θ . O feixe difratado é expresso através
2 de picos, registrados num espectro de intensidade versus o ângulo 2θ , formando o
3 padrão difratométrico ou difratograma. As intensidades obtidas em ângulos 2θ ,
4 representadas através dos picos nos difratogramas, correspondem à difração do
5 feixe incidente por um determinado conjunto de planos do cristal. As informações
6 obtidas de cada pico são a intensidade, a posição angular (2θ) ou distância
7 interplanar (d) e o perfil. A intensidade e perfil dos picos são afetadas não só por
8 sobreposições dos planos de reflexão, como também por efeitos físicos,
9 instrumentais e por características de cada amostra, bem como de efeitos de
10 preparação da amostra analisada (KLUG; ALEXANDER, 1974; CULLITY, 1978).

11 Cada composto cristalino apresenta um padrão difratométrico
12 característico, permitindo sua identificação através das posições angulares e
13 intensidades relativas dos picos difratados (CULLITY, 1978). Um banco com mais de
14 70.000 compostos é mantido pelo *International Center for Diffraction Data* nos EUA.
15 Esse banco de dados é formado por cartões com os padrões de referência do
16 composto químico, que é usado para identificar o material estudado (modelos de
17 cartões em anexo).

18 A DRX em produtos lácteos é mais usada em estudos reológicos de
19 queijos, doces e soro de leite em pó. As principais estruturas que têm seu padrão
20 cristalográfico estudado são a lactose e os triglicerídeos (VEGA; ROOS, 2007). No
21 leite fluído esses componentes estão amorfos e quando são processados
22 tecnologicamente podem originar cristais. Na liofilização (*freeze-drying*), um
23 processo de desidratação na ausência de ar atmosférico e em baixa temperatura,
24 promove a formação de cristais e as propriedades físico-químicas do leite são
25 mantidas quase que inalteradas (GAVA; FRIAS; SILVA, 2009).

26 A associação das técnicas de DRX e microscopia eletrônica de
27 varredura (MEV) é importante para a caracterização micro-estrutural e composição
28 química dos produtos lácteos. Com a (MEV) é possível observar e analisar
29 características micro-estruturais de objetos sólidos - um instrumento pode alcançar
30 uma resolução melhor que 1 nm. Outra característica importante do MEV é a
31 aparência tridimensional da imagem das amostras (NAGATANI et al., 1987), o que
32 possibilita maior compreensão sobre sua organização.

1 1.4 FRAUDES EM LEITE

2

3 Qualquer adição ou subtração de substâncias no leite antes de seu
4 beneficiamento é proibida por lei, além de trazer riscos à saúde pública (BRASIL,
5 2011). As fraudes mais praticadas são a adição de água, reconstituintes de
6 densidade, neutralizantes de acidez e substâncias conservadoras (TRONCO, 2008;
7 KARTHEEK et al., 2011). A adição de água tem como único objetivo aumentar o
8 volume de leite. Essa fraude dificilmente é realizada de forma isolada devido à
9 facilidade das provas de rotina (crioscopia e densidade) em detectar a adulteração.
10 Alterações do índice crioscópico do leite são frequentemente observadas em
11 trabalhos realizados em todo o Brasil (SOUZA, et al., 2011; GIOMBELLI et al.,2011),
12 assim como a presença de substâncias reconstituintes de densidade, como açúcar,
13 sal e farinha (MENDES, et al. 2010; FIRMINO et al., 2010; ROSA-CAMPOS et al.,
14 2011).

15 Nos últimos anos, as fraudes em leite se tornaram mais elaboradas,
16 com a adição simultânea de diversas substâncias e em quantidades equilibradas
17 que podem confundir os testes utilizados no controle de qualidade da indústria de
18 laticínios. Além disso, outras substâncias de difícil detecção por provas de rotina
19 podem estar sendo utilizadas.

2 REFERÊNCIAS

BERTRAM, H.C.; WIKING, L.; NIELSEN, J.H.; ANDERSEN, H.J. Direct measurement of phase transitions in milk fat during cooling of cream - A low-field NMR approach. **International Dairy Journal**, v.15, p.1056–1063, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dezembro de 2011, Seção 1, 2011.

BRITO, A.B.N. **Estudo da cristalização da lactose em diferentes solventes**. 2002. 200 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, SP, 2007.

CAMPOS, R.; NARINE, S.S.; MARANGONI, A.G. Effect of cooling rate on the structure and mechanical properties of milk fat and lard. **Food Research International**, v.35, p.971–981, 2002.

CLYDESDALE, G.; ROBERTS, K.J.; DOCHERTY, R. Modelling the morphology of molecular crystals in the presence of disruptive tailor-made additives. **Journal Cryst Growth**, v.135, n.1–2, p.331–340, 1994.

CULLITY, B.D. **Elements of X-ray diffraction**, 2ed. London: Addison-Wesley Publishing Company, 1978. 555p.

FIRMINO, F.C.; TALMA, S.V.; MARTINS, M.L.; LEITE, M.O.; MARTINS, A.D.O. Detecção de fraudes em leite cru de tanques de expansão da região do rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.65, n. 376, p.5-11, 2010.

FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry 2: Lipids**. Third ed. Springer: New York, 2006. 224p.

FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Blackie Professional & Academic: London, 1998.

- 1 GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**,
2 v.45, p.473-483, 2005.
- 3
- 4 GAVA, A.J.; FRIAS, J.R.G.; SILVA, C.A.B da. **Tecnologia de Alimentos: Princípios**
5 **e Aplicação**. 1. ed. 2009. 152p.
- 6
- 7 GIOMBELLI, C.J.; TAMANINI, R.; BATTAGLINI, A.P.P.; MAGNANI, D.F.; ÂNGELA,
8 H.L.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e dos
9 parâmetros enzimáticos de leite pasteurizado e leite tipo B, produzidos no Paraná.
10 **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.4, p.1539-1546, 2011.
- 11
- 12 HARTEL, R.W.; SHASTRY, A.V. Sugar crystallization in food products. **Critical**
13 **Reviews Food Science Nutrition**, v.30, n.1, p.49–112, 1991.
- 14
- 15 HERRERA, M.L.; HARTEL, R.W. Effect of processing conditions on physical
16 properties of a milk fat model system: microstructure. **Journal of the American Oil**
17 **Chemists Society**, v.77, p.1197–1204, 2000.
- 18
- 19 HUI, Y.H. **Dairy Science and Technology Handbook**. 1 ed. London: Wiley-VCH,
20 1993, p.400-475.
- 21
- 22 JENSEN, R.G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December
23 2000. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.295–350, 2002.
- 24
- 25 JIA, Z.; DU, S. Grafting of casein onto polyacrylonitrile fiber for surface modification.
26 **Fibers and polymers**, v.7, n.3, p.235-240, 2006.
- 27
- 28 KARTHEEK, M.A.; SMITH, A.; KOTTAIMUTHU, A.; MANAVALAN, R. Determination
29 of adulterants in food: a review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical**
30 **Research**, v.3, n.2, p.629-636, 2011.
- 31
- 32 KEDWARD, C.J.; MACNAUGHTAN, W.; MITCHELL, J.R. Isothermal and non-
33 isothermal crystallization in amorphous sucrose and lactose at low moisture contents.
34 **Carbohydrate Research**, p.423-430, 2000.

- 1 KLUG, H.P e ALEXANDER, L.E. **X-ray diffraction procedures for polycrystalline**
2 **and amorphous materials**. 2ed. Jonh Willey & Sons: London, 1974. 996p.
3
- 4 LINNIKOV, O.D. Mechanism of aggregation and intergrowth of crystals during bulk
5 crystallization from solutions. **Crystal Research and Technology**, v.43, n.12,
6 p.1268–1277, 2008.
7
- 8 LISTIOHADI, Y.D.; HOUIGAN, J.A.; SLEIGH, R.W.; STEELE, R.J. Properties of
9 lactose and its caking behaviour. **Australian Journal Dairy Technologic**, v.60, n.1,
10 p.33–52, 2005.
11
- 12 LOPEZ, C.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; OLLIVON, M. Thermal and structural
13 behavior of anhydrous milk fat. 3. Influence of cooling rate. **Journal Dairy Science**,
14 v.88, n.2, p.511-526, 2005.
15
- 16 MAZZANTI, G.; GUTHRIE, S.; SIROTA, E. B.; MARANGONI, A. G.; IDZIAL, H. J.
17 Effect of minor components and temperature profiles on polymorphism in milk fat.
18 **Crystal Growth and Design**, v.4, p.1303–1309. 2004.
19
- 20 MENDES, C.G.; SAKAMOTO, S.M.; SILVA, J.B.A.; JÁCOME, C.G.M.; LEITE, A.I.
21 Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal produzido no
22 município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.2, p.349-356, 2010.
23
- 24 MIMOUNI, A.; SCHUCK, P.; BOUHALLAB, S. Kinetics of lactose crystallization and
25 crystal size as monitored by refractometry and laser light scattering: effect of
26 proteins. **Lait**, v.85, n.4–5, p.253–260, 2005.
27
- 28 MULLIN, J.W. **Crystallization**. 3rd. ed. London: Butterworth-Heinemann, 1993.
29
- 30 NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high
31 resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-
32 lens system. **Scanning Microscopy**, v.11, 901-909, 1987.
33

- 1 NÝVLT, J. **Tthe kinects of industrial crystallization**. Amsterdam: Elsevier Science
2 Publishers, 1985.
- 3
- 4 NICKERSON, T.A.; MOORE, E.E. Alpha lactose and crystallization rate. **Journal**
5 **Dairy Science**, v.57, n.2, p.160–164,1974.
- 6
- 7 NIJDAM, J.; IBACH, A.; EICHHORNAND, K; KIND, M. An X-ray diffraction analysis of
8 crystallised whey and whey-permeate powders. **Carbohydrate Research**, n.342, p.
9 2354–2364, 2007.
- 10
- 11 ORDONEZ, J.A. **Tecnologia de alimentos: produtos de origem animal**. Porto
12 Alegre: Artmed, 2005.
- 13
- 14 ROSA-CAMPOS, A.A.; ROCHA, J.E.S.; BORGGO, L.A.; MENDONÇA, M.A.
15 Avaliação físico-química e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado integral tipo C
16 produzido na região de Brasília, Distrito Federal. **Revista do Instituto de Laticínios**
17 **Cândido Tostes**, v.66, n. 379, p.30-34, 2011.
- 18
- 19 ROUSSEAU, D.; HILL, A.R.; MARANGONI, A.G. Restructuring butterfat trough
20 blending and chemical interesterification. 2 - Microstructure and polymorphism.
21 **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.73, p.973–981,1996.
- 22
- 23 SHI, Y.; SMITH, C.M.; HARTEL, R.W. Compositional effects on milk fat
24 crystallization. **Journal Dairy Science**, v.84, p.2392-2401, 2001.
- 25
- 26 SHI, Y.; LIANG, B.; HARTEL, R.W. Crystal refining Technologies by controlled
27 crystallization. U.S. patent US 2006/0128953 A1, 2006.
- 28
- 29 SOMOLI, M.E.; DAS, D.; LANGRISH, T.A.G. Crystallization behavior of
30 lactose/sucrose mixtures during water-induced crystallization. **Journal of Food**
31 **Engineering**, v.116, n.4, p.873-880, 2013.
- 32
- 33 SOUSA, F.; SILVA, L.; SOUSA, E.; SILVA, J.; FEITOSA, M. Análises físico-químicas
34 e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado tipo C. **Caderno Verde de**

- 1 **Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v., n.1, 2011.
- 2
- 3 TIMMS, R.E. Crystallization of fats. In: HAMILTON, R. J. **Developments in oils and**
- 4 **fats**. London: Chapman & Hall, 1995, p. 204-223.
- 5
- 6 TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3 ed. Santa
- 7 Maria: UFSM, 2008.
- 8
- 9 VAZ, C.M.; FOSSEN, M.; VAN TUIL R.F.; DE GRAAF, L.A.; REIS,R.L.; CUNHA,
- 10 A.M. Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as
- 11 alternative biodegradable polymers for biomedical applications. **Journal of Biomed**
- 12 **Mater Research**, n.65, p.60 –70, 2003.
- 13
- 14 VEGA, C.; ROOS, Y.O.H. The State of Aggregation of Casein Affects the Storage
- 15 Stability of Amorphous Sucrose, Lactose and Their Mixtures. **Food Biophysics**, v.2,
- 16 p10-19, 2007.
- 17
- 18 WALSTRA, P.; KLOEK, W.; VAN VLIET, T. Fat Crystal Network. In: GARTI, N.;
- 19 SATO, K. **Crystallisation processes in fats and lipid systems**. Marcel Dekker inc:
- 20 New York, 2001. p 289–312.
- 21
- 22 WIKING, L.; GRAEF, V.; RASMUSSEN, M.; DEWETTINCK, K. Relations between
- 23 crystallization microstructure of milk fat. **International Dairy Journal**, v.19, p.424-
- 24 430, 2009.
- 25
- 26 WONG, S.Y.; HARTEL, R.W. Crystallization in lactose refining – a review. **Journal of**
- 27 **Food Science**, v.79, n.3, p.257-272, 2014.
- 28
- 29 WRIGHT, A. J. et al. Rheological properties of milkfat and butter. **Journal Food**
- 30 **Science**, v. 66, n. 8, p. 1056-1071, 2001.
- 31

1 **3 OBJETIVOS**

2

3 **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

4

5 Avaliar a capacidade da técnica de difratometria de raios X em
6 detectar fraudes em leite.

7

8 **3.1.1 Objetivos Específicos**

9

- 10 a) Determinar o perfil cristalográfico de leite cru liofilizado;
- 11 b) Caracterizar a micro-estrutura dos componentes do leite.

12

4 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MICRO-ESTRUTURAL DO LEITE CRU LIOFILIZADO (MICROSTRUCTURE CHARACTERIZATION OF LYOPHILIZED WHOLE MILK)

4.1.1 Resumo

Conhecer o comportamento natural dos cristais de lactose no leite integral e os fatores que influenciam sua cristalização é fundamental para detectar alterações causadas pela adição intencional de substâncias ao leite. Quando associadas, a difração de raios X (DRX) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) são eficazes na caracterização estrutural e composição química dos produtos lácteos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a micro-estrutura do leite integral liofilizado e a interação dos componentes naturais do leite com a cristalização da lactose. Na MEV, foi possível observar que a lactose do leite liofilizado é o principal componente cristalizado, enquanto proteínas e lipídeos permaneceram amorfos em sua maior parte. A DRX também mostrou a lactose como o principal componente formador de cristais, com picos entre $6,3^\circ$ e $55,4^\circ$ no leite liofilizado. Os sólidos do leite influenciaram na intensidade dos picos da lactose localizados entre $12,51^\circ$ e $37,61^\circ$. Quanto maior a quantidade de sólidos e gordura, menor foi a intensidade destes picos. Da mesma forma, a quantidade de sólidos totais interferiu no processo de formação dos cristais de lactose.

PALAVRAS-CHAVE: cristalografia, difratometria, lactose.

1 4.1.2 Abstract

2
3 Knowing the natural behavior of lactose crystals in whole milk and the factors that
4 have influence on its crystallization is crucial to detect changes caused by the
5 fraudulent addition of substances to milk. When combined, X-ray diffraction (XRD)
6 and scanning electron microscopy (SEM) are effective in structural and chemical
7 characterization of dairy products. The aim of this study was to analyze the
8 microstructure of the freeze-dried whole milk and the interaction of natural milk
9 constituents with the lactose crystallization. SEM showed lactose as the main
10 crystallized component in freeze-dried milk, while proteins and lipids remained mostly
11 amorphous. XRD also showed lactose as the principal component of crystals, with
12 peaks of 6.3° and 55.4° in freeze-dried milk. Milk solids had influence on the intensity
13 of the peak located between 12.51 and 37.61° . The greater the amount of solids and
14 fat, the lower the intensity of these peaks. Similarly, the total solids amount interfered
15 with the formation of lactose crystals.

16
17 **KEYWORDS:** crystallography, diffractometry, lactose.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 4.1.3 Introdução

2
3 A difração de raios X (DRX) é amplamente utilizada na tecnologia de
4 produtos lácteos. Lactose, triglicerídeos, caseína e sais orgânicos e inorgânicos são
5 compostos de moléculas com perfis cristalográficos explorados por difração de raios
6 X (MAZZANTI; MARANGONI; IDZIAK, 2009; THACHEPAN; LI; MANN, 2010). No
7 leite fluído esses componentes estão amorfos e quando são processados
8 tecnologicamente podem originar cristais (VEGA; ROOS, 2007).

9 A lactose é um dos componentes do leite mais estudados por DRX e
10 seus difratogramas podem apresentar diferenças entre si. Os sólidos do próprio leite,
11 como as proteínas e sais, e a adição de substâncias estranhas, podem interferir na
12 intensidade dos picos (NIJDAM et al. 2007). Conhecer o comportamento dos cristais
13 de lactose e os fatores que influenciam sua cristalização é fundamental para detectar
14 alterações causadas por processos tecnológicos ou adição intencional de
15 substâncias estranhas.

16 Quando associadas, a DRX e a microscopia eletrônica de varredura
17 (MEV) são eficazes na caracterização estrutural e composição química dos produtos
18 lácteos.

19 O objetivo deste trabalho foi caracterizar a micro-estrutura do leite
20 integral liofilizado e a interação dos componentes naturais do leite com a
21 cristalização da lactose.

22 23 4.1.4 Material e Métodos

24
25 Foram utilizadas amostras de leite cru refrigerado de 20
26 propriedades rurais do norte do Paraná.

27 As amostras foram encaminhadas à Associação Paranaense de
28 Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) e analisadas quanto à
29 porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não
30 gordurosos (SNG) e ureia pela metodologia de infravermelho (INTERNACIONAL IDF
31 STANDART 141C, 2000). Para a determinação do pH, as amostras foram
32 analisadas no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da
33 Universidade Estadual de Londrina (UEL) utilizando o pHmêtro portátil Hanna
34 HI8424.

1 Para o processo de liofilização, 30 mL de leite foram encaminhadas
2 ao LIPOA e congelados à -18°C em 4h e assim permanecendo por mais 44h para
3 minimizar as variáveis que pudessem interferir na cristalização dos componentes
4 lácteos.

5 Após congelamento, as amostras foram liofilizadas em aparelho
6 giratório tipo *speed vac* (Speed Vac SC110), Savant Instruments, Inc., USA por 30
7 horas. A liofilização (*freeze-drying*) é um processo realizado em baixas temperaturas
8 e na ausência de ar atmosférico, mantendo as propriedades físico-químicas e
9 organolépticas quase inalteradas (GAVA; FRIAS; SILVA, 2009).

10 A micro-estrutura das amostras liofilizadas foi analisada pela
11 microscopia eletrônica de varredura (MEV). Fragmentos dos leites liofilizados foram
12 fixados com glutaraldeído 2% em tampão cacodilato 0,1 M por 15 horas. Após a
13 fixação, as amostras foram lavadas duas vezes em tampão cacodilato 0,1 e fixadas
14 novamente com ósmio 1% por seis horas. Posteriormente, as mostras foram lavadas
15 em tampão cacodilato e desidratadas progressivamente com etanol 70%, 80%, 90%
16 e 100%, sendo então secas ao ponto crítico em CO_2 (Bal Tec CPD 030). Após
17 secagem as amostras foram fragmentadas, colocadas em *stubs* e recobertas com
18 uma camada de ouro de 25nm de espessura (Sputter coater Bal-Tec SCD 050) para
19 análise no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200. A Espectroscopia de
20 Energia Dispersiva (EDS) indicou que os cristais apresentaram estruturas compatível
21 com a lactose.

22 As amostras liofilizadas foram enviadas ao Laboratório de Raios X
23 da UEL e analisadas com o difratômetro Panalytical X'Pert PRO MPD, com tubo de
24 cobre, monocromador de grafite e detector por ionização, em um intervalo de 5° à
25 60° , 2θ , com passo de $0,05^{\circ}$ e um segundo de medida em cada passo. Os
26 difratogramas foram submetidos à análise no *software* X'Pert HighScore Plus
27 (PANALYTICAL, 2004).

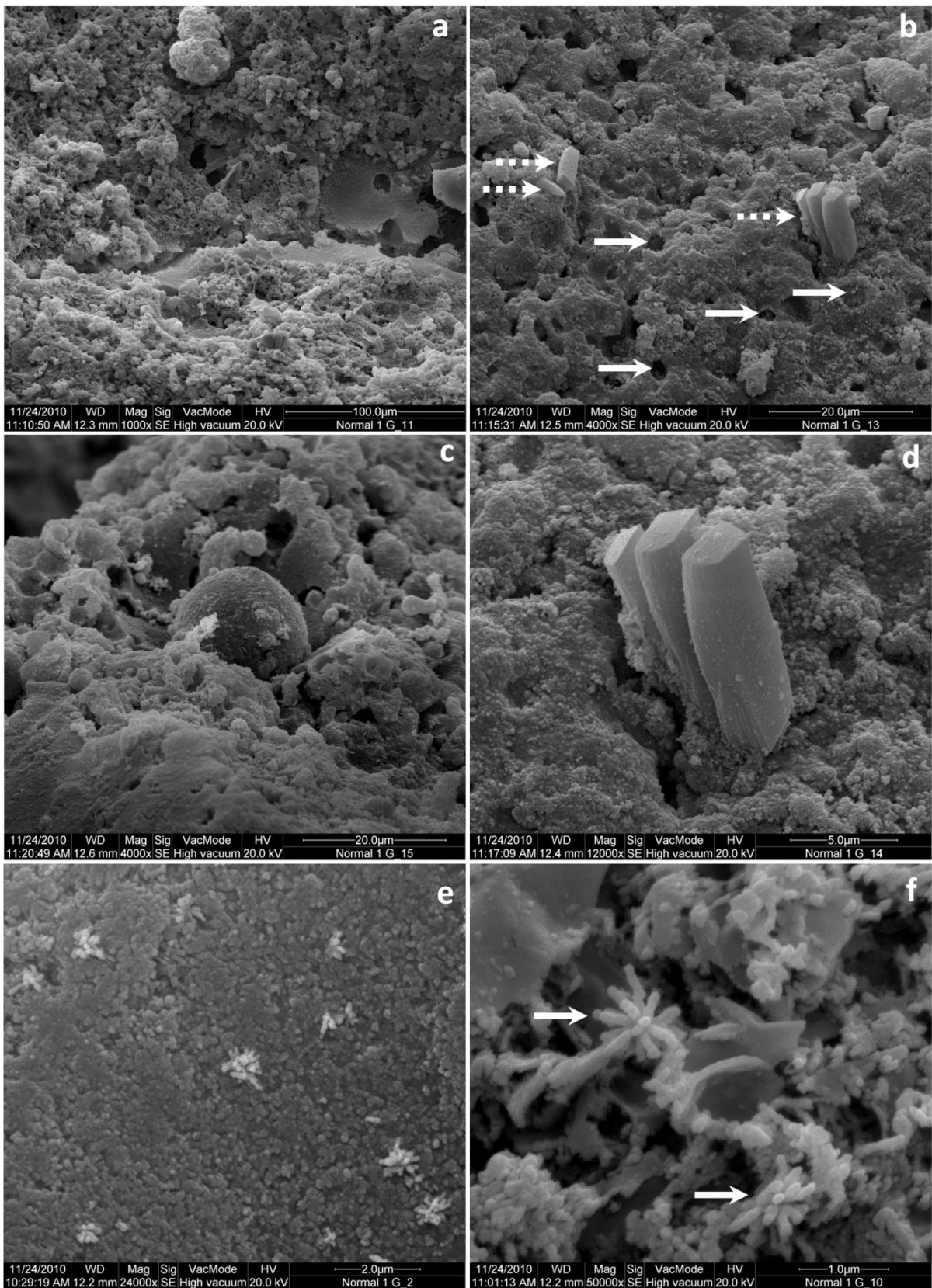
28 O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e as
29 variáveis analisadas foram pH, porcentagem de gordura, de proteína, de lactose, de
30 sólidos totais (ST) e de sólidos não gordurosos (SNG) e uréia. Os dados foram
31 testados quanto à normalidade e homocedastidade e não apresentaram distribuição
32 normal segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para avaliar a relação da
33 cristalinidade e intensidade dos picos com os componentes do leite, foi feita uma
34 análise de regressão, com correlação linear pelo teste de Spearman. As correlações

1 foram consideradas fracas quando $r < 0$, e moderadas quando $r = 0,5 - 0,75$. Os
2 testes consideraram $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Para todas as
3 análises foi utilizado o programa Statistica 7.0.

4 5 6 4.1.5 Resultados e Discussão

7 8 **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

9
10 A MEV revelou cristais de lactose e cristais e glóbulos de gordura
11 inseridos em uma rede de caseína (Figura 1a). Foram observados cristais de lactose
12 com um eixo de simetria, lados trapezoidais, bases e topos rombos (Figura 1b e 1d).
13 Esta forma, conhecida como *tomahawk*, ocorre em condições lentas de cristalização
14 (LISTIOHADI et al. 2005; HUNZIKER; NISSEN;1926). A gordura se apresentou nas
15 formas de glóbulos e esferulitos (Figura 1c, 1e e 1f, respectivamente). A gordura do
16 leite pode apresentar simultaneamente várias organizações cristalinas diferentes
17 (LOPEZ et. al, 2005) e também uma cristalização parcial (ROUSSSEAU, 2000;
18 FREDRICK; WALSTRA; DEWETTINCK, 2010) dependendo das interferências
19 durante o processo de cristalização. A forma de esferulito é característica dos
20 cristais tipo β' , comumente encontrado na gordura do leite (NARINE; MARANGONI,
21 1999).

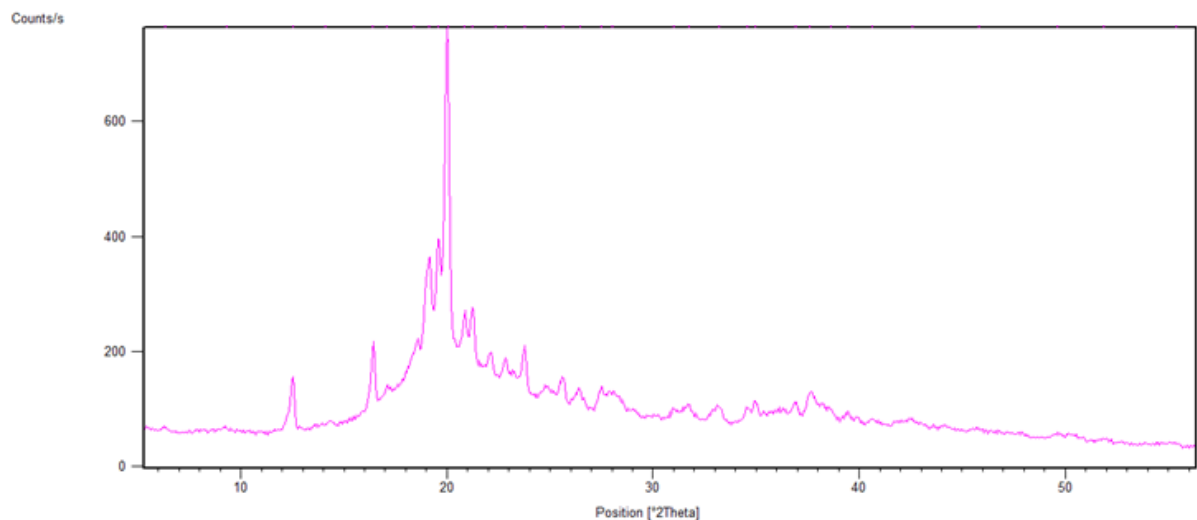


1
 2 **Figura 1.** a) micro-estrutura de leite liofilizado – 1000x; b) setas contínuas indicam
 3 cavidades globulares da gordura na matriz proteica; setas pontilhadas indicam
 4 cristais de lactose – 4000x; c) glóbulo de gordura - 4000x; d) cristais de lactose -
 5 12000x; e) esferulitos de gordura – 24000x; f) esferulitos de gordura – 50000x.

1 Difração de raios X (DRX)

2
3 O perfil cristalográfico das 20 amostras de leite cru liofilizado gerou
4 picos distribuídos em um plano de fundo amorfo. Estes picos surgiram entre 6,3° e
5 55,4° (Figura 2). Uma análise foi realizada pelo *software* de difratometria
6 (PANALYTICAL, 2004) com o objetivo de identificar o componente cristalino que
7 originou os picos. A partir da base de dados do *software*, os picos foram
8 identificados como lactose monohidratada, com 85% dos picos condizentes com o
9 padrão difratométrico deste composto.

10 A lactose pode cristalizar em diferentes formas, incluindo a α -
11 lactose, β -lactose e uma mistura delas. A forma como estes dois cristais estão
12 presentes no leite influenciam a intensidade e a localização dos picos (DRAPIER-
13 BECHE et al., 1997; NIJDAM et al., 2007). Neste trabalho, dentro do intervalo de
14 medição dos ângulos de difração, foi observada a presença de picos carcterísticos
15 de α -lactose, β -lactose e lactose hidratada (Figura 2). A presença de sólidos do leite
16 e a alta umidade diminuem a taxa de cristalização e favorecem a mutarotação,
17 formando diferentes tipos de critais de lactose (NIJDAN et al., 2007).



18
19 **Figura 2.** Somatória dos difratogramas de 20 amostras de leite liofilizado; picos
20 representam a lactose.

21
22 A difratometria de raio X revelou a lactose como o principal
23 componente cristalizado, enquanto proteínas e lipídeos permaneceram amorfos em
24 sua maior parte. Quando os átomos estão sistematicamente arranjados, como nos

1 cristais de lactose, padrões difratométricos são visíveis, assim como periodicidade
2 nos picos da difração (CULLITY, 2001).

3
4 **Influência dos componentes do leite na intensidade dos picos mais frequentes**
5 **e na taxa de cristalização da lactose**

6
7 Os resultados obtidos da análise do pH, da porcentagem de gordura,
8 de proteína, de lactose, de sólidos totais (ST) e de sólidos não gordurosos (SNG) e a
9 concentração de ureia do leite cru refrigerado estão descritas na Tabela 2.

10
11 **Tabela 2.** Mediana (*Mdn*), média (\bar{x}), desvio padrão (σ) e valores mínimos e
12 máximos (†) do pH, gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), sólidos não
13 gordurosos (SNG) e ureia das 20 amostras de leite cru refrigerado.

	<i>Mdn</i>	$\bar{x} \pm \sigma$	Mín. † Máx.
pH	6.68	6.58 ± 0.27	5.93 † 6.81
Gordura (%)	3.86	3.97 ± 1.33	1.43 † 6.84
Proteína (%)	3.18	3.22 ± 0.18	2.76 † 3.50
Lactose (%)	4.46	4.40 ± 0.26	3.67 † 4.68
SNG (%)	8.63	8.50 ± 0.57	6.74 † 9.14
ST (%)	12.66	12.48 ± 1.54	8.98 † 15.08
Ureia (mg/dL)	11.22	10.74 ± 3.04	3.06 † 16.24

14
15 Os difratogramas das 20 amostras de leite liofilizado revelaram
16 semelhança entre os cristais de lactose, porém com picos de intensidade diferentes
17 (Tabela 3). NIJDAM et al. (2007) também observaram que a quantidade de sólidos,
18 como as proteínas e sais, interferem na intensidade dos picos.

19 Na Tabela 3 estão apresentadas a média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) da
20 intensidade dos picos de lactose que aparecem em mais de 80% das 20 amostras
21 de leite liofilizado.

22
23
24
25
26

1 **Tabela 3.** Média (\bar{x}) e desvio padrão (σ) da intensidade dos picos de lactose que
 2 aparecem em mais de 80% das 20 amostras de leite liofilizado.

Pico (°)	Intensidade*	
	\bar{x}	σ
12,51	105,95	54,19
16,40	144,30	60,37
19,13	248,44	39,93
20,03	612,72	148,07
21,24	171,11	37,48
23,77	114,83	52,88
25,64	58,34	18,42
33,20	33,57	13,47
37,61	54,69	19,50

3 * Contagem por segundo

4

5 Na Tabela 4 são apresentados os índices de correlação (r) entre os
 6 componentes do leite e a intensidade dos picos de maior intensidade e a cristalinidade
 7 da 20 amostras de leite liofilizado.

8

9 **Tabela 4.** Índice de correlação (r) entre os componentes do leite e a intensidade dos
 10 picos de lactose de maior intensidade e a cristalinidade das 20 amostras de leite
 11 liofilizado.

	Índice de correlação (r)						
	pH (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	SNG (%)	ST (%)	Ureia (mg/dL)
Pico 12,51°	-0,43	-0,57*	-0,17	-0,38	-0,38	-0,63**	-0,41
Pico 16,40°	-0,10	-0,29	-0,32	-0,44	-0,44	-0,40	-0,49
Pico 19,13°	-0,26	-0,15	-0,20	-0,56*	-0,47	-0,31	-0,36
Pico 20,03°	-0,39	-0,37	0,47	0,17	0,26	-0,22	0,03
Pico 21,24°	-0,46	-0,27	-0,31	-0,65*	-0,58*	-0,46	-0,59*
Pico 23,77°	-0,16	-0,21	-0,38	-0,51	-0,50	-0,37	-0,55
Cristalinidade	-0,30	-0,42	-0,24	-0,49	-0,47	-0,54*	-0,42

12 * p<0.05 ** p<0.01

13

14 A taxa de cristalização das amostras do leite liofilizado foi
 15 inversamente proporcional à quantidade de sólidos totais encontrada nas amostras
 16 ($r=-0,5399$, $p=0,031$). A cristalinidade relativa é baseada na área total e na área
 17 amorfa dos difratogramas de raios X, e uma diminuição da área amorfa resulta em
 18 um aumento da cristalinidade (VANIER et. al, 2012). O teor de sólidos influenciou de
 19 maneira inversamente proporcional na intensidade dos picos localizados entre 12,51

1 e 37,61° (Tabela 4).

2 A cristalização da lactose é influenciada por diversos fatores, como a
3 variação da velocidade e da temperatura durante a cristalização. Isto significa que a
4 forma e ordem dos cristais depende das condições de cristalização (SOMOLI; DAS;
5 LANGRISH, 2013). Neste estudo, as condições de liofilização (velocidade e
6 temperatura de congelamento; temperatura, tempo e pressão de liofilização) foram
7 controladas para evitar que as diferenças no protocolo interferissem nos resultados.

8 Em geral, os sólidos do leite têm componentes que promovem ou
9 inibem o crescimento dos cristais de lactose. A gordura do leite atua como uma
10 barreira hidrofóbica que limita o crescimento dos cristais de lactose (KELLY, 2009).
11 Além disso, diferenças na taxa de crescimento dos cristais de lactose também
12 interferem na forma destes cristais. Quando a taxa de crescimento do cristal é alta,
13 são formados cristais na forma de prismas. À medida que a taxa de crescimento
14 diminui, a forma de cristal é alterada para *tomahawk* (ZENG et al., 2000).

15 A DRX não conseguiu identificar a presença de cristais de gordura
16 nas amostras de leite liofilizado. Por ser formada por grande variedade de ácidos
17 graxos, a cristalização da gordura do leite é um processo complexo. A formação de
18 cristais de gordura também pode ser influenciada pela raça e alimentação dos
19 animais, temperatura e velocidade de resfriamento e a agitação (HERRERA;
20 HARTEL, 2000; SHI; SMITH; HARTEL, 2001; BERTRAM et al, 2005). Já a MEV
21 identificou a gordura do leite nas formas globular e esferulito (Figura 1e e 1f).

22 23 4.1.6 Conclusões

24
25 Na MEV, a lactose do leite liofilizado foi o principal componente
26 cristalizado, enquanto proteínas e lipídeos permaneceram amorfos em sua maior
27 parte. A gordura apareceu predominantemente na forma de esferulitos.

28 A DRX também mostrou a lactose como o principal componente
29 formador de cristais, com picos entre 6.3° e 55.4° no leite liofilizado.

30 Os sólidos do leite influenciaram na intensidade dos picos da lactose
31 localizados entre 12.51 e 37.61°. Quanto maior a quantidade de sólidos e gordura,
32 menor é a intensidade destes picos. Da mesma forma, a quantidade de sólidos totais
33 interferiu no processo de formação dos cristais de lactose.

34 A formação de cristais mostrou ser influenciada por vários fatores,

1 como componentes acompanhantes e condições de prepara das amostras, sendo
2 necessários outros estudos para determinar de qual maneira isso ocorre.

3 4 4.1.7 Referências

5
6 BERTRAM, H.C., WIKING, L., NIELSEN, J.H., ANDERSEN, H.J. Direct
7 measurement of phase transitions in milk fat during cooling of cream - A low-field
8 NMR approach. **International Dairy Journal**, v.15, p.1056–1063, 2005.

9
10 CULLITY, B. D. **Elements of x-ray diffraction**. 3th ed. Boston: Addison-Wesley
11 Publishing Company Inc, 2001.

12
13 DRAPIER-BECHE, N.; FANNI, J.; PARMENTIER, M.; VILASI, M. Evaluation of
14 lactose crystalline forms by nondestructive analysis. **Journal of Dairy Science**, v.80,
15 p.457-463, 1997.

16
17 FREDRICK, E.; WALSTRA, P.; DEWETTINCK, K. Factors governing partial
18 coalescence in oil-in-water emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**,
19 v.153, p.30-42, 2010.

20
21 GAVA, A.J.; FRIAS, J.R.G.; SILVA, C.A.B da. **Tecnologia de Alimentos: Princípios**
22 **e Aplicação**. 1. ed. 2009. 152p.

23
24 HERRERA, M.L.; HARTEL, R.W. Effect of processing conditions on physical
25 properties of a milk fat model system: microstructure. **Journal of the American Oil**
26 **Chemists Society**, v.77, p.1197–1204, 2000.

27
28 HUNZIKER, O.F.; NISSEN, B.H. Lactose solubility and lactose crystal formation: I.
29 Lactose solubility. **Journal of Dairy Science**, v.9, n.6, p.517-537, 1926.

30
31 INTERNATIONAL IDF Standard 141C:2000: Whole milk - determination of milkfat,
32 protein and lactose content. **Guidance on the operation of mid-infrared**
33 **instruments**. Brussels, 2000.

34

- 1 KELLY, P.M. Significance of lactose in milk powders. In: **P. L. H. Advanced dairy**
2 **chemistry volume 3: lactose, water, salts and minor constituents**. New York:
3 Springer, 2009.
4
- 5 LISTIOHADI, Y.D.; HOURIGAN, J.A.; SLEIGH, R.W.; STEELE, R.J. Properties of
6 lactose and its caking behavior. **Australian Journal of Dairy Technologic**, v. 60,
7 n.1, p.33-52, 2005.
8
- 9 LOPEZ, C.; LESIEUR, P.; BOURGAUX, C.; OLLIVON, M. Thermal and structural
10 behavior of anhydrous milk fat. 3. Influence of cooling rate. **Journal Dairy Science**,
11 v.88, n.2, p.511-526, 2005.
12
- 13 MAZZANTI, G.; ALEJANDRO, G.M.; STEFAN, H.J.I. Synchrotron study on
14 crystallization kinetics of milk fat under shear flow. **Food Research International**,
15 v.42, p.682-694, 2009.
16
- 17 NARINE, S.S.; MARANGONI, A.G. Relating structure of fat crystal networks to
18 mechanical properties: a review. **Food Research International**, v. 32, n. 4, p. 227-
19 248, 1999.
20
- 21 NIJDAM, J.; IBACH, A.; EICHHORNAND, K; KIND, M. An X-ray diffraction analysis of
22 crystallised whey and whey-permeate powders. **Carbohydrate Research**, n. 342, p.
23 2354–2364, 2007.
24
- 25 PANALYTICAL. X'Pert HighScore Plus. Versão 2.0.1. **Pananalytical B.V.**, The
26 Netherlands, 2004.
27
- 28 ROUSSEAU, D.; HILL, A.R.; MARANGONI, A.G. Restructuring butterfat through
29 blending and chemical interesterification. 2 - Microstructure and polymorphism.
30 **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.73, p.973–981,1996.
31
- 32 SHI, Y.; SMITH, C.M.; HARTEL, R.W. Compositional effects on milk fat
33 crystallization. **Journal Dairy Science**, v.84, p.2392-2401, 2001.
34

- 1 SORMOLI, M.E.; DAS, D.; LANGRISH, T.A.G. Crystallization behavior of
2 lactose/sucrose mixtures during water-induced crystallization. **Journal of Food**
3 **Engineering**, v.116, n.4, p.873-880, 2013.
4
- 5 THACHEPAN, S.; LI, M.; MANN, S. Mesoscale crystallization of calcium phosphate
6 nanostructures in protein (casein) micelles. **Nanoscale**, v.2, p.2400-2405, 2010.
7
- 8 VEGA, C.; ROOS, Y.O.H. The State of Aggregation of Casein Affects the Storage
9 Stability of Amorphous Sucrose, Lactose and Their Mixtures. **Food Biophysics**, v.2,
10 p10-19, 2007.
11
- 12 WONG, S. Y.; HARTEL, R.W. Crystallization in lactose refining - a review. **Journal of**
13 **Food Science**, v.79, n.3, p. 257-272, 2014.
14
- 15 ZENG, X.M; MARTIN, G.P.; MARRIOTT, C.; PRITCHARD, J. The influence of
16 crystallization conditions on the morphology of lactose intended for use as a carrier
17 for dry powder aerosols. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v.52, n.6, p.633-643,
18 2000.
19

4.2 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X APLICADA À INSPEÇÃO DE LEITE NA DETECÇÃO DE FRAUDES (X-RAY DIFFRACTION APPLIED TO INSPECTION OF MILK AND FRAUD DETECTION)

4.2.1 Resumo

A detecção de fraudes em leite é uma tarefa difícil tanto para a indústria como para os órgãos de fiscalização. Assim, métodos alternativos para a inspeção de leite podem auxiliar na identificação de substâncias fraudulentas, com resultados mais rápidos e precisos. O objetivo deste trabalho foi utilizar a difração de raios X para identificar compostos desconhecidos adicionados ao leite antes de seu beneficiamento. Duas substâncias utilizadas para fraudar leite foram encaminhadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da UEL por laticínios do Paraná. As amostras foram submetidas à testes físico-químicos e também encaminhadas para o Laboratório de Difração de Raios X da UEL e analisadas com o difratômetro Panalytical X'Pert PRO MPD. A Amostra A foi identificada como citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) pelo difratômetro. Esse resultado condiz com os padrões obtidos nas provas físico-químicas realizadas, onde a substância tornou o ponto de congelamento mais negativo. A Amostra B foi identificada como sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). Esse resultado também condiz com os padrões obtidos nas provas físico-químicas, onde a substância influenciou a densidade e a crioscopia, além de ser positiva para a prova de açúcares. A identificação de substâncias adicionadas ao leite foi possível através da difratometria com rapidez e precisão.

PALAVRAS-CHAVE: sacarose, citrato, fraude.

1 4.2.2 Abstract

2
3 Alternative methods in dairy inspection can help to identify fraudulent
4 substances, with faster and more accurate results. The aim of this work was to use
5 the X-ray diffraction to analyze unknown substances added to raw milk before its
6 industrialization. Two samples were received by the Laboratory Inspection of Animal
7 Products UEL. Physical chemical tests were made and after the samples were
8 submitted to the X-Ray Diffraction Laboratory of UEL and analyzed with PANalytical
9 X'Pert PRO MPD diffractometer. The sample "A" was identified as sodium citrate
10 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). This result agreed with its physicochemical characteristics, since the
11 substance deepened the freezing point of milk. The sample "B" was identified as
12 sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). This result also agreed with physicochemical patterns, once the
13 substance had changed the density, the freezing point and was positive for sugar
14 test. The identification of substances was possible by X-ray diffraction, enabling fast
15 and accurate fraud detection.

16
17 **KEYWORDS:** Sucrose, Citrate, Fraud.

18

1 4.2.3 Introdução

2
3 Qualquer adição ou subtração de substâncias no leite antes de seu
4 beneficiamento é proibida por lei, além de trazer riscos à saúde pública (BRASIL,
5 2011). Essas práticas são caracterizadas como fraudes e frequentemente estão
6 associadas à adição de água para aumentar o volume do leite, conservá-lo ou
7 mascarar sua acidez.

8 Além de alterar a composição natural do leite, as fraudes podem ser
9 um risco à saúde dos consumidores, uma vez que compostos não indicados ao
10 consumo humano podem ser utilizados, como soda cáustica, hipoclorito de sódio,
11 formol e urina (TRONCO, 2008).

12 São inúmeras as substâncias que podem ser adicionadas ao leite e
13 nem sempre as provas de rotina, que são específicas para cada substância, obtêm
14 êxito em sua detecção (KAROUI; BAERDEMAEKER, 2007). O uso de novas
15 tecnologias pode auxiliar na identificação dessas substâncias fraudulentas, com
16 resultados mais rápidos e precisos.

17 O objetivo deste trabalho foi utilizar a difração de raios X para
18 identificar compostos desconhecidos adicionados ao leite antes de seu
19 beneficiamento.

21 4.2.4 Material e Métodos

22
23 Duas amostras de substâncias utilizadas para fraudar leite foram
24 encaminhadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da UEL
25 (LIPOA) por laticínios do Paraná, que informaram que as substâncias eram
26 adicionadas intencionalmente por coletores de leite. A Amostra A era um pó fino,
27 branco e inodoro. A Amostra B era um gel translúcido, já misturado ao leite.

28 As amostras foram diluídas em água destilada em diversas
29 proporções, de 1% até 10% e depois estas soluções foram adicionadas ao leite.
30 Realizou-se, então, análises de crioscopia, densidade, pesquisa para amido,
31 hipoclorito, cloretos, peróxido de hidrogênio, formol e sacarose (BRASIL, 2006).

32 Paralelamente, amostras das substâncias em pó (A) e em gel (B)
33 foram encaminhadas para o Laboratório de Difração de Raios X da Universidade
34 Estadual de Londrina e analisadas com o Panalytical X'Pert PRO MPD, com tubo de

1 cobre, monocromador de grafite e detector por ionização (PANALYTICAL, 2004). A
 2 medida da Amostra A foi realizada em um range de 5 à 70°, 2θ, com passo de 0,05°
 3 e 1 segundo de medida em cada passo. A medida da Amostra B foi realizada num
 4 range de 5 à 50°, 2θ, com passo de 0,005° e 1 segundo de medida em cada passo.

6 4.2.5 Resultados e Discussão

8 Por se desconhecer a concentração utilizada para fraudar leite das
 9 substâncias recebidas, ensaios com a adição de diferentes concentrações foram
 10 testados no LIPOA. A Tabela 5 mostra os resultados das análises físico-químicas
 11 realizadas na substância A com diluição a 4% em água, e na substância B diluída a
 12 10%.

14 **Tabela 5.** Características físico-químicas da solução aquosa da substância A a 4%
 15 (Amostra A) e da substância B a 10% (Amostra B) enviadas para a rotina do
 16 laboratório de inspeção de leite da UEL.

	Amostra A	Amostra B
Crioscopia (°H)	-0,505	*
Densidade à 15°C (g/cm ³)	<1,014	>1,042
Pesquisa de amido	negativo	negativo
Pesquisa de hipoclorito	negativo	positivo
Pesquisa de cloretos	negativo	negativo
Pesquisa de sacarose	negativo	positivo
Pesquisa de H ₂ O ₂	negativo	negativo
Pesquisa de formol	negativo	negativo

17 * erro de leitura.

18
 19 A Amostra A apresentou crioscopia de -0,505°H e densidade à 15° C
 20 de 1,014 g/cm³. A crioscopia da Amostra B foi inferior ao limite mínimo de leitura do
 21 aparelho e a densidade foi superior a capacidade de leitura do
 22 termolactodensímetro, impossibilitando a aferição em todas as diluições realizadas.

23 Não foram encontradas a presença de peróxido de hidrogênio,
 24 formol, amido e cloretos em nenhuma das duas soluções analisadas. O teste de
 25 sacarose e hipoclorito foi positivo apenas para a Solução B.

O hipoclorito pode ter sido adicionado intencionalmente como parte da fraude no leite, com o objetivo de impedir a multiplicação bacteriana, ou ainda ser um resíduo da sanitização de equipamentos (VELLOSO, 2002). Como a Amostra B foi retirada de um compartimento de caminhão isotérmico usado no transporte a granel de leite, nenhuma das hipóteses pode ser descartada.

As substâncias A e B também foram adicionadas ao leite, em diversas concentrações, com o objetivo de determinar a quantidade de água que poderia ser adicionada na presença destas substâncias. A adição de 4% da substância A permitiu aumentar o volume do leite em até 10% fazendo com que a crioscopia, a densidade e a acidez ficassem dentro dos limites determinados pela legislação, o que impediria a sua detecção pelas provas de rotina se adicionado ao leite cru nessa proporção. A substância B, além de ser positiva na prova de sacarose, apronfundou a crioscopia e aumentou a densidade do leite, sendo que a concentração adicionada ao leite que apresentou resultados mais próximos aos padrões permitidos na legislação foi a adição de 10% da substância B e 10% de água (Tabela 6).

A adição de água no leite faz com que o ponto de congelamento se aproxime de 0°H. Por sua vez, substâncias com propriedade de ficar em solução no leite, como sais e açúcares, tornam o índice crioscópico cada vez mais negativo (FOX; McSWEENEY, 1998). Assim, é possível mascarar a adição de água no leite pela adição de compostos solúveis, recompondo o índice crioscópico do leite fraudado. Leites fraudados com água também têm suas densidades alteradas, ficando mais próximas de 1,000g/cm³. Nesse caso, as substâncias comumente utilizadas como reconstituintes são farinha, açúcar ou sal (AMIOT, 1991).

Tabela 6. Crioscopia e densidade do leite sem fraude e com adição de 4% da substância A e 10% da Substância com 10% de água.

	Leite	Leite + Substância A 4% + 10% água	Leite + Substância B 10% + 10% água
Crioscopia (°H)	-0,537	-0,533	-0,572
Densidade à 15°C (g/cm ³)	1,032	1,030	1,038

As provas de rotina realizadas no LIPOA indicaram que a substância

1 B possuía sacarose em sua composição e agiu como reconstituente de densidade e
2 crioscopia. A substância A também se comportou como reconstituente, porém sem
3 indícios do que havia em sua composição quando utilizou-se as provas oficiais de
4 detecção.

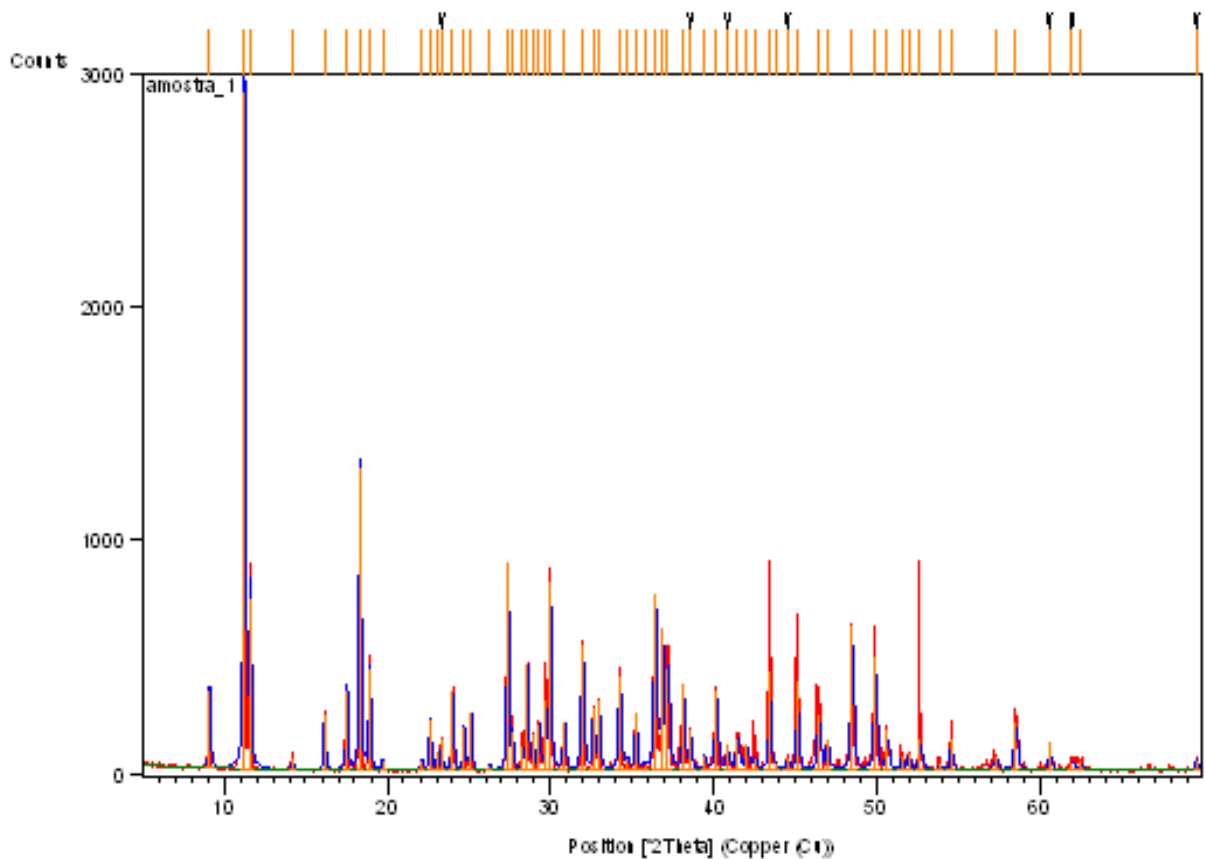
5 As substâncias A e B foram, então, encaminhadas ao Laboratório de
6 Difração de Raios X da UEL e analisadas com o difratômetro de raios X Panalytical
7 X'Pert PRO MPD.

8 A substância A (em pó) foi indentificada como citrato de sódio
9 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (PDF number 00-016-1170), conforme o difratograma mostrado na
10 Figura 3. Esse resultado condiz com os padrões obtidos nas provas físico-químicas
11 realizadas no LIPOA, onde a substância provocou o aprofundamento da crioscopia
12 do leite. O citrato de sódio pode ser utilizado como estabilizante em leite UHT, mas é
13 proibido em leite cru e pasteurizado (BRASIL, 2011). Para o leite UHT, não há
14 parâmetro de índice crioscópico, justamente porque os sais estabilizantes
15 permitidos, entre eles o citrato, alteram o padrão estabelecido para o leite cru e
16 pasteurizado.

17

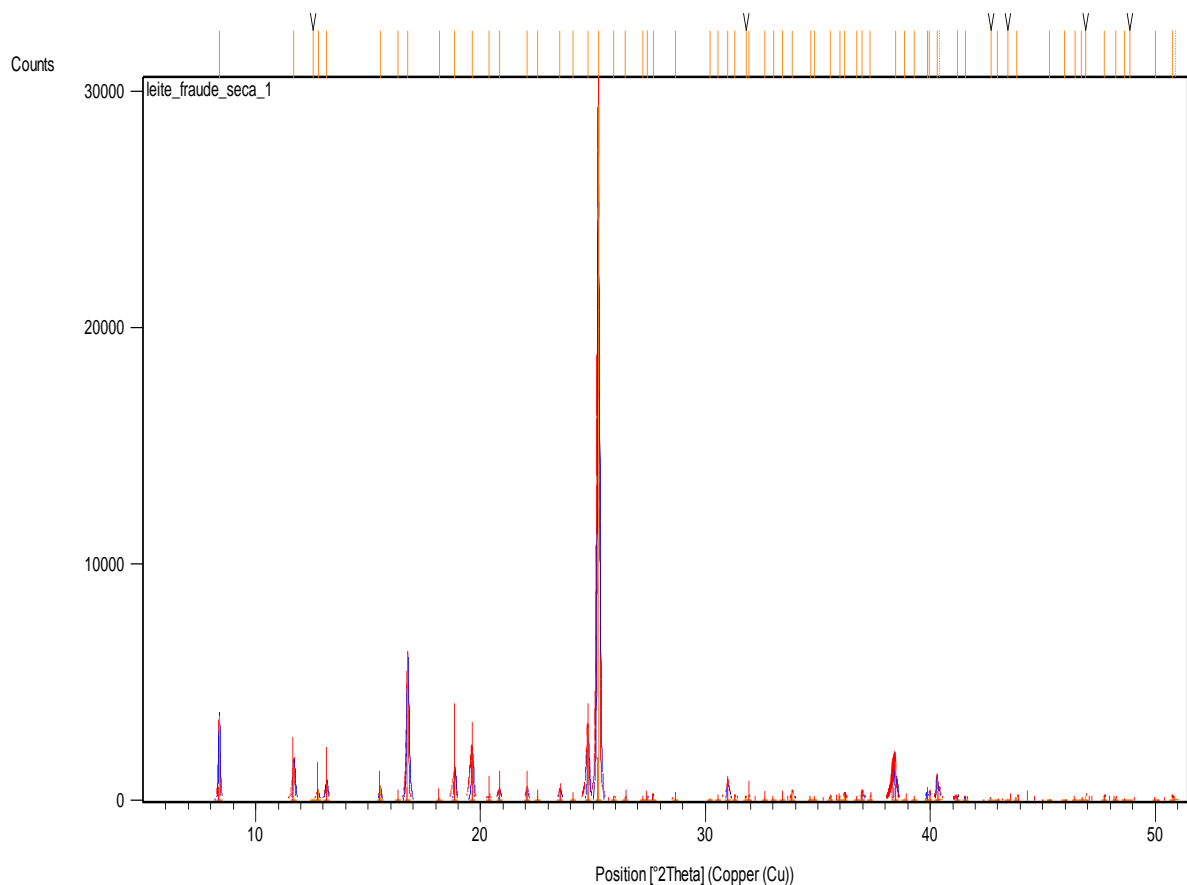
18

19



1
2 **Figura 3.** Difratoograma da substância em pó (substância A), identificada como citrato
3 de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (PDF number 00-016-1170). Linhas verticais sobre o gráfico
4 indicam picos de citrato de sódio.

5
6 A substância B (em gel) foi indentificada como sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)
7 (PDF number 00-024-1977), conforme o difratoograma na Figura 4. Esse resultado
8 também condiz com os padrões obtidos nas provas físico-químicas realizadas, onde
9 a substância influenciou a densidade e a crioscopia, além de ser positiva para a
10 prova de sacarose.



1
2 **Figura 4.** Difratoograma da substância em gel (substância B), identificada como
3 sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) (PDF number 00-0124-1977). Linhas verticais sobre o
4 gráfico indicam picos de sacarose.
5

6 A difração de raios X em produtos lácteos é mais usada em estudos
7 reológicos de queijos, doces e soro de leite em pó. As principais estruturas que têm
8 seu padrão cristalográfico estudado são a lactose e os triglicerídeos (MAZZANTI et
9 al. 2004).

10 Os resultados mostraram que o campo da inspeção de laticínios
11 também pode ser explorado por essa técnica, uma vez que obteve êxito na
12 identificação de substâncias desconhecidas adicionadas ao leite.

13 Assim, a identificação de substâncias adicionadas ao leite foi
14 possível através da difratometria de raios X, possibilitando rapidez e precisão na
15 detecção de fraudes.
16
17
18

1 4.2.6 Conclusões

2

3 As provas de densidade e crioscopia não seriam suficientes para
4 detectar a fraude realizada pela adição de água e concentrações específicas das
5 substâncias A e B. Análises oficiais para as substâncias específicas não permitiriam
6 identificar a presença da substância A e o leite seria considerado não adulterado.

7 A difratometria de raios X identificou com precisão as substâncias
8 utilizadas em fraudes de leite, podendo essa metodologia ser uma ferramenta
9 importante na detecção de fraudes.

10

11 4.2.7 Referências

12

13 AMIOT, J. **Ciência y Tecnología de La Leche**. Zaragoza: Acribia, 1991.

14

15 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de
16 Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa Nº 62, de 29 de
17 dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dezembro de 2011,
18 Seção 1, 2011.

19

20 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de
21 Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa Nº 68, de 12 de
22 Dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de Dezembro de 2006.
23 Seção 1, 2006.

24

25 FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Blackie
26 Professional & Academic: London, 1998.

27

28 ISMAIL, B.; REUHS, L.R.; NIELSEN, S.S. Analysis of Food Contaminants, Residues,
29 and Chemical Constituents of Concern. **Food Analysis**. v. 3 p. 317–349, 2010.

30

31 KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with
32 chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products.
33 **Food Chemistry**. v. 102, p. 621–640, 2007.

34

- 1 MAZZANTI, G.; GUTHRIE, S.; SIROTA, E. B.; MARANGONI, A. G.; IDZIAL, H. J.
2 Effect of minor components and temperature profiles on polymorphism in milk fat.
3 **Crystal Growth and Design**, v. 4, p. 1303–1309, 2004.
4
- 5 PANALYTICAL. X'Pert HighScore Plus. Versão 2.0.1. **Pananalytical B.V.**, The
6 Netherlands, 2004.
7
- 8 TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3 ed. Santa
9 Maria: UFSM, 2008.
10
- 11 VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Milk and Milk Products Technology,**
12 **Chemistry and Microbiology**. London: Chapman and Hall, 1994.
13
- 14 VELLOSO, C.R.V. **Elementos de Inspeção Sanitária e Tecnológica de Leite e**
15 **Produtos Lácteos**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2002.

4.3 ALTERAÇÕES CRISTALOGRÁFICAS DA LACTOSE PELA ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS EM FRAUDE NO LEITE: UREIA, CITRATO DE SÓDIO E AÇUCAR

4.3.1 Resumo

As fraudes mais praticadas em leite são a adição de água, reconstituintes de densidade, neutralizantes de acidez e substâncias conservadoras. A adição de água tem como único objetivo aumentar o volume de leite. Essa fraude dificilmente é realizada de forma isolada devido à facilidade das provas de rotina (crioscopia e densidade) em detectar a adulteração. Substâncias intencionalmente adicionadas ao leite podem alterar os padrões cristalográficos e influenciar a cristalização da lactose do leite. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da ureia, citrato de sódio e sacarose na cristalização da lactose e a capacidade da técnica de difratometria de raios X (DRX) em detectar estas substâncias, em solução de lactose a 4,5%. A adição de ureia, citrato de sódio e açúcar na solução de lactose a 4,5% causou uma alteração na quantidade e intensidade dos picos de lactose. A DRX foi capaz de identificar a presença da ureia nas três concentrações testadas. Porém, não foi capaz de identificar cristais de citrato de sódio e açúcar em solução de lactose a 4,5% nas concentrações usualmente utilizadas para fraude em leite.

PALAVRAS-CHAVE: difração, cristalografia, fraude

1 4.3.2 Abstract

2

3 The addition of water in milk, as well as substances to restore the density, neutralize
4 acidity and to prevent the microbiological multiplication, are the most common
5 adulterants found in milk. The addition of water to normal whole milk was assumed to
6 increase the volume. This dilution is hardly added singly because is easily detected
7 by routine analyses (freezing point and density). Substances added intentionally to
8 milk may change its crystallographic pattern and influence on the crystallization of
9 lactose. The aim of this study was to evaluate the influence of urea, sodium citrate
10 and sucrose cane in the crystallization of lactose and the ability of X-ray
11 diffractometry (XRD) to detect these substances in 4,5% lactose solutions. The
12 addition of urea, sodium citrate and sucrose in 4,5% lactose solutions caused a
13 change in the number of peaks of lactose. The XRD was able to identify the presence
14 of urea in the three concentrations tested. However, it was unable to identify crystals
15 of sodium citrate and sucrose in 4,5% lactose solutions.

16

17 **KEYWORDS:** diffraction, crystallography, fraud.

18

4.3.3 Introdução

Qualquer adição ou subtração de substâncias no leite antes de seu beneficiamento é proibida por lei, além de trazer riscos à saúde pública (BRASIL, 2011). As fraudes mais praticadas são a adição de água, reconstituintes de densidade, neutralizantes de acidez e substâncias conservadoras (TRONCO, 2008; KARTHEEK et al., 2011). A adição de água tem como único objetivo aumentar o volume de leite. Essa fraude dificilmente é realizada de forma isolada devido à facilidade das provas de rotina (crioscopia e densidade) em detectar a adulteração. Assim, além da água são adicionadas substâncias reconstituintes de crioscopia e densidade, como sal, açúcar e ureia.

Substâncias intencionalmente adicionadas ao leite, como a sacarose, podem influenciar a cristalização e alterar os padrões cristalográficos da lactose, impedindo o desenvolvimento completo dos cristais de lactose do leite (NIJDAM et al. 2007; WONG; HARTEL, 2014)

A difração de raios X (DRX) é capaz de identificar substâncias quando presentes na forma de cristais, produzindo difratogramas com picos característicos (SOMOLI; DAS; LANGRISH, 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de substâncias utilizadas para fraudar leite (ureia, citrato de sódio e açúcar) na cristalização da lactose e a capacidade da técnica de difratometria de raios X em detectar estas substâncias, em solução de lactose a 4,5%.

4.3.4 Material e métodos

Foram preparadas soluções padrões de 4,5% de lactose monohidratada (Anidrol Laboratórios) em água deionizada adicionadas de:

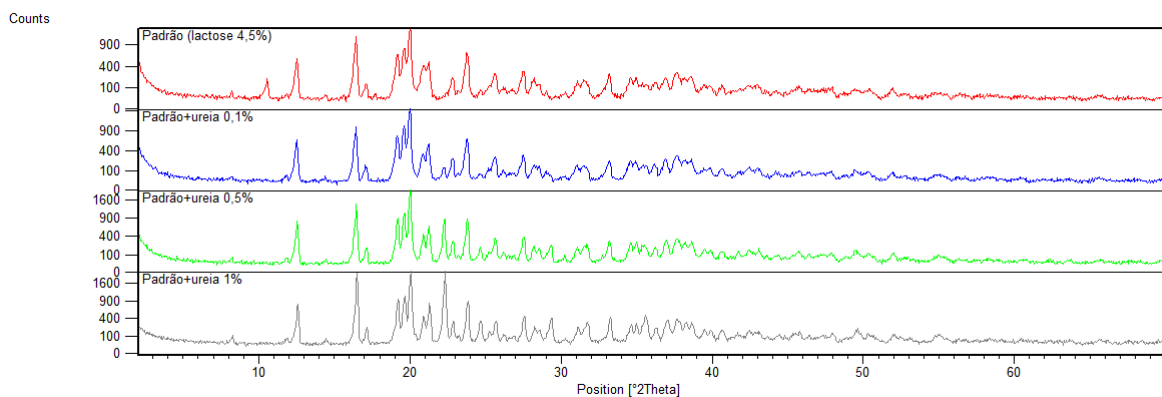
- 0,1%, 0,5% e 1,0% de ureia (fertilizante)
- 0,1% e 0,25% de citrato de sódio P.A ($C_6H_5Na_3O_7$)
- 0,5% e 1,0% de açúcar comercial União

As amostras foram submetidas ao processo de liofilização: 100 mL da solução foram congelados à $-18^{\circ}C$ por 48h em placas de Petri. Após o congelamento, as amostras foram liofilizadas em aparelho giratório tipo *speed vac* (Speed Vac SC110), Savant Instruments, Inc., USA, por 28-30 horas.

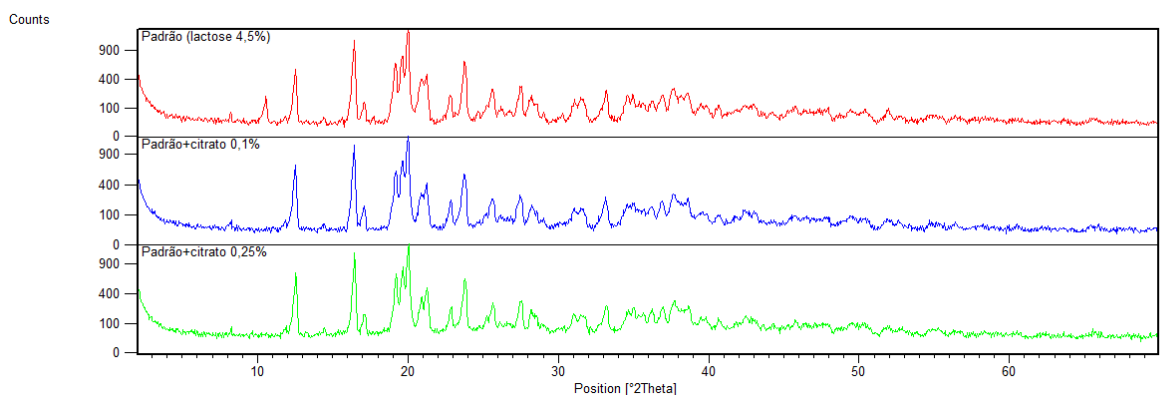
1 As amostras liofilizadas foram analisadas com o difratômetro
2 Panalytical X'Pert PRO MPD, com tubo de cobre, monocromador de grafite e
3 detector por ionização, em um intervalo de 5° à 70° , 2θ , com passo de $0,05^{\circ}$ e um
4 segundo de medida em cada passo. Os difratogramas foram submetidos à análise
5 no *software* X'Pert HighScore Plus (PANALYTICAL, 2004).

6 4.3.5 Resultados e discussão

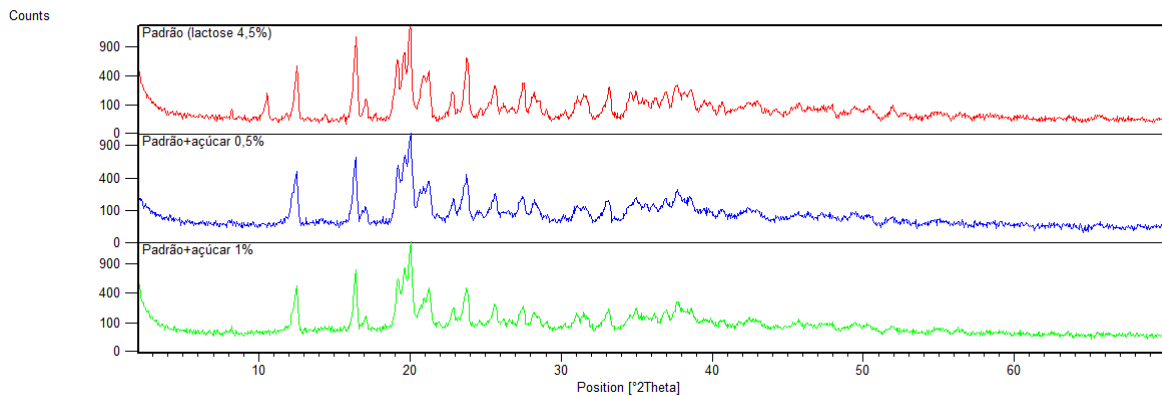
7
8
9 Nas Figuras 5, 6 e 7 estão os difratogramas da solução de lactose a
10 4,5% (padrão) e desta solução adicionada de diferentes concentrações de ureia,
11 citrato de sódio e açúcar, respectivamente.



13
14 **Figura 5.** Difratogramas da solução padrão de lactose a 4,5% e desta solução com
15 ureia 0,1%, ureia 0,5% e ureia 1,0%.



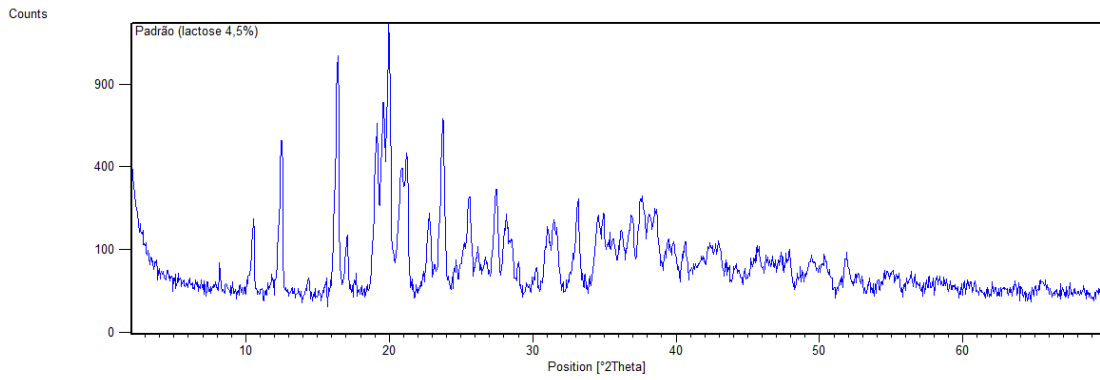
17
18 **Figura 6.** Difratogramas da solução padrão de lactose a 4,5% e desta solução com
19 citrato de sódio 0,1% e citrato de sódio 0,25%.



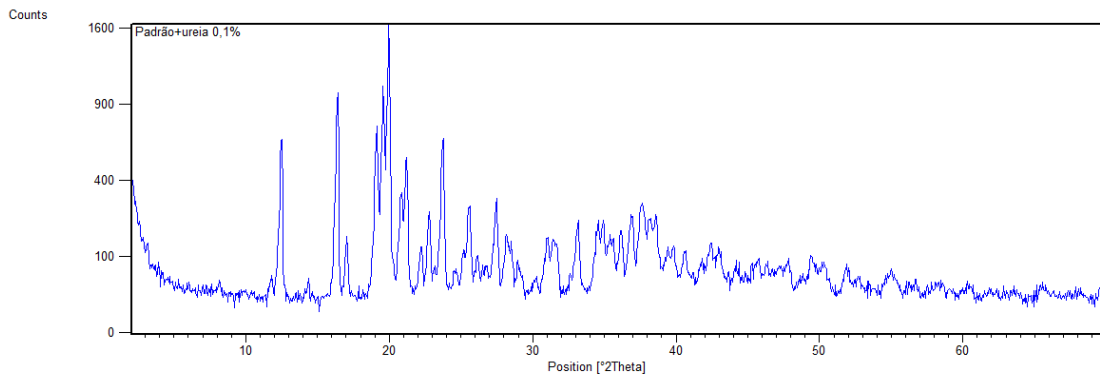
1
2 **Figura 7.** Difratomogramas da solução padrão de lactose a 4,5% e desta solução com
3 açúcar 0,5% e açúcar 1,0%.

4
5 A solução padrão de lactose a 4,5% apresentou picos distribuídos
6 entre 8.15 e 65.55°. A solução padrão adicionada de citrato de sódio e açúcar
7 tiveram uma diminuição no número de picos em relação à solução padrão de lactose
8 4,5%. Já a solução de lactose 4,5% mais ureia teve o número de picos aumentado
9 em todas as concentrações testadas. A sacarose evita o desenvolvimento completo
10 dos cristais de lactose, produzindo cristais curtos e grossos com pouco
11 desenvolvimento do ápice e da base, mas não produz nenhum efeito sobre o cristal
12 de α -lactose. Já os sais podem aumentar ou diminuir a taxa de crescimento,
13 promover ou inibir o crescimento dos cristais e reduzir o rendimento da cristalização
14 da lactose, dependendo do tipo de sal e suas combinações (WONG; HARTEL,
15 2014).

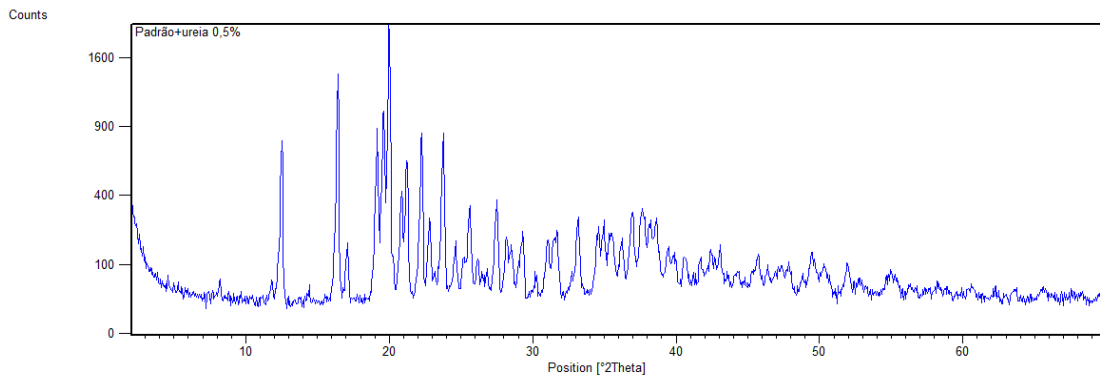
16 A DRX não identificou picos característicos de citrato de sódio e
17 açúcar nas concentrações adicionadas ao padrão de 4,5% de lactose. Foi possível
18 identificar a presença da ureia nas três concentrações testadas (Figura 8).
19 Concentrações superiores a 1,0% de ureia não são usuais na fraude de leite.



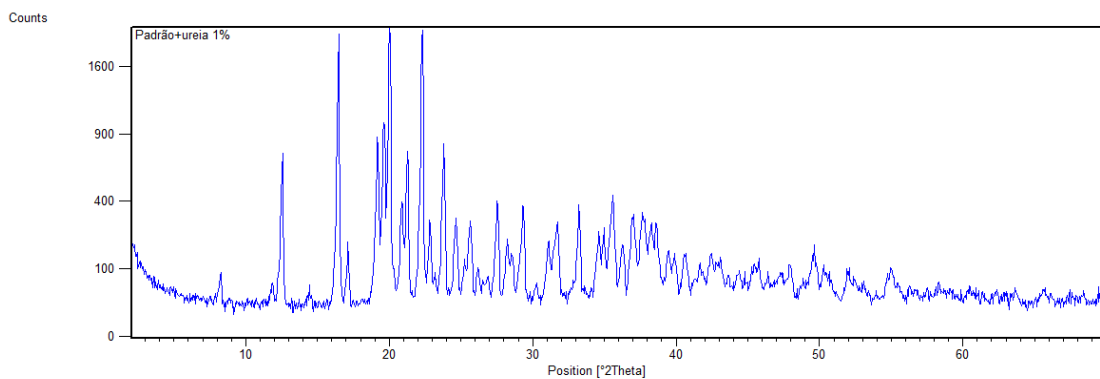
1



2



3



4

5 **Figura 8.** Difractogramas da solução padrão de lactose a 4,5% adicionada de 0,1%,
6 0,5% e 1,0% de ureia.

7

8

1 4.3.6 Conclusões

2
3 A adição de ureia, citrato de sódio e açúcar na solução de lactose a
4 4,5% causou uma alteração na quantidade dos picos de lactose, ocasionando o
5 desaparecimento do pico em 10,4°.

6 A DRX foi capaz de identificar a presença da ureia nas três
7 concentrações testadas (0,1%, 0,5% e 1,0%). Porém, não foi capaz de identificar
8 cristais de citrato de sódio e açúcar em solução de lactose a 4,5% nas
9 concentrações usualmente utilizadas para fraude em leite.

10 11 4.3.7 Referências

12
13 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de
14 Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa Nº 62, de 29 de
15 dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de dezembro de 2011,
16 Seção 1, 2011.

17
18 KARTHEEK, M.A.; SMITH, A.; KOTTAIMUTHU, A.; MANAVALAN, R. Determination
19 of adulterants in food: a review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical**
20 **Research**, v.3, n.2, p.629-636, 2011.

21
22 NIJDAM, J.; IBACH, A.; EICHHORNAND, K.; KIND, M. An X-ray diffraction analysis
23 of crystallised whey and whey-permeate powders. **Carbohydrate Research**, n. 342,
24 p. 2354–2364, 2007.

25
26 PANALYTICAL. X'Pert HighScore Plus. Versão 2.0.1. **Pananalytical B.V.**, The
27 Netherlands, 2004.

28
29 SORMOLI, M.E.; DAS, D.; LANGRISH, T.A.G. Crystallization behavior of
30 lactose/sucrose mixtures during water-induced crystallization. **Journal of Food**
31 **Engineering**, v.116, n.4, p.873-880, 2013.

32
33 TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3 ed. Santa
34 Maria: UFSM, 2008.

- 1 WONG, S.Y.; HARTEL, R.W. Crystallization in lactose refining – a review. **Journal of**
- 2 **Food Science**, v.79, n.3, p.257-272, 2014.
- 3

1 5 CONCLUSÕES FINAIS

2
3 A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a difratometria de
4 raios X (DRX) mostraram que a lactose é o principal componente cristalizado no leite
5 liofilizado, formando cristais do tipo *tomahawk*. A intensidade dos picos de lactose
6 nos difratogramas de raios X do leite liofilizado variaram dependendo da quantidade
7 de sólidos e gordura naturalmente presentes no leite. A quantidade de sólidos totais
8 do leite também influenciou a formação dos cristais de lactose.

9 A técnica DRX foi capaz de detectar com precisão o citrato de sódio
10 e a sacarose antes de serem adicionadas ao leite, ou quando adicionadas em altas
11 concentrações.

12 A DRX foi capaz de identificar a presença de ureia em solução
13 padrão de lactose a 4,5% nas concentrações 0,1%, 0,5% e 1,0%. Porém, não foi
14 capaz de detectar a presença das substâncias reconstituintes citrato de sódio e
15 açúcar quando adicionadas em solução de lactose a 4,5% nas concentrações
16 usualmente utilizadas na fraude de leite.

17 A intensidade dos picos de lactose variou naturalmente no leite
18 liofilizado, portanto não deve ser considerada quando se analisa alterações
19 cristalográficas causadas pela adição de substâncias estranhas ao leite.

20

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

ANEXOS

ANEXO A

Name and formula

Reference code: 00-027-1947
 PDF index name: Lactose hydrate
 Empirical formula: $C_{12}H_{24}O_{12}$
 Chemical formula: $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$

Crystallographic parameters

Crystal system: Monoclinic
 Space group: P21
 Space group number: 4
 a (Å): 7,9750
 b (Å): 21,6120
 c (Å): 4,8300
 Alpha (°): 90,0000
 Beta (°): 109,7700
 Gamma (°): 90,0000
 Volume of cell (10^6 pm^3): 783,41
 Z: 2,00
 RIR: -

Subfiles and Quality

Subfiles: Organic
 Common Phase
 Educational pattern
 Forensic
 Quality: Indexed (I)

Comments

General comments: *Merck Index*, 9th Ed., 5192.
 Additional pattern: To replace 24-1783.
 Unit cell: Crystal system reported by Seifert, Labrot, *Naturwissenschaften*, **48**
 691 (1961): a=7.864, b=21.894, c=4.897, A=0.3591, C=0.2237,
 b=105.975 Dx=1.476, Dm=1.497.

References

Primary reference: Folen, V., *J. Forensic Sci.*, **20**, 348, (1975)
 Unit cell: Wang, P., Polytechnic Inst. of Brooklyn, NY, USA., *ICDD Grant-in-Aid*, (1975)

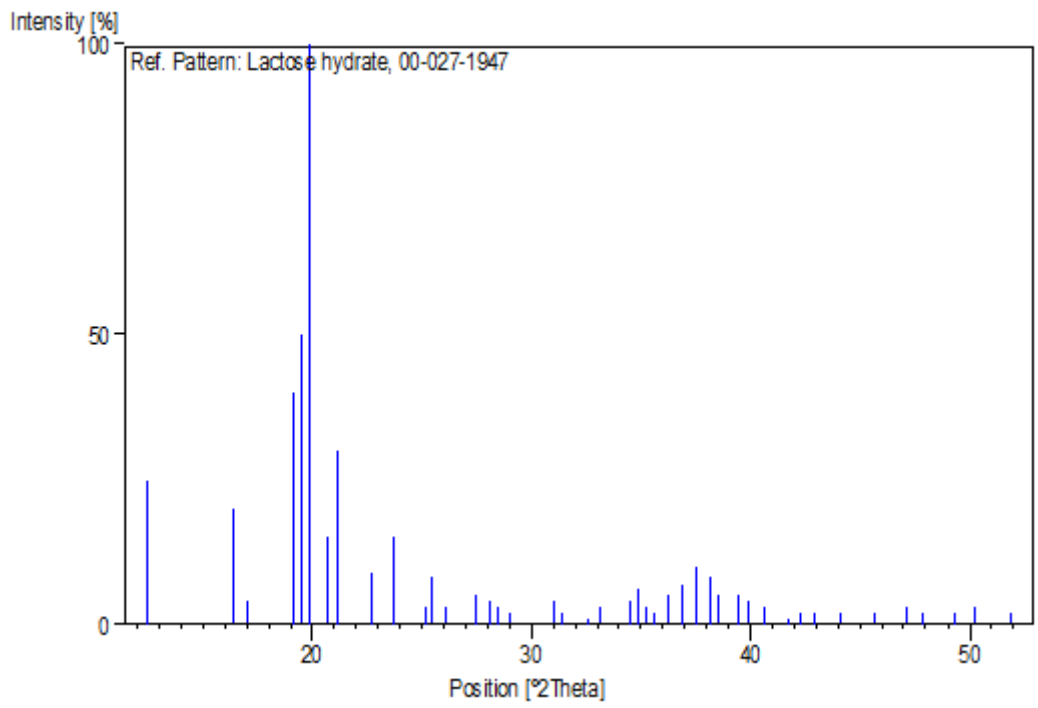
Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1	1	1	0	7,10000	12,457	25,0

1	2	0	4	0	5,41000	16,372	20,0
2	3	-1	3	0	5,19000	17,071	4,0
3	4	-1	0	1	4,64000	19,112	40,0
4	5	-1	1	1	4,54000	19,537	50,0
5	6	0	1	1	4,46000	19,891	100,0
6	7	-1	2	1	4,28000	20,737	15,0
7	8	0	2	1	4,20000	21,136	30,0
8	9	-1	3	1	3,91000	22,724	9,0
9	10	2	0	0	3,75000	23,707	15,0
10	11	-1	4	1	3,53000	25,208	3,0
11	12	-2	1	1	3,49000	25,502	8,0
12	13	1	0	1	3,41000	26,111	3,0
13	14	1	2	1	3,25000	27,421	5,0
14	15	-1	5	1	3,17000	28,127	4,0
15	16	0	5	1	3,13000	28,494	3,0
16	17	2	4	0	3,08000	28,967	2,0
17	18	1	4	1	2,88200	31,005	4,0
18	19	-1	6	1	2,84600	31,407	2,0
19	20	-2	5	1	2,74400	32,607	1,0
20	21	0	8	0	2,70000	33,153	3,0
21	22	-2	6	0	2,59700	34,508	4,0
22	23	-1	7	1	2,56900	34,897	6,0
23	24	-1	8	0	2,54300	35,265	3,0
24	25	-3	2	1	2,52000	35,598	2,0
25	26	1	6	1	2,47900	36,206	5,0
26	27	3	2	0	2,43500	36,884	7,0
27	28	-1	1	2	2,39500	37,523	10,0
28	29	-1	2	2	2,35400	38,201	8,0
29	30	-1	8	1	2,33300	38,559	5,0
30	31	-1	9	0	2,28500	39,402	5,0
31	32	0	1	2	2,26000	39,856	4,0
32	33	-3	5	1	2,22000	40,606	3,0
33	34	0	10	0	2,16200	41,745	1,0
34	35	-2	4	2	2,13500	42,298	2,0
35	36	-3	6	1	2,10400	42,952	2,0
36	37	-2	5	2	2,05000	44,142	2,0
37	38	-3	3	2	1,98400	45,692	2,0
38	39	-3	4	2	1,92800	47,098	3,0
39	40	1	11	0	1,89900	47,862	2,0
40	41	-2	10	1	1,84500	49,355	2,0
41	42	-4	3	0	1,81600	50,197	3,0
42	43	-2	8	2	1,76000	51,911	2,0

43
44
45
46

Stick Pattern



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16

Name and formula

Reference code: 00-024-1783
 PDF index name: a-Lactose hydrate
 Empirical formula: $C_{12}H_{24}O_{12}$
 Chemical formula: $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$

Crystallographic parameters

Crystal system: Monoclinic
 Space group: P21
 Space group number: 4
 a (Å): 7,9820
 b (Å): 21,5620
 c (Å): 4,8240
 Alpha (°): 90,0000
 Beta (°): 109,5700
 Gamma (°): 90,0000
 Calculated density (g/cm³): 1,54
 Measured density (g/cm³): 1,54
 Volume of cell (10⁶ pm³): 782,29
 Z: 2,00

RIR: -

Status, subfiles and quality

Status: Marked as deleted by ICDD
 Subfiles: Organic
 Quality: Indexed (I)

Comments

Deleted by: Deleted by 27-1947.
 Color: White
 General comments: (Pattern indexed at Department of Physics, University college, Cardiff, Wales).
 Additional pattern: To replace 1-0333 and 3-175.

References

Primary reference: Department of Physics at University College, Cardiff, Wales., *ICDD Grant-in-Aid*
 Unit cell: Fries et al., *Acta Crystallogr., Sec. B*, **27**, 1005, (1971)

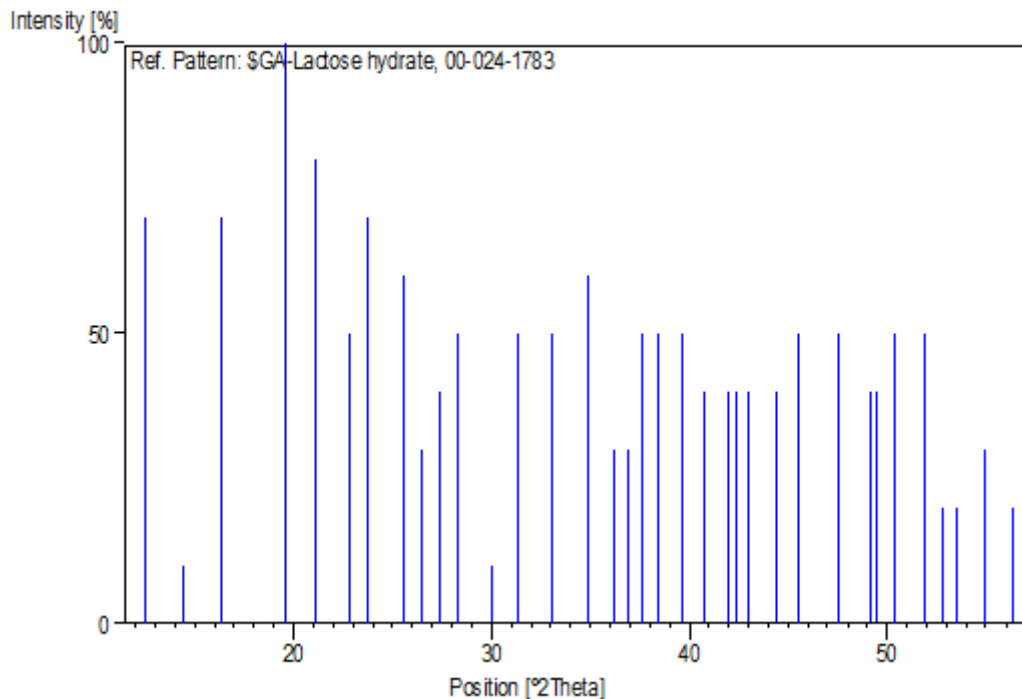
Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1	1	1	0	7,08000	12,492	70,0
2	1	2	0	6,14000	14,414	10,0
3	0	4	0	5,41000	16,372	70,0
4	-1	1	1	4,53000	19,581	100,0

1	5	0	2	1	4,21000	21,086	80,0
2	6	-1	3	1	3,89000	22,842	50,0
3	7	1	5	0	3,74000	23,772	70,0
4	8	0	4	1	3,48000	25,577	60,0
5	9	-2	2	1	3,36000	26,507	30,0
6	10	1	2	1	3,25000	27,421	40,0
7	11	-1	5	1	3,15000	28,309	50,0
8	12	-2	4	1	2,97000	30,064	10,0
9	13	1	7	0	2,85000	31,362	50,0
10	14	0	8	0	2,71000	33,027	50,0
11	15	-1	7	1	2,57000	34,882	60,0
12	16	1	6	1	2,48000	36,191	30,0
13	17	-3	3	1	2,43000	36,963	30,0
14	18	-1	1	2	2,39000	37,604	50,0
15	19	-3	4	1	2,34000	38,439	50,0
16	20	0	0	2	2,27000	39,673	50,0
17	21	-2	3	2	2,21000	40,798	40,0
18	22	-2	8	1	2,15000	41,989	40,0
19	23	-2	4	2	2,13000	42,402	40,0
20	24	-3	6	1	2,10000	43,038	40,0
21	25	-2	5	2	2,04000	44,370	40,0
22	26	1	1	2	1,99000	45,547	50,0
23	27	3	2	1	1,91000	47,569	50,0
24	28	4	2	0	1,85000	49,212	40,0
25	29	-2	10	1	1,84000	49,498	40,0
26	30	1	5	2	1,81000	50,375	50,0
27	31	-3	9	1	1,76000	51,911	50,0
28	32	-3	9	0	1,73000	52,880	20,0
29	33	2	0	2	1,71000	53,547	20,0
30	34	-4	7	1	1,67000	54,937	30,0
31	35	2	4	2	1,63000	56,403	20,0

32
33
34
35

Stick Pattern



36

Name and formula

Reference code: 00-029-1758
 PDF index name: b-Lactose
 Empirical formula: $C_{12}H_{22}O_{11}$
 Chemical formula: $C_{12}H_{22}O_{11}$

Crystallographic parameters

Crystal system: Unknown

RIR: -

Subfiles and Quality

Subfiles: Organic
 Common Phase
 Educational pattern
 Forensic
 Quality: Blank (B)

Comments

General comments: *Merck Index*, 9th Ed., 5192.

References

Primary reference: Folen, V., *J. Forensic Sci.*, **20**, 348, (1975)

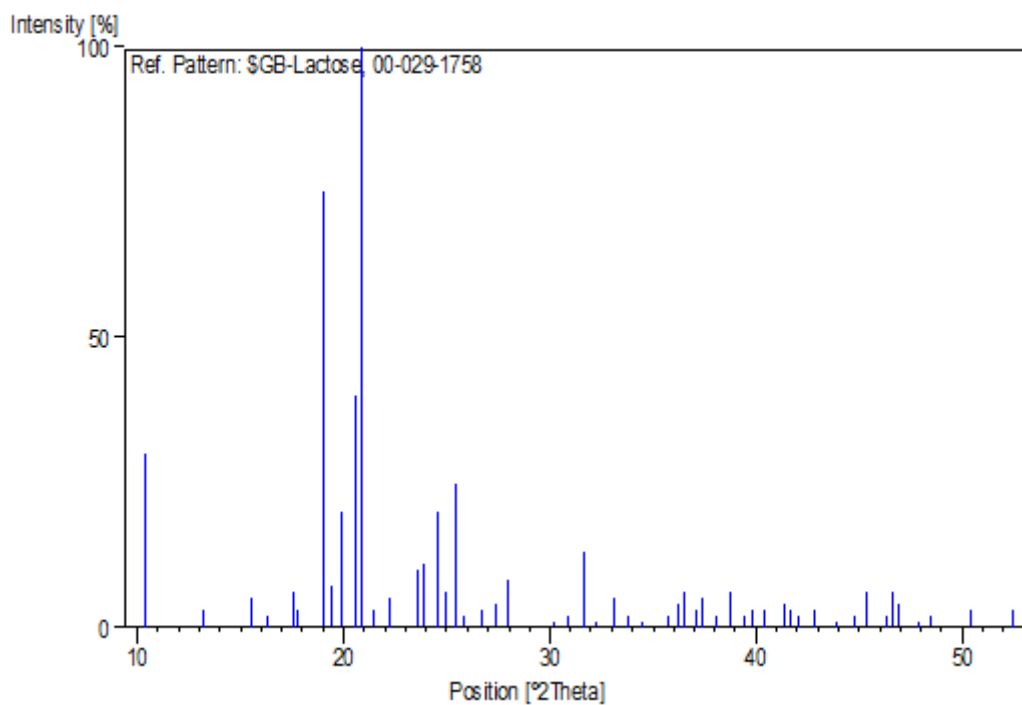
Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1				8,50000	10,399	30,0
2				6,72000	13,164	3,0
3				5,70000	15,533	5,0
4				5,44000	16,281	2,0
5				5,04000	17,583	6,0
6				4,98000	17,796	3,0
7				4,67000	18,988	75,0
8				4,56000	19,451	7,0
9				4,47000	19,846	20,0
10				4,31000	20,591	40,0
11				4,26000	20,835	100,0
12				4,13000	21,499	3,0
13				3,99000	22,263	5,0
14				3,76000	23,643	10,0
15				3,72000	23,901	11,0
16				3,62000	24,572	20,0
17				3,57000	24,921	6,0
18				3,50000	25,428	25,0
19				3,44000	25,879	2,0
20				3,33000	26,750	3,0
21				3,25000	27,421	4,0

1	22	3,19000	27,947	8,0
2	23	2,96000	30,168	1,0
3	24	2,89000	30,917	2,0
4	25	2,82500	31,647	13,0
5	26	2,77000	32,292	1,0
6	27	2,70500	33,090	5,0
7	28	2,65000	33,797	2,0
8	29	2,59700	34,508	1,0
9	30	2,51300	35,700	2,0
10	31	2,47500	36,267	4,0
11	32	2,46000	36,496	6,0
12	33	2,42200	37,089	3,0
13	34	2,40200	37,409	5,0
14	35	2,36200	38,067	2,0
15	36	2,32300	38,731	6,0
16	37	2,28200	39,456	2,0
17	38	2,26000	39,856	3,0
18	39	2,23000	40,416	3,0
19	40	2,18200	41,345	4,0
20	41	2,16800	41,624	3,0
21	42	2,14600	42,071	2,0
22	43	2,11000	42,824	3,0
23	44	2,06100	43,894	1,0
24	45	2,02200	44,786	2,0
25	46	2,00000	45,306	6,0
26	47	1,95800	46,334	2,0
27	48	1,94700	46,611	6,0
28	49	1,93400	46,943	4,0
29	50	1,89700	47,915	1,0
30	51	1,87500	48,514	2,0
31	52	1,81000	50,375	3,0
32	53	1,74300	52,455	3,0

33
34
35
36

Stick Pattern



37

ANEXO B

Name and formula

Reference code:	00-031-1979
PDF index name:	Urea
Empirical formula:	CH ₄ N ₂ O
Chemical formula:	CH ₄ N ₂ O

Crystallographic parameters

Crystal system:	Tetragonal
Space group:	P-421m
Space group number:	113
a (Å):	5,6568
b (Å):	5,6568
c (Å):	4,7072
Alpha (°):	90,0000
Beta (°):	90,0000
Gamma (°):	90,0000
Calculated density (g/cm ³):	1,32
Volume of cell (10 ⁶ pm ³):	150,63
Z:	2,00
RIR:	0,84

Subfiles and Quality

Subfiles:	Organic Pharmaceutical
Quality:	Star (S)

Comments

Color:	Colorless
General comments:	d-values given correspond to cell parameters quoted. Intensity values given as peak heights, though better agreement with calculated values for known structure obtained by using $x[(I_p - I_b)]$ times width at $0.5(I_p - I_b)$. x =vacancy. Recrystallized from Analar grade urea. Merck Index, 9th Ed., 9525. Data obtained while testing a new empirical correction for line position on Guinier films. Centers of symmetric peaks agree with calculated line positions on film to within error of estimation using 50mm aperture on scanning densitometer. (0.1mm=0.025° of θ) for whole pattern.
Unit cell:	Authors gave $a=5.661$, $c=4.712$ for $l=1.542$ recalculating for $\lambda=1.5405$ gives $a=5.6555$, $c=4.7074$.

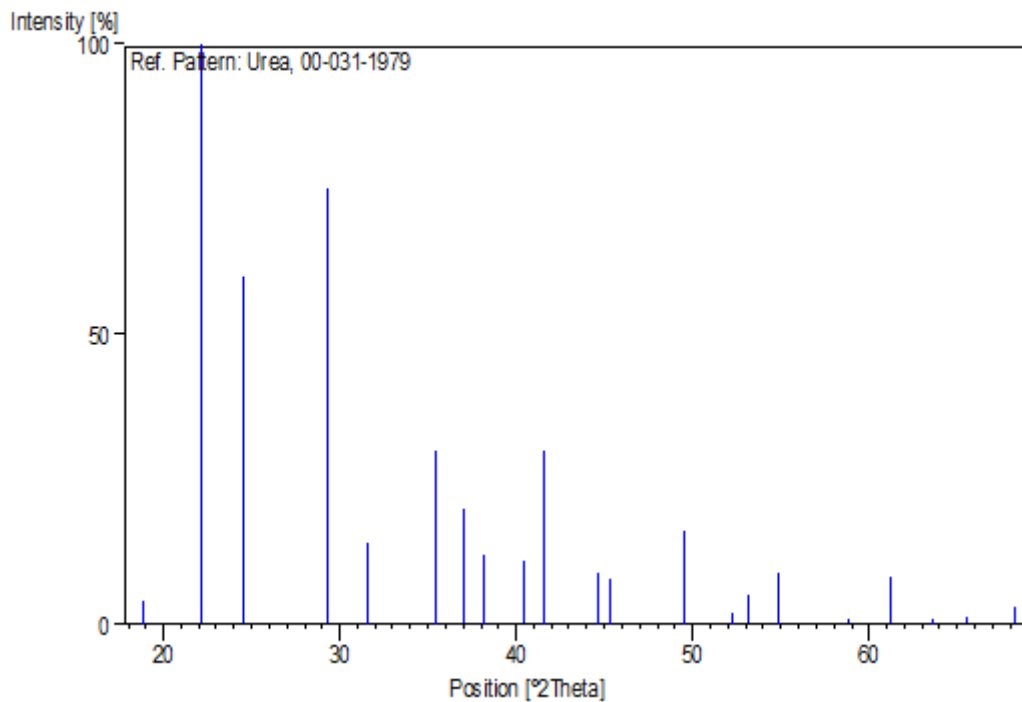
References

1
 2 Primary reference: Mendelssohn, M., Milledge, University College, London, England.,
 3 *ICDD Grant-in-Aid*
 4 Unit cell: Vaughan, P., Donohue., *Acta Crystallogr.*, **5**, 530, (1952)
 5

6 Peak list

7	8	No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
9		1	0	0	1	4,70700	18,838	4,0
10		2	1	1	0	4,00000	22,206	100,0
11		3	1	0	1	3,61800	24,586	60,0
12		4	1	1	1	3,04800	29,277	75,0
13		5	2	0	0	2,82800	31,612	14,0
14		6	2	1	0	2,52900	35,467	30,0
15		7	2	0	1	2,42400	37,058	20,0
16		8	0	0	2	2,35400	38,201	12,0
17		9	2	1	1	2,22800	40,453	11,0
18		10	1	0	2	2,17300	41,524	30,0
19		11	1	1	2	2,02900	44,623	9,0
20		12	2	2	0	2,00000	45,306	8,0
21		13	2	2	1	1,84100	49,469	16,0
22		14	3	0	1	1,75000	52,230	2,0
23		15	2	1	2	1,72300	53,112	5,0
24		16	3	1	1	1,67200	54,865	9,0
25		17	0	0	3	1,56900	58,806	1,0
26		18	1	0	3	1,51200	61,255	8,0
27		19	1	1	3	1,46100	63,639	1,0
28		20	3	1	2	1,42400	65,495	1,0
29		21	4	1	0	1,37200	68,311	3,0

32 Stick Pattern



34

35

ANEXO C

Name and formula

Reference code: 00-016-1170
 PDF index name: Sodium citrate dihydrate
 Empirical formula: $C_6H_9Na_3O_9$
 Chemical formula: $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$

Crystallographic parameters

Crystal system: Monoclinic
 Space group: C2/c
 Space group number: 15
 a (Å): 15,7000
 b (Å): 12,5000
 c (Å): 11,2800
 Alpha (°): 90,0000
 Beta (°): 103,5800
 Gamma (°): 90,0000
 Calculated density (g/cm³): 1,81
 Volume of cell (10⁶ pm³): 2151,81
 Z: 8,00

RIR: -

Subfiles and Quality

Subfiles: Organic
 Forensic
 Quality: Indexed (I)

Comments

Additional diffraction line(s): Plus 7 additional reflections to 1.949.

References

Primary reference: de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands.,
ICDD Grant-in-Aid

Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1	-1	1	0	9,54000	9,263	12,0
2	-1	1	1	7,86000	11,248	100,0
3	2	0	0	7,63000	11,589	10,0
4	1	1	1	6,77000	13,067	2,0
5	0	2	0	6,25000	14,159	2,0
6	0	0	2	5,49000	16,132	18,0

1	7	0	2	1	5,43000	16,311	2,0
2	8	-2	0	2	5,05000	17,548	30,0
3	9	-2	2	0	4,83000	18,354	10,0
4	10	3	1	0	4,71000	18,826	2,0
5	11	-2	2	1	4,69000	18,907	4,0
6	12	1	1	2	4,59000	19,322	6,0
7	13	2	2	1	4,20000	21,136	2,0
8	14	0	2	2	4,12000	21,552	2,0
9	15	-3	1	2	4,03000	22,039	4,0
10	16	-2	2	2	3,93000	22,607	4,0
11	17	-1	3	1	3,85000	23,083	4,0
12	18	4	0	0	3,82000	23,267	2,0
13	19	1	3	1	3,70000	24,033	35,0
14	20	-1	1	3	3,60000	24,710	6,0
15	21	-4	0	2	3,55000	25,064	4,0
16	22	2	2	2	3,39000	26,268	6,0
17	23	-1	3	2	3,34000	26,668	2,0
18	24	-4	2	1	3,31000	26,914	2,0
19	25	1	1	3	3,26000	27,335	2,0
20	26	4	2	0	3,25800	27,352	12,0
21	27	3	1	2	3,24000	27,507	6,0
22	28	-3	3	1	3,23000	27,594	10,0
23	29	0	2	3	3,16000	28,218	8,0
24	30	0	4	0	3,12000	28,587	4,0
25	31	-4	2	2	3,09000	28,871	4,0
26	32	-5	1	1	3,04000	29,356	4,0
27	33	0	4	1	3,01000	29,655	14,0
28	34	-3	3	2	2,97900	29,971	6,0
29	35	4	2	1	2,96400	30,127	10,0
30	36	-5	1	2	2,90000	30,808	4,0
31	37	2	4	0	2,89000	30,917	4,0
32	38	4	0	2	2,83500	31,532	2,0
33	39	-2	0	4	2,79800	31,960	6,0
34	40	-1	3	3	2,79100	32,043	6,0
35	41	0	0	4	2,74200	32,631	12,0
36	42	0	4	2	2,71400	32,977	6,0
37	43	-2	4	2	2,65700	33,706	2,0
38	44	-3	1	4	2,63200	34,035	2,0
39	45	3	1	3	2,62500	34,129	2,0
40	46	-3	3	3	2,61900	34,210	6,0
41	47	4	2	2	2,58200	34,715	4,0
42	48	-2	2	4	2,55400	35,108	2,0
43	49	-6	0	2	2,54700	35,208	2,0
44	50	1	1	4	2,54000	35,308	4,0
45	51	-4	0	4	2,52500	35,525	2,0
46	52	0	2	4	2,51100	35,729	2,0
47	53	-5	3	1	2,50700	35,788	2,0
48	54	1	5	0	2,46700	36,389	8,0
49	55	5	3	0	2,46300	36,450	8,0
50	56	-4	4	1	2,43800	36,837	14,0
51	57	-5	3	2	2,42500	37,042	6,0
52	58	-6	2	1	2,41400	37,217	10,0
53	59	5	1	2	2,39000	37,604	2,0
54	60	0	4	3	2,37500	37,851	2,0
55	61	-6	2	2	2,35900	38,117	4,0
56	62	-1	3	4	2,33300	38,559	2,0
57	63	5	3	1	2,31100	38,941	2,0
58	64	-1	5	2	2,28100	39,474	2,0
59	65	3	3	3	2,25700	39,911	4,0
60	66	-5	3	3	2,24800	40,078	2,0
61	67	-3	5	1	2,24400	40,153	6,0

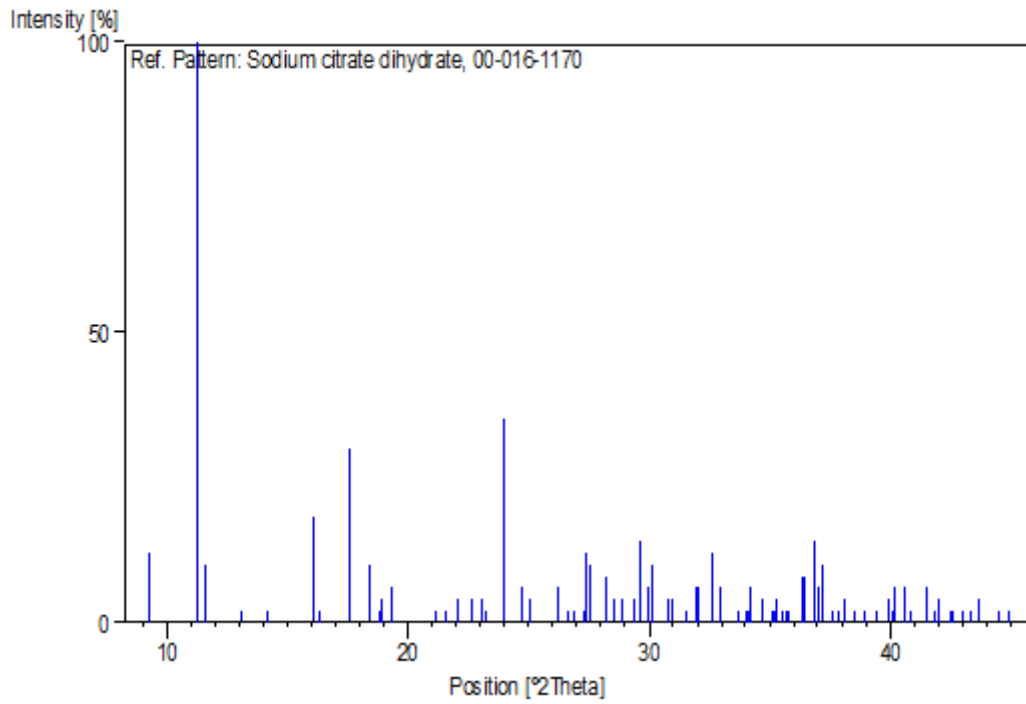
1	68	4	2	3	2,22100	40,587	6,0
2	69	6	2	1	2,20700	40,855	2,0
3	70	3	1	4	2,17400	41,504	6,0
4	71	-3	5	2	2,15600	41,867	2,0
5	72	7	1	0	2,14800	42,030	4,0
6	73	6	0	2	2,12600	42,486	2,0
7	74	-2	2	5	2,12100	42,591	2,0
8	75	4	4	2	2,10000	43,038	2,0
9	76	-2	4	4	2,08500	43,363	2,0
10	77	0	2	5	2,07100	43,671	4,0
11	78	-5	3	4	2,03300	44,531	2,0
12	79	-4	2	5	2,01500	44,950	2,0

13

14

15 **Stick Pattern**

16



17

18

19

20

21

22

23

24

25

ANEXO D

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

Name and formula

Reference code: 00-024-1977
 PDF index name: Sucrose
 Empirical formula: $C_{12}H_{22}O_{11}$
 Chemical formula: $C_{12}H_{22}O_{11}$

Crystallographic parameters

Crystal system: Monoclinic
 Space group: P21
 Space group number: 4
 a (Å): 10,8680
 b (Å): 8,7100
 c (Å): 7,7610
 Alpha (°): 90,0000
 Beta (°): 102,9700
 Gamma (°): 90,0000
 Calculated density (g/cm³): 1,59
 Volume of cell (10⁶ pm³): 715,92
 Z: 2,00
 RIR: 0,70

Subfiles and Quality

Subfiles: Organic
 Common Phase
 Educational pattern
 Forensic
 NBS pattern
 Pharmaceutical
 Quality: Star (S)

Comments

Color: Colorless
 General comments: Moisture - >0.01%, ash - >0.01%, reducing substances - >0.02%.
 Sample source: The sample used was an NBS Standard Reference Material (Number 17).
 Optical data: A=1.540, B=1.558, Q=1.564, Sign=[-], 2V=40(15)°
 Additional pattern: To replace 6-142.
 Additional diffraction line(s): Plus 11 additional reflections to 1.635.
 Temperature: Pattern taken at 25 C.

References

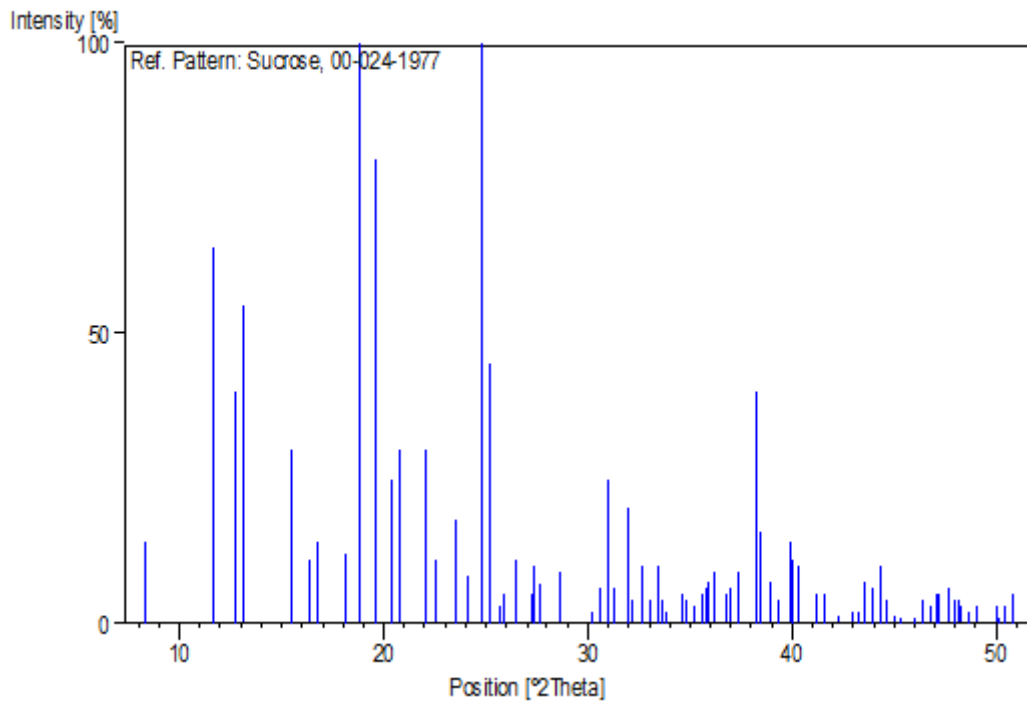
Primary reference: *Natl. Bur. Stand. (U.S.) Monogr. 25, 11, 66, (1974)*

Peak list							
	No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1							
2							
3							
4	1	1	0	0	10,60000	8,335	14,0
5	2	0	0	1	7,58000	11,665	65,0
6	3	-1	0	1	6,94000	12,745	40,0
7	4	-1	1	0	6,73000	13,145	55,0
8	5	0	1	1	5,71200	15,501	30,0
9	6	-1	1	1	5,42400	16,329	11,0
10	7	2	0	0	5,29800	16,720	14,0
11	8	-2	0	1	4,88400	18,149	12,0
12	9	1	1	1	4,70600	18,842	100,0
13	10	2	1	0	4,52300	19,611	80,0
14	11	0	2	0	4,35400	20,381	25,0
15	12	-2	1	1	4,25900	20,840	30,0
16	13	-1	2	0	4,02800	22,050	30,0
17	14	2	0	1	3,94300	22,531	11,0
18	15	0	2	1	3,77600	23,542	18,0
19	16	-1	2	1	3,69000	24,099	8,0
20	17	2	1	1	3,59100	24,773	100,0
21	18	3	0	0	3,53100	25,201	45,0
22	19	-2	0	2	3,46700	25,674	3,0
23	20	1	2	1	3,43700	25,902	5,0
24	21	-2	2	0	3,36400	26,474	11,0
25	22	3	1	0	3,27200	27,233	5,0
26	23	-2	2	1	3,25400	27,387	10,0
27	24	-2	1	2	3,22200	27,664	7,0
28	25	1	1	2	3,11200	28,662	9,0
29	26	3	0	1	2,95600	30,210	2,0
30	27	2	2	1	2,92300	30,559	6,0
31	28	-1	2	2	2,88200	31,005	25,0
32	29	0	2	2	2,85600	31,294	6,0
33	30	3	1	1	2,79900	31,949	20,0
34	31	-3	1	2	2,77700	32,208	4,0
35	32	-3	2	0	2,74200	32,631	10,0
36	33	0	3	1	2,71100	33,015	4,0
37	34	-1	3	1	2,67700	33,446	10,0
38	35	2	1	2	2,66100	33,653	4,0
39	36	4	0	0	2,64800	33,824	2,0
40	37	-1	0	3	2,58600	34,660	5,0
41	38	-4	1	1	2,57400	34,827	4,0
42	39	2	3	0	2,54500	35,236	3,0
43	40	0	0	3	2,52100	35,583	5,0
44	41	-2	0	3	2,50400	35,833	6,0
45	42	-2	3	1	2,49600	35,951	7,0
46	43	-1	1	3	2,47900	36,206	9,0
47	44	3	2	1	2,44400	36,743	5,0
48	45	-3	2	2	2,43000	36,963	6,0
49	46	-2	1	3	2,40600	37,345	9,0
50	47	-4	1	2	2,34900	38,286	40,0
51	48	2	3	1	2,33900	38,456	16,0
52	49	-3	0	3	2,31200	38,923	7,0
53	50	-4	2	1	2,29100	39,295	4,0
54	51	1	1	3	2,25800	39,893	14,0
55	52	3	1	2	2,25300	39,985	11,0
56	53	-3	1	3	2,23400	40,340	10,0
57	54	1	3	2	2,18900	41,207	5,0
58	55	-2	2	3	2,17100	41,564	5,0
59	56	1	4	0	2,13300	42,340	1,0
60	57	2	0	3	2,10100	43,016	2,0
61	58	0	4	1	2,09100	43,233	2,0

1	59	-4	0	3	2,07500	43,583	7,0
2	60	1	2	3	2,06000	43,917	6,0
3	61	2	1	3	2,04200	44,324	10,0
4	62	1	4	1	2,02800	44,647	4,0
5	63	-2	4	0	2,01400	44,974	1,0
6	64	-5	1	2	2,00000	45,306	1,0
7	65	4	0	2	1,97100	46,011	1,0
8	66	-4	3	0	1,95600	46,384	4,0
9	67	-5	2	1	1,94200	46,738	3,0
10	68	5	0	1	1,92900	47,072	5,0
11	69	-2	0	4	1,92400	47,202	5,0
12	70	0	3	3	1,90400	47,728	6,0
13	71	-1	4	2	1,89500	47,969	4,0
14	72	0	4	2	1,88700	48,185	4,0
15	73	5	1	1	1,88500	48,240	3,0
16	74	-4	3	2	1,87000	48,652	2,0
17	75	3	4	0	1,85500	49,071	3,0
18	76	1	4	2	1,82300	49,991	3,0
19	77	3	3	2	1,81800	50,138	1,0
20	78	-3	3	3	1,80900	50,405	3,0
21	79	4	2	2	1,79500	50,826	5,0

22
23
24
25

Stick Pattern



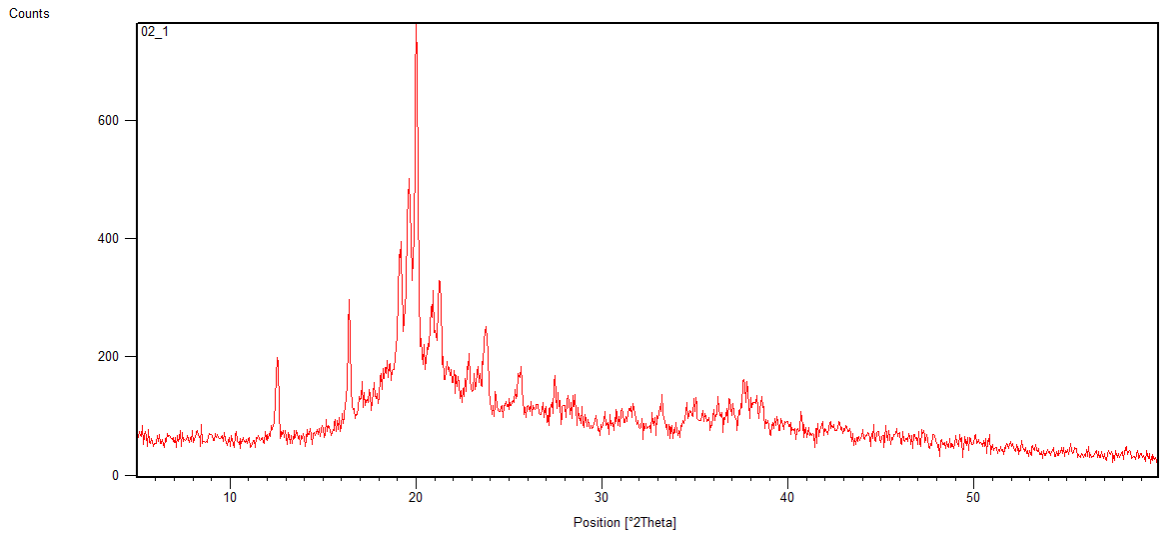
26
27
28
29
30
31

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

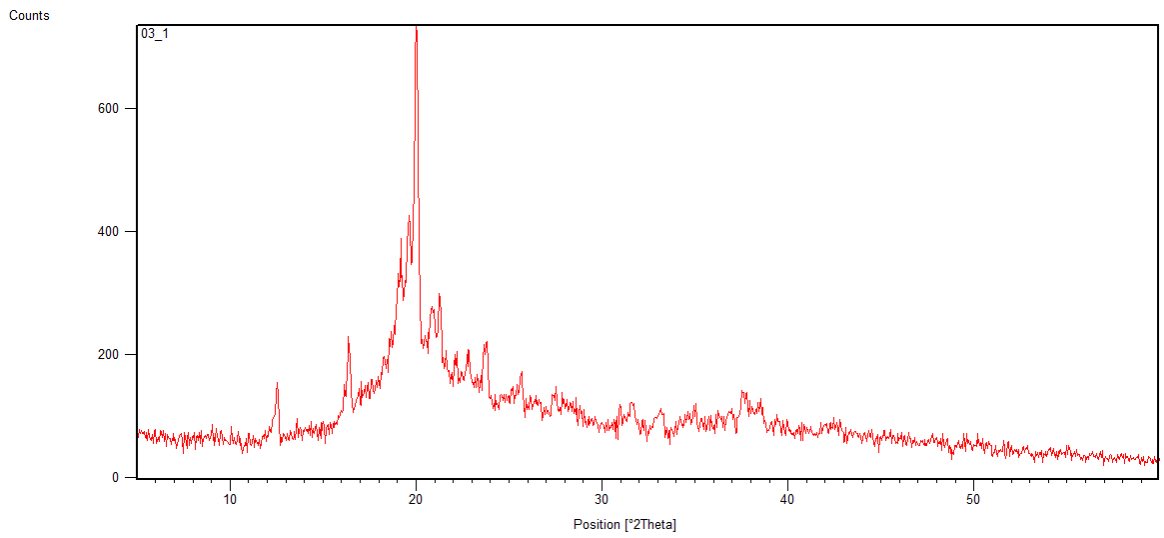
APÊNDICES

APÊNDICE A

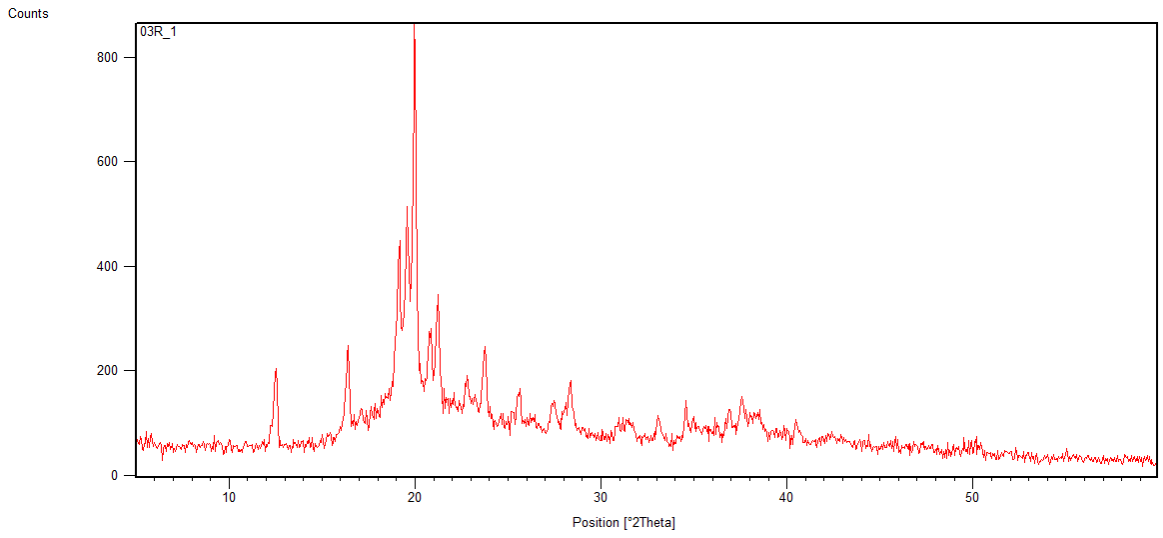
1
2



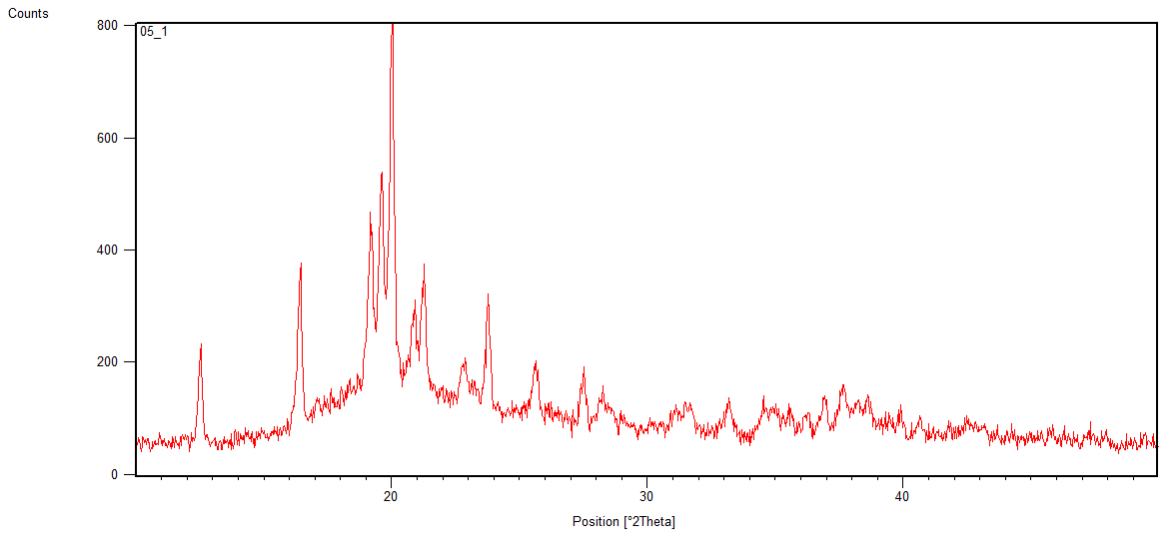
3



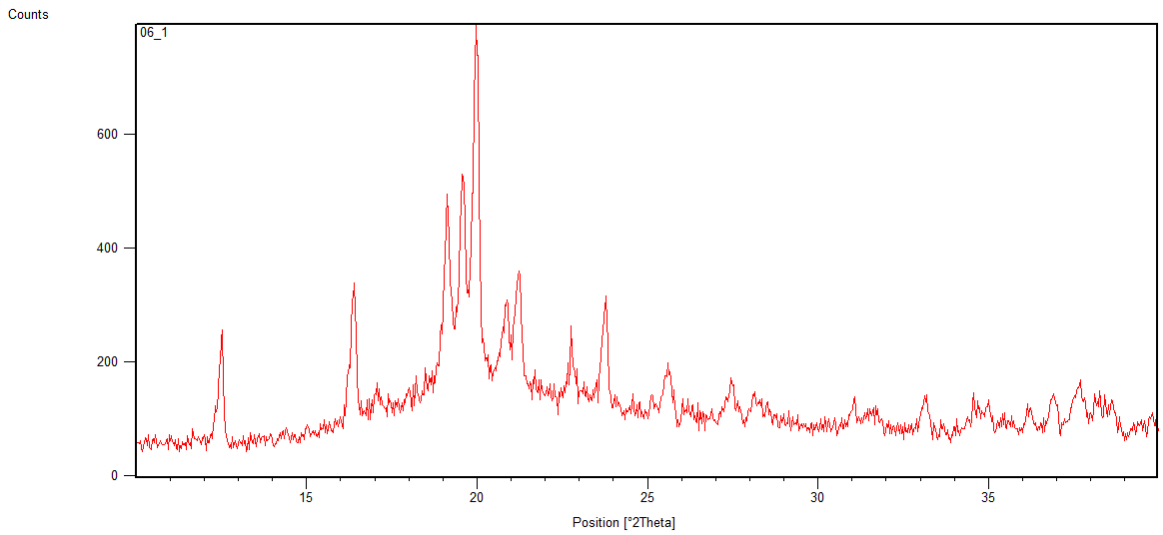
4



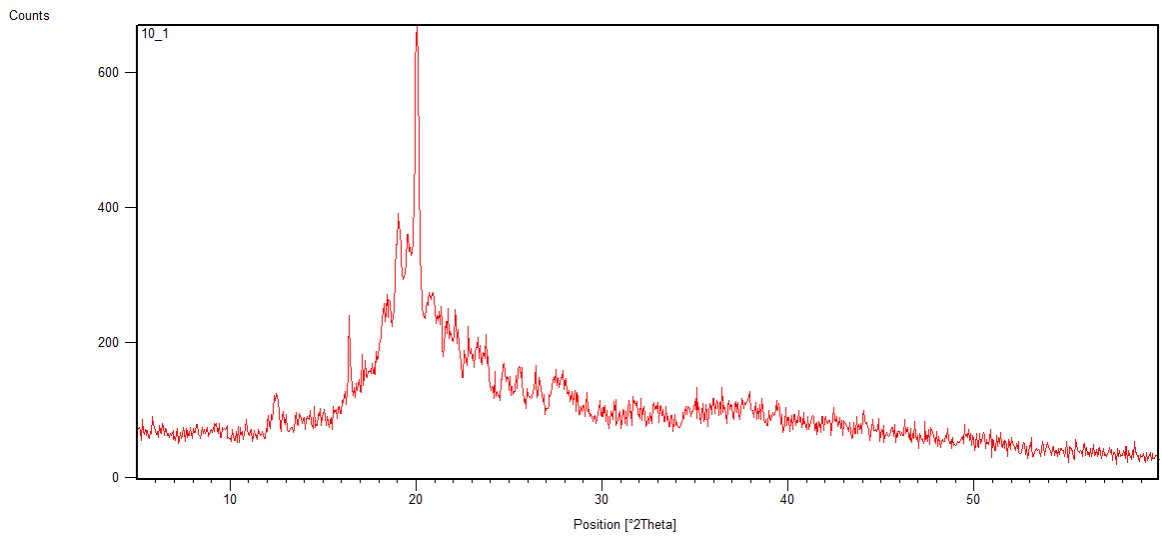
1



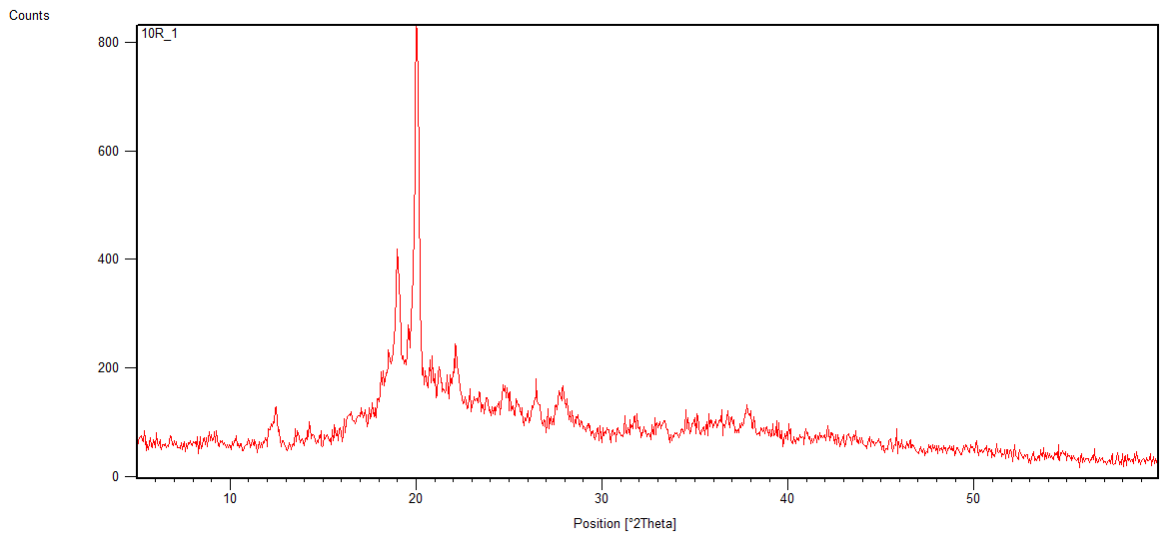
2



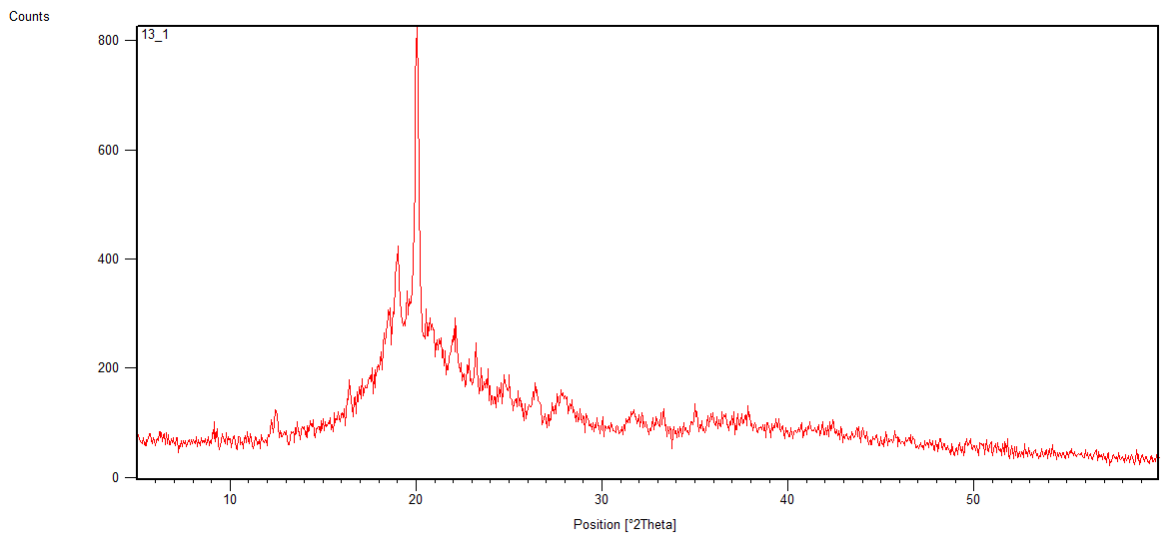
3



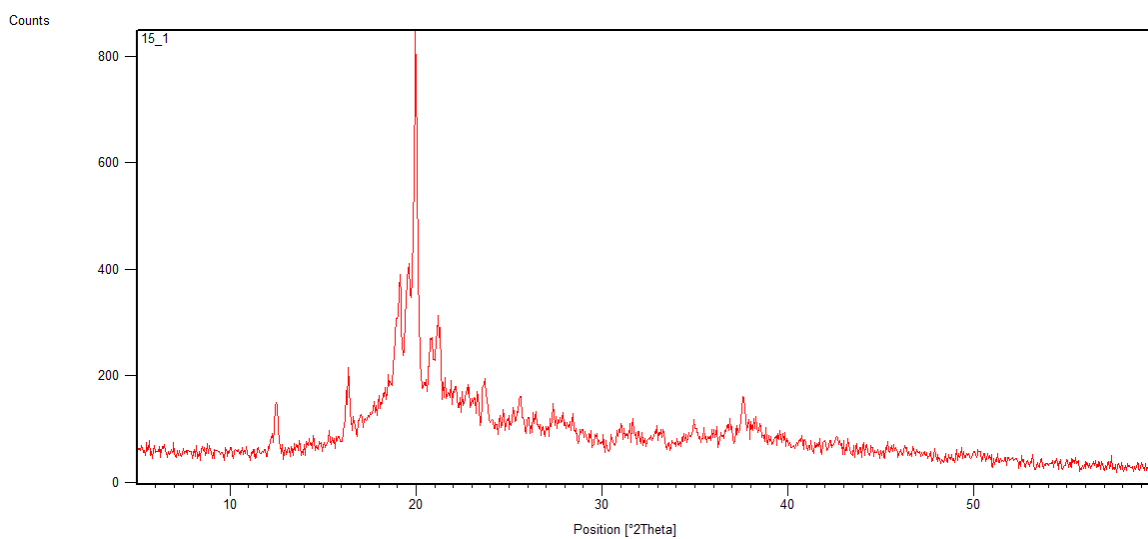
1



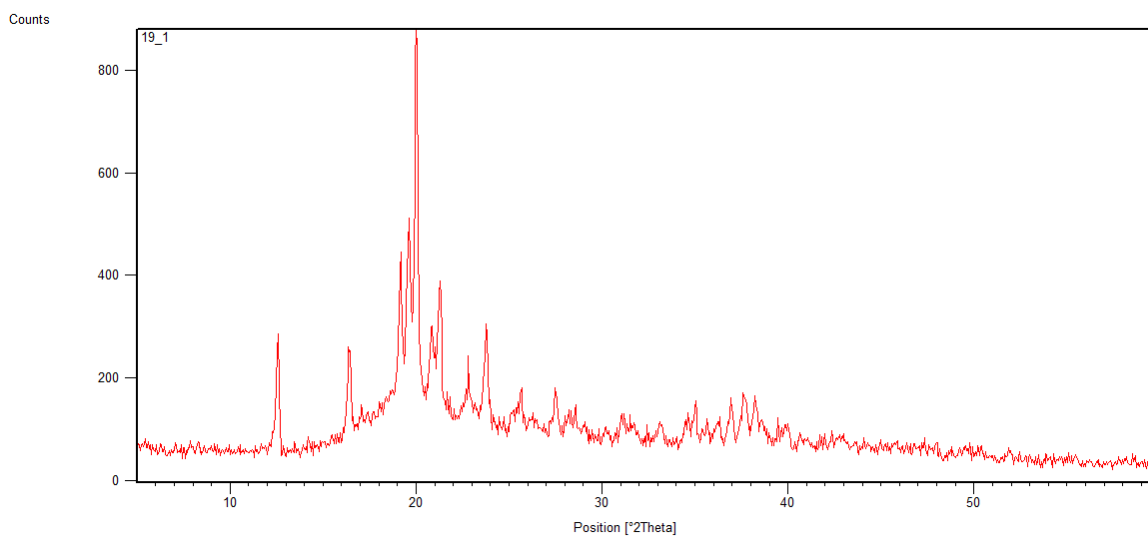
2



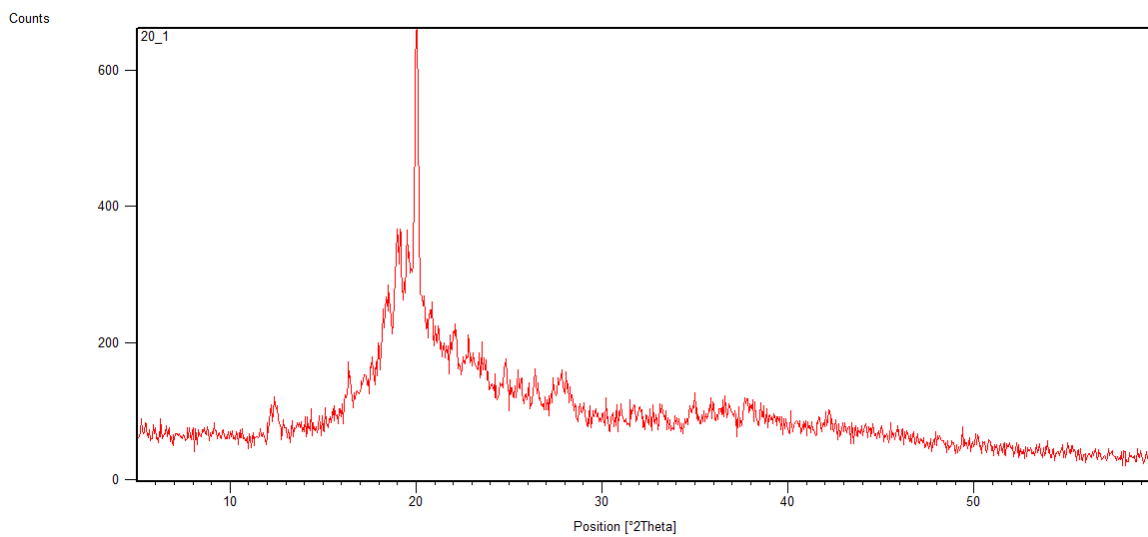
3



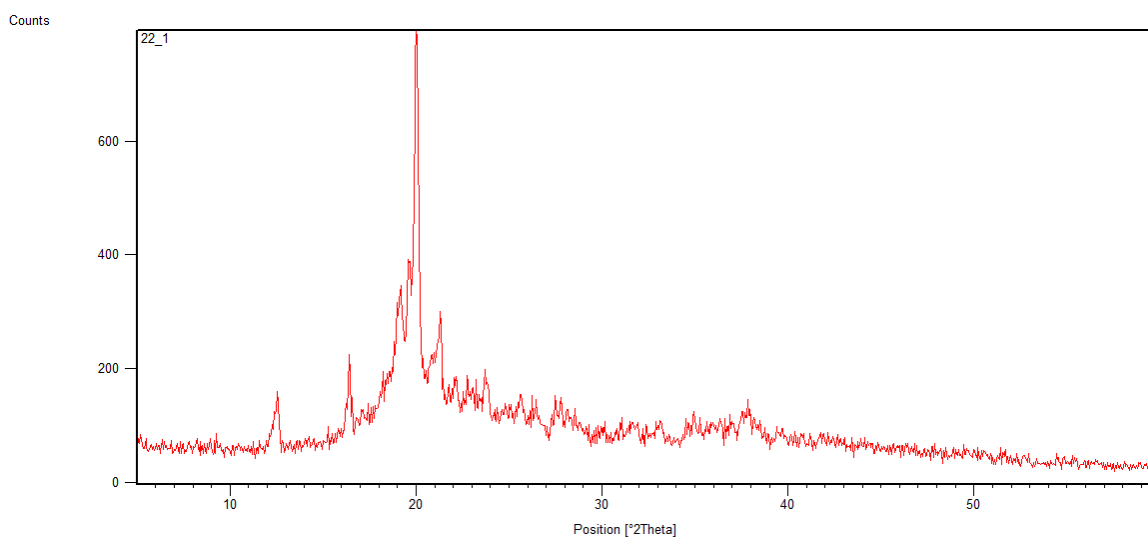
1



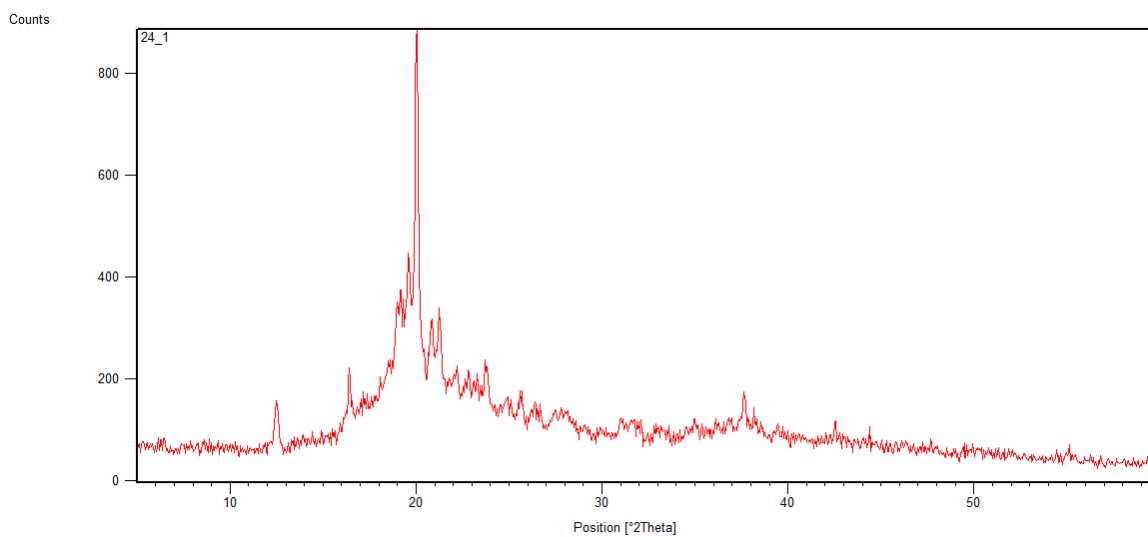
2



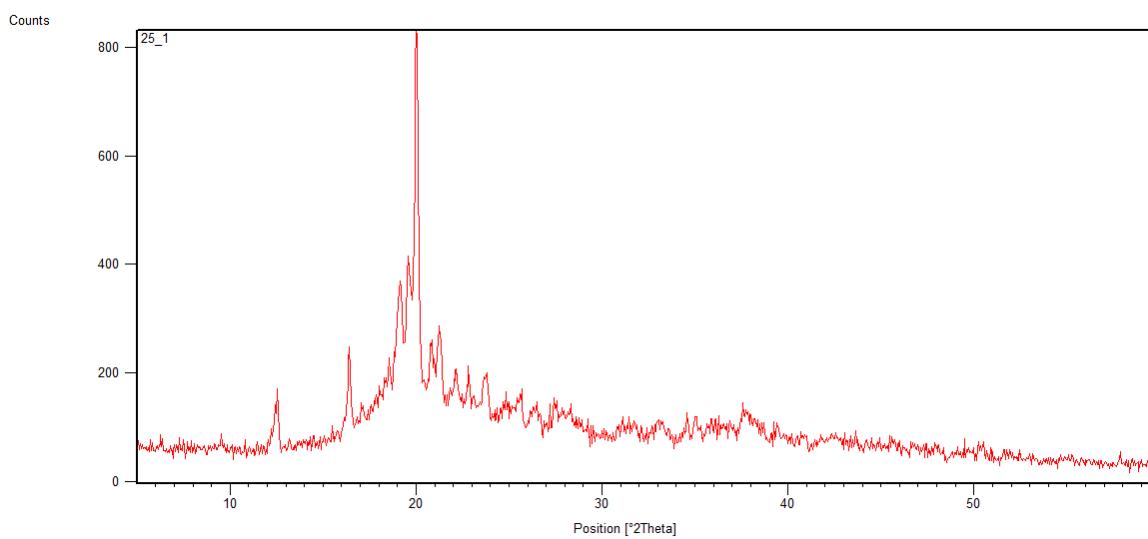
3



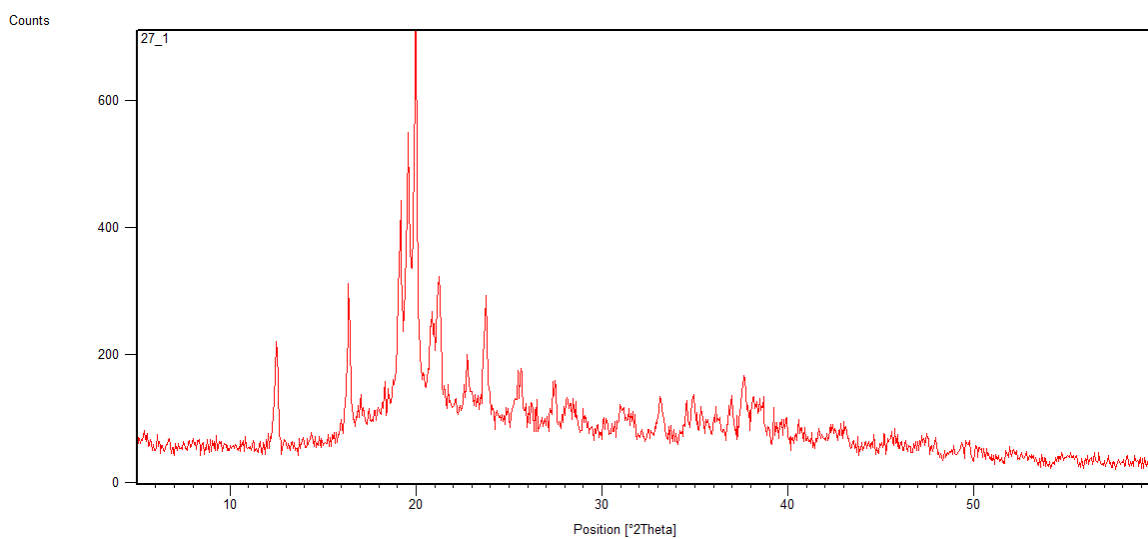
1



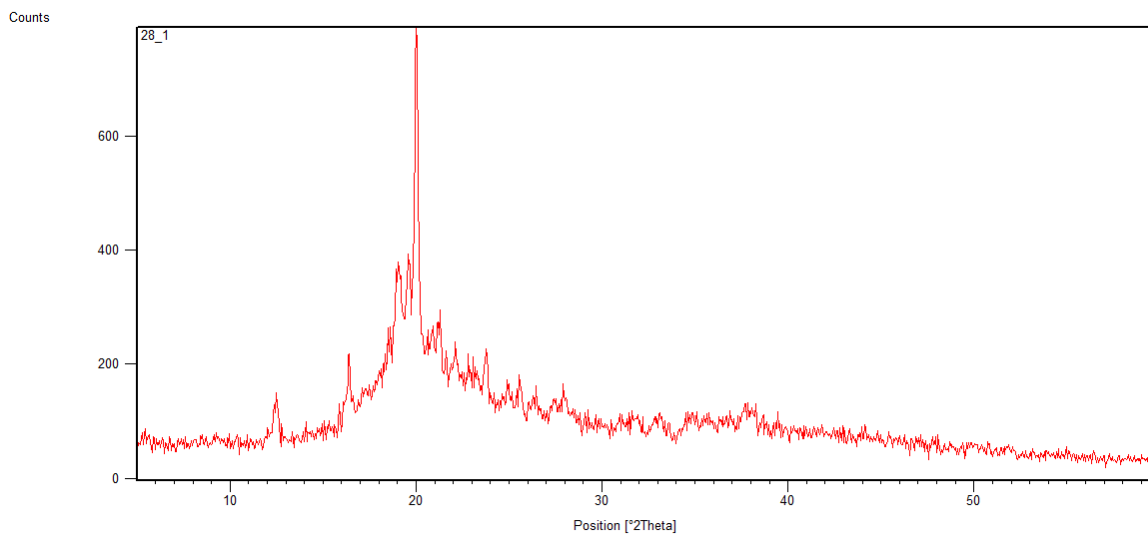
2



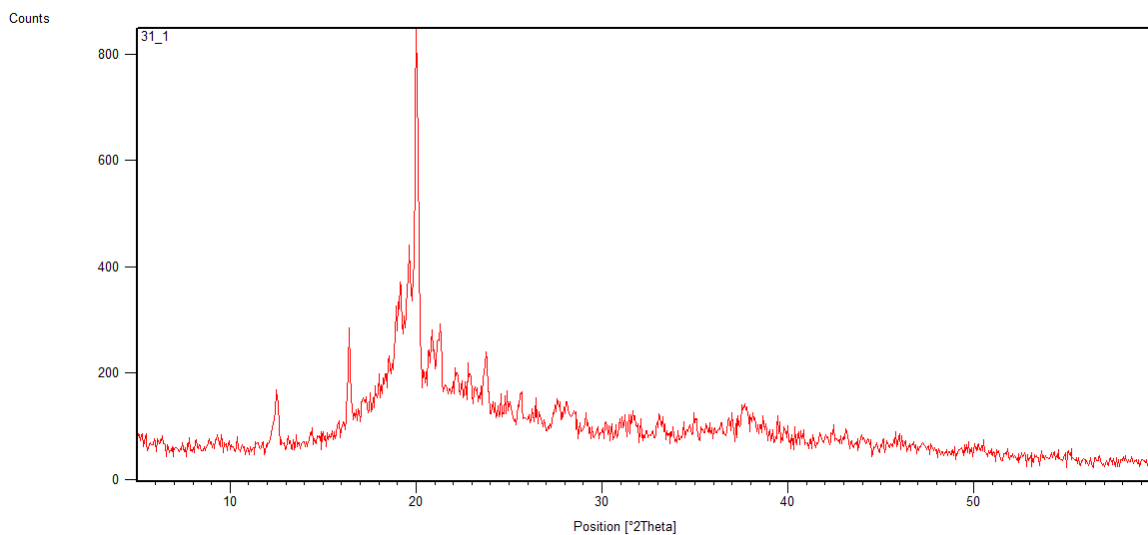
3



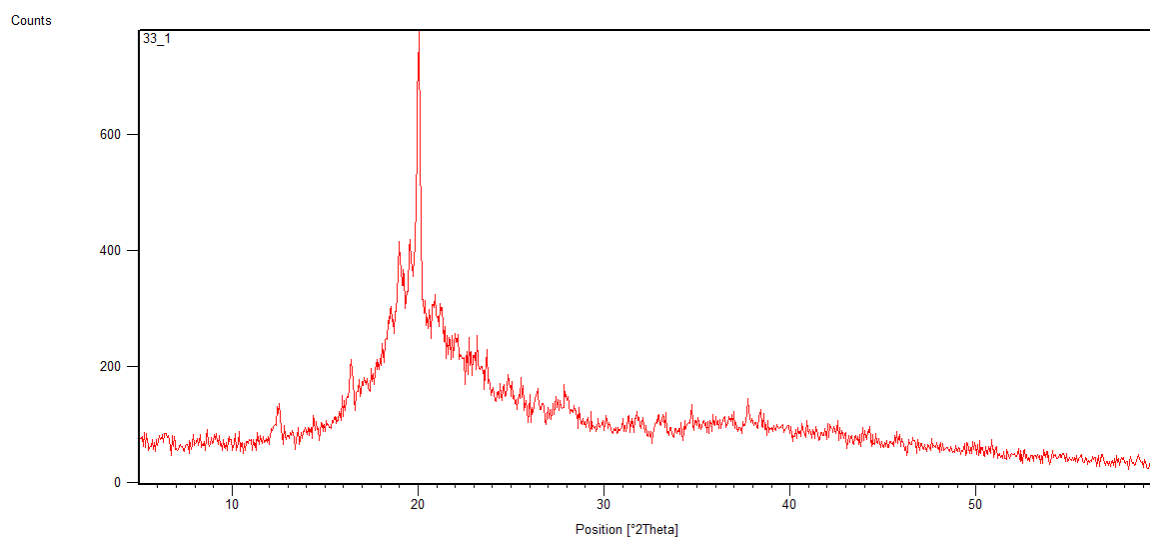
1



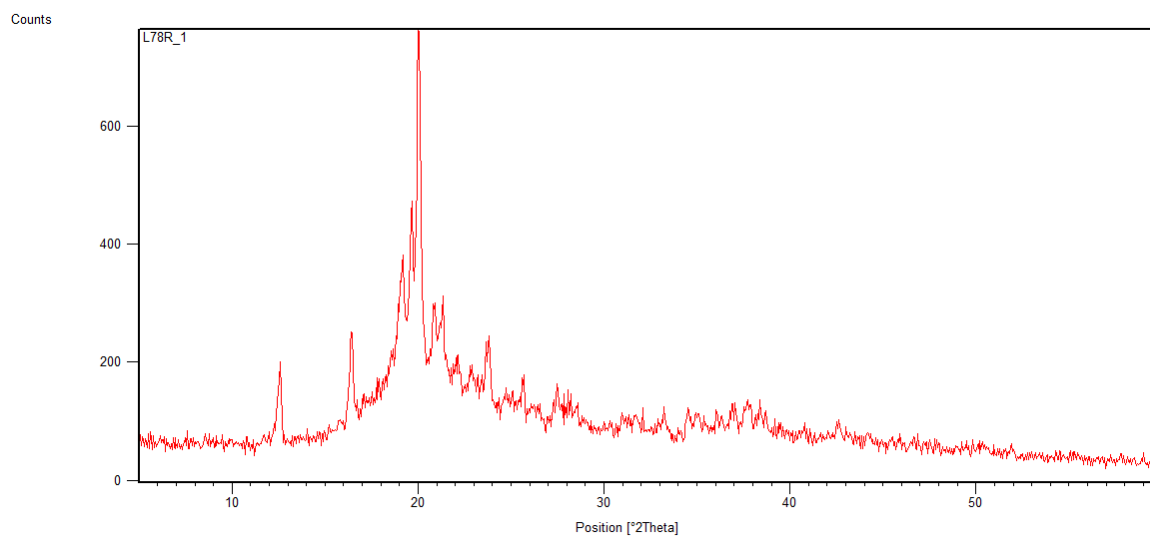
2



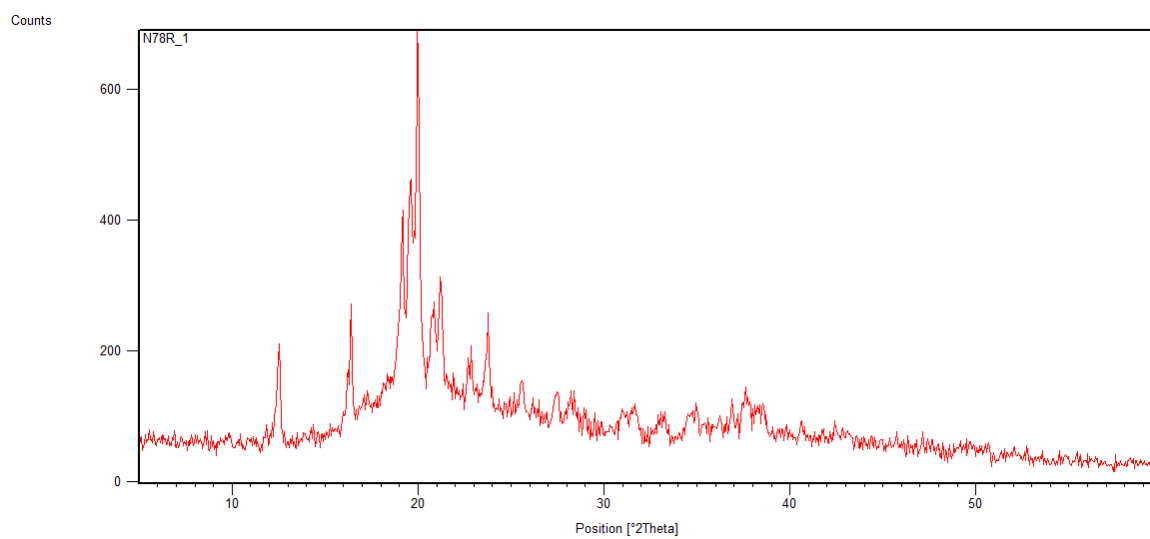
3



1



2

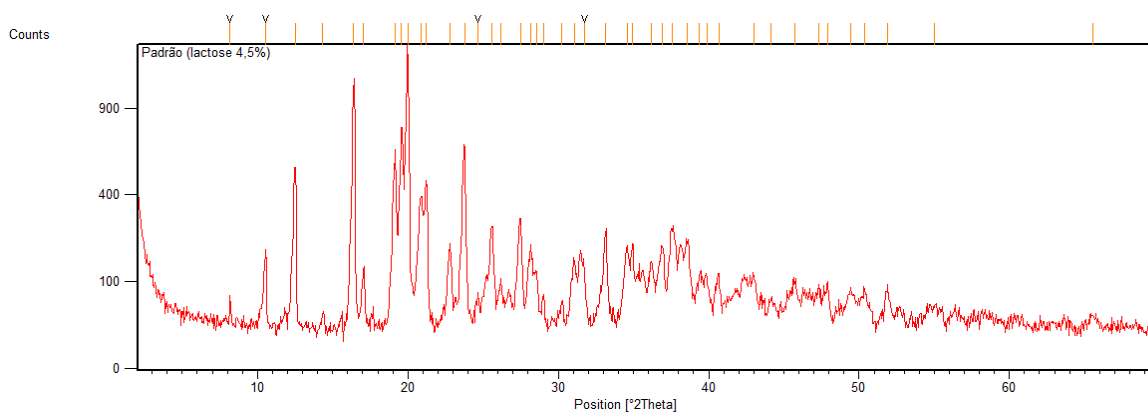


3

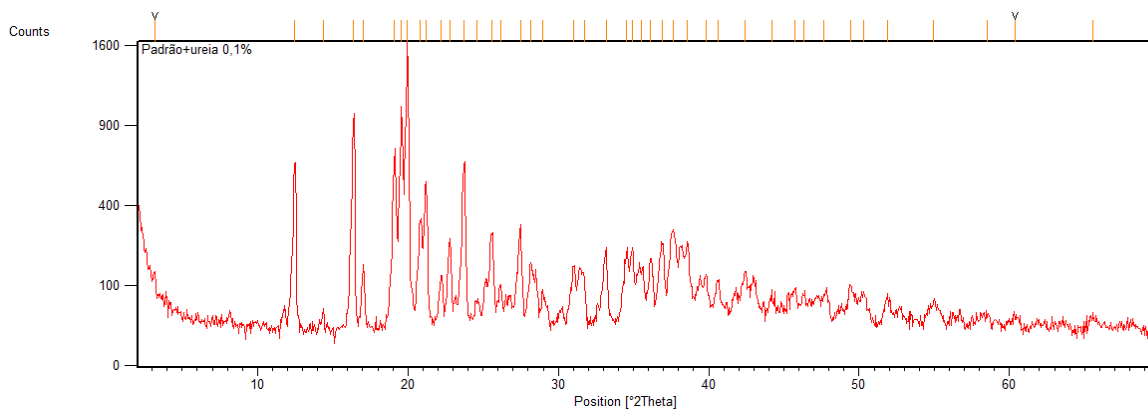
APÊNDICE B

1

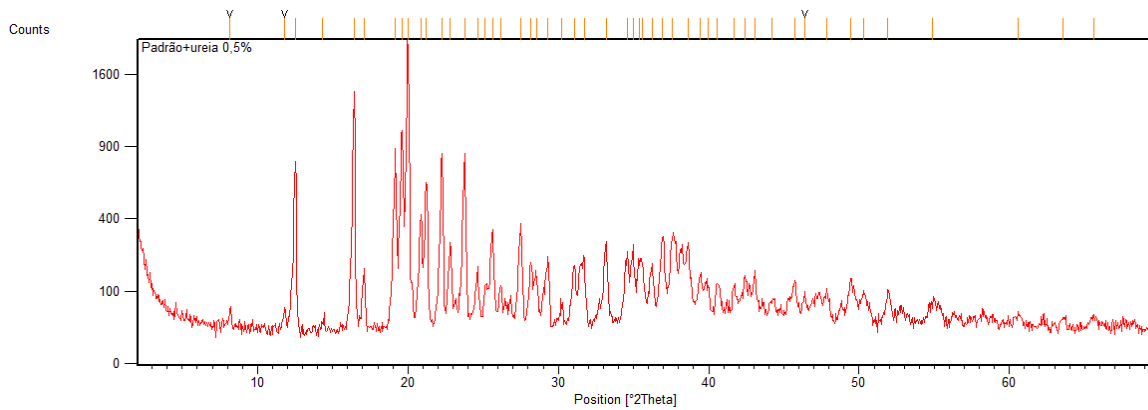
2



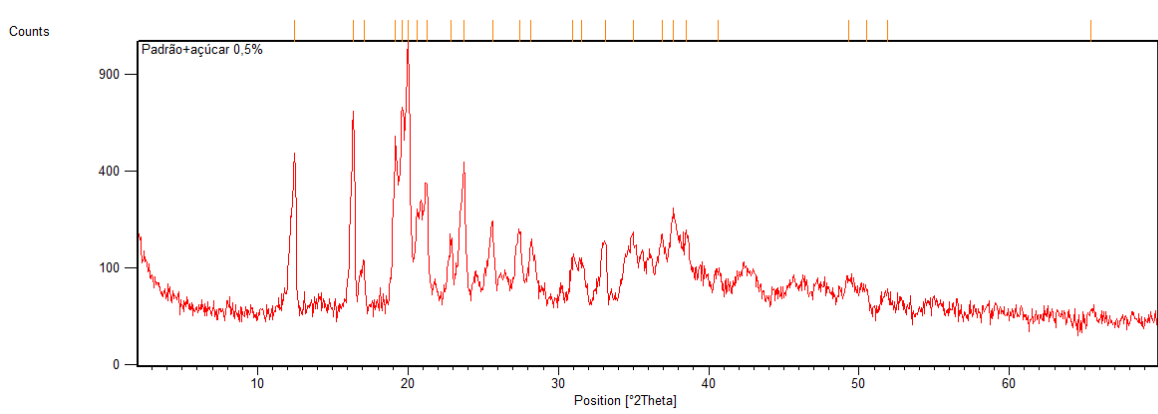
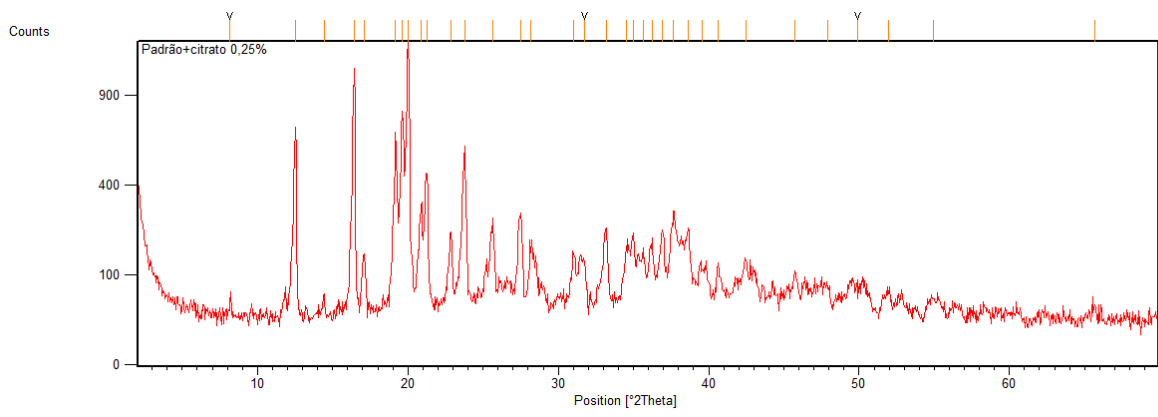
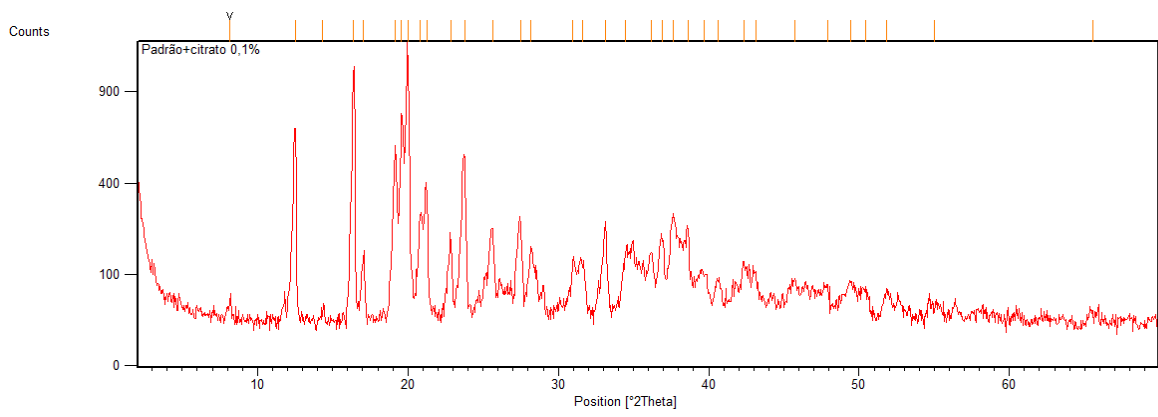
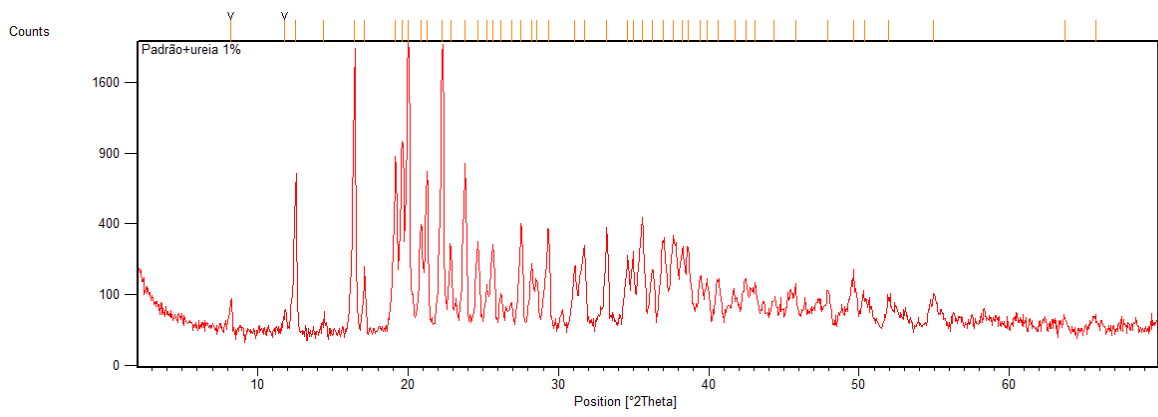
3

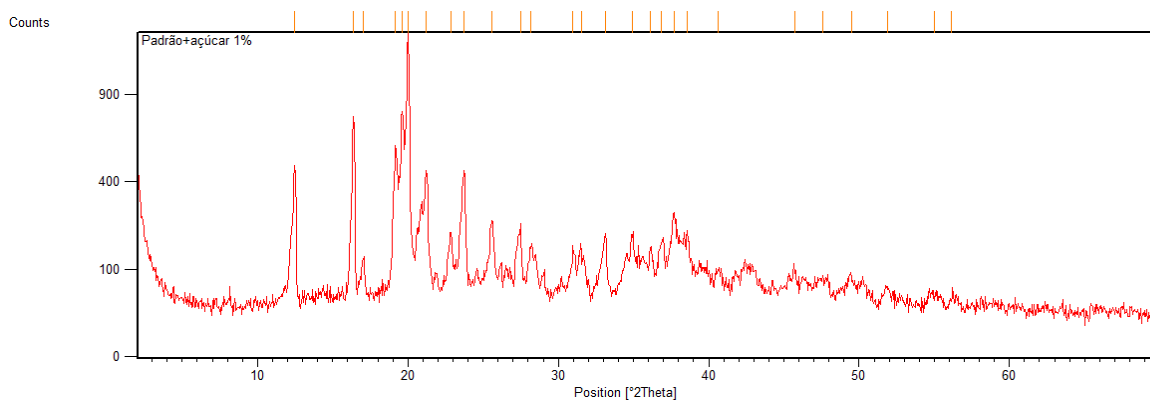


4



5





1