

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Nathalia da Silva Campos

Identificação e caracterização de pontos brancos (PIPS) em doce de leite

Juiz de Fora

2021

Nathalia da Silva Campos

Identificação e caracterização de pontos brancos (PIPS) em doce de leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Juiz de Fora

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Campos, Nathalia da Silva.

Identificação e caracterização de pontos brancos (PIPS) em doce de leite / Nathalia da Silva Campos. -- 2021.

61 f.

Orientador: Rodrigo Stephani

Coorientador: Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

1. Doce de Leite. 2. Pontos brancos. 3. PIPS. 4. Caracterização. I. Stephani, Rodrigo, orient. II. Oliveira, Luiz Fernando Cappa de, coorient. III. Título.

Nathalia da Silva Campos

Identificação e caracterização de pontos brancos (PIPS) em doce de leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Físico-Química.

Aprovada em 27 de setembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rodrigo Stephani - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto

Universidade Federal de Alfenas



Prof. Dr. Italo Tuler Perrone

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai
(*in memoriam*) que sempre me apoiaram em
todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*) que nunca mediram esforços pela minha educação. Mãe, você sempre foi minha maior inspiração. Eu amo você infinitamente. Pai, obrigada pai pelos 16 anos em que vivemos juntos, você sempre foi o meu maior incentivador. Seu amor estará sempre vivo dentro de mim, eu amo você.

À minha tia Jaqueline e aos meus primos Laís e Gustavo que estão ao meu lado em todos os momentos. Obrigada pelos momentos compartilhados e por todo apoio. Eu amo vocês.

Ao meu namorado Alan por todo companheirismo, amor e paciência. Seu apoio foi fundamental nesta etapa da minha vida. Obrigada por tudo. Eu amo você.

A todos os amigos que me acompanham desde a graduação, em especial, Hugo, Beatriz, Paulo Henrique, Guilherme, Thaís, Hudson, William e Bismark. Vocês acompanharam toda minha trajetória e nada seria possível sem a amizade de vocês. Tenho um imenso carinho por cada um. Agradeço por toda ajuda e pelos momentos compartilhados.

A todos os companheiros do Laboratório QUIMTEC. Sou muito grata pela ajuda de todos, sem vocês este projeto não seria possível. É uma honra trabalhar na companhia de cada um de vocês. Em especial, gostaria de agradecer à Natalia Alves por ser uma grande companheira quando apenas nós duas estávamos autorizadas a usar o laboratório por conta da pandemia de covid-19. Além de agradecer ao Igor por todo auxílio durante os experimentos. Agradeço também aos professores do NEEM/QUIMTEC por todo conhecimento compartilhado.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Stephani por todo suporte desde a iniciação científica e por me dar a oportunidade de trabalhar neste projeto de mestrado. Agradeço também ao meu coorientador Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira por todo auxílio durante esse projeto.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química. Agradeço também aos membros da banca, Dr. Ítalo Tuler Perrone e Dr. Antonio Carlos Doriguetto, por terem aceito o convite para a defesa de mestrado e por todas as contribuições dadas.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento que possibilitou a realização desse projeto, e à Universidade Federal de Juiz de Fora, por me acolher desde a graduação em Química.

RESUMO

O doce de leite é um alimento produzido e comercializado na América Latina e, assim como o leite condensado, é submetido ao processo de evaporação. Então, durante sua fabricação ocorrem diversas mudanças físico-químicas que podem garantir ao doce de leite características indesejáveis, como a presença de pontos brancos (PIPS). O termo PIPS foi escolhido pois os pontos brancos remetem a aparência típica da marcação das peças de dominó. Portanto, esse trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar PIPS em amostras de doce de leite pastoso utilizando diferentes técnicas analíticas. Com as técnicas de microscopia foi possível verificar a morfologia dos PIPS que é composta por um centro esférico que serve como ponto de nucleação para crescimento de um material em formato de agulhas. Na técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raios X foi identificado a presença de átomos de cálcio e fósforo e, com a análise quantitativa desses elementos foi possível afirmar a presença majoritária de cálcio na estrutura dos PIPS. De acordo com os resultados da análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio, os PIPS têm a presença de matéria orgânica e aminoácidos. A concentração de cada aminoácido presente foi identificada através do aminograma, que destacou as concentrações de ácido glutâmico, prolina, leucina e ácido aspártico. As espectroscopias no infravermelho e Raman identificaram a presença de citrato de cálcio. Na difração de raios X foi identificado o citrato de cálcio hexahidratado como fase majoritária. E por fim, o espectro de ressonância magnética nuclear no estado sólido de ^{13}C apresentou sinais condizentes com deslocamento químico de carbono de carbonilas de carboxilatos, possivelmente de aminoácidos. Além de apresentar sinais de cadeia carbônica de ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina. O espectro de ^{31}P apresentou sinais característicos dos deslocamentos químicos de ortofosfatos inorgânicos, tais como fosfato octacálcico e hidroxiapatita. Dessa forma, foi possível concluir que os PIPS possuem uma estrutura cristalina composta majoritariamente por citrato de cálcio hexahidratado, além disso, os PIPS possuem aminoácidos e uma pequena quantidade de fosfatos que podem estar relacionados com a presença de α_{s1} -caseína.

Palavras-chave: Doce de leite. Pontos brancos. PIPS. Morfologia. Caracterização.

ABSTRACT

Dulce de leche is a food produced and marketed in Latin America and, like condensed milk, is subjected to the evaporation process. Therefore, during its manufacture, several physicochemical changes occur that can guarantee undesirable characteristics to the dulce de leche, such as the presence of white dots (PIPS). The term PIPS was chosen because the white dots refer to the typical appearance of marking dominoes. Therefore, this work aimed to identify and characterize PIPS in dulce de leche samples using different analytical techniques. With the microscopy techniques it was possible to verify the morphology of the PIPS, which is composed of a spherical center that serves as a nucleation point for the growth of a material in the shape of needles. In the X-ray energy dispersive spectroscopy technique, the presence of calcium and phosphorus atoms was identified and, with the quantitative analysis of these elements, it was possible to affirm the majority presence of calcium in the structure of the PIPS. According to the results of the elemental analysis of carbon, hydrogen and nitrogen, PIPS have the presence of organic matter and amino acids. The concentration of each amino acid present was identified through the aminogram, which highlighted the concentrations of glutamic acid, proline, leucine and aspartic acid. Infrared and Raman spectroscopy identified the presence of calcium citrate. In X-ray diffraction, calcium citrate hexahydrate was identified as the major phase. Finally, the solid state nuclear magnetic resonance spectrum of ^{13}C showed signals consistent with chemical shift of carbon from carboxylate carbonyls, possibly amino acids. In addition to showing signs of a carbon chain of glutamic acid, aspartic acid and leucine. The ^{31}P spectrum showed signs characteristic of chemical shifts of inorganic orthophosphates, such as octacalcium phosphate and hydroxyapatite. Thus, it was possible to conclude that PIPS have a crystal structure mainly composed of calcium citrate hexahydrate, in addition, PIPS have amino acids and a small amount of phosphates that may be related to the presence of α_{s1} -casein.

Keywords: Dulce de leche. White dots. PIPS. Morphology. Characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - PIPS no doce de leite (A) e a respectiva imagem aproximada (B).....	28
Quadro 1 - Análises realizadas nas amostras de PIPS.....	28
Figura 2 - Microscopia óptica dos PIPS presentes na massa do doce de leite com aumento de (A e B) 250x, (C) 400x e (D e E) dimensões dos PIPS em aumento de 250x.....	33
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de PIPS em diferentes ampliações.....	35
Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos PIPS na amplificação de 1800x.	36
Figura 5 - Imagens do mapeamento de distribuição elementar por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (A, C e E) das amostras de PIPS numeradas como 1, 2 e 3 respectivamente, na amplificação de 500X. Espectros de fluorescência de raios X (B, D e F) das amostras de PIPS numeradas como 1, 2 e 3 respectivamente.	37
Figura 6 - Espectros Raman dos PIPS, sendo (A) amostra 1, (B) amostra 2 e (C) amostra 3.	42
Figura 7 - Espectros Raman dos (A) PIPS, (B) DL-CLP sintetizado, padrões de (C) lactato de cálcio pentahidratado e (D) L-lactato de cálcio hidratado.	43
Figura 8 - Espectros Raman dos (A) PIPS e (B) padrão de citrato de cálcio tetra hidratado.	43
Figura 9 - Espectros no infravermelho dos PIPS, sendo (A) amostra 1, (B) amostra 2 e (C) amostra 3.....	45
Figura 10 - Espectros no infravermelho dos (A) PIPS, (B) DL-CLP sintetizado, padrões de (C) lactato de cálcio pentahidratado e (D) L-lactato de cálcio hidratado.....	45
Figura 11 - Espectros no infravermelho dos (A) PIPS e (B) padrão de citrato de cálcio tetra hidratado.	46
Figura 12 - Difração de raios X das amostras (A) 1, (B) 2, (C) 3, (D) 4 e (E) 5 dos PIPS.	47
Figura 13 - Difração de raios X dos PIPS obtido experimentalmente e do citrato de cálcio hexahidratado.....	48
Figura 14 - Espectros RMN de ¹³ C das amostras (A) 1, (B) 2, (C) 3 e (D) 8 dos PIPS.....	51
Figura 15 - Espectros RMN de ³¹ P das amostras (A) 1, (B) 2, (C) 3 e (D) 8 dos PIPS.	52
Figura 16 - Tentativa de ilustração da estrutura dos PIPS.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição mineral do leite de vaca.....	16
Tabela 2 - Concentrações (mM) de íons livres e associados na fase solúvel do leite.	18
Tabela 3 - Fórmulas químicas e graus de saturação (S) de diferentes sais de cálcio e magnésio em leite ultrafiltrado.....	19
Tabela 4 - Análise de cálcio e fosforo das amostras de PIPS.....	38
Tabela 5 - Análise de CHN das amostras de PIPS.	39
Tabela 6 - Aminograma das amostras de PIPS em mg.100mg ⁻¹ amostra.....	40
Tabela 7 - Análise estatística de correlação entre as porcentagens de aminoácidos presentes nas amostras de PIPS e a porcentagem de aminoácidos presentes nas frações de caseína e proteínas do soro.	41
Tabela 8 - Atribuição dos espectros Raman do citrato de cálcio tetrahidratado (CCT) e dos PIPS.	44
Tabela 9 - Atribuição dos espectros no infravermelho do citrato de cálcio tetrahidratado (CCT) e dos PIPS	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Ca	Cálcio
Ca ²⁺	Íon cálcio
CCA	Citrato de cálcio anidro
CCD	Citrato de cálcio dihidratado
CCH	Citrato de cálcio hexahidratado
CCT	Citrato de cálcio tetrahidratado
Cit ³⁻	Íon citrato
CHN	Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
Cl ⁻	Íon cloreto
CO ₃ ²⁻	Íon carbonato
DCP	Fosfato dicálcico
DCPD	Fosfato dicálcico dihidratado
DL-CLP	DL-lactato de cálcio pentahidratado
DRX	Difração de raios X
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva por raios-X
FT-IR/ATR	Espectroscopia de infravermelho de refletância total atenuada com transformada de Fourier
Glc-1-PH ⁻	Glicose fosfatada
Glc-1-P ²⁻	Glicose fosfatada
HAP	Hidroxiapatita
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H ₂ CO ₃	Ácido carbônico
K ⁺	Íon potássio
MAS	Magic angle spinning
MCP	Fosfato de cálcio micelar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg ²⁺	Íon magnésio
Na ⁺	Íon sódio
Nd:YAG	Neodymium-doped yttrium aluminium garnet
OCP	Fosfato octacálcico

P	Fósforo
PIPS	Pontos brancos
PDRX	Difração de raios X em pó
PO ₄ ³⁻	Íon fosfato
RCOOH	Ácido carboxílico
RCOO ⁻	Íon carboxilato
RMN	Ressonância magnética nuclear
SO ₄ ²⁻	Íon sulfato
TCC	Citrato tricálcico dihidratado
TMS	Tetrametilsilano
β-TCP	β-fosfato tricálcico
<i>r</i>	Balanço (<i>rocking</i>)
<i>v</i>	Estiramento (<i>stretching</i>)
<i>v</i> _{as}	Estiramento assimétrico (<i>anti-symmetric stretching</i>)
<i>v</i> _s	Estiramento simétrico (<i>symmetric stretching</i>)
¹ H	Hidrogênio com número atômico igual 1
¹³ C	Carbono com número atômico igual a 13
³¹ P	Fósforo com número atômico igual a 31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	DOCE DE LEITE	14
2.2	PONTOS BRANCOS (PIPS).....	15
2.3	COMPOSIÇÃO MINERAL DO LEITE	16
2.4	TÉCNICAS ANALÍTICAS	19
2.4.1	Microscopia eletrônica de varredura	19
2.4.2	Técnicas espectroscópicas	20
2.4.2.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho</i>	21
2.4.2.2	<i>Espectroscopia Raman</i>	22
2.4.3	Difração de raios X	23
2.4.4	Ressonância magnética nuclear	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	MICROSCOPIA ÓPTICA DOS DOCES DE LEITE E EXTRAÇÃO DOS PONTOS BRANCOS.....	27
4.2	SÍNTESE DL-LACTATO DE CÁLCIO PENTAHIDRATADO	28
4.3	ANÁLISES REALIZADAS	29
4.3.1	Microscopia óptica	30
4.3.2	Microscopia eletrônica de varredura e análise de energia dispersiva de raios X	30
4.3.3	Análise de cálcio e fósforo	30
4.3.4	Análise Elementar CHN	30
4.3.5	Aminograma	30
4.3.6	Espectroscopia Raman	31
4.3.7	Espectroscopia no infravermelho	31
4.3.8	Difração de raios X	32
4.3.9	Ressonância magnética nuclear no estado sólido	32
5	RESULTADOS	33
5.1	MICROSCOPIA ÓPTICA.....	33
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	34

5.3	ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X.....	36
5.4	ANÁLISE DE CÁLCIO E FÓSFORO.....	37
5.5	ANÁLISE ELEMENTAR DE CHN.....	38
5.6	AMINOGRAMA.....	39
5.7	ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	41
5.8	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....	44
5.9	DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	46
5.10	CITRATO DE CÁLCIO.....	48
5.11	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NO ESTADO SÓLIDO.....	50
6	CONCLUSÃO.....	53
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O trabalho apresentado neste documento é um projeto de química e tecnologia na área de alimentos e tem o intuito de identificar e caracterizar um defeito encontrado em doces de leite. Esse defeito foi nomeado “PIPS” pelo grupo de pesquisa para identificá-lo devido a sua semelhança com a marcação em pontos feitas nas peças de dominó. Os PIPS são cristais de coloração branca, que são encontrados de forma homogênea na massa do doce de leite. É um defeito que pode ter uma variação sazonal e regional.

Este projeto já tem uma longa trajetória no grupo de pesquisa. Ao longo dos anos, o grupo vem realizando diversas análises na tentativa de elucidar a estrutura química dos PIPS, afim de auxiliar os produtores de doce de leite a criar novas estratégias para controlar este defeito durante a fabricação e ao longo do armazenamento do produto.

Portanto, o trabalho apresentado neste documento tem como objetivo identificar e caracterizar pontos brancos (PIPS) presentes em doce de leite utilizando diferentes ferramentas analíticas, pois este conhecimento pode levar a novas estratégias de fabricação e armazenamento para controlar a formação deste defeito em doce de leite.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nas sessões a seguir serão apresentadas informações da literatura científica sobre doce de leite, pontos brancos (PIPS), composição mineral do leite e também sobre as principais técnicas analíticas para caracterização de materiais. Dentre as técnicas descritas estão: microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia Raman, difração de raios X e ressonância magnética nuclear.

2.1 DOCE DE LEITE

O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite, aprovado pela Portaria N° 354 de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento define doce de leite como o produto, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração e ação do calor a pressão normal ou reduzida do leite ou leite reconstituído, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e/ou creme e adicionado de sacarose (parcialmente substituída ou não por monossacarídeos e/ou outros dissacarídeos) (BRASIL, 1997).

O doce de leite é um alimento produzido e comercializado na América Latina, em países como Brasil e Argentina. O produto é apreciado pelos consumidores devido à coloração, consistência e sabor característicos adquiridos em função de reações de escurecimento não enzimático. É utilizado como ingrediente na produção de bolos, biscoitos, sorvetes, além de ser consumido diretamente como sobremesa ou acompanhado de queijo (MACHADO, 2005).

A produção no Brasil é feita tanto por empresas de grande porte como também por empresas de pequeno porte, além da produção caseira. Essa produção regionalizada no Brasil e em outros países sul-americanos explica a defasagem de referências na literatura científica a respeito deste produto (DEMIATE; KONKEL; PEDROSO, 2001).

O doce de leite pode ser obtido na forma de doce em pasta ou barra e sua produção representa aproximadamente 0,6% do que é produzido em um laticínio. O estado de Minas Gerais é o principal produtor brasileiro de doce de leite, sendo assim, responsável por aproximadamente 50% da produção brasileira. O doce de leite é um produto com alto potencial para exportação, entretanto, os volumes exportados ainda são baixos. Nos últimos anos, a produção nacional foi predominantemente consumida no mercado interno. As exportações, no ano de 2017, foram de 160 toneladas contra a importação de 904 toneladas (PERRONE *et al.*, 2019).

Existe um mercado em potencial para o consumo de doce de leite, de acordo com especialistas, porém alguns fatores limitam este crescimento como a pequena capacidade de produção das indústrias, variação do preço de atacado e a falta de padronização do produto (PERRONE *et al.*, 2019).

Assim como o leite condensado e o leite em pó, o doce de leite também passa pelo processo de evaporação, o qual retira a água do leite através da transferência de energia na forma de calor. Esse processo pode ocorrer em equipamentos que trabalham sob pressão atmosférica ou em equipamentos que trabalham sob vácuo. Então, durante a fabricação do doce de leite ocorrem diversas mudanças físico-químicas, e algumas podem garantir ao doce de leite características indesejáveis, o que pode gerar uma descaracterização do produto (PERRONE *et al.*, 2019). Uma dessas características indesejáveis é a presença de pontos brancos na massa do doce de leite.

2.2 PONTOS BRANCOS (PIPS)

A presença de pequenos pontos na cor branca, distribuídos de forma homogênea em toda a massa do doce de leite, é considerado um defeito que descaracteriza o produto. Devido à ausência de uma terminologia para esses pontos de cor branca, usamos o termo PIPS para identificá-los já que os mesmos remetem a aparência típica da marcação das peças de um dominó (PIPS – termo da língua inglesa que expressa essa marcação com pontos brancos feita em peças de dominó). Similar ao comportamento de formação dos cristais de lactose em doce de leite (SANTOS, 1976), os PIPS são formados durante o período de estocagem e comercialização do produto.

Devido à complexidade dos compostos presentes no leite e, também, devido às diversas reações químicas que ocorrem durante o tratamento térmico, ainda não há estudos na literatura científica sobre a composição destes pontos brancos em doce de leite e quais os fatores que estão relacionados com a sua formação. Entretanto, diversos artigos científicos relatam a presença de pontos, manchas e cristais em queijo, o que em alguns casos também pode ser considerado um defeito do produto.

Muitos autores estudaram a formação de cristais de lactato de cálcio, principalmente em queijo cheddar (AGARWAL *et al.*, 2005; AGARWAL *et al.*, 2006; AGARWAL *et al.*, 2008; DYBING *et al.*, 1988; TANSMAN; KINDSTEDT; HUGUES, 2014). D’Incecco *et al.* (2016) estudaram a presença de manchas, pontos e cristais em queijos duros e extraduros utilizando técnicas como microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e

espectroscopia Raman. As manchas foram identificadas como tirosina cristalina, já os pontos, como uma estrutura complexa contendo vários aminoácidos, e os cristais, por fim, como fosfato de cálcio com componentes proteicos ao redor do cristal. Então, para compreender como substâncias contendo o mineral cálcio têm ocorrência em produtos lácteos, é preciso conhecer como os minerais estão distribuídos no leite.

2.3 COMPOSIÇÃO MINERAL DO LEITE

O leite é constituído por proteínas, gordura, lactose, vitaminas e minerais. A fração mineral do leite contém cátions como cálcio, magnésio, sódio e potássio, e também ânions, como fosfato inorgânico, citrato e cloreto (GAUCHERON, 2005). A Tabela 1 apresenta as faixas de concentração desses minerais no leite de vaca.

Os sais distribuem-se no leite em duas fases: a fase livre ou solúvel e a fase ligada às micelas de caseína ou coloidal (ORDOÑEZ *et al.*, 2005). Os íons potássio, sódio e cloreto estão essencialmente na fase solúvel. Já os íons cálcio, fosfato inorgânico, magnésio e citrato estão parcialmente ligados às micelas de caseína. Cerca de um terço do cálcio, metade do fosfato inorgânico, dois terços do magnésio e mais de 90% do citrato estão na fase solúvel do leite (GAUCHERON, 2005). Dessa forma, cálcio, fosfato inorgânico, magnésio e citrato se encontram tanto na fase solúvel quanto na fase coloidal.

Tabela 1 - Composição mineral do leite de vaca.

Mineral	Concentração (mg.kg ⁻¹)	Concentração (mmol.kg ⁻¹)
Cálcio	1043-1283	26-32
Magnésio	97-146	4-6
Fosfato inorgânico	1805-2185	19-23
Fósforo total	930-992	30-32
Citrato	1323-2079	7-11
Sódio	391-644	17-28
Potássio	1212-1681	31-43
Cloreto	772-1207	22-34

Fonte: Adaptado de (GAUCHERON, 2005).

Na fase solúvel do leite, os íons não se apresentam totalmente isolados em solução, ocorrendo então diferentes associações entre eles. Tais associações dependem da capacidade de ligação entre cátions e ânions e as solubilidades dos sais formados. Os diferentes sais não podem ser determinados analiticamente pois são inseparáveis nesta fase (GAUCHERON, 2005). Entretanto, Holt, Dalgleish e Jenness (1981) propuseram um cálculo para o equilíbrio de íons presentes na fase solúvel do leite. Na Tabela 2 é apresentado um exemplo deste cálculo explicitando as diferentes associações.

De acordo com a Tabela 2, o cálcio existe como íon livre e também forma um complexo estável principalmente com citrato, e em menor grau com fosfato inorgânico e com cloreto. A baixa quantidade de fosfato de cálcio na fase solúvel se deve às baixas solubilidades destes sais. O sódio e o potássio existem principalmente como íons livres, mas uma pequena parte desses íons está associada ao citrato, fosfato inorgânico e cloreto (GAUCHERON, 2005).

O fosfato de cálcio está supersaturado na fase solúvel do leite e pode se apresentar na forma de diferentes estruturas (GAUCHERON, 2005) conforme está disposto na Tabela 3. Nessa tabela são apresentadas as fórmulas químicas e graus de saturação de diferentes sais de cálcio e magnésio em leite ultrafiltrado, ou seja, leite sem a presença de caseína e soroproteínas.

Como já foi dito anteriormente, na fase coloidal também há presença de minerais, principalmente cálcio e fosfato inorgânico. As micelas de caseína possuem em sua composição sais de fosfato de cálcio (SILVA *et al.*, 2019). Entretanto, de acordo com a literatura, ainda não existe um consenso sobre a estrutura química do fosfato de cálcio coloidal (GAUCHERON, 2005; SILVA *et al.*, 2019).

Na literatura é descrito que o fosfato de cálcio, presente na fase solúvel do leite, tem sua solubilidade diminuída durante o tratamento térmico. Além disso, são descritas mudanças na estrutura e composição do fosfato de cálcio coloidal para uma forma mais insolúvel (HOLT, 1995). As novas estruturas formadas não são claramente identificadas, embora alguns autores relacionem a formação de β -fosfato tricálcico cristalino ou hidroxiapatita (NELSON; HOLT; HUCKINS, 1989; VISSER *et al.*, 1986).

Wahlgren, Dejmek e Drakenberg (1990) mostraram, usando Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{43}Ca e ^{31}P , uma associação de cálcio e fosfato inorgânico às micelas de caseína durante um tratamento térmico de 30 a 64° C. Se o tratamento térmico for inferior a 95° C durante alguns minutos, as modificações no equilíbrio salino são consideradas reversíveis. Porém, aquecimentos severos, por exemplo, de 120° C durante 20 minutos, causam mudanças irreversíveis nas micelas de caseína e no equilíbrio salino (HOLT, 1995). Com o aquecimento do leite, também ocorre o deslocamento do cálcio solúvel para a fase coloidal,

com precipitação do fosfato tricálcico, devido à baixa solubilidade desse sal a altas temperaturas (DA SILVA, 2003).

Tabela 2 - Concentrações (mM) de íons livres e associados na fase solúvel do leite.

Ânion	Íon livre	Íon complexado			
		Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺
H ₂ Cit ⁻	+	+	+	+	+
HCit ⁻	0,04	0,01	+	+	+
Cit ³⁻	0,26	6,96	2,02	0,03	0,04
H ₂ PO ₄ ⁻	7,50	0,07	0,04	0,10	0,18
HPO ₄ ²⁻	2,65	0,59	0,34	0,39	0,52
PO ₄ ³⁻	+	0,01	+	+	+
Glc-1-PH ⁻	0,50	+	+	0,01	0,01
Glc-1-P ²⁻	1,59	0,17	0,07	0,10	0,14
H ₂ CO ₃	0,11	-	-	-	-
HCO ₃ ⁻	0,32	0,01	+	+	+
CO ₃ ²⁻	+	+	+	+	+
Cl ⁻	30,90	0,26	0,07	0,39	0,68
HSO ₄ ⁻	+	+	+	+	+
SO ₄ ²⁻	0,96	0,07	0,03	0,04	0,10
RCOOH	0,02	-	-	-	-
RCOO ⁻	2,98	0,03	0,02	0,02	0,04
Íon livre	-	2,00	0,81	20,92	36,29

Concentração mostrada como: (+) <0,005 e (-) não estimada.

Fonte: Adaptado de (HOLT; DALGLEISH; JENNESS, 1981).

Sabendo que os PIPS são formados na massa do doce de leite, que é um produto que passa por um longo tratamento térmico, e visto que a literatura científica mostra a diminuição da solubilidade de sais presentes na fração mineral do leite quando são expostos ao tratamento térmico, existe a possibilidade de ter compostos contendo minerais na estrutura dos PIPS.

Tabela 3 - Fórmulas químicas e graus de saturação (S) de diferentes sais de cálcio e magnésio em leite ultrafiltrado.

Composto	Abreviação	Fórmula	Ca/P	S
Fosfato dicálcico	DCP	CaHPO_4	1,0	3
Fosfato dicálcico dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	6
Fosfato de cálcio micelar	MCP	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{PO}_4)_{0,2} \cdot x\text{H}_2\text{O}$	1,1	1
Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	60
β -fosfato tricálcico	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	200
Hidroxiapatita	HAP	$\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$	1,67	8×10^8
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)_{0,2}(\text{PO}_4)_{1,87} \cdot x\text{H}_2\text{O}$	1,45	0,2
Citrato tricálcico dihidratado	TCC	$\text{Ca}_3(\text{Cit})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	0,4
Fosfato de dimagnésio	-	MgHPO_4	-	0,3

Fonte: Adaptado de (GAUCHERON, 2005).

2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Ao longo do trabalho foram realizadas diversas técnicas analíticas com o intuito de caracterizar os PIPS e elucidar sua estrutura química. Dentre as técnicas mais utilizadas para caracterização de materiais estão: microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia Raman, difratometria de raios X e ressonância magnética nuclear.

2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) fornece informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. A técnica pode ser usada em diferentes áreas como: biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalúrgica, física, medicina e geologia. É um método de análise eficaz para análise de compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo metais e polímeros, em uma escala de nanômetro a micrômetro (ABDULLAH; MOHAMMED, 2019; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A técnica permite obter a imagem ampliada e tridimensional da amostra devido à interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura se baseia no uso de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para

explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas. A maioria dos instrumentos utiliza como fonte de elétrons um filamento de tungstênio aquecido. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo. Em seguida, o feixe é focalizado sobre a amostra por lentes eletromagnéticas. Desta forma o feixe interage com a amostra produzindo elétrons e fótons que podem ser coletados por detectores e convertidos em sinal de vídeo (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Por utilizar um feixe de elétrons, o microscópio eletrônico de varredura se diferencia de um microscópio óptico convencional que utiliza fótons, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado à fonte de luz branca, além do poder de ampliação que pode chegar até 1 milhão de vezes dependendo do modelo do equipamento (ABDULLAH; MOHAMMED, 2019; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Entretanto não é possível qualquer quantificação com o uso dessa técnica. Por esse motivo, a microscopia eletrônica de varredura pode ser associada com a espectroscopia de energia dispersiva por raios X (EDS), que fornece de forma qualitativa e até quantitativa, em alguns casos, a composição química da superfície do material, assim como também pode ser associada com a espectroscopia Raman para obtenção de mais informações sobre a superfície do material (CAMPOS *et al.*, 2020).

Como exemplo de aplicação, Toledo *et al.* (2020) realizou o mapeamento de superfícies de diferentes produtos lácteos desidratados através do uso combinado da espectroscopia Raman e da microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectroscopia por energia dispersiva. De Paula (2021) caracterizou a morfologia de produtos lácteos de búfala em pó utilizando também a microscopia eletrônica de varredura. Além disso, foi calculado o índice de polidispersividade (PDI) através da avaliação do comprimento das partículas obtidas nas imagens do MEV.

2.4.2 Técnicas espectroscópicas

A espectroscopia é definida como o estudo da interação de uma onda eletromagnética com a matéria e seu principal objetivo é a determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares (DUFOUR, 2009). A energia total de uma molécula dá-se pela soma das energias eletrônica, vibracional e rotacional. Esses três tipos de energia são distintos e, assim, é possível separar suas contribuições espectrais. As energias vibracionais e rotacionais estão relacionadas ao deslocamento dos núcleos atômicos. Devido à maior massa dos núcleos em relação aos elétrons, suas contribuições podem ser separadas, o que é conhecido como aproximação de Born-Oppenheimer. Dessa forma, os núcleos podem ser considerados como fixos em relação aos elétrons. Na prática o espectro molecular é dividido em três regiões

energéticas distintas: a de micro-ondas e radiofrequência (espectroscopia rotacional), infravermelho e visível (espectroscopia vibracional) e região do visível à ultravioleta (espectroscopia eletrônica) (RODRIGUES, 2012).

Nas transições eletrônicas, ocorre a passagem de um elétron de um estado de menor energia para um estado de maior energia, através da absorção da radiação, mas não há mudança da posição dos núcleos da molécula. Nos demais tipos de transição ocorre uma mudança da posição relativa dos átomos da molécula devido ao efeito da radiação eletromagnética. Por esse motivo, existem os graus de liberdade, os quais definem a quantidade de movimentos que podem ser feitos pelos átomos que compõem a molécula. Para uma molécula linear existirão $3N-5$ movimentos vibracionais, já para uma molécula não linear existirão $3N-6$ movimentos vibracionais, em que N é o número de átomos. Dentre os movimentos vibracionais, alguns serão ativos na técnica de espectroscopia no infravermelho, mas outros serão ativos na técnica de espectroscopia Raman. Isso acontece pois os efeitos físicos envolvidos são distintos. Portanto as duas técnicas são complementares entre si, e para uma análise completa dos movimentos vibracionais, torna-se necessário obter-se ambos os espectros (OLIVEIRA, 2001).

2.4.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho

O fenômeno físico envolvido nessa técnica é a absorção da radiação na região do infravermelho pela molécula. A radiação eletromagnética pode ser descrita por dois componentes: os campos elétrico e magnético, perpendiculares entre si. Entretanto, somente o componente do campo elétrico da radiação irá interagir com a molécula. Para absorver essa radiação, a molécula deve sofrer uma variação no seu momento de dipolo durante seu movimento vibracional (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Os movimentos vibracionais das moléculas induzem a absorção na região do infravermelho, formando bandas de absorção, que ao serem atribuídas a grupos químicos fornecem uma impressão digital da molécula (DUFOUR, 2009).

A obtenção de informações espectrais de produtos alimentares está ganhando cada vez mais destaque devido ao desenvolvimento de equipamentos mais compactos, portáteis e robustos. Nesse sentido, a espectroscopia no infravermelho tem potencial em uma variedade de aplicações na indústria de alimentos, incluindo monitoramento de processos, determinação da qualidade e adulteração de produtos lácteos (FAGAN *et al.*, 2009). Como exemplo de aplicação, Viana (2018) caracterizou fórmulas infantis para lactentes utilizando espectroscopia no infravermelho. Balabin e Smirnov (2011) estudaram a utilização da espectroscopia no

infravermelho para detecção de melamina em matrizes lácteas. Essa substância esteve envolvida em um escândalo de adulteração de leite na China em 2008. Nesse estudo foi verificado que as metodologias propostas são eficazes para detectar a melamina em leite em pó ou líquido e em fórmula infantil, e podem ser considerados como processos rápidos, sensíveis, robustos e de baixo custo.

2.4.2.2 Espectroscopia Raman

O efeito Raman foi demonstrado experimentalmente em 1928 pelo cientista indiano Sir Chandrasekhara Venkata Raman, mas já tinha sido previsto por Smekal em 1923. A importância da descoberta de Raman foi reconhecida em 1930 quando foi agraciado com o prêmio Nobel de Física (OLIVEIRA, 2001; SALA, 2008).

O espalhamento Raman consiste na interação da radiação eletromagnética monocromática com a matéria, onde uma pequena parcela dessa radiação será espalhada pela matéria com valores diferentes da radiação incidente, originando, assim, o chamado espalhamento inelástico da luz. Bem como na espectroscopia no infravermelho, somente o componente do campo elétrico da radiação irá interagir com a molécula. A diferença entre a frequência da radiação incidente e da frequência da radiação espalhada consiste nas frequências vibracionais que são observadas no espectro Raman (OLIVEIRA, 2001).

Toda molécula tem um momento de dipolo intrínseco ou efetivo. Mas, quando o campo elétrico da radiação incidente interage sobre a molécula, teremos o aparecimento de um novo momento de dipolo, que agora será induzido pela radiação. Esse momento de dipolo induzido apresenta uma relação linear com o campo elétrico da radiação incidente (OLIVEIRA, 2001; STEPHANI, 2015), como mostra a Equação 1:

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (1)$$

O termo α refere-se à polarizabilidade. Ela é uma propriedade intrínseca de cada sistema químico, mas que se manifesta somente quando há interação da radiação eletromagnética com a molécula em questão (OLIVEIRA, 2001; STEPHANI, 2015).

A espectroscopia Raman apresenta algumas vantagens em relação à espectroscopia no infravermelho. As amostras não necessitam de um pré-tratamento, não usa reagentes, não gera subprodutos tóxicos, além de ser uma técnica não destrutiva. A água não interfere na aquisição de espectros e é possível determinar mais de um componente ao mesmo tempo (STEPHANI,

2015). Essa técnica tem se mostrado muito eficiente para caracterização de materiais e no controle de qualidade de produtos alimentícios (ALMEIDA *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2012; STEPHANI, 2015). Como exemplo de aplicação, D’Incecco *et al.* (2016) caracterizou cristais encontrados em queijos utilizando espectroscopia Raman. Campos (2020) utilizou a mesma técnica para caracterizar carotenoides presentes em diferentes estágios de maturação do tomate. Através da espectroscopia Raman, De Paula (2021) estudou como a estocagem de produtos lácteos de búfala em pó, levando-se em consideração diferentes umidades relativas do ar, poderia favorecer a cristalização da lactose.

2.4.3 Difração de raios X

Os raios X são ondas eletromagnéticas que ocupam a região entre a radiação gama e os raios ultravioleta no espectro eletromagnético, caracterizando-se por possuir comprimento de onda da ordem de ângstroms ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$) e frequência acima de 10^{16} Hertz (DA SILVA, 2013).

A difração de raios X em cristais foi descoberta por Max von Laue em 1912 e, devido a essa descoberta, foi agraciado com o prêmio Nobel de Física em 1914. Esse trabalho abriu caminho para as contribuições posteriores de William Henry Bragg e William Lawrence Bragg. Desde então, a técnica vem sendo usada para o estudo da estrutura cristalina de materiais. Ela consiste na incidência de radiação eletromagnética sobre um material. Entretanto, o comprimento de onda da radiação deve ser da mesma ordem de grandeza das distâncias interatômicas em sólidos, ou seja, da ordem de 1 \AA . A difração será consequência da interferência construtiva entre os fótons espalhados pelas eletrosferas dos átomos da rede cristalina do material analisado. A intensidade difratada em função de um ângulo de espalhamento dependerá das posições relativas entre os átomos da rede cristalina do material. Então, da análise do padrão de difração é possível obter informações sobre quais tipos de estruturas cristalinas estão presentes em um dado material e em quais proporções (SANSONE, 2018).

A difração de raios X em pó (PDRX) é usada há décadas para identificar estruturas cristalinas que aparecem em queijo. Dentre essas estruturas está o fosfato de cálcio, o lactato de cálcio pentahidratado, a cisteína e a tirosina (CONOCHIE *et al.*, 1960; HARPER *et al.*, 1953; PEARCE *et al.*, 1973). Por meio dessa técnica, Tansman, Kindstedt e Hugues (2014) diferenciaram dois enantiômeros de lactato de cálcio pentahidratado encontrados em queijo

cheddar. Esse estudo mostrou que a difração de raios X pode ser usada como uma ferramenta para identificar diferentes cristais de lactato de cálcio que têm ocorrência em queijo cheddar.

2.4.4 Ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) foi descoberta pelos cientistas americanos Felix Bloch e Edward Mills Purcell em 1946, e desde então, a técnica vem sendo usada para analisar vários materiais, inclusive alimentos. Nesse caso, o fenômeno físico envolvido é a interação do átomo com um campo magnético externo, portanto, o núcleo que contém momento angular e magnético apresenta um movimento sob a ação do campo magnético externo (BALTHAZAR *et al.*, 2021).

Os átomos possuem em seu núcleo uma partícula carregada positivamente, o próton, que possui uma propriedade denominada momento angular. O momento angular representa o movimento de rotação do próton em torno do seu próprio eixo. O próton pode ter spin $+1/2$ ou $-1/2$, portanto, nos núcleos com número par de subpartículas do mesmo tipo (prótons ou nêutrons), os spins se cancelam, fazendo com que esses núcleos não tenham momento magnético total. Mas em alguns átomos como ^1H , ^{13}C e ^{31}P , o núcleo tem rotação diferente de zero, o que gera um momento magnético. Então, a técnica de ressonância magnética é aplicada ao estudo de núcleos com momento magnético diferente de zero (BALTHAZAR *et al.*, 2021; LOPES, 2017).

Os núcleos se comportam como ímãs, então, a aplicação de um campo magnético afeta sua rotação, permitindo observar, em ressonância, os espectros dos núcleos resultantes do retorno ao equilíbrio através do relaxamento dos núcleos excitados por radiofrequência. A técnica possui algumas vantagens, como não necessitar de preparação da amostra ou separação de solvente, além de ser rápida e simples. Mas, apresenta algumas desvantagens como o alto custo dos equipamentos e da manutenção dos mesmos (BALTHAZAR *et al.*, 2021).

O espectro de ressonância magnética nuclear de materiais no estado sólido se diferencia de um espectro de materiais no estado líquido, visto que no estado sólido o espectro possui sinais mais largos. Isso deve-se à natureza anisotrópica de materiais no estado sólido. Esse fato requer boa resolução espectral, então se faz necessário o uso de algumas técnicas como a rotação da amostra em torno de um ângulo mágico (MAS – Magic Angle Spinning). Nessa técnica de alta resolução, o material sólido é rotacionado em torno de um eixo inclinado a um ângulo de $54,74^\circ$ (ângulo mágico) em relação ao campo magnético externo (LOPES, 2017). Como exemplo de aplicação, Bak *et al.* (2001) analisou a composição de micelas de caseína

por ressonância magnética nuclear no estado sólido e, assim, identificou uma variedade de fosfatos orgânicos e inorgânicos. De acordo com Balthazar *et al.* (2021), o RMN é uma importante ferramenta para controle de qualidade de produtos lácteos durante processamento e estocagem. A técnica pode ser usada para mensurar o teor de gordura em produtos lácteos, a mobilidade molecular da água e capacidade de retenção de água dos queijos, além de detectar soro de leite, ureia, peróxido de hidrogênio e urina sintética em leite cru.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal identificar e caracterizar pontos brancos (PIPS) em amostras de doce de leite pastoso de diferentes fabricantes utilizando diferentes técnicas analíticas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentre os objetivos específicos do trabalho, estão:

- a) caracterizar a morfologia dos PIPS presentes na massa do doce de leite pastoso por microscopia óptica;
- b) extrair os PIPS de amostras de doce de leite pastoso;
- c) caracterizar os materiais extraídos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) combinado com analisador de energia dispersiva de raios X (EDS);
- d) realizar a quantificação de cálcio e fósforo nos materiais extraídos por método oficial (AOAC);
- e) realizar a análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) nos materiais extraídos;
- f) realizar a análise de aminoácidos (aminograma) nos materiais extraídos;
- g) caracterizar os materiais extraídos por espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman;
- h) caracterizar os materiais extraídos por difratometria de raios X;
- i) caracterizar os materiais extraídos por ressonância magnética nuclear no estado sólido (RMN);
- j) sintetizar o DL-Lactato de Cálcio Pentahidratado (DL-CLP) para verificar a presença deste composto nos PIPS;
- k) caracterizar o DL-Lactato de Cálcio Pentahidratado (DL-CLP) utilizando espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman.

4 METODOLOGIA

A seguir será apresentada a metodologia utilizada para a realização deste trabalho. Dentre as etapas estão: microscopia óptica das amostras de doce de leite, extração dos PIPS a partir das amostras de doce de leite, síntese do DL-lactato de cálcio pentahidratado e análises de caracterização realizadas nos PIPS e também no DL-CLP sintetizado.

4.1 MICROSCOPIA ÓPTICA DOS DOCES DE LEITE E EXTRAÇÃO DOS PONTOS BRANCOS

Os PIPS se apresentam distribuídos uniformemente por toda a massa do doce de leite, e, geralmente, já é possível observá-los pela embalagem do doce de leite, conforme é apresentado na Figura 1.

Foram adquiridas 8 amostras de doce de leite pastoso de diferentes fabricantes para realizar as extrações dos PIPS. Antes de realizar a extração dos PIPS, uma pequena quantidade dos doces de leite foi colocada em uma lâmina de vidro. Essa pequena quantidade de amostra foi pressionada por uma lamínula de vidro e levada ao microscópio óptico para verificar a morfologia dos PIPS.

Para realizar cada extração, inicialmente foi pesado aproximadamente 600 g de doce de leite pastoso que foi dissolvido em 5 L de água deionizada aquecida. Os PIPS são insolúveis em água e por este motivo a mistura permaneceu em repouso por 1 h para que os PIPS decantassem por gravidade. Após esse processo, foram feitas várias lavagens para retirar o excesso de doce de leite. Os PIPS extraídos foram mantidos em temperatura ambiente (22 ± 2 °C) em um dessecador por sete dias para a retirada total da água restante da lavagem. Ao final, a amostra foi retirada do dessecador, pesada e guardada em local apropriado. As amostras de PIPS foram codificadas com números de 1 a 8.

O rendimento de cada extração é muito baixo, geralmente 600 g de doce de leite rende aproximadamente 0,5 g de PIPS ou até menos, em alguns casos. Portanto, as análises propostas não foram feitas necessariamente das mesmas amostras. Os PIPS foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) combinado com analisador de energia dispersiva de raios X (EDS), análise dos elementos cálcio e fósforo, análise elementar de C, H e N (CHN), aminograma, espectroscopias no infravermelho e Raman, difratometria de raios X (DRX) e ressonância magnética nuclear no estado sólido (RMN). Na Tabela 4 é

apresentado quais análises foram realizadas em cada amostra, onde é possível reparar que as amostras 1, 2 e 3 tiveram o maior número de técnicas abrangidas.

Figura 1 - PIPS no doce de leite (A) e a respectiva imagem aproximada (B).



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Quadro 1 - Análises realizadas nas amostras de PIPS.

Amostra	Análises
1	MEV, EDS, Ca e P, CHN, FT-IR, Raman, DRX e RMN
2	MEV, EDS, Ca e P, CHN, FT-IR, Raman, DRX e RMN
3	MEV, EDS, Ca e P, CHN, FT-IR, Raman, DRX e RMN
4	CHN e DRX
5	CHN e DRX
6	Aminograma
7	Aminograma
8	RMN

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.2 SÍNTESE DL-LACTATO DE CÁLCIO PENTAHIDRATADO

A síntese do DL-lactato de cálcio pentahidratado (DL-CLP) foi feita para verificar a presença desta substância nas amostras de PIPS, visto que a mistura racêmica das formas D(-) e L(+)-lactato de cálcio foi estudada por vários autores devido a sua presença em amostras de queijo (CHOU *et al.*, 2003; DYBING *et al.*, 1988; JOHNSON; RIESTER; OLSON, 1990).

Além de ser reportado na literatura a baixa solubilidade de DL-lactato de cálcio em relação ao L-lactato de cálcio (CAO *et al.*, 2001), considerando que os PIPS são formados na massa do doce de leite que é um produto com baixa concentração de água, alta concentração de açúcar e acidez total desenvolvida devido ao tratamento térmico. O DL-CLP também não é comercializado.

A síntese foi feita conforme é descrito por Tansman, Kindstedt e Hugues (2014). Primeiramente, em um béquer, foram dissolvidos 4 g de carbonato de cálcio (Sigma Aldrich) em 50 mL de água deionizada. No mesmo béquer, 10 mL de DL-ácido láctico (Sigma Aldrich) foi adicionado lentamente para que a efervescência não transbordasse o béquer. A solução foi agitada lentamente com um agitador magnético até que toda a efervescência cessasse e a solução ficasse límpida. Uma espátula de metal foi usada para arranhar o fundo do béquer, o que facilitou a cristalização do DL-CLP. A agitação foi mantida até a solução se tornar um gel.

O gel de DL-CLP cristalino foi transferida para um funil de Buchner com papel de filtro nº 541 (Sigma-Aldrich) ajustado a um kitassato, onde foi aspirado e seco com vácuo. Depois que não foi retirada mais solução da amostra por pelo menos meia hora, o DL-CLP cristalino foi transferido para um dessecador para secar por mais 24 h. Após a secagem no dessecador, a amostra foi moída finamente utilizando grau e pistilo e colocada na estufa a 38° C por 12 h. O DL-CLP foi caracterizado utilizando espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman.

Padrões de lactato de cálcio pentahidratado (Sigma-Aldrich), L-lactato de cálcio hidratado (Sigma-Aldrich) e citrato de cálcio tetra hidratado (Sigma-Aldrich) foram caracterizados por espectroscopia vibracional no infravermelho e Raman, com o intuito de comparar os perfis espectrais destes padrões com os perfis espectrais dos PIPS.

4.3 ANÁLISES REALIZADAS

A seguir serão descritas as especificações dos equipamentos utilizados para a realização das análises nas amostras de doce de leite (microscopia óptica) e também para as análises de caracterização dos PIPS extraídos (MEV, EDS, análise de Ca e P, análise elementar CHN, aminograma, espectroscopias no infravermelho e Raman, difração de raios X e RMN no estado sólido). E como dito anteriormente as espectroscopias no infravermelho e Raman também foram usadas para caracterizar o DL-CLP sintetizado, além de padrões de lactato de cálcio pentahidratado, L-lactato de cálcio hidratado e citrato de cálcio tetra hidratado.

4.3.1 Microscopia óptica

A microscopia óptica foi realizada em um microscópio óptico Medilux modelo MC30 com fonte de iluminação halógena. O software MShot Image Analysis System foi usado para registrar as imagens e medir o diâmetro dos PIPS.

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura e análise de energia dispersiva de raios X

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada utilizando um microscópio modelo TM 3000 (Hitachi Ltd) em diferentes graus de magnitude. A análise de energia dispersiva de raios X (EDS) foi realizada utilizando o mesmo microscópio combinado com o EDS (Bruker).

4.3.3 Análise de cálcio e fósforo

A análise dos elementos cálcio e fósforo foi realizada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). A análise foi feita baseada no método oficial AOAC (2012), Official Methods 985.35 e 984.27 e utilizou técnicas de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES), respectivamente.

4.3.4 Análise Elementar CHN

A análise de CHN foi realizada em um analisador CHNS-O modelo Flash2000 (ThermoScientific) utilizando também balança modelo XP6 (Metler Toledo). O software usado para aquisição dos resultados foi o Eager Xperience (ThermoScientific).

4.3.5 Aminograma

O aminograma foi realizado pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). A composição de aminoácidos foi determinada após hidrólise com LiOH 4 mol/L para triptofano por 24 h à 110 ± 1 °C e com HCl 6 mol/L para os demais aminoácidos à mesma temperatura por 22 h. Um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (modelo MP 3000E - Milton Coy Co.) foi usado para analisar os

aminoácidos. A eluição de aminoácidos foi realizada com solvente A — acetato de sódio 0,14 M, 0,05%, pH 5,6 e solvente B — acetonitrila — água (60:40, v/v). A análise de cada amostra foi feita em duplicata.

Com os dados do aminograma foi elaborada uma análise estatística de correlação utilizando a função CORREL do programa Microsoft Office Excel 2019, que retorna o coeficiente de correlação entre as variáveis escolhidas. As porcentagens dos aminoácidos presentes nas amostras de PIPS foram correlacionadas com as porcentagens de aminoácidos presentes nas frações de caseína e nas proteínas do soro de leite. A composição de aminoácidos presentes em cada fração de caseína e nas proteínas do soro foram descritas por Silva *et al.* (2019) e por Tavares (2020).

4.3.6 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi realizada em um espectrômetro modelo FT-Raman RFS 100 (Bruker), equipado com um detector de Ge, com linha de excitação de 1064 nm a partir de um *laser* de estado sólido de Nd:YAG. As amostras foram adicionadas em porta amostras de alumínio e levadas ao equipamento onde foram utilizados os seguintes parâmetros espectrais para coleta de dados: 300 mW de potência, 512 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} na região de 4000 cm^{-1} a 50 cm^{-1} . O *software* OPUS 6.0 (Bruker) foi empregado para a coleta dos dados e o programa OriginPro 2018 foi utilizado para a elaboração dos espectros representativos de cada amostra.

4.3.7 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho foi realizada em um espectrômetro no Infravermelho Bruker modelo Alpha FT-IR/ATR (Bruker). Os espectros foram obtidos na região compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} , um total de 128 acumulações foram realizadas para cada espectro. O *software* OPUS 6.0 (Bruker Optik Ettingen, Alemanha) foi empregado para a coleta dos dados e o programa OriginPro 2018 foi utilizado para a elaboração dos espectros representativos de cada amostra.

4.3.8 Difração de raios X

A difração de raios X de pó (PDRX) foram realizadas na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Os dados de PDRX foram registrados à temperatura ambiente usando um difratômetro Ultima IV (Rigaku) com geometria $\theta - 2\theta$. A radiação Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) foi gerada usando um tubo selado a 40 kV e 30 mA.

4.3.9 Ressonância magnética nuclear no estado sólido

O experimento de RMN de ^{13}C no estado sólido foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III HD 300 (7.04 T), operado a uma frequência de Larmor de 75,00 MHz. As análises foram executadas em uma sonda MAS, em rotores de ZrO_2 (e tampas de Kel-F) de 4 mm. Os espectros foram obtidos numa frequência de giro de 10000 HZ, com tempo de relaxação de 2,5s e um pulso de 90° de $5,00\mu\text{s}$ utilizando giro-ao-ângulo mágico, e polarização cruzada. Os deslocamentos químicos foram padronizados de forma indireta através de uma amostra de Glicina, com sinal referente a carbonila em 176,00 ppm em relação ao TMS que é o padrão primário.

O experimento de RMN de ^{31}P no estado sólido foram realizados no mesmo espectrômetro, porém operado a uma frequência de Larmor de 121,00 MHz. As análises foram executadas em uma sonda MAS, em rotores de ZrO_2 (e tampas de Kel-F) de 4 mm. Os espectros foram obtidos numa frequência de giro 10000 HZ, com tempo de relaxação de 60s e um pulso de 90° de $4,0\mu\text{s}$ utilizando giro-ao-ângulo mágico. Os deslocamentos químicos foram padronizados de forma indireta de uma amostra de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, com sinal de 2,3 ppm em relação a uma solução aquosa de 85% H_3PO_4 que é o padrão primário.

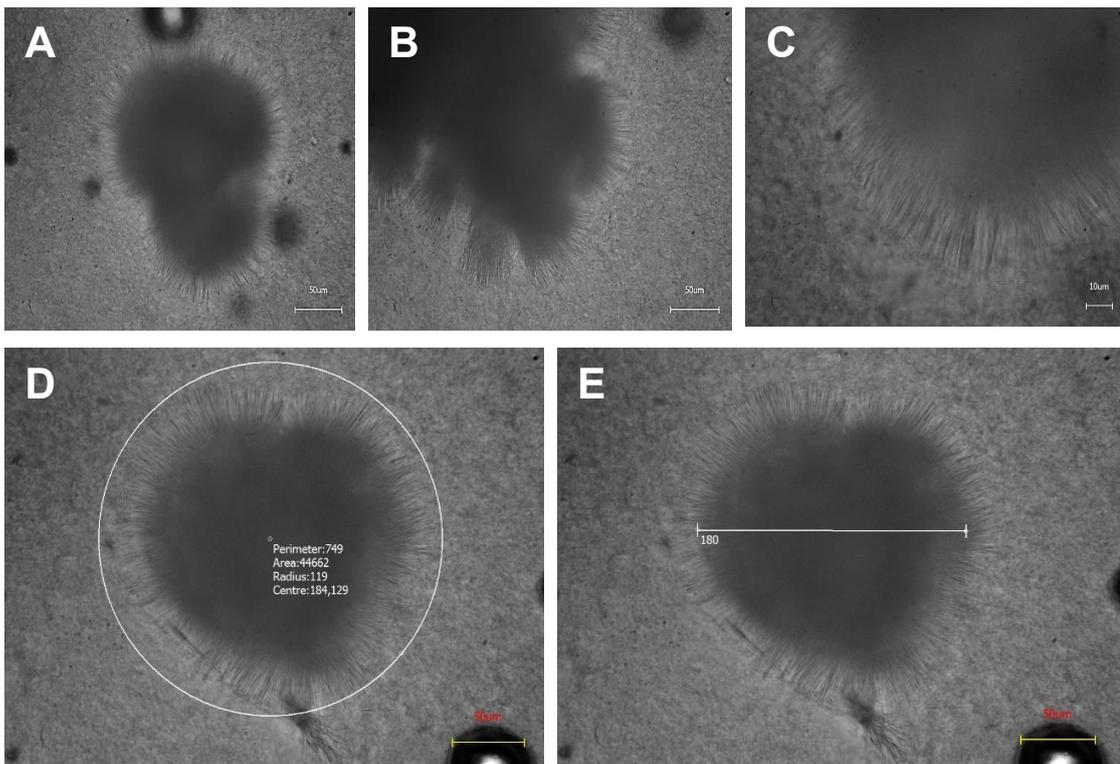
5 RESULTADOS

Nas sessões a seguir serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho a partir das análises realizadas. De acordo com os resultados, foi feita uma discussão com base em referências da literatura científica.

5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

A morfologia dos PIPS foi inicialmente investigada através da microscopia óptica. Na Figura 2 é apresentado as imagens de microscopia óptica obtidas para amostras de doce de leite, em que todas as amostras apresentaram a mesma morfologia. Os PIPS apresentam uma morfologia de agregados esféricos onde a superfície é composta por um material com formato de agulhas. O tamanho dos cristais varia de 100 a 500 μm e normalmente observaram-se cristais provenientes de um centro em comum com formato de agulha na superfície.

Figura 2 - Microscopia óptica dos PIPS presentes na massa do doce de leite com aumento de (A e B) 250x, (C) 400x e (D e E) dimensões dos PIPS em aumento de 250x.

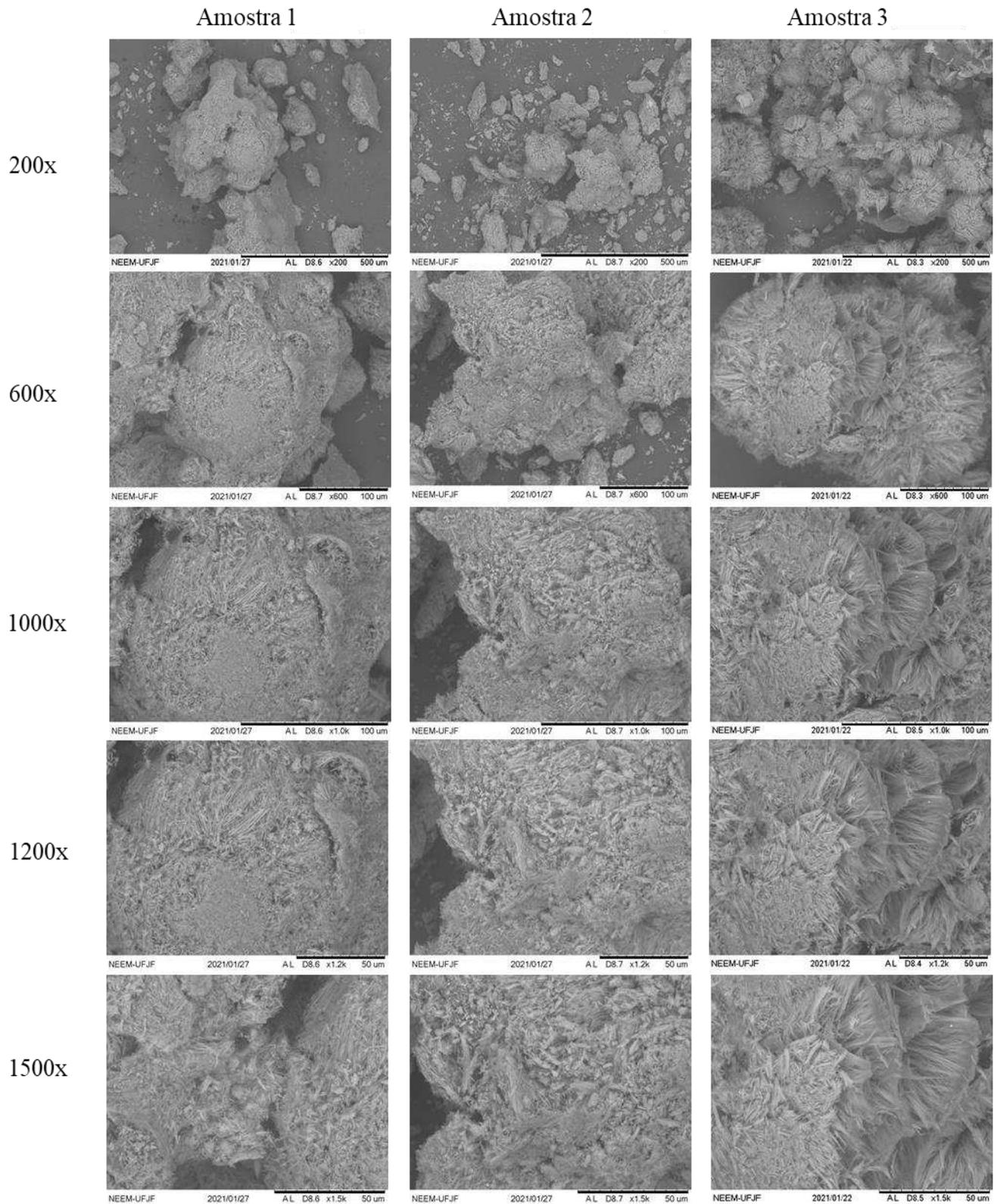


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

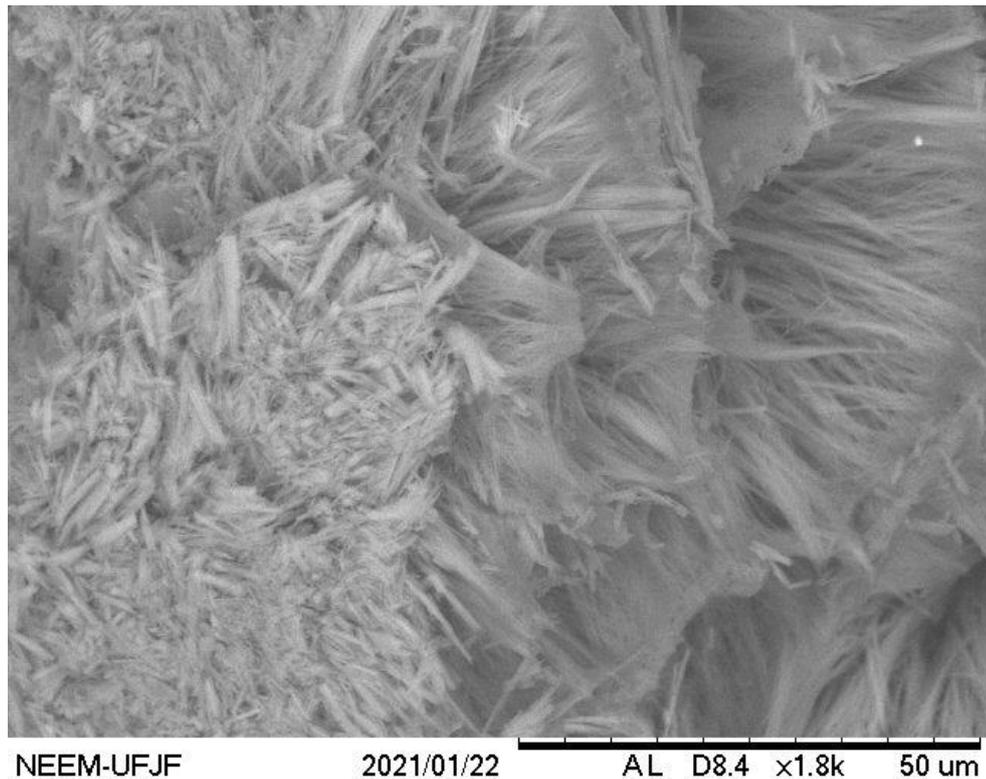
As imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de PIPS, em diferentes magnitudes, são apresentadas na Figura 3. Através dessas imagens, foi possível observar a formação de agregados esféricos com uma superfície composta por um material com formato de agulhas, assim como já tinha sido observado na microscopia óptica. Além disso, pode ser verificado que a estrutura densa esférica serve como ponto de nucleação para o crescimento das agulhas. Na Figura 4 é apresentada uma imagem do MEV da amostra 3 de PIPS na magnificação de 1800x para destacar a superfície composta pelo material em forma de agulhas.

Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de PIPS em diferentes ampliações.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos PIPS na magnificação de 1800x.

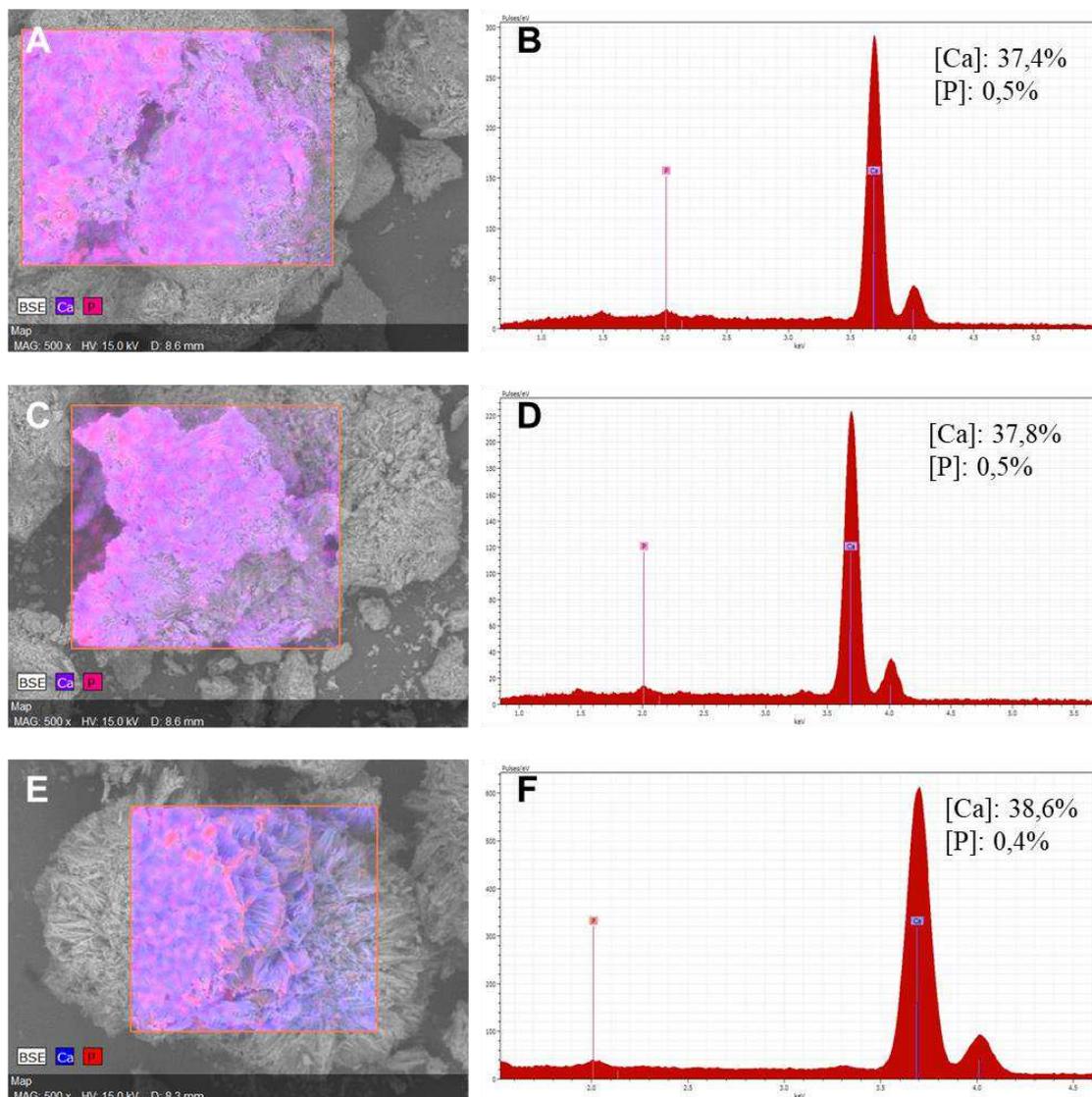


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.3 ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X

Na Figura 5 são apresentados os mapeamentos de superfícies por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) das amostras de PIPS. O mapeamento mostrou a presença majoritária de átomos de cálcio. Além do cálcio, é possível observar a presença de uma pequena quantidade de átomos de fósforo.

Figura 5 - Imagens do mapeamento de distribuição elemental por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (A, C e E) das amostras de PIPS numeradas como 1, 2 e 3 respectivamente, na magnificação de 500X. Espectros de fluorescência de raios X (B, D e F) das amostras de PIPS numeradas como 1, 2 e 3 respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.4 ANÁLISE DE CÁLCIO E FÓSFORO

Para complementar a análise semiquantitativa feita por espectroscopia de EDS, que confirmou a presença átomos de cálcio e fósforo nas amostras de PIPS, foi realizada uma análise quantitativa com o intuito de determinar a proporção desses elementos. Os resultados da análise quantitativa de cálcio e fósforo para as amostras de PIPS são apresentados na Tabela 5. Conforme foi mostrado nos resultados de EDS, os PIPS possuem maior concentração de cálcio

em relação a concentração de fósforo. E como dito anteriormente, os elementos cálcio e fósforo estão presentes na fração mineral do leite.

Tabela 4 - Análise de cálcio e fosforo das amostras de PIPS.

Amostra	Cálcio (g.100g ⁻¹)	Fósforo (g.100g ⁻¹)
1	9,392±0,241	0,937±0,066
2	17,599±0,147	0,361±0,004
3	18,249±0,154	0,197±0,008

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.5 ANÁLISE ELEMENTAR DE CHN

A análise de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) foi realizada para verificar a possível existência de matéria orgânica nos PIPS. Também foi possível verificar a presença de nitrogênio que é um indicativo da existência de aminoácidos e proteínas. As análises de CHN foram realizadas em duplicata e as respectivas médias são apresentadas na Tabela 6. De acordo com os mesmos, foi possível confirmar a presença de matéria orgânica e, possivelmente, aminoácidos na estrutura dos PIPS.

Tabela 5 - Análise de CHN das amostras de PIPS.

Amostra	Carbono (g.100g ⁻¹)	Hidrogênio (g.100g ⁻¹)	Nitrogênio (g.100g ⁻¹)
1	31,57±0,18	4,72±0,20	3,20±0,10
2	28,95±0,17	3,99±0,01	2,61±0,04
3	29,13±0,58	4,23±0,09	1,01±0,13
4	25,60±0,28	3,85±0,04	1,03±0,01
5	27,17±0,23	3,95±0,08	1,33±0,00
Média Geral	28,48	4,15	1,84
Valor Máximo	31,70	4,86	3,27
Valor Mínimo	25,40	3,82	0,92
Amplitude	6,30	1,04	2,35
Desvio Padrão	2,13	0,34	0,95
Erro padrão da média	0,67	0,11	0,30
Coefficiente de variação	7,5%	8,2 %	51,7%

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.6 AMINOGRAMA

Para confirmar a presença de aminoácidos e suas respectivas concentrações foi feito um aminograma. As análises foram feitas em duplicata e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 7. Nesse aminograma destacam-se as concentrações de ácido glutâmico, prolina, leucina e ácido aspártico. Podemos observar também que o percentual de aminoácidos nas amostras de PIPS está em torno de 4%.

Os PIPS são um defeito encontrado na massa do doce de leite e sua ocorrência pode ser sazonal e regional. Dessa forma, a formação dos PIPS em doce de leite pode coincidir com a época do ano onde os animais são alimentados com grãos. A adição de grãos na alimentação animal contribui para a formação de ácido propiônico, que contribui para maior formação de aminoácidos, especialmente o ácido glutâmico (FONTANELI, 2001). Esse fato explica a alta concentração de ácido glutâmico em relação aos demais aminoácidos.

Com os dados do aminograma foi elaborada uma análise estatística de correlação que é apresentada na Tabela 8. A análise de correlação, em estatística, mede o grau de dependência entre duas variáveis e retorna o coeficiente de correlação. Nesse caso, os percentuais dos

aminoácidos presentes nas amostras de PIPS foram correlacionadas com os percentuais de aminoácidos presentes nas frações de caseína e nas proteínas do soro de leite. A composição de aminoácidos presentes em cada fração de caseína e nas proteínas do soro foram descritas por Silva *et al.* (2019) e por Tavares (2020).

Tabela 6 - Aminograma das amostras de PIPS em mg.100mg⁻¹ amostra.

Aminoácidos	Amostra 6 (1)	Amostra 6 (2)	Amostra 7 (1)	Amostra 7 (2)
Triptofano	0,09	0,09	0,09	0,09
Lisina	0,19	0,19	0,23	0,24
Histidina	0,07	0,07	0,08	0,08
Arginina	0,14	0,14	0,15	0,16
Ácido aspártico	0,31	0,30	0,36	0,36
Treonina	0,18	0,18	0,21	0,21
Serina	0,23	0,22	0,25	0,25
Ácido glutâmico	0,81	0,81	0,84	0,84
Prolina	0,36	0,36	0,39	0,39
Glicina	0,09	0,10	0,10	0,10
Alanina	0,14	0,14	0,16	0,16
½ Cistina	0,02	0,02	0,03	0,03
Valina	0,23	0,23	0,25	0,25
Metionina	0,11	0,11	0,10	0,10
Isoleucina	0,18	0,18	0,20	0,21
Leucina	0,37	0,36	0,41	0,41
Tirosina	0,22	0,22	0,23	0,24
Fenilalanina	0,20	0,20	0,22	0,22
Total	3,94	3,92	4,30	4,34

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O coeficiente de correlação igual a 1 significa correlação perfeita e positiva entre duas variáveis. Na Tabela 8 destacam-se os valores próximos de 1 obtidos para a fração α_{s1} -caseína. Horne (2017) reporta que a fração α_{s1} -caseína possui 199 resíduos de aminoácidos, onde 136 desses resíduos são hidrofóbicos, ou seja, a α_{s1} -caseína tem uma grande região hidrofóbica que, possivelmente, não se solubilizou no processo de extração dos PIPS. A fração coloidal contém cátions e ânions ligados diretamente aos resíduos de aminoácidos das caseínas e, de acordo com a literatura científica, a fração α_{s1} -caseína tem afinidade por cátions bivalentes, principalmente cálcio, devido à presença de resíduos de fosfoserina que servem como sítios de ligação para cálcio (SILVA *et al.*, 2019). Os PIPS são formados majoritariamente por cálcio, portanto, pode haver interação entre o cálcio dos PIPS e a α_{s1} -caseína.

Tabela 7 - Análise estatística de correlação entre as porcentagens de aminoácidos presentes nas amostras de PIPS e a porcentagem de aminoácidos presentes nas frações de caseína e proteínas do soro.

Correlação com:	Média	Amostra			
		6 (1)	6 (2)	7 (1)	7 (2)
α_{s1} -caseína	0,958	0,959	0,959	0,956	0,955
α_{s2} -caseína	0,826	0,822	0,818	0,831	0,831
β -caseína	0,915	0,917	0,919	0,911	0,910
κ -caseína	0,863	0,860	0,858	0,867	0,865
β -lactoglobulina	0,805	0,796	0,787	0,814	0,820
α -lactoalbumina	0,483	0,466	0,457	0,501	0,505

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

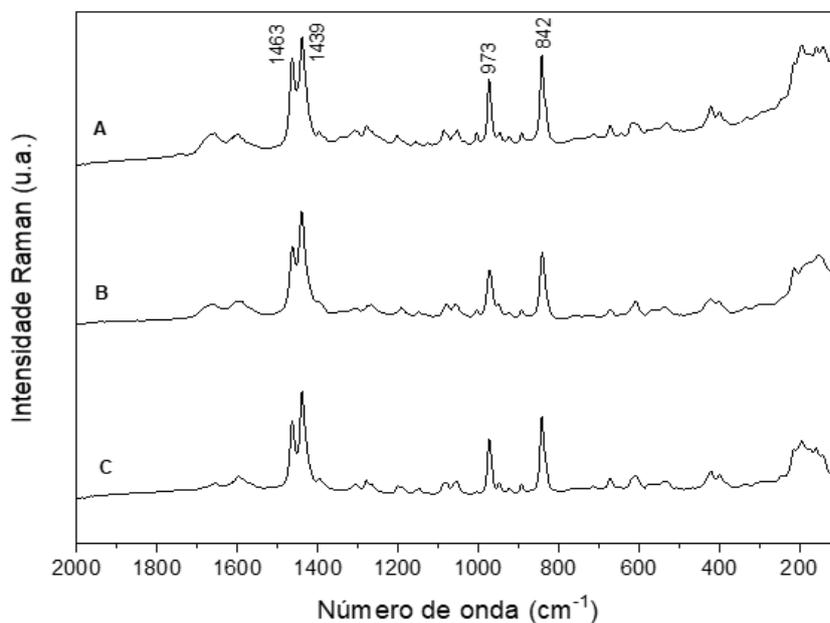
5.7 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Os espectros Raman das amostras de PIPS são semelhantes, conforme é mostrado na Figura 6. Portanto, nas Figuras 7 e 8 é apresentado apenas um espectro dos PIPS. Na Figura 7 está disposto o espectro Raman dos PIPS juntamente com o espectro do DL-CLP sintetizado, além dos espectros dos padrões de lactato de cálcio pentahidratado e L-lactato de cálcio hidratado. É possível observar que as bandas do duplete em 1463 cm^{-1} e 1439 cm^{-1} presente nos espectros dos PIPS são semelhantes às bandas do duplete em 1451 cm^{-1} e 1430 cm^{-1} presente no espectro do DL-CLP. Esse duplete é atribuído ao estiramento do íon carboxilato (COO^-).

Entretanto as bandas em 973 cm^{-1} e 842 cm^{-1} dos PIPS não são encontradas no espectro do DL-CLP e nem nos espectros dos padrões de lactato de cálcio.

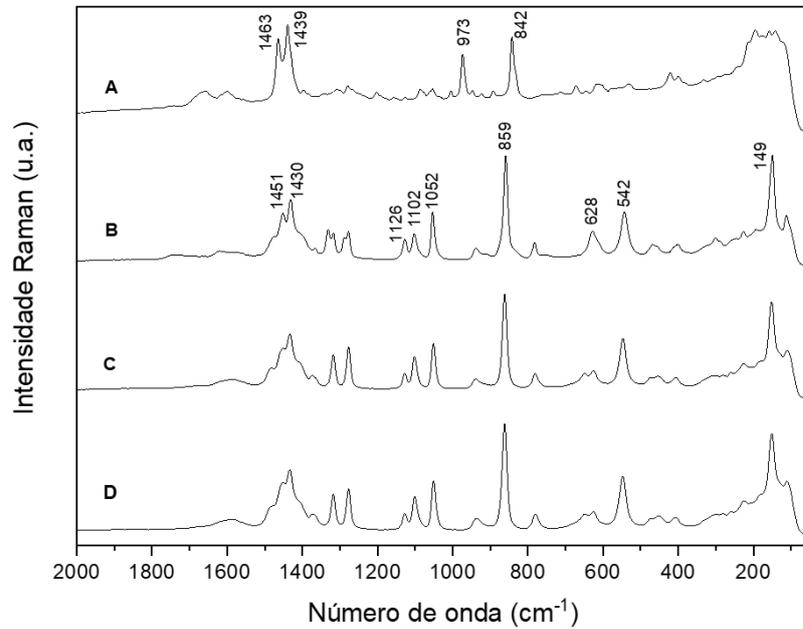
Na Figura 8 está disposto o espectro Raman dos PIPS juntamente com o espectro do padrão de citrato de cálcio tetra hidratado e, assim, podemos observar que os espectros são semelhantes, confirmando a presença de citrato de cálcio nos PIPS. A Tabela 9 representa a tentativa de atribuição de alguns modos vibracionais de acordo com a literatura. As bandas em torno de 1460 e 1440 cm^{-1} de ambos espectros são atribuídas ao íon COO^- , já as bandas em torno de 970 cm^{-1} e 840 cm^{-1} são atribuídas ao balanço (*rocking*) da ligação CH_2 (LI *et al.*, 2016; SMITH *et al.*, 2016).

Figura 6 - Espectros Raman dos PIPS, sendo (A) amostra 1, (B) amostra 2 e (C) amostra 3.



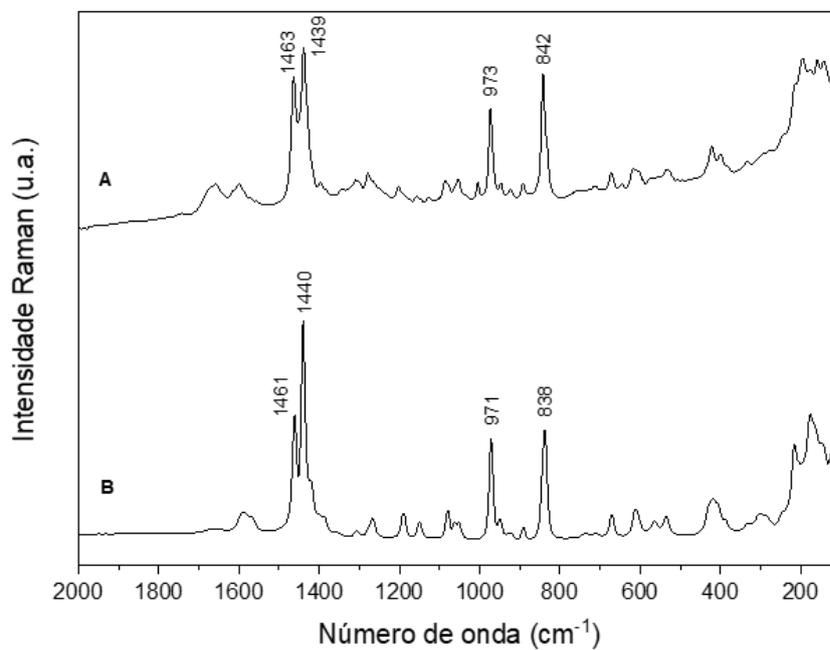
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 7 - Espectros Raman dos (A) PIPS, (B) DL-CLP sintetizado, padrões de (C) lactato de cálcio pentahidratado e (D) L-lactato de cálcio hidratado.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 8 - Espectros Raman dos (A) PIPS e (B) padrão de citrato de cálcio tetrahidratado.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 8 - Atribuição dos espectros Raman do citrato de cálcio tetrahidratado (CCT) e dos PIPS.

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuição
CCT	PIPS	
1461	1463	νCOO^-
1440	1439	νCOO^-
971	973	νCH_2
838	842	νCH_2

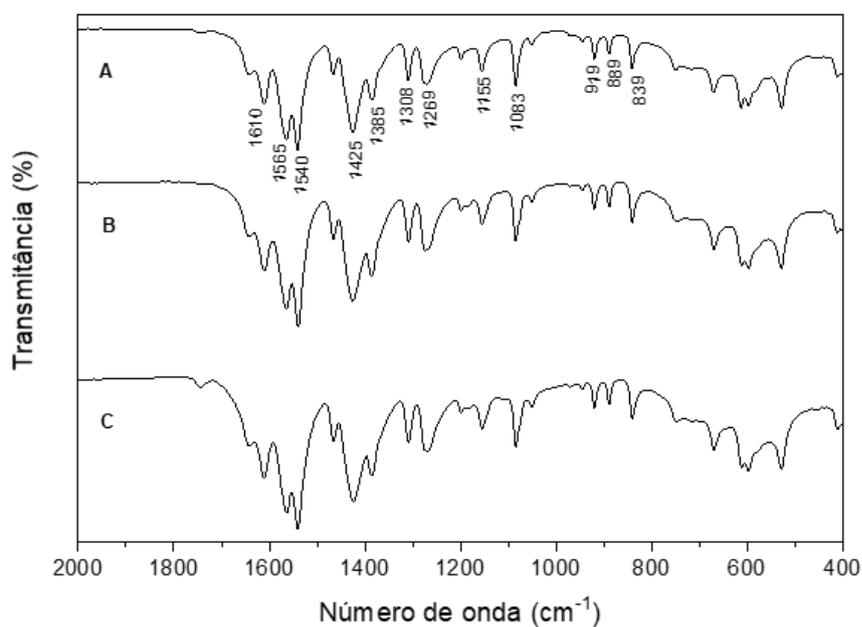
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.8 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros na região do infravermelho das amostras de PIPS são semelhantes, conforme é mostrado na Figura 9. Portanto, nas Figuras 10 e 11 é apresentado apenas um espectro dos PIPS. Na Figura 10 está disposto o espectro no infravermelho dos PIPS juntamente com o espectro do DL-CLP sintetizado, além dos espectros dos padrões de lactato de cálcio penhidratado e L-lactato de cálcio hidratado. Através desses resultados, é possível observar que o espectro no infravermelho dos PIPS não possui bandas semelhantes com os espectros dos lactatos.

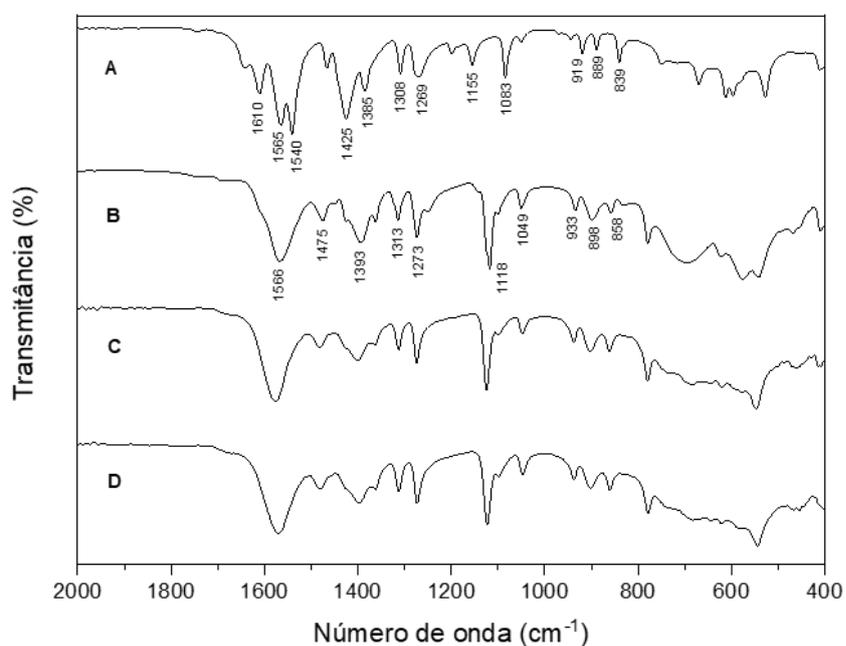
Na Figura 11 é apresentado os espectros no infravermelho dos PIPS juntamente com o espectro do padrão de citrato de cálcio tetrahidratado e, assim, é possível observar a semelhança entre os espectros, confirmando a presença de citrato de cálcio nos PIPS. A Tabela 10 representa a tentativa de atribuição de alguns modos vibracionais de acordo com a literatura. As bandas encontradas entre $1580 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$ e $1360 \pm 60 \text{ cm}^{-1}$ em ambos espectros é atribuído ao estiramento antissimétrico e simétrico, respectivamente, do íon COO^- , já a banda em torno de 1260 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da ligação C-O (LI *et al.*, 2016; MAYO; MILLER; HANNAH, 2003).

Figura 9 - Espectros no infravermelho dos PIPS, sendo (A) amostra 1, (B) amostra 2 e (C) amostra 3.



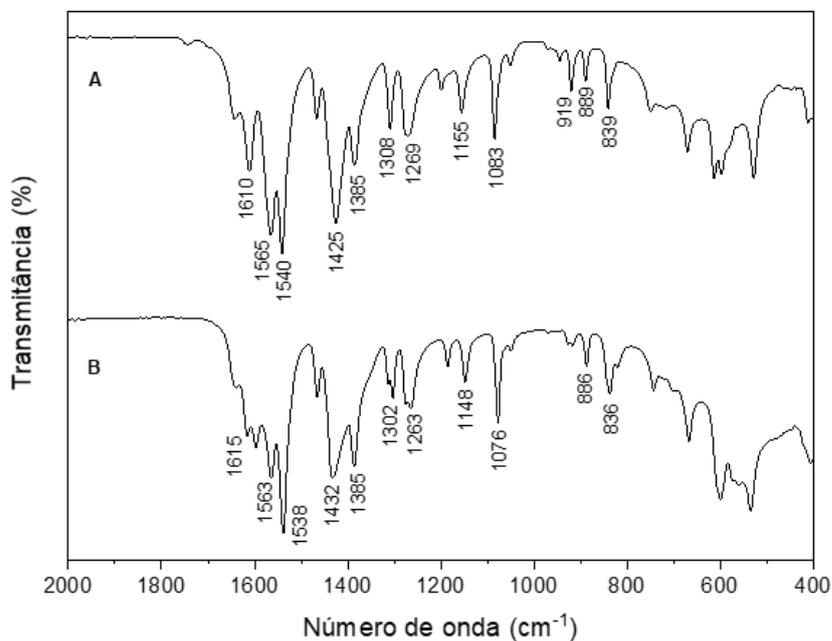
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 10 - Espectros no infravermelho dos (A) PIPS, (B) DL-CLP sintetizado, padrões de (C) lactato de cálcio pentahidratado e (D) L-lactato de cálcio hidratado.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 11 - Espectros no infravermelho dos (A) PIPS e (B) padrão de citrato de cálcio tetra hidratado.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 9 - Atribuição dos espectros no infravermelho do citrato de cálcio tetra hidratado (CCT) e dos PIPS

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuição
CCT	PIPS	
1615-1538	1610-1540	$\nu_{as}COO^-$
1432-1385	1425-1385	ν_sCOO^-
1263	1269	$\nu C-O$

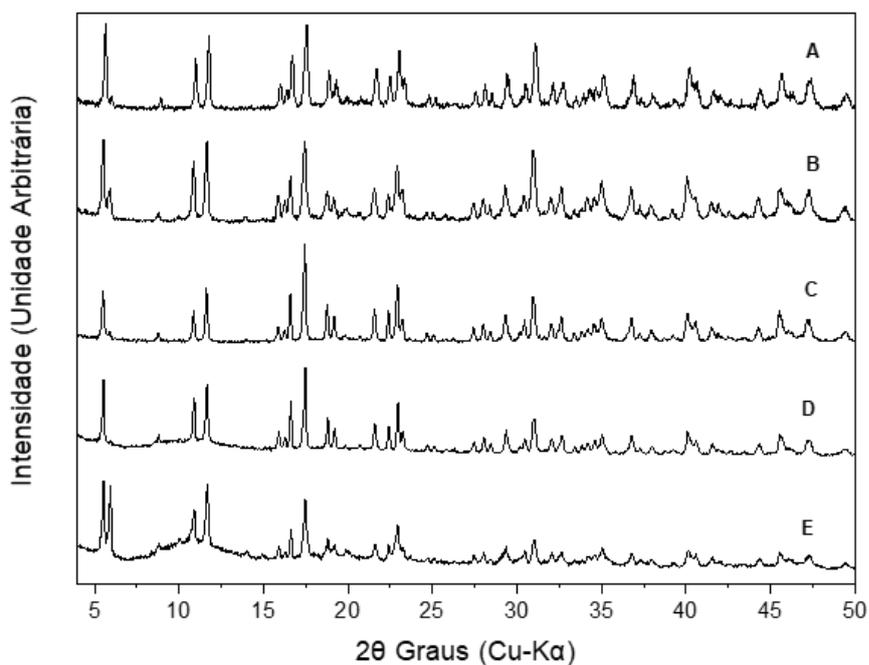
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.9 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A estrutura cristalina dos PIPS foi investigada usando a difração de raios X e o perfil de difração das amostras de PIPS são apresentados na Figura 12. O perfil cristalino das amostras apresentam semelhanças, e por esse motivo, na Figura 13 será apresentado apenas um difratograma de uma das amostras de PIPS.

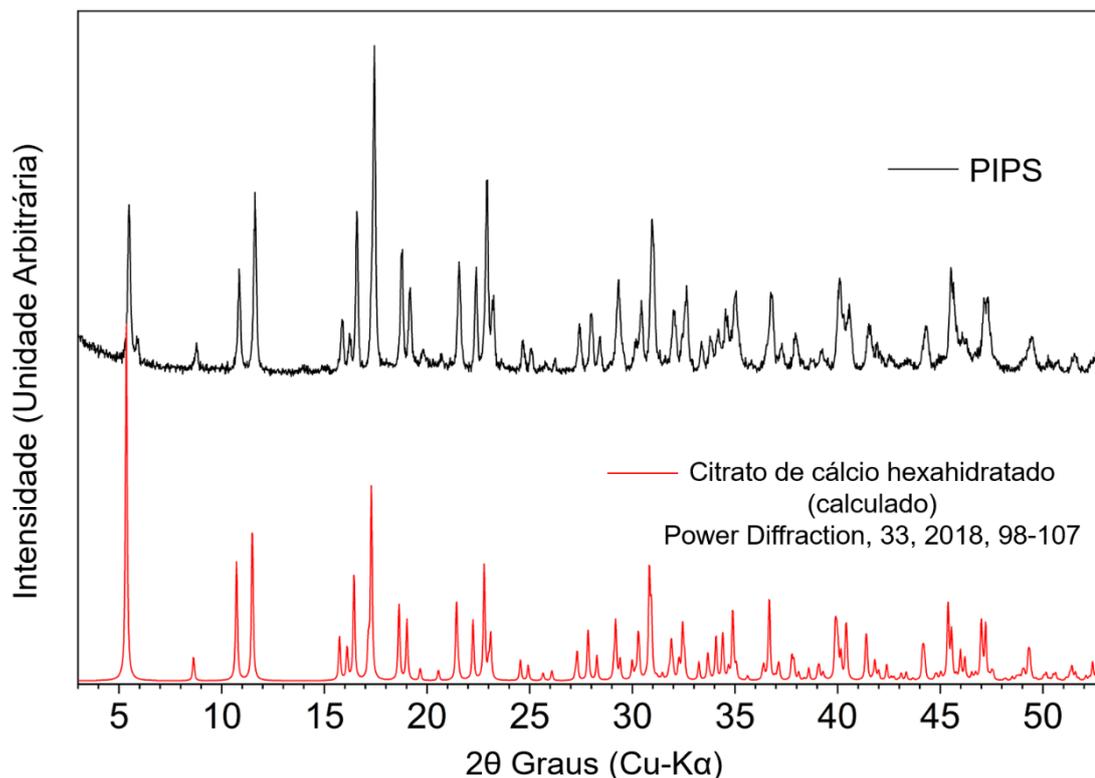
Na Figura 13 é apresentado uma comparação entre o difratograma dos PIPS e o difratograma calculado do citrato de cálcio hexahidratado disponível no trabalho de Kaduk (2018). Através dessa comparação é possível afirmar que a fase majoritária da estrutura cristalina dos PIPS é formada por citrato de cálcio hexahidratado.

Figura 12 - Difração de raios X das amostras (A) 1, (B) 2, (C) 3, (D) 4 e (E) 5 dos PIPS.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 13 - Difração de raios X dos PIPS obtido experimentalmente e do citrato de cálcio hexahidratado calculado.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

5.10 CITRATO DE CÁLCIO

O citrato é um íon presente tanto na fase solúvel quanto na fase coloidal do leite. Cerca de 86% do citrato está na fase solúvel e 14% está na fase coloidal (SILVA *et al.*, 2019). Na fase solúvel do leite, o citrato forma um complexo estável com cálcio, formando, assim, o citrato de cálcio. O citrato de cálcio está presente no leite em uma concentração de 6,96 mM e de acordo com os estudos de solubilidade de Liu, Kirkensgaard e Skibsted (2021), esse composto possui solubilidade em água variando entre 3,141 e 4,646 mM a 25°C, ou seja, o citrato de cálcio está supersaturado no leite (HOLT; DALGLEISH; JENNESS, 1981). O doce de leite passa por um extenso tratamento térmico, onde é evaporada boa parte da água presente no leite, portanto, o citrato de cálcio estará ainda mais saturado no doce de leite, permitindo sua precipitação e, conseqüentemente, permitindo o crescimento dos cristais. Tal fato explica a presença de citrato de cálcio na estrutura química dos PIPS. A cerca da ocorrência sazonal e regional dos PIPS, os teores salinos do leite têm variações de acordo com a raça do animal, o estágio de lactação e

alimentação, sendo a alimentação o fator que mais impacta na variação do teor de citrato (DA SILVA, 2003; FOX, 1991).

De acordo com Boulet e Marier (1960), o citrato de cálcio hexahidratado é instável e, gradualmente, é convertido para a forma tetrahidratada a temperatura ambiente. Entretanto, no estudo de solubilidade feito por Vavrusova e Skibsted (2016), a solubilidade desses compostos é igual na temperatura de 51,6°C, então espera-se que o hexahidratado se transforme em tetrahidratado nessa temperatura de transição. Segundo os autores, uma fase menos estável é formada antes da transformação para a forma termodinamicamente estável. Efeitos semelhantes foram observados para outros sais importantes para a indústria de laticínios, como os fosfatos (GAO *et al.*, 2010). Portanto, o citrato de cálcio, possivelmente, precipita como um sal duplo.

Em um estudo mais recente de Liu, Kirkensgaard e Skibsted (2021) é reportado a existência de quatro formas de citrato de cálcio: anidro (CCA), dihidratado (CCD), tetrahidratado (CCT) e hexahidratado (CCH). A diminuição da solubilidade segue a ordem: CCA>CCD>CCT>CCH a 25 °C, mostrando que o CCH tem a menor solubilidade quando comparado aos demais. Além disso, segundo os autores, os precipitados de CCT e CCH podem coexistir em equilíbrio em soluções aquosas. Também é relatado que o CCH precipita a partir do CCT após um ajuste do pH para valores mais baixos. Levando-se em consideração que os PIPS são formados na massa do doce de leite, que é um produto com baixa concentração de água, alta concentração de açúcar e acidez total desenvolvida devido ao tratamento térmico, os resultados apresentados até o momento e as informações obtidas no trabalho de Liu, Kirkensgaard e Skibsted (2021) indicam que os PIPS são constituídos de citrato de cálcio hexahidratado (CCH).

Considerando que a massa molar do CCH é 606,49 g.mol⁻¹, temos que 19,82% da massa molar de CCH é composta por cálcio. Na análise de cálcio, apresentada na Tabela 5, vimos que a amostra de PIPS com maior concentração de cálcio (amostra 3) possui 18,25%, ou seja, quase a totalidade do cálcio dos PIPS é proveniente do CCH. A massa molar de CCH tem 23,76% de carbono e 3,63% de hidrogênio e, de acordo com a análise de CHN apresentada na Tabela 6, temos que a mesma amostra de PIPS (amostra 3) tem 29,13% de carbono e 4,23% de hidrogênio, portanto, a amostra de PIPS tem um percentual maior desses elementos se comparado à molécula de CCH. Acredita-se que parte do carbono e do hidrogênio possa ser proveniente dos aminoácidos. Então, podemos inferir que os PIPS são formados majoritariamente de CCH, entretanto apresentam aproximadamente 4% de aminoácidos que podem ser provenientes da fração de α_{s1} -caseína.

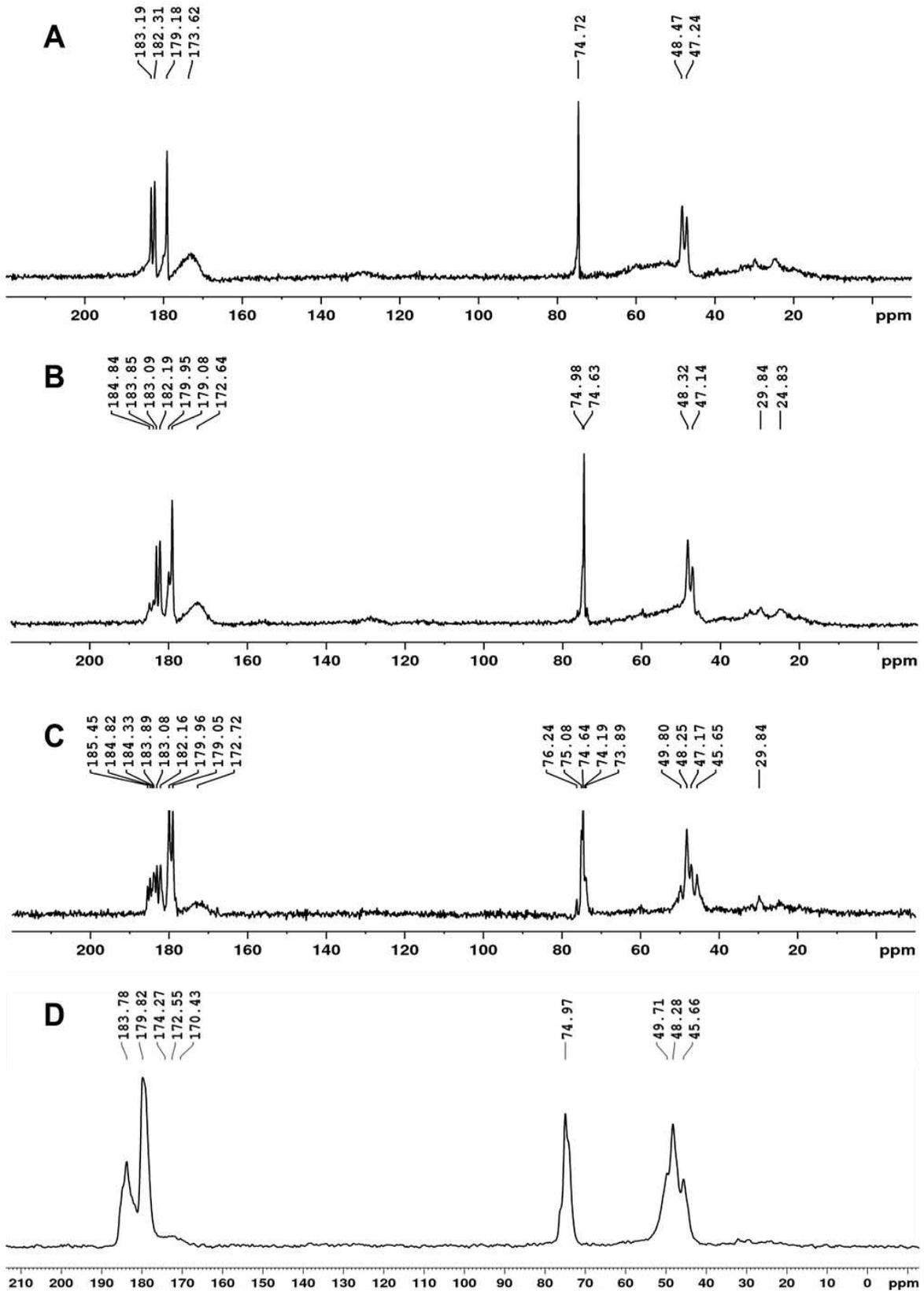
5.11 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NO ESTADO SÓLIDO

O espectro de RMN do núcleo de ^{13}C das amostras de PIPS está disposto na Figura 14 e apresenta sinais pouco intensos na região entre δ 170,43 e 174,27 ppm condizentes com os apresentados por espécies de carbonato, conforme descrito na literatura (NEBEL *et al.*, 2008). Já os sinais entre δ 179,82 e 185,45 ppm estão condizentes com o deslocamento químico de carbono de carbonilas de carboxilatos, possivelmente referentes a aminoácidos (REINHOLDT e KIRKPATRICK, 2006). Os sinais em torno de δ 74,97, 49,71, 48,28 e 45,66 ppm podem corresponder aos sinais da cadeia carbônica dos seguintes aminoácidos: ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina (BELTON; GIL; TANNER, 1992; GOULD *et al.*, 2010; REINHOLDT; KIRKPATRICK, 2006), os quais foram identificados no aminograma com as maiores concentrações se comparado aos demais.

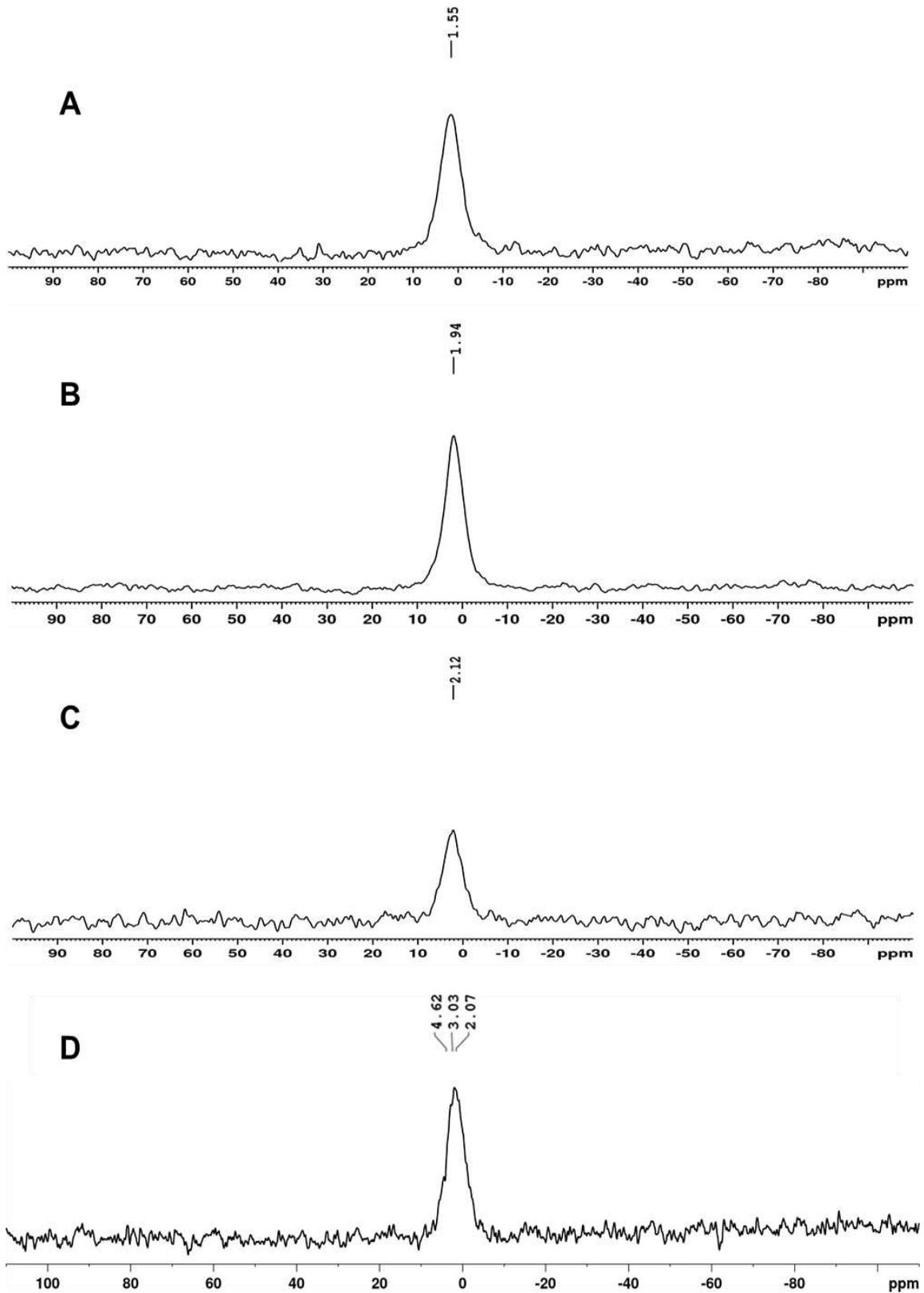
O espectro de RMN do núcleo de ^{31}P das mesmas amostras está disposto na Figura 15 e apresenta sinais entre δ 1,55 e 4,62 ppm, característicos dos deslocamentos químicos de ortofosfatos inorgânicos, tais como fosfato octacálcico (OCP) e hidroxiapatita (HAP) (TSAI *et al.*, 2010; BAK *et al.*, 2001). Vale ressaltar a baixa razão sinal ruído se deve a baixa concentração de fósforo nas amostras.

Portanto, os resultados de RMN de ^{13}C confirmam a presença dos aminoácidos ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina, que de acordo com aminograma, são os que possuem os maiores percentuais de concentração na estrutura dos PIPS. Como já foi discutido anteriormente, os aminoácidos podem estar relacionados à presença da fração α_{s1} -caseína. Os sinais pouco intensos condizentes com os apresentados por espécies de carbonato podem ser de algum resíduo do processo de extração, visto que a extração é um processo simples, feito somente com água e não há uma etapa de purificação. O espectro de RMN de ^{31}P identificou a presença de alguns fosfatos inorgânicos que, possivelmente, estão relacionados também com a presença de α_{s1} -caseína na estrutura dos PIPS, visto que as micelas de caseína possuem em sua composição sais de fosfato de cálcio.

Figura 14 - Espectros RMN de ^{13}C das amostras (A) 1, (B) 2, (C) 3 e (D) 8 dos PIPS.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 15 - Espectros RMN de ^{31}P das amostras (A) 1, (B) 2, (C) 3 e (D) 8 dos PIPS.

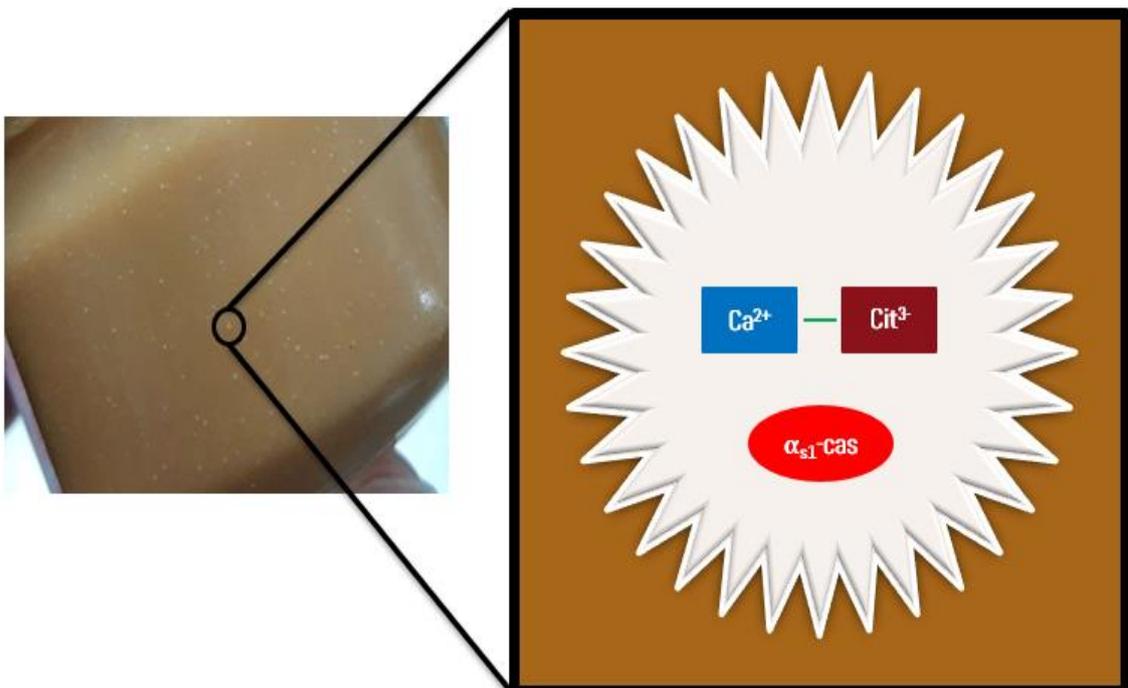
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

6 CONCLUSÃO

Os PIPS são formados na massa do doce de leite, que é um produto com baixa concentração de água, alta concentração de açúcar e acidez total desenvolvida devido ao tratamento térmico. Então, através de um conjunto de análises qualitativas e quantitativas, técnicas de espectroscopia na região do infravermelho e Raman, além da difração de raios X, foi possível caracterizar os PIPS e concluir que possuem uma estrutura cristalina formada majoritariamente por citrato de cálcio hexahidratado.

A presença de uma pequena concentração de fosfatos inorgânicos na estrutura dos PIPS, identificados por RMN no estado sólido, pode estar relacionada com a presença de frações de caseína, visto que as micelas de caseína possuem em sua composição sais de fosfato de cálcio. O aminograma e a análise estatística de correlação indicam a presença de α_{s1} -caseína, que pode estar presente por ter caráter hidrofóbico, além de possuir interações com Ca^{2+} devido à presença de resíduos de fosfoserina. Na Figura 16 é apresentado uma imagem que representa uma tentativa de ilustração da estrutura dos PIPS.

Figura 16 - Tentativa de ilustração da estrutura dos PIPS.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho apresentado neste documento será o primeiro a tratar sobre a estrutura química dos pontos brancos distribuídos na massa do doce de leite. Além de ser o primeiro a usar a terminologia PIPS para identificá-los. Os PIPS caracterizados nesse trabalho estão presentes em um produto latino-americano, entretanto a elucidação de sua estrutura química tem importância internacional, já que esse defeito pode ocorrer também em um produto presente no mundo todo, o leite condensado, visto que as técnicas de fabricação de ambos os produtos são semelhantes.

Portanto, esse trabalho caracterizou a estrutura química dos PIPS, mas até o presente momento não foi proposta uma solução tecnológica para evitar o aparecimento dos mesmos em doce de leite. Então, essa será uma etapa futura do projeto.

A proposta inicial é a realização de uma etapa de síntese, onde será avaliada a adição de citrato de cálcio, em concentrações a serem definidas, em conjunto com os ingredientes necessários para produção de doce de leite, e assim, realizar a evaporação à pressão ambiente. O intuito é “forçar” a formação dos PIPS em doce de leite e caracterizá-los. Ainda nessa etapa será avaliada a influência do pH na formação dos PIPS. A quantificação de citrato de cálcio em leite também é uma proposta futura afim de verificar a partir de quais concentrações de citrato de cálcio os PIPS são formados. Através dessas investigações propostas, acreditamos ser possível propor uma solução tecnológica que auxilie os fabricantes de doce de leite a evitar esse defeito, além de estender o estudo para outros produtos como o leite condensado.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.; MOHAMMED, A. Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. **Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics - HERVEX**, [S. l.], n. January, p. 1–9, 2019.
- AGARWAL, S.; COSTELLO, M.; CLARK, S. Gas-flushed packaging contributes to calcium lactate crystals in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 3773-3783, 2005.
- AGARWAL, S.; POWERS, J. R.; SWANSON, B. G.; CHEN, S.; CLARK, S. Cheese pH, protein concentration, and formation of calcium lactate crystals. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4144-4155, 2006.
- AGARWAL, S.; POWERS, J. R.; SWANSON, B. G.; CHEN, S.; CLARK, S. Influence of salt-to-moisture ratio on starter culture and calcium lactate crystal formation. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 8, p. 2967-2980, 2008.
- AGARWAL, S.; SHARMA, K.; SWANSON, B. G.; YUKSEL, G. U.; CLARK, S. Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1452-1466, 2006.
- ALMEIDA, M. R.; OLIVEIRA, K. D. S.; STEPHANI, R.; DE OLIVEIRA, L. F. C. Fourier-transform Raman analysis of milk powder: A potential method for rapid quality screening. **Journal Raman Spectroscopy**, 42, p. 1548-1552, 2011.
- ALMEIDA, M. R.; DE SÁ, K. O.; STEPHANI, R.; DE OLIVEIRA, L. F. C. Application of FT-Raman spectroscopy and chemometric analysis for determination of adulteration in milk powder. **Analytical Letters**, 45, p. 2589-2602, 2012.
- BAK, M.; RASMUSSEN, L.K.; PETERSEN, T.E.; NIELSEN, N.C. Colloidal Calcium Phosphates in Casein Micelles Studied by Slow-Speed-Spinning 31P Magic Angle Spinning Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1310-1319, 2001.
- BALADIN, R. M.; SMIRNOV, S. V. Melamine detection by mid- and near-infrared (MIR/NIR) spectroscopy: A quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder. **Talanta**, 85: 562-568, 2011.
- BALTHAZAR, C. F.; GUIMARÃES, J. T.; ROCHA, R. S.; PIMENTEL, T. C.; NETO, R. P. C.; TAVARES, M. I. B.; GRAÇA, J. S.; FILHO, E. G. A.; FREITAS, M. Q.; ESMERINO, E. A.; GRANATO, D.; RODRIGUES, S. RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; SANT'ANA, A. S.; CRUZ, A. G. Nuclear magnetic resonance as an analytical tool for monitoring the quality and authenticity of dairy foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 84-91, 2021.
- BELTON, P.S.; GIL, A.M.; TANNER, S.F. On the ¹³C CP/MAS spectra of leucine. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 1, p. 67-71, 1992.

BOULET, M.; MARIER, J. R. Solubility of tricalcium citrate in solutions of variable ionic strength and in milk ultrafiltrates. **Journal of Dairy Science**, 43, p. 155-164, 1960.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 354, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Doce de Leite. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 8 de set. de 1997. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/legislacao>. Acesso em: 06 agosto 2021.

CAMPOS, M. T. C. **Espectroscopia Raman aplicada ao estudo de carotenos do tomate**. 2020. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 64 p., 2020.

CAMPOS, N. S.; ALMEIDA, M. R.; VIANA, C. C. R.; MAURICIO, E. F.; STEPHANI, R.; DE OLIVEIRA, L. F. C. Técnicas analíticas para o controle de qualidade e desenvolvimento de produtos na indústria de secagem de soro. *In*: DE CARVALHO, A. F.; PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; TAVARES, G. M.; RENHE, I. R. T. (org.). **Química e tecnologia do soro de leite**. 1. ed. Juiz de Fora: Innóvite, 2020. p. 145–173.

CAO, X.; LEE, H.; YUN, H. S.; KOO, Y. Solubilities of calcium and zinc lactate in water and water-ethanol mixture. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 1, p. 133-135, 2001.

CASSANAS, G.; MORSSLI, M.; FABRÈGUE, E.; BARDET, L. Vibrational Spectra of Lactic Acid and Lactates. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 22, p. 409-413, 1991.

CHAKRABARTY, D.; MAHAPATRA, S. Aragonite crystals with unconventional morphologies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 9, p. 2953-2957, 1999.

CHOU, Y. E.; EDWARDS, C. G.; LUEDECKE, L. O.; BATES, M. P.; CLARK, S. Nonstarter lactic acid bacteria and aging temperature affect calcium lactate crystallization in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2516-2524, 2003.

CONOCHIE, J.; CZULAK, J.; LAWRENCE, A. J.; COLE, W. F. Tyrosine and calcium lactate crystals on rindless cheese. **Aust. J. Dairy Technol.** 15:120, 1960.

DA SILVA, P. H. F. **Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 2003. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 163 p., 2003.

DA SILVA, A. L. **Caracterização mineralógica por difração de raios X e determinação de terras raras por ICP-MS de rochas da região sul da Bahia**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências e Técnicas Nucleares). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 114 p., 2013.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura – aplicações e preparação de amostras – materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Edição do Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise (CEMM) do IDEIA-PUCRS, Porto Alegre: EDIPUCRS, 60p., 2007.

DEMIATE, I. M.; KONKEL, F. E.; PEDROSO, R. A. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso-composição química. 2001.

DE PAULA, I. L. **Produção e caracterização de produtos lácteos em pó de búfala com e sem hidrólise de lactose**. 2021. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 76 p., 2021.

D'INCECCO, P.; LIMBO, S.; FAORO, F.; HOGENBOOM, J.; ROSI, V.; MORANDI, S.; PELLEGRINO, L. New insight on crystal and spot development in hard and extra-hard cheeses: Association of spots with incomplete aggregation of curd granules. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 1-13, 2016.

DUFOUR, E. Principles of infrared spectroscopy. *In*: Sun D-W, editor. **Infrared Spectrosc. Food Qual. Anal. Control**. 1st ed., National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc.; 2009, p. 3-26.

DYBING, S. T.; WIEGAND, J. A.; BRUDVIG, S. A.; HUANG, E. A.; CHANDAN, R. C. Effect of processing variables on the formation of calcium lactate crystals on cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 7, p. 1701-1710, 1988.

FAGAN, C.; O'DONNELL, C.; RUDZIK, L.; WÜST, E. Milk and dairy products. *In*: Sun D-W, editor. **Infrared Spectrosc. Food Qual. Anal. Control**. 1st ed., National University of Ireland, Dublin: Elsevier Inc.; 2009, p. 241-67.

FONTANELI, R. S. Fatores que afetam a composição e as características físico-químicas do leite. **Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do Tecido Animal (VET00036) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS**, primeiro semestre de 2001.

FOX, P. F. **Food chemistry**. Part III. Cork: Cork University College, p. 201, 1991.

GAO, R.; VAN HALSEMA, F. E. D.; TEMMINGHOFF, E. J. M.; VAN LEEUWEN, H. P.; VAN VALENBERG, H. J. F.; EISNER, M. D.; *et al.* Modelling ion composition in simulated milk ultrafiltrate (SMUF). I: influence of calcium phosphate precipitation. **Food Chemistry**, 122, 700-709, 2010.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 473-483, 2005.

GAZE, L.V.; COSTA, M. P.; MONTEIRO, M. L. G.; LAVORATO, J. A. A.; CONTE JÚNIOR, C. A.; RAICES; R. S. L.; CRUZ, A. G.; FREITAS, M. Q. Dulce de Leche, a typical product of Latin America: Characterisation by physicochemical, optical and instrumental methods. **Food Chemistry**, v. 169, p.471-477, fev. 2015.

GOULD, J.A.; JONES, J.T.A.; BACSA, J. KHIMYAK, Y.Z.; ROSSEINSKY, M.J. A homochiral three-dimensional zinc aspartate framework that displays multiple coordination modes and geometries. **Chemical Communications**, v. 46, p. 2793-2795, 2010.

HARPER, W. J.; SWANSON, A. M.; and SOMMER, H. H. Observations on the Chemical composition of white particles in several lots of Cheddar cheese. **J. Dairy Sci.** 36:368–372, 1953.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Tradução para o português: Célio Pasquini et al. (coord.) 6º ed. Porto Alegre, 2009.

HOLT, C. Effect of heating and cooling on the milk salts and their interaction with casein. In: Fox PF (Ed), Heat induced changes in milk. Internacional dairy Federation, No 9501, Bruxelles, p. 105-133, 1995.

HOLT, C.; DALGLEISH, D. G.; JENNESS, R. Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experimente. **Analytical Biochemistry**, v. 113, p. 154-163, 1981.

HORNE, D. S. A balanced view of casein interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 28, p. 74-86, 2017.

JOHNSON, M. E.; RIESTER, B. A.; OLSON, N. F. Influence on nonstarter bacteria on calcium lactate crystallization on the surface of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1145-1149, 1990.

KADUK, J. A. Crystal structures of tricalcium citrates. **Powder Diffraction**, v. 33, p. 98-107, 2018.

KIRAN-YILDIRIM, B; TITIZ-SARGUT, S.; SAYAN, P. Effect of the amino acids L-methionine and D-threonine on calcium lactate pentahydrate crystallization. **Chemical Engineering Technology**, v. 41, n. 6, p. 1252-1258, 2018.

LI, J.; LIU, Y.; GAO, Y.; ZHONG, L.; ZOU, Q.; LAI, X. Preparation and properties of calcium citrate nanosheets for bone graft substitute. **Bioengineered**, v. 7, n. 5, p. 376-381, 2016.

LIN, K.; CHENGTIE W. U.; CHANG, J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.4071-4102, out. 2014.

LIU, X.; KIRKENSGAARD, J. J. K.; SKIBSTED, L. H. Hydrates of calcium citrate and their interconversion in relation to calcium bioaccessibility. **Food Research International**, v. 140, 109867, 2021.

LOPES, T. R. **Utilização de RMN no estado sólido em uma abordagem multinuclear para estudo de materiais carbonosos porosos**. 2017. Tese (Doutorado em Física). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 154 p., 2017.

MACHADO, L.M.P. **Uso de soro de queijo e amido de milho modificado na qualidade do doce de leite pastoso**. 2005. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 170 p., 2005.

MAYO, D. W.; MILLER, F. A.; HANNAH, R. W. **Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra**. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 583p., 2003.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry. Sixth Edition, John Wiley & Sons, 2009.

NEBEL, H.; NEUMANN, M.; MAYER, C.; EPPLE, M. On the Structure of Amorphous Calcium Carbonates A Detailed Study by Solid-State NMR Spectroscopy. **Inorganic Chemistry**, v. 47, p. 7874-7879, 2008.

NELSON, L.S.; HOLT, C.; HUCKINS, D.W.L. The EXAFS spectra of poorly crystalline calcium fosfate preparations from heated milk. **Physica B**, 158, p. 103-104, 1989.

NEUMANN, M.; EPPLE, M. Monohydrocalcite and its relationship to hydrated amorphous calcium carbonate in biominerals. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 1953-1957, 2007.

OLIVEIRA, L. F. C. Espectroscopia molecular. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 4, p. 24-30, 2001.

ORDOÑEZ, J. A. et. al. **Tecnologia de Alimentos: componentes dos alimentos e processos**. V. 1. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PEARCE, K. N.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Calcium lactate deposits on rindless Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Tech.* 8:3-7, 1973.

PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; NEVES, B. S. **Doce de leite: Aspectos Tecnológicos**. Juiz de Fora: Do autor. 2011, 186 p.

PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; NEVES, B. S.; DE SÁ, J. F. O.; CARVALHO, A. F. Atributos tecnológicos de controle para produção do doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 42-51, 2012.

PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; CARVALHO, A. F.; NETTO, G. G.; FRANCISQUINI, J. D. **Doce de leite: Química e Tecnologia**, CAP-LAB, São Paulo, 2019, 151 p.

REINHOLDT, M.X.; KIRKPATRICK, R.J. Experimental Investigations of Amino Acid-Layered Double Hydroxide Complexes: Glutamate-Hydrotalcite. **Chemistry of Materials**, v. 18, p. 2567-2576, 2006.

RODRIGUES, L. N. **Espectroscopia por FTIR de variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados para a produção de etanol celulósico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Física), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 143 p., 2012.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**, 2 ed. São Paulo: Editora UNESP, 2008.

SANSONE, A. E. S. **Estudo da formação de fases cristalinas por difração de raios X no sistema $UO_2-Er_2O_3$** . 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 109 p., 2018.

SANTOS, D. M. Arenosidade no doce de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes (Brasil)**, v. 31, n. 185, p. 3-9, 1976.

SILVA, N. N.; CASANOVA, F.; PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.; GAUCHERON, F. Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, e2018185, 2019.

SMITH, G. P. S.; HOLROYD, S. E.; REID, D. C. W.; GORDON, K. C. Raman imaging processed cheese and its components. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 48, n. 3, p. 374-383, 2016.

STEPHANI, R. **Uma contribuição à pesquisa das propriedades dos concentrados proteicos de soro de leite**. 2015. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

TANSMAN, G. F.; KINDSTEDT, P. S.; HUGHES, J. M. Powder X-ray diffraction can differentiate between enantiomeric variants of calcium lactate pentahydrate crystal in cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7354-7362, 2014.

TAVARES, G. M. Proteínas do soro de leite: aspectos físico-químicos e estruturais. *In*: DE CARVALHO, A. F.; PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; TAVARES, G. M.; RENHE, I. R. T. (org.). **Química e tecnologia do soro de leite**. 1. ed. Juiz de Fora: Innóvite, 2020. p. 19–29.

TERCINIER, L. **Study of the interactions between milk proteins and hydroxyapatite particles**. 2016. Thesis (Doctor of Philosophy in Food Technology). Massey University, Riddet Institute, Palmerston North, New Zealand, 305 p., 2016.

TSAI, T.W.T.; CHOU, F.-C.; TSENG, Y.-H.; CHAN, J.C.C. Solid-state P-31 NMR study of octacalcium phosphate incorporated with succinate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, p. 6692-6697, 2010.

TOLEDO, P. H. M.; PEREIRA, J. P. F.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F.; OLIVEIRA, L. F. C.; STEPHANI, R. Caracterização da superfície de partículas de produtos lácteos desidratados. **Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 75, n.1, p. 10-21, 2020.

VAVRUSOVA, M.; SKIBSTED, L. H. Aqueous solubility of calcium citrate and interconversion between the tetrahydrate and the hexahydrate as a balance between endothermic dissolution and exothermic complex formation. **International Dairy Journal**, 57, p. 20-28, 2016.

VIANA, C. C. R. **Caracterização de fórmulas infantis para lactentes usando espectroscopia no infravermelho médio**. 2018. Dissertação (Mestrado profissional em ciência e tecnologia do leite e derivados), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

VISSER, J.; MINIHAN, A.; SMITS, P.; TJAN, S.B.; HEERTJE, I. Effects of pH and temperature on the milk salt system. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, 40, p. 351-368, 1986.

VON LAUE, M. - Biográfico. NobelPrize.org. Divulgação do Prêmio Nobel AB 2021. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1914/laue/biographical/>. Acesso em: 30 out. 2021.

WAHLGREN, M.; DEJMEK, P.; DRAKENBERG, T. A ^{43}Ca and ^{31}P NMR study of the calcium and fosfate equilibria in heated milk solutions. **Journal of Dairy Research**, 57, p. 355-364, 1990.