

DETERMINAÇÃO DE MELAMINA EM LEITE ADULTERADO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA 3D E CALIBRAÇÃO DE ORDEM SUPERIORMatheus C. Barreto^{1*}, Sherlan G. Lemos², Wallace D. Fragoso³

1. Estudante de IC da Fac.de Engenharia Química da UFPB

2. Professor e pesquisador do Departamento de Química da UFPB

3. Professor e pesquisador do Departamento de Química da UFPB / Orientador

Resumo:

A melamina é um componente utilizado na indústria de plásticos e produtos antichama, com alta fração mássica de nitrogênio. A melamina tem sido usada para adulterar leite e disfarçar a perda do conteúdo proteico devido à diluição. Além de ser um crime contra o consumidor, essa prática acarreta em danos à saúde das vítimas já que a melamina tende a se acumular nos rins, podendo levar a sérios problemas renais. Neste trabalho propomos o uso de fluorescência 3D e o método de Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC), para a determinação de melamina em leite. Após uma etapa de remoção da caseína por adição de ácido acético e centrifugação, são adquiridos os espectros 3D do soro do leite adulterado. Estes são deconvoluídos pelo PARAFAC e o espectro da melamina é recuperado. Uma calibração pseudo-univariada é realizada e com isso pode-se estimar a concentração de melamina presente no caso de adições que mascarem a perda de nitrogênio devido a diluições do leite a partir de 5%.

Palavras-chave: adulteração de leite; PARAFAC; espectroscopia 3D de emissão-excitação.

Apoio financeiro: CNPq/UFPB.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFPB

Introdução:

A melamina é usada na fabricação de plásticos e produtos antichama. Uma vez que o nitrogênio corresponde a 66% de sua massa a melamina tem sido usada na adulteração de leite para repor o nitrogênio da proteína após diluição fraudulenta do produto, a fim de enganar a análise pelo método de Kjeldahl. Além de corresponder a um crime contra o consumidor essa prática acarreta danos a saúde, uma vez que devido a sua baixa solubilidade a melamina acumula-se nos rins podendo levar a crise renal, como se verificou em 2008 na China. (GOSSNER, 2009)

Devido ao leite ser uma matriz complexa, muitos dos métodos utilizados para a detecção de melamina no leite são muito laboriosos, empregando técnicas cromatográficas caras e exigindo várias etapas de preparo de amostra (FINETE, 2015). Essa complexidade se deve a grande quantidade de substâncias no leite que podem interferir com o sinal analítico. Etapas de extração de proteínas, conhecidas como *clean up* são necessárias mesmo quando métodos de separação como a cromatografia são empregados. Também há de se levar em conta que a separação cromatográfica se dá no domínio do tempo, o que faz estas técnicas naturalmente demoradas.

A melamina apresenta sinal de fluorescência intenso que pode ser utilizado para sua quantificação, mas na ausência de técnicas de separação há de se levar em conta o problema dos interferentes. A Química Analítica moderna associa sinais analíticos de maior complexidade, chamados de sinais de ordem superior, a exemplo dos espectros 3D de excitação-emissão-intensidade, a algoritmos de deconvolução espectral, como a Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC) de modo a permitir a construção de modelos de calibração robustos a presença de interferentes, mesmo que esses sejam desconhecidos durante a etapa de calibração. Essa é a chamada vantagem de segunda ordem. (SENA, 2005)

Neste trabalho propomos desenvolver um método baseado em espectroscopia de fluorescência 3D de excitação-emissão e Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC) para a determinação da melamina em leite após uma única etapa simples de remoção da caseína.

Metodologia:

Os padrões de melamina foram preparados em solução 10 mM de NH₄Cl nas concentrações de 0,05 a 5 ppm. As amostras adulteradas com melamina foram preparadas de forma que as mesmas possuíssem uma concentração de nitrogênio detectável no teste de Kjeldahl equivalente a que seria encontrada no leite integral não adulterado, considerando-se uma concentração de proteína de 40,3 g/L. Esse valor foi determinado empregando-se a relação de kjeldahl: $m_{proteinas} = m_N * 6,38$. Sabendo que a melamina tem uma fração mássica de nitrogênio de 66%, temos que a massa de melamina equivalente a massa de proteínas do leite (em termos

da concentração mássica de nitrogênio) é: $m_{Melamina} = \frac{m_{Proteínas}}{4,2108}$. As amostras de leite adulterado foram preparadas utilizando da adição de 2 a 12% de água ao leite integral e da quantidade de melamina adequada para manter a concentração de nitrogênio. As massas de melamina foram pesadas em balança analítica Sartorius com precisão de centésimo de miligrama. Para fins de calibração a concentração molar de cada amostra teve sua concentração de referência de melamina calculada em função da massa efetivamente pesada, o que levou a amostras de concentrações distintas, mesmo em replicatas.

As amostras de leite foram tratadas da seguinte forma: 7 mL de leite foram adicionadas de 3 mL de água e 70 µL de ácido acético. O leite coagulado foi centrifugado por 20 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico e avolumado para 10 mL. Esse procedimento elimina a caseína, mas não as demais proteínas do leite. A matriz foi então diluída 400 vezes, já que as proteínas restantes produzem sinal fluorescente intenso que satura o detector do fluorímetro.

Espectros 3D de excitação-emissão para os padrões e para as soluções da amostra foram obtidos utilizando o espectrofluorímetro *Cary Eclipse* da *Agilent Technologies*, do Laboratório de Estudos em Química Ambiental, LEQA-UFPA. Para os experimentos, foram utilizadas as seguintes condições: *i)* Excitação: 236 a 260 nm com passo de 2 nm; *ii)* Emissão: 320 a 440 nm com passo de 2 nm; *iii)* Aberturas das fendas de excitação e emissão: 20 nm de bandpass; *iv)* Tempo de integração: 0,20 segundos; *v)* Tensão da fotomultiplicadora: 650 V.

Para o tratamento dos dados e construção do modelo de calibração, o software utilizado foi o MATLAB® (um software interativo com linguagem de alto nível, voltado para o cálculo numérico e programação, desenvolvido pela *The MathWorks inc.*). O algoritmo PARAFAC foi executado pelo *The N-way Toolbox* (ANDERSON, 2000) para Matlab disponibilizadas pelo Professor Rasmus Bro, da Universidade Real de Veterinária e Agricultura, Dinamarca, acessadas através da interface gráfica MVC2 disponibilizada pelo Professor Alejandro Olivieri da Universidade Nacional de Rosario, Argentina. (OLIVIERI, 2009)

Resultados e Discussão:

Os espectros 3D de excitação-emissão foram obtidos para os padrões, para as amostras de leite adulterado e para algumas amostras de leite não adulterados. Observamos que o soro de leite não adulterado já apresenta um sinal de fluorescência significativo, provavelmente devido a fluorescência das proteínas que não foram removidas no tratamento da amostra. Foram testadas algumas diluições para diminuir esse sinal da matriz e o melhor resultado foi obtido com uma diluição de 400 vezes.

De fato, uma diluição da ordem de 100 vezes já diminui suficientemente o sinal de fluorescência da matriz, mas efeitos não lineares foram observados nos espectros das amostras, provavelmente relacionados a transferência de energia entre a melamina e algum componente da matriz. Com a diluição de 400 vezes essas não linearidades não foram mais observadas e a modelagem pelo PARAFAC foi possível. De fato, embora bastante atenuado o sinal de matriz ainda existe nas soluções diluídas de soro de leite e ocorre em uma região espectral potencialmente interferente para a melamina. No entanto o algoritmo PARAFAC apresenta a vantagem de segunda ordem, que corresponde a robustez do modelo de previsão mesmo na presença de interferentes desconhecidos, de modo que o sinal interferente não é um problema.

A modelagem com o PARAFAC funciona se o conjunto de dados apresentar trilinearidade. A condição de trilinearidade foi verificada nos nossos dados através do diagnóstico de concordância de núcleo (CONCORDIA) que apontou 100% de trilinearidade. A decomposição PARAFAC gera os perfis de excitação e emissão dos componentes puros e escores proporcionais a concentração dos mesmos. No nosso caso foram observados dois componentes, sendo um a melamina e outro a matriz de soro de leite. Usando os padrões, uma curva de calibração pseudo-univariada foi construída relacionando os escores da melamina nos padrões com sua concentração e projetando os escores das amostras nessa curva.

As amostras analisadas correspondem a diluições de 2, 5, 8,10 e 12%. Isso leva a concentrações de melamina na faixa de 270 a 1700 ppb de melamina na amostra analítica, sendo que o modelo construído apresenta RMSEP de 98 ppb. Esse valor de erro sugere que podemos usar o modelo para detectar melamina em amostras adulteradas em 2% em volume, e quantifica-la em amostras adulteradas a partir de 5% em volume.

Conclusões:

Um método rápido e barato para a detecção de melamina em leite adulterado foi desenvolvido. O tratamento da amostra necessário é uma única etapa de remoção da caseína por adição de ácido acético e centrifugação. A amostra analítica é preparada pela diluição do soro de leite em 400 vezes, uma vez que com diluições menores ocorrem transferência de energia entre a melamina e componentes da matriz que levam a não linearidades que inviabilizam a modelagem PARAFAC. A modelagem identificou dois componentes nas amostras, o soro de leite e a melamina. O método desenvolvido mostrou-se eficiente na detecção de melamina na faixa de 270 a 1700 ppb, com RMSEP de 98 ppb.

Referências bibliográficas

ANDERSON, Claus A.; BRO, Rasmus, The N-way toolbox for Matlab. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 52 (2010), pp. 1-4.

FINETE, Virginia L., GOUVÊA, Marcos M., et al. Validation of a method of high performance liquid chromatography with fluorescence detection for melamine determination in UHT whole bovine milk. *Food Control* 51(2015), pp. 402-407.

GOSSNER, Céline Marie-Elise, et al. The Melamine Incident: Implications for International Food and Feed Safety, *Environmental Health Perspectives, Vol 117*(2009), N°12, pp. 1803-1808

OLIVIERI, Alejandro C., WU, Hai-Long, & YU, Ru-Qin. MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (2009) 96, pp. 246-251.

SENA, M., TREVISAN, M., & POPPI, R.. PARAFAC: UMA FERRAMENTA QUIMIOMÉTRICA PARA TRATAMENTO DE DADOS MULTIDIMENSIONAIS. APLICAÇÕES NA DETERMINAÇÃO DIRETA DE FÁRMACOS EM PLASMA HUMANO POR ESPECTROFLUORIMETRIA. *Química Nova, Vol. 28, N°5* (2005), pp. 910-920.

TREVISAN, Marcello G. *Aplicação de Métodos Quimiométricos de Ordem Superior e Fluorescência Molecular na Análise em Matrizes Biológicas*. Dissertação de Mestrado pela UNICAMP, Laboratório de Quimiometria em Química Analítica – LAQQA; Campinas, Julho de 2003.