

PRESENCIA DE MELAMINA EN LECHES EN POLVO COMERCIALIZADAS EN LA ARGENTINA Y BRASIL

C. M. Reynoso¹; V.A. García¹; M. C. Z.de Paula²;
V. M. Scussel³; P. S.Pok¹; S.L. Resnik^{1,4}

¹Departamentos de Química Orgánica e Industrias -
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales -
Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de
Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - Universidade
Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, Brasil.

³Laboratório de Micotoxycologia e Contaminantes
Alimentares-LABMICO - Departamento de Tecnologia e
Ciência dos Alimentos - Universidade Federal de Santa
Catarina-UFSC - Centro de Ciências Agrárias.

Florianópolis, Brasil.

⁴Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de
Buenos Aires. La Plata. Provincia de Buenos Aires. Argentina
paula.sol.pok@gmail.com

Trabajo presentado en el Congreso CyTAL
2015. Buenos Aires, 3-5 noviembre de 2015.



RESUMEN

La melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) es una sustancia orgánica ampliamente utilizada en la fabricación de laminados, plásticos, mezclas de fertilizantes, filtros comerciales, etc. Con anterioridad fue utilizada como suplemento de nitrógeno no proteico (67%) para la alimentación del ganado, pero su uso se discontinuó debido a que no era completamente hidrolizada por los rumiantes. Hasta 2007 la melamina no era analizada rutinariamente en alimentos, pero a partir del incidente en China que causó la muerte de neonatos por la ingestión de leche contaminada con melamina se ha incluido su control en forma periódica.

Debido al uso generalizado de melamina en aplicaciones que implican contacto con los alimentos, se pueden encontrar trazas en muchos de los mismos. Está comprobado su efecto tóxico a nivel renal, sobre todo en neonatos. La Unión Europea y la FAO establecen como límite máximo para la presencia de melamina en productos lácteos 2,5 mg/kg, y 1 mg/kg para alimentos de neonatos. La melamina se puede encontrar en niveles de ppm en los alimentos y bebidas debido a la migración a partir de resinas que contienen esta sustancia.

La presencia de melamina en alimentos se ha dividido en dos categorías, a la primera se la denomina nivel basal y se refiere a los niveles en los alimentos que no resultan de la adulteración o mal uso. La segunda corresponde a los niveles de "adulteración", referidos a la adición intencional de melamina a los alimentos o el uso no autorizado de melamina o sustancias que puede degradarse para formar melamina.

La leche es una importante fuente de proteínas ampliamente consumidas por niños. El objetivo de este trabajo ha sido determinar las concentraciones de melamina en leches en polvo entera y descremada consumidas en la Argentina y Brasil. Se analizaron 31 muestras de leche en polvo entera y descremada de distintas marcas comerciales adquiridas en diferentes supermercados de estos países, las cuales estaban envasadas en films multicapas y latas. Las muestras se extrajeron con una mezcla de ácido tricloroacético 1%/acetonitrilo seguido de una limpieza en fase sólida con una columna Strata X-C. El eluido se evapora bajo corriente de nitrógeno y se resuspende en fase móvil. La fase móvil utilizada en un cromatógrafo líquido de alta resolución con arreglo de diodos fue n-heptanosulfonato de sodio a pH=2,7; acetonitrilo (92:8, v/v). Los

límites de detección y cuantificación fueron 0,07mg/kg y 0,22mg/kg, respectivamente. El porcentaje de recuperación fue igual o mayor al 74% cuando se inyectó 90 µl. De las muestras analizadas sólo una de ellas, envasada en film multicapas, presentó contaminación con melamina en baja concentración.

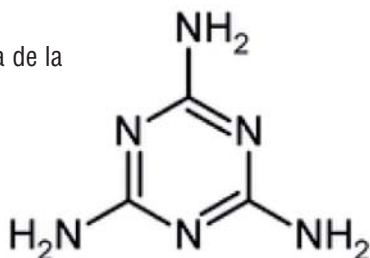
Este es el primer estudio realizado en Argentina y Brasil sobre la ocurrencia de melamina en leche en polvo con diferentes empaques, que muestra que hasta el momento este contaminante no es prioritario para un control rutinario en leche en polvo.

Palabras clave: Melamina, leche en polvo entera, leche en polvo descremada.

INTRODUCCIÓN

La melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) es un compuesto orgánico polar formado por un anillo heterocíclico (triazina) rico en nitrógeno (Figura 1). En la industria se utiliza en la fabricación de laminados, plásticos, productos ignífugos, revestimientos, mezclas de fertilizantes, filtros comerciales, adhesivos, etc. (Chik, Mohamad Haron, Ahmad, Taha y Mustafa, 2011; Zhang, Wu, Chen y Song, 2011). La melamina puede combinarse con formaldehído para la fabricación de artículos plásticos debido a que es durable y resistente al calor (Venkatasami y Sowa, 2010). También puede estar presente como resultado de la degradación de la cirmazina, un insecticida (Shia, Mallet, Young, Li, Meng y Qi, 2008; EFSA, 2010). En la década del '60 fue utilizada como suplemento de nitrógeno no proteico (67%) para la alimentación del ganado pero su uso se discontinuó debido a que no era completamente hidrolizada por los rumiantes. La contaminación de leche con melamina en China causó la muerte de neonatos (Xiang, Zeng, Zhai, Li y He, 2011) e hizo que se incluyera su control en alimentos en forma periódica.

FIGURA 1
Estructura de la melamina



Debido al uso generalizado de melamina en aplicaciones que implican contacto con alimentos y bebidas, pueden encontrarse trazas causadas por la migración de resinas que contienen melamina (Yang, Zhou, Guo, Chen, Zhao, Lin y Wang, 2009; WHO/FAO, 2008). La



Dataloggers Wi-Fi testo Saveris 2

En cualquier área de conservación, depósito o transporte de alimentos, el control de la temperatura cobra una importancia vital.

- Acceso permanente a todos los datos desde cualquier dispositivo con acceso a internet (PC - Tablet - Smartphone).
- Alarmas por e-mail en valores límite.
- Temperatura - humedad y temperatura - sensores internos y/o externos.

www.testo.com.ar/saveris2

Yerbal 5266 - 4º piso (C1407EBN) - Buenos Aires - Argentina
Tel.: (011) 4683-5050 - Fax: (011) 4683-2020
info@testo.com.ar - www.testo.com.ar

Unión Europea y la FAO establecen como límite máximo para la presencia de melamina en productos lácteos 2,5 mg/kg, y 1 mg/kg para alimentos de neonatos (EFSA, 2010; WHO/FAO, 2008).

La presencia de melamina en alimentos se ha dividido en dos categorías, a la primera se la denomina nivel basal y se refiere a los niveles en los alimentos que no resultan de la adulteración o mal uso. La segunda corresponde a los niveles de "adulteración", o sea la adición intencional de melamina a los alimentos o el uso no autorizado de melamina o sustancias que puede degradarse para formar melamina.

La leche es una importante fuente de proteínas ampliamente consumida por niños. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar los niveles basales de melamina, en muestras de leche en polvo leche entera y descremada que se consumen en la Argentina y Brasil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas, solventes y estándares

Melamina (MEL) estándar (99% pureza) de Fluka (Sigma-Aldrich, EE.UU.), ácido tricloroacético (TCA) J.T. Baker (NJ, EE.UU.). Los solventes acetonitrilo (ACN) Carlo Erba (Rodano MI, Italia) y metanol (MeOH) Sintorgan S.A. (Bs. As., Argentina) de grado HPLC. El agua grado HPLC se obtuvo a partir del sistema de purificación NANO pure Diamond (Barnstead International, EEUU). El 1-heptansulfonato de sodio, grado cromatográfico, de Biopack (Bs.As., Argentina) se utilizó como reactivo de par iónico. Ácido cítrico e hidróxido de amonio, grado analítico de Merck (Alemania).

La solución stock de MEL (1000 µg/mL) se preparó disolviendo 100 mg de MEL en ACN:agua (74:26, v/v). Dicha solución se almacenó a 4°C, protegida de la luz. Las soluciones de trabajo se obtuvieron diluyendo la solución stock con agua grado HPLC.

Muestras

El número de muestras de leche en polvo analizadas fue 31, las cuales se adquirieron en diferentes supermercados de la Argentina y Brasil. En la tabla 1 se puede observar un resumen de los productos, tipo de envase y país de origen. El tamaño de muestra fue de 1 kg. El muestreo en góndolas de supermercado se realizó de acuerdo a la Norma Europea N° 401/2006 EC (2006). Cuando el número de producto fue menor a 10 y cuando el tamaño del envase fue menor a 1 kg se compraron varios paquetes para obtener una muestra representativa del lote. Las fechas de vencimiento de todas las muestras fueron posteriores a octubre de 2013. Las muestras se mantuvieron en sus envases originales, perfectamente identificados y fueron almacenadas a 4±1°C hasta su análisis.

Extracción y purificación

Se pesaron dos gramos de leche en polvo en un tubo de polipropileno, se agregaron 15 mL de TCA 1% y 5 mL de ACN para precipitar proteínas. Luego se mezcló con vortex durante un minuto, se sonicó 30 min en un baño de ultrasonido (Branson Ultrasonics, modelo 2510E-MT, Danbury, LT, EE.UU.) y se agitó durante 10 min en un agitador mecánico (Vicking Shaker Pro, Argentina) a 420 rpm. Los extractos se centrifugaron a 10.000 rpm 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un matraz de 25 mL y se llevó a volumen con solución de TCA 1%. Se tomó aproximadamente 10 mL de muestra y se centrifugó nuevamente a 4.000 rpm por 10 min. A 5 mL del sobrenadante se le adicionó 5 mL de agua.

La purificación se llevó a cabo con columnas de extracción en fase sólida Strata™ -X-C-33 µm, 60 mg/3mL Phenomenex (8B-S029- UBJ, www.phenomenex.com). El método aplicado es el publicado por DIONEX 224 (2009) con modificaciones. Brevemente, la columna se acondicionó con 3 mL de MeOH, seguido por 3 mL de agua, se cargó la columna con 10 mL conformado por 5 mL de muestra y 5 mL de agua deionizada, luego se lavó con 3 mL de MeOH y 3 mL de agua. Se secó la columna durante 2 min a 10" de Hg. La MEL se eluyó con 7 mL de solución de hidróxido de amonio 5% en MeOH. El eluido se llevó a sequedad a temperatura ambiente con corriente de nitrógeno y se reconstituyó 1.000 µL de fase móvil, se filtró por membrana de nylon de 0,45 mm y se colocó en viales.

TABLA 1 - Muestras de leche en polvo entera y descremada obtenidas en la Argentina y Brasil

País	Tipo de leche en polvo	Número de muestras	Envase
Argentina	Leche de vaca entera	11	Film multilaminado en contacto con la leche
	Leche de vaca descremada	8	
	Leche de cabra descremada	1	
Brasil	Leche de vaca entera	3	Lata
		8	Film multilaminado en contacto con la leche

Equipo

Para la determinación de MEL se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución que consiste en un módulo Waters Alliance 2695 (Singapur), un detector de diodos Waters 2698 (EE.UU.) y un detector de fluorescencia Waters 2475 (EE.UU.). La separación se realizó con una columna BDS Hypersil C8 columna de 5 mm, 250 x 4.6 mm (Thermo Scientific, part N° 28205-254630, EE.UU.) a 30°C. La fase móvil fue una solución de 1-heptansulfonato de sodio 10 mM y ácido cítrico 10 mM (pH 2,7) con ACN (92:8, v/v), el flujo fue de 1,0 mL/min. Todas las soluciones se filtraron con vacío a través de filtros de nylon de 0,45 mm de tamaño de poro. El volumen de inyección fue 90 uL para estándares y extractos. La detección se realizó a 236,3 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

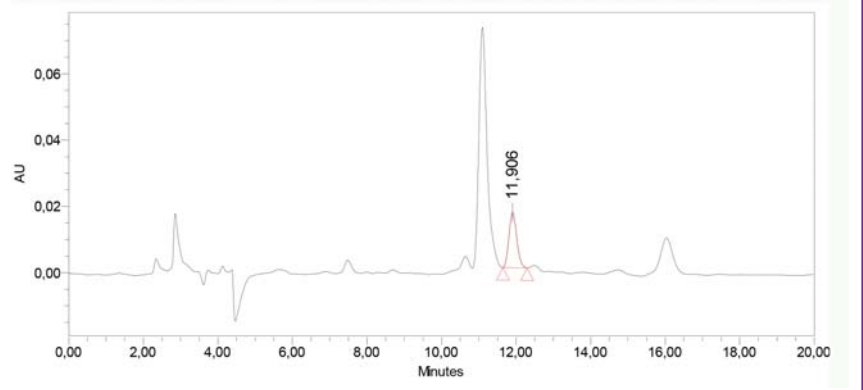
La curva de calibración se realizó diluyendo la solución stock de melamina de manera tal de obtener ocho puntos de concentración, obteniéndose una respuesta lineal en el rango comprendido entre 0,07 mg/kg y 0,54 mg/kg con un coeficiente de correlación (R2) superior a 0,999. Para evaluar la precisión y exactitud del método se agregó melamina a una muestra de leche en polvo negativa en tres niveles diferentes de concentración y se analizó cada nivel por triplicado. Las muestras adicionadas con diferentes niveles de melamina fueron tratadas en las mismas condiciones (como se describe en el ítem Extracción y purificación) para comprobar si existía efecto matriz. La recuperación de melamina fue en todos los niveles igual o mayor a 74%.

El límite de detección (LOD) se definió como la concentración a la cual la relación señal:ruido era 3:1 y el límite de cuantificación (LOQ) como la concentración a la cual la relación señal:ruido era 5:1. Los valores de los límites así calculados fueron LOD 0,07 mg/kg y LOQ 0,22 mg/kg. En la figura 2 se puede observar un cromatograma de una leche con agregado de 2,0 mg/kg de melamina.

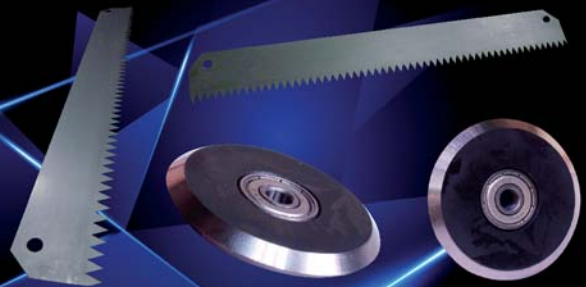
De las muestras analizadas sólo una leche entera en polvo, envasada en un empaque de film multilaminado, presentó una concentración de melamina de 0,091 mg/kg, valor que se encuentra entre el LOD y LOQ. En la figura 3 se puede observar el cromatograma de la muestra que resultó positiva.

Estos resultados se encuentran por debajo del límite máximo especificado por la FAO y la Legislación de la Unión Europea para la presencia de melamina en productos lácteos, que es de 2,5 mg/kg y 1 mg/kg para alimentos de neonatos (EFSA, 2010; WHO/FAO, 2008). Por otra parte, los resultados muestran que la migración de melamina en la leche en polvo entera y descremada provenientes de los recubrimientos de los envases o adhesivos utilizados en ambos países, en el tiem-

FIGURA 2 - Cromatograma de una leche adicionada con 2,0 mg/kg de melamina



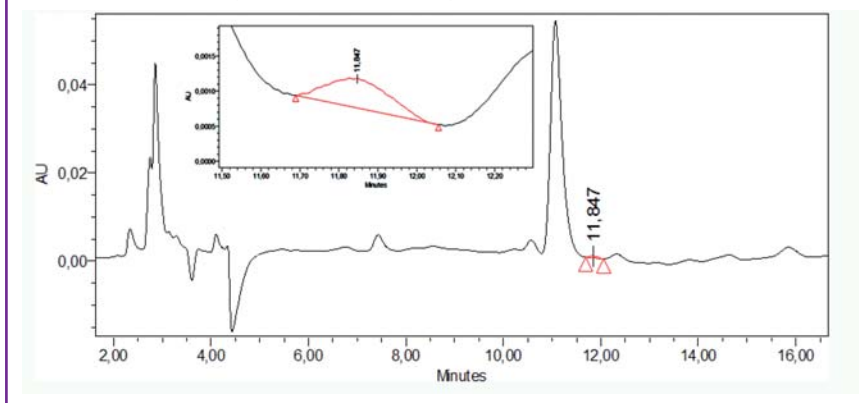
Fabricación de cuchillas dentadas, rectas, circulares, guillotinas, tijeras de múltiple aplicación, en líneas de envasado al vacío y llenadoras verticales, diseñadas y construídas en aceros de alta calidad para la obtención de un más alto rendimiento.



Pacheco de Melo 657 - Lomas de Zamora - Buenos Aires - Tel.: (011) 4245-2379
matriceriaduper@hotmail.com - matriceriaduper@speedy.com.ar

Cuchillas con PTFE y tratamientos anticorrosivos que evitan óxido y adherencias

FIGURA 3 - Cromatograma de la muestra positiva



REFERENCIAS

Chik, Z., Mohamad Haron, D.E., Ahmad, E.D., Taha, H., Mustafa, A.M. (2011). Analysis of melamine migration from melamine food contact articles. *Food Additives and Contaminants*, 28 (7), 967–973.

Comisión Europea (2009). Reglamento (CE) No 975/2009 por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 274, 3-8.

DIONEX, (2009). Application Note 224. Determination of Melamine in Milk Powder by Reversed-Phase HPLC with UV Detection. Dionex Corporation, EEUU. www.dionex.com

EFSA (2010). European Food Safety Authority. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) and EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids. *EFSA Journal*, 8 (4), 1573, 1-145.

Shia, J., Mallet, C., Young, M., Li, J., Meng, I., Qi, C. (2008). Rapid, specific analysis of melamine contamination in infant formula and liquid milk by UPLC-MS/MS. Application note 72000282EN. Waters Corporation. (access on line November 2012).

Venkatasami, G., Sowa, J.R. Jr. (2010). A rapid, acetonitrile-free, HPLC method for determination of melamine in infant formula. *Analytica Chimica Acta*. 665, 227–230.

WHO/FAO. (2008). World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations. Melamine and Cyanuric acid: Toxicity, Preliminary Risk Assessment and Guidance on Levels in Food. Report of a WHO Expert meeting in collaboration with FAO supported by Health Canada.

Xiang, D., Zeng, G., Zhai, K., Li, L., He, Z. (2011). Determination of melamine in milk powder based on the fluorescence enhancement of Au nanoparticles. *Analyst*, 136, 2837–2844.

Yang, H-H., Zhou, W-H., Guo, X-C., Chen, F-R., Zhao, H-Q., Lin, L-M., Wang, X-R. (2009). Molecularly imprinted polymer as SPE sorbent for selective extraction of melamine in dairy products. *Talanta*, 80, 821–825.

Zhang, J., Wu, M., Chen, D., Song, Z. (2011). Ultrasensitive determination of melamine in milk products and biological fluids by luminol-hydrogen peroxide chemiluminescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1038–1042.

po que llevan envasados, se encuentra muy por debajo de los límites específicos de migración (SML) de 30 mg/kg establecido por la directiva de la Comisión Europea (2009).

CONCLUSIONES

Este es el primer estudio sobre los niveles basales de melamina en muestras de leche en polvo leche entera y descremada, envasadas en diferentes tipos de empaque que se consumen en Argentina y Brasil, y muestra que la contaminación de estos productos por melamina no constituye actualmente un riesgo para la salud de los consumidores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) de Brasil y SPU (Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación) de la Argentina, la Universidad de Buenos Aires y de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Envolvedora de Pallets. La gama más completa del país (manuales, automáticas, de brazo rotante)

Pegadoras de cintas adhesivas. De acero inoxidable o chapa común

DG
FÁBRICA DE MÁQUINAS PARA EMBALAJES

◀ Cintas transportadoras especiales

Excelente servicio post venta

Industria Argentina

Calle 2 N° 970 - Parque Industrial - Sunchales - Santa Fe - Tel./Fax: 03493 421741 / 423441 / 15665765 - ventas@danielgenta.com - www.danielgenta.com