

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE
MELAMINA EN LECHE MEDIANTE LA TÉCNICA HPLC-UV

Trabajo Especial de Grado presentado ante la
Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br.
Mailyn Carolina Franco Sánchez,
para optar al título de Licenciada en Química.

Tutor: Dr. Luis Ramón Gómez

Caracas, Mayo de 2011.

ACTA

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: Desarrollo de un método para la determinación de melamina en leche mediante la técnica HPLC-UV.

Presentado por la Br. Mailyn C. Franco S, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.

Luis R. Gómez
(Tutor)

Marinela Barrero
(Jurado)

Gustavo Perez
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por ser mi guía, mi sustento, mi fortaleza día a día a pesar de las adversidades.

Agradezco a mis padres José Rafael y Raiza Carolina por haberme dado la vida y por haberme hecho lo que soy, sin su apoyo, sin su amor, sin sus exigencias, sin su presencia, sin su comprensión esto jamás habría sido posible. Siempre que los necesito están disponibles para mí.

Enormemente te doy gracias ABUELA NANCY porque siempre creíste en mí, porque me amaste como a nadie, porque llenaste de alegrías, de sonrisas y abrazos mi vida, lo que hoy extraño, y aunque te encuentras con Diosito te siento a mi lado en cada uno de mis pasos. Tú me diste lo que nadie, y sé que hoy estás orgullosa de mi por este nuevo logro. Te amo.

A mis hermanitas Marilyn y Mayerlyn, por ser parte de mi vida, jamás habría elegido Dios mejores hermanas para mí, me ayudaron a mi crecimiento como persona y me enseñaron tantas cosas para hacerme madurar, con ustedes aprendí un poco lo que es ser mama.

Como no nombrar a mi amigo y tutor Luis Ramón Gómez, que con su carácter e inteligencia supo llevarme de la mano con este trabajo de investigación, y hacerme salir adelante. Cada uno de sus regaños y consejos me sirvieron plenamente.

A mis tía Alicia, Zulay, Maritza y Yudith, a mis padrinos Samuel y Nery por siempre estar pendientes de mi, los quiero mucho.

A la familia Castrejón y a mi amiga Raiza Rojas, por estar para mí cada vez que necesitaba unas palabras de aliento.

De verdad que no fue fácil, pero doy las gracias eternamente por cada una de las personas que participaron y que realmente aprecio. Mil gracias, los quiero.

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Alimentos, alimentación y nutrición.....	4
2.2. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	6
2.3. Seguridad en los alimentos	7
2.4. Contaminación química de los alimentos	7
2.4.1.- <i>Ejemplo de contaminación química de los alimentos</i>	9
2.5. Medidas preventivas y de análisis	18
2.6. Métodos de extracción.....	19
2.7. Sistemas cromatográficos.....	19
2.7.1.- <i>Cromatografía líquida de alta eficiencia</i>	22
2.8. Modos de separación por HPLC.....	24
2.9. Melamina	28
2.9.1.- <i>Toxicidad de la melamina</i>	29
3.- JUSTIFICACIÓN	31
4.- ANTECEDENTES	32
5.- OBJETIVOS	38
6.- PARTE EXPERIMENTAL.....	40
6.1.- Descripción de los equipos y reactivos.....	40
6.1.1.- <i>Cromatógrafo líquido de alta eficiencia</i>	40
6.1.2.- <i>Columna cromatográfica</i>	41
6.1.3.- <i>Agitador mecánico vortex</i>	41

6.1.4.- Centrifuga	42
6.1.5.- Ultra-Centífuga	43
6.1.6.-Ultra-Sonido.	43
6.1.7.- Espectrofotómetro UV-Visible.	43
6.1.8.- Agua 18 MΩ	44
6.1.9.- Estándar de Melamina	44
6.1.10.- Reactivos genéricos.	44
6.2.- Metodología experimental	45
6.2.1. Escogencia del modo de separación de melamina por HPLC.....	45
6.2.2. Modo de separación por Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica	47
6.2.3. Condiciones cromatográficas de partida para la determinación de melamina.....	54
6.2.4. Reajuste de las condiciones cromatográficas.	58
6.2.5. Curvas de calibración de la melamina.....	67
6.2.6. Tratamiento previo de las muestras de leche.....	70
6.2.7. Niveles permitidos de melamina en leche y niveles de contaminación encontrados en leche	71
6.2.8. Muestras de leche alteradas antes del tratamiento de muestra (pre- spike).....	73
6.2.8. Muestras de leche de consumo nacional	75
7. CONCLUSIONES.....	80
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	82

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<u>Tabla 1.</u> Representan las áreas obtenidas en función de los rangos de concentración empleados.....	68
Figura 1. Esquema de un equipo de HPLC.	23
Figura 2. Estructura química de la Melamina.....	28
Figura 3. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Agilent, modelo 1100	40
Figura 4. Agitador mecánico, modelo MAXI MIN, Plus™	41
Figura 5. Centrífuga, modelo IEC centra CL2.	42
Figura 6. Ultra-Centrífuga, modelo MIKRO 22R..	42
Figura 7. Ultra-Sonido, modelo US 8890..	43
Figura 8. Espectrofotómetro UV, modelo Genesys 10uv.	43
Figura 9. Desionizador 18 MΩ, modelo NANO pure.....	44
Figura 10. Orden de elución por RPLC Vs HILIC.....	48
Figura 11. Superposición de los diferentes modos de separación por HPLC.	48
Figura 12. Grupo funcional de Zwitterionic-HILIC.....	49
Figura 13. Ilustración del proceso de retención por HILIC.	51
Figura 14. Efecto del modificador orgánico sobre la retención (k).	52
Figura 15. Cromatograma preliminar del patrón de melamina	56
Figura 16. Cromatograma del extracto de leche sin alteración con melamina.....	57
Figura 17. Cromatograma del extracto de leche alterado con melamina.....	58
Figura 18. Cromatograma del extracto de leche bajo las condiciones cromatográficas, 85-15 % Acetonitrilo-agua y 5,0 mM de Acetato de Amonio.....	60
Figura 19. Cromatograma del extracto de leche contaminado con melamina bajo las condiciones cromatográficas, 85-15 Acetonitrilo-agua a 5,0 mM de Acetato de Amonio.....	61

Figura 20. Cromatograma del extracto de leche bajo las mejores condiciones de 85-15 Acetonitrilo-agua a 25,0 mM de Acetato de Amonio..	63
Figura 21. Barrido de longitudes de onda para un patrón de melamina, en un solvente de 85-15 Acetonitrilo-agua a 25,0 mM de Acetato de Amonio..	65
Figura 22. Cromatograma de un patrón de melamina en las óptimas condiciones cromatográficas.	66
Figura 23. Curva de calibración, patrones altos.	69
Figura 24. Curva de calibración, patrones bajos.	69
Figura 25. Cromatograma de un extracto de leche en las óptimas condiciones.	74
Figura 26. Cromatogramas de leche cruda alteradas con melamina, para valores de 34,8 ; 69,5 ; 139 y 278 mg/Kg respectivamente..	75
Figura 27. Cromatogramas de leche CAMP	76
Figura 28. Cromatogramas de leche CASA.	77
Figura 29. Cromatogramas de leche S-S.	77
Figura 30. Cromatogramas de leche VZLA.	78
Figura 31. Cromatogramas de leche ZM	78
Figura 32. Cromatogramas de leche, alterada con melamina en el orden de 70 mg/Kg.	79

1.- RESUMEN

En el presente trabajo experimental, se desarrolló una metodología para la determinación de melamina en leche en polvo, en el contexto de establecer si dicho compuesto había sido empleado en la adulteración del contenido proteico de la misma. Dicha metodología, debería ser simple en el tratamiento de la muestra y posterior análisis, con la finalidad de obtener una respuesta rápida y concluyente, al ser aplicado a productos comercializados por los proveedores nacionales.

La técnica utilizada fue la cromatografía líquida de alta eficiencia, con detección por espectroscopía molecular UV y por el modo de separación “relativamente nuevo”, de Interacción Hidrofílica. El cual es un método de separación para compuestos altamente polares e hidrofílicos, y por otra parte, no se requiere de tratamientos previos muy extensivos, ideal para este tipo de muestras.

Las condiciones cromatográficas encontradas, fueron realizadas mediante una columna Sec-Quant ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm, 4 μ m/200 Å), fase móvil: Acetonitrilo-agua 85/15 (25,0 mM de acetato de amonio), flujo: 0,5 mL/min, λ : 220 nm y un Vol. Inyección de inyección: 50 μ L. El tiempo total de análisis fue de 30 min por muestra.

El tratamiento de la muestra fue simple y rápido, mediante las etapas de extracción, centrifugación, decantación y ultra-centrifugación respectivamente. La banda de melamina presentó un ligero solapamiento con respecto a una banda de la matriz de leche, pero para efectos de estudios de contaminación, fue suficientemente satisfactoria. El valor mínimo reportado de contaminación corresponde a 139 mg/kg, sin embargo por esta metodología es posible determinar hasta 30 mg/Kg en la leche cruda.

Las muestras de leche de proveedores locales no arrojaron concentraciones considerables de melamina, lo cual sugiere que al menos para las muestras en estudio, no presentaron adulteración, con el fin de aumentar el contenido proteico.

2.- INTRODUCCION

La seguridad alimentaria constituye hoy en día uno de los principales objetivos en el campo de las ciencias de la alimentación y se ha convertido en uno de los factores más importantes para cierto grupo de consumidores. Además, las recientes crisis a nivel mundial en la industria alimentaria han hecho aumentar la preocupación de las autoridades sanitarias por garantizar un suministro de alimentos seguros e inocuos para la salud. Así, se han establecido reglamentaciones que recogen los contenidos máximos para algunos contaminantes y que permitan el control de ciertos compuestos químicos tóxicos que naturalmente se producen en los alimentos.

En este orden de ideas, es interesante destacar el análisis de productos lácteos ya que la leche y sus derivados juegan un papel fundamental en la nutrición, al ser un alimento de extendido consumo y base de la alimentación en los primeros años de nuestra vida, el control de los contaminantes químicos que pueden estar presentes en ella como materia prima resulta de enorme interés. En el presente trabajo se pretende estudiar el contenido de un compuesto químico, cuya presencia en la leche está reconocida y cuyos límites máximos permitidos se encuentran regulados. Para ello, se intentará desarrollar métodos analíticos específicos sencillos y prácticos que, posteriormente puedan ser aplicados y validados siguiendo los criterios marcados para el aseguramiento de la calidad en los laboratorios de análisis químico.

2.1.- Alimentos, alimentación y nutrición

Los alimentos son mezclas complejas de compuestos orgánicos e inorgánicos, cuya función fundamental es la de proporcionar los nutrientes necesarios al organismo. Su procedencia abarca los sectores agrícolas, ganaderos y pesqueros, mientras que la manufacturación puede tener un origen tanto artesanal como industrial. Una vez introducidos en el organismo promueven y sustentan el crecimiento, mantienen las funciones corporales, reemplazan o reparan tejidos y suministran la energía necesaria para el mantenimiento de las funciones vitales.

Desde el punto de vista sanitario se define alimento como toda sustancia natural, elaborada o semi-elaborada que se destina al consumo humano y cualesquier otros ingredientes que se utilicen en su fabricación, preparación o tratamiento. Se incluyen las bebidas, más no los medicamentos y suplementos alimenticios (estos últimos contienen una gran diversidad de ingredientes, los cuales pueden estar presentes en forma de concentrados o extractos y son ofrecidos en cápsulas, comprimidos, grageas, píldoras, gránulos, tabletas, polvos, líquidos e inyecciones) [1].

En este mismo orden de ideas, se define la alimentación al hecho de introducir en el organismo sustancias, ya sean líquidas o sólidas, para proporcionar al cuerpo humano los nutrientes indispensables, mientras que la nutrición es el conjunto de procesos gracias a los cuales el organismo recibe, transporta y utiliza las sustancias químicas contenidas en el alimento [1].

Nuestro organismo para mantenerse saludable precisa de aproximadamente 40 nutrientes diferentes y obtiene cada uno de ellos de distintos alimentos, ya que no están distribuidos de manera homogénea en ellos. En cada alimento predomina uno u otro, de ahí la importancia de seguir una dieta variada. De manera general, entre los nutrientes más importante podemos mencionar el agua, los hidratos de

carbono, los lípidos, las proteínas, las vitaminas, los minerales (macroelementos, microelementos y oligoelementos), etc. La desigual distribución de nutrientes en los alimentos ha llevado a clasificarlos en grupos de acuerdo a su afinidad nutritiva o a las características que desempeñan: •En función de la cantidad en la que se encuentran en los alimentos (macronutrientes y micronutrientes). •La función específica de cada uno (energéticos y reguladores). •Del grado de energía que proporcionan al ser metabolizados por el organismo (calóricos y no calóricos). •Por la capacidad del organismo para fabricarlos (esenciales y no esenciales o dependencia del exterior para su correcta asimilación para el organismo). • etc.

Por otra parte, los alimentos también pueden ser fuentes de enfermedades, bien sea por el contenido natural de sustancias tóxicas que acompañan a los diferentes nutrientes, o por la incorporación durante su elaboración y más común aún, por la inadecuada manipulación de los mismos. Es conocido que el procedimiento más común de contaminación es la manipulación de los alimentos, bien sea desde su origen o en las diferentes etapas de su elaboración. Se ha demostrado que existe una relación entre una inadecuada manipulación y la producción de enfermedades transmitidas a través de estos, generando el término “Enfermedades Transmitidas por Alimentos” [2].

2.2.- Enfermedades transmitidas por alimentos

La Organización Mundial de la Salud, ha señalado que las Enfermedades Transmitidas por Alimentos o ETA, siglas como se le conoce en los distintos ámbitos vinculados a la alimentación, son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos infectados con agentes químicos tóxicos o contaminantes microbiológicos, en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor ^[3].

Las enfermedades transmitidas por alimentos no son nada nuevas, se conocen desde épocas muy remotas. Por ejemplo, en el año 2000 A.C, Moisés dictó leyes sobre los alimentos que se podían comer y los que se debían rechazar, así como también estaban legislados los métodos de preparación y se hizo hincapiés en la importancia de la limpieza de los mismos antes de ingerirlos ^[3].

Generalmente los relatos de intoxicaciones alimentarias que registra la historia antigua se atribuyen a productos químicos venenosos, a veces incorporados deliberadamente. No fue sino a recién del siglo XIX, que se tuvo conocimiento de las enfermedades alimentarias también pueden ser producidas por gérmenes. Esto llevó a relacionar los alimentos contaminados con el estado de putrefacción de los mismos. Hoy día, se sabe que los alimentos contaminados con químicos o microorganismos pueden tener aspecto, olor y sabor normal.

En base a lo descrito en los párrafos anteriores, es importante destacar el término “seguridad en los alimentos”, el cual se refiere a las condiciones en la calidad que presentan, así como los hábitos de preservación de los mismos, en vías de evitar su contaminación y las posibles enfermedades que pueden provocar ^[2].

2.3.- Seguridad en los alimentos

Se denominan alimentos potencialmente peligrosos, aquellos que en razón de su composición o sus características físicas, químicas o biológicas pueden contener agentes químicos tóxicos o pudieran favorecer el crecimiento de microorganismos y la formación de sus toxinas, representando un riesgo para la salud humana. Es un problema tan recurrente en el mundo, que en los Estados Unidos de Norte América (país que se caracteriza por llevar un amplio control estadístico en todos los ámbitos) a pesar de ser uno de los suplidores de alimentos más seguro en el mundo, cada año se reportan más de dos millones de casos de enfermedades de transmisión alimentaria ^[2].

De todos los aspectos relativos a la seguridad de los alimentos y el cual es el tema de interés en el presente trabajo, es el referente a la calidad del mismo desde el punto de vista de la presencia de químicos tóxicos y en particular aquella contaminación química que viene implícita en el alimento.

Estos procesos de contaminación pueden ocurrir en cualquiera de los eslabones que involucra la manipulación de los mismos, desde la producción primaria, manufacturación, preservación, empaçado, transporte y comercialización.

2.4.- Contaminación química de los alimentos

Se llama contaminación química de los alimentos, a la presencia de elementos o sustancias químicas tóxicas, provenientes de fuentes tanto naturales como antropogénicas (actividades humanas), que los convierten en agentes potencialmente peligrosos para la salud ^[4].

Las fuentes de contaminación química que puede presentar un alimento desde su origen son muy variadas, pudiendo provenir del aire, agua y suelo. Incluyen agentes físicos como partículas extrañas (polvos) hasta disoluciones gas líquido (aerosoles). Contribuye a ello, el uso intencionado de diversos productos químicos, tales como pesticidas, fármacos o sustancias administradas a los animales y de productos agroquímicos (abonos, etc). Por tanto, son muchos los químicos orgánicos e inorgánicos indeseados que pueden estar presentes en los alimentos, como compuestos asociados a la contaminación ambiental o bien sustancias que por condición natural, procesamiento, conservación y/o envasado pueden encontrarse en los mismos.

Un aspecto a destacar son los tóxicos naturales, los cuales son productos originados en el metabolismo de animales o plantas que utilizamos como alimentos. Muchas de estas sustancias naturales son potentes tóxicos, con efectos adversos inmediatos, y que dan lugar a intoxicaciones severas e incluso fatales. Algunos presentan toxicidad retardada y el conocimiento de su presencia en los alimentos como agente causal de la intoxicación resulta difícil.

Por otra parte, en las últimas décadas las distintas actividades asociadas al sector agropecuario así como pesquero, han sufrido una importante transformación, especialmente en los países más desarrollados. Se han intensificado las actividades agrícolas y se ha pasado de las típicas explotaciones ganaderas extensivas, ligadas al suelo, a las explotaciones ganaderas intensivas sin suelo. Los cambios en los sistemas de producción han generado indudables logros socioeconómicos, aunque como contrapartida han venido generando importantes problemas de carácter medioambiental y la introducción de nuevos agentes externos, que en muchos casos representa un riesgo para la salud humana. Esto concierne no solo a los productos agrícolas, ganaderos y de la pesca, sino a sus diferentes derivados (lácteos, embutidos, harinas, aceites, etc). A continuación

mencionaremos algunos ejemplos de contaminación que abarca los diferentes sectores de la producción alimentaria.

2.4.1- Ejemplos de contaminación química de los alimentos.

La agricultura como proveedor de fuentes de alimentos es una de las que contribuye más significativamente a las enfermedades alimentarias, la contaminación puede ocurrir tanto en las tareas de cultivo (fertilización, etc) como por el uso de agroquímicos en el control de plagas.

La contaminación de origen agrícola deriva principalmente del uso de plaguicidas, pesticidas, biocidas, fertilizantes y abonos, llevando consigo sales compuestas de nitrógeno, azufre, fosfatos, agregados clorados, dioxinas y metales pesados entre otros. Esto trae como consecuencia que los alimentos desde su origen primario, en especial los vegetales como hortalizas, frutas, etc, lleguen a los mercados, distribuidores y finalmente a los consumidores, con la posibilidad de contener algún agente contaminante.

Entre los compuestos orgánicos contaminantes de mayor importancia se encuentran los organohalogenados, que incluyen las dioxinas, dibenzofuranos, bifenilos policlorados (PCB) o polibromados (PBB) y los propios plaguicidas (DDT, aldrín, dieldrín y otros).

La producción comercial de bifenilos policlorados comenzó en 1930 y durante ese decenio se reportaron varios casos de intoxicación. Uno de los primeros episodios de grandes proporciones ocurrió en 1953, en Japón (Yusho), en el cual más de 1000 personas manifestaron signos de intoxicación a causa de la ingestión de aceite de arroz contaminado con PCB provenientes de un fluido de termocambiador. Los efectos más notables fueron hipersecreción ocular,

pigmentación, erupciones acneiformes de la piel y perturbaciones del aparato respiratorio. Los niños nacidos de madres con síntomas de Yusho fueron de tamaño inferior al normal e inicialmente presentaron pigmentación cutánea. A lo largo de un período de seis años, los efectos sobre la piel fueron disminuyendo, pero los síntomas no específicos tendieron a adquirir una relevancia.

La presencia plaguicidas organohalogenados de elevada persistencia es debida a la aplicación directa sobre estos. Todos estos compuestos halogenados (sobre todo clorados), además de su gran afinidad con el tejido adiposo, pueden ocasionar trastornos de diversa índole: neurológicos, dermatológicos (cloracné), inmunológicos, hepatotoxicidad, etc., pero, sin duda, uno de los aspectos que despierta mayor inquietud es el posible papel que pueden desempeñar en la cancerogénesis; en realidad, más que cancerígenos, se consideran cocancerígenos (promotores que realzan la acción cancerígena de otros compuestos químicos). Estos pueden cambiar la tasa de metabolismo de los cancerígenos, alterando las rutas o interfiriendo con los mecanismos de reparación que podrían reducir el efecto de un cancerígeno ^[5].

Se debe tener en cuenta que todas estas sustancias son muy difíciles de degradar y por lo tanto son altamente persistentes. Todos estos compuestos comparten además una gran liposubilidad, lo que explica que sean sustancias muy fácilmente absorbibles (a través de membranas lipofílicas) y que, por el contrario, resulten extremadamente difíciles de eliminar.

Otro contaminante químico común son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), los más conocidos son los benzopirenos, de los que se ha detectado un posible efecto cancerígeno ^[5]. Estas sustancias se forman por combustión de materia orgánica, sobre todo hidratos de carbono y lípidos, a temperatura elevada (300-500 °C). Se trata de los componentes que normalmente forman parte del humo, ya sea de la combustión

de derivados del petróleo, de la combustión controlada de maderas (procesos de ahumado) o combustión incontrolada (incendios) e incluso del humo del tabaco. Se trata asimismo de sustancias liposolubles y por lo tanto, fáciles de absorber y difíciles de metabolizar y de eliminar. Su presencia en alimentos ha sido también objeto de escándalo reciente, al detectarse benzopireno debido a la contaminación por parte de la maquinaria de producción en aceites de orujo [5].

Compuesto de interés son las micotoxinas, las cuales son agregados policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos, en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los mohos, que crecen en los alimentos almacenados por largo tiempo en lugares cálidos y húmedos. Aunque los mohos se retiren, las micotoxinas permanecen y no es posible hacerlas desaparecer ni con lavados o tratamientos térmicos. Los alimentos de mayor riesgo son los frutos secos y las especias secundarias, los cereales, el café, los lácteos y los productos hechos con manzana. Las micotoxinas llegan a afectar sistemas específicos del organismo, generalmente dañan el hígado o los riñones alterando los procesos metabólicos, produciendo efectos como hígado pálido, agrandado, inflamación de riñones, lesiones orales, disminución de la respuesta inmunológica, mala absorción de nutrientes, alteración de la fertilidad, etc. El grado del daño depende de las micotoxinas involucradas, del nivel de contaminación del alimento y del tiempo en que se ha consumido. Aunque el número total de micotoxinas se desconoce y se estime que existan miles de metabolitos fúngicos potencialmente tóxicos, solo algunas de ellas han sido estudiadas y asociadas a una intoxicación. Entre las micotoxinas de mayor preocupación para la agroindustria se encuentran las aflatoxinas, seguidas de los tricotecenos, zearalenonas, fumonisinas, ocratoxina A, citrinina, esterigmatocistina, ácido ciclopiazónico, platulina, alcaloides del ergot y moniliformina. Las aflatoxinas al igual que otras micotoxinas son metabolitos secundarios generalmente tóxicos producidos por algunas especies fúngicas.

Estos son mohos toxigénicos, capaces de desarrollarse en gran variedad de sustratos, pudiendo contaminar los alimentos cuando éstos son cultivados, procesados, transformados o almacenados en condiciones adecuadas que favorezcan su desarrollo ^[1].

Otro aspecto importante es la presencia de metales pesados, los cuales tienen la capacidad de provocar cambios evolutivos dañinos en las plantas y animales. De todos los elementos que componen la tabla periódica, aproximadamente 84 son metales, por lo que no es de extrañar que las posibilidades de contaminación metálica en el ambiente sean numerosas. No obstante, no todos los elementos que tienen esas características tienen funciones biológicas análogas.

Estudios muy recientes se han ocupado de la repercusión negativa de los metales pesados en la situación del ecosistema y la salud del ser humano. Hoy día se conoce mucho más sobre los efectos de estos elementos, cuya exposición está relacionada con problemas de salud como retrasos en el desarrollo, varios tipos de cáncer, daños en el riñón, enfermedades de los sistemas circulatorio o nervioso central y peor aun casos de muerte ^[1].

A pesar de las abundantes pruebas de estos efectos nocivos para la salud, la exposición a los metales pesados continúa y puede incrementarse por la falta de una política consensuada y concreta. El mercurio todavía se utiliza profusamente en las minas de oro de América latina, el arsénico, junto con los compuestos de cobre y cromo, es un ingrediente muy común en los conservantes de la madera. El aumento del uso del carbón incrementará la exposición a los metales porque las cenizas contienen muchos metales tóxicos que pueden ser aspiradas hasta el interior de los pulmones.

Los metales en muy “pequeñas cantidades” pueden tener efectos negativos y normalmente se les denominan, “elementos traza” o “metales traza”. La toxicidad depende de la dosis que se ingiera, así como la cantidad excretada. Debe tenerse

presente que las diferentes formas química de un determinado elemento metálico, posee diferente toxicidad (análisis de especiación). Algunos ejemplos de contaminación por metal tenemos:

Arsénico (As): Se encuentra de forma natural en la corteza terrestre. Alcanza concentraciones elevadas en productos marinos a causa de la contaminación industrial o por insecticidas arsenicales. En el ambiente se combina y forma compuestos orgánicos e inorgánicos. El paso al medio ambiente lo realizan por medio de herbicidas, aleaciones con plomo y cobre, fabricación de semiconductores, fundiciones de minerales, emisiones de hornos de las fábricas que usan carbón, producción de vidrio e industria farmacéutica. El arsénico es absorbido por el organismo humano a través de las vías respiratorias, piel y el tracto intestinal. Es transportado por la sangre pasando por los tejidos y distribuyéndose en los distintos compartimentos corporales como son el hígado y en menor medida los dientes, uñas, pelo y piel. Puede causar tanto daños agudos como crónicos. En el caso de efectos agudos traen consigo vómitos, edemas faciales y anomalías cardíacas mientras que los efectos crónicos ocasionan cuadros similares a los que produce los compuestos inorgánicos. Hoy en día es bien sabido que la toxicidad del arsénico depende en gran medida de su especiación, por ejemplo el arsenito es 10 veces más tóxico que el arsenioso y 70 veces más tóxico que las especies metiladas ^[6].

Mercurio (Hg): Se manifiesta de forma natural en el ambiente por la desgasificación de la corteza terrestre, entre algunos de sus usos tenemos: la producción de gas de cloro y soda cáustica, fabricación de termómetros, amalgamas dentales y fabricación de pilas. Se combina con otros elementos y forma compuestos orgánicos e inorgánicos. El más común es el metilmercurio, producido por organismos microscópicos en el suelo y agua. Mientras mayor sea la cantidad de mercurio en el medio ambiente, mayor es la cantidad de toxina producida por estos seres. El metilmercurio se acumula en la sangre,

mayoritariamente en las células rojas. El envenenamiento con mercurio presenta variedad de síntomas clínicos y depende del tiempo y de la dosis a que ha sido expuesto. En los casos severos, los síntomas pueden ser incapacidad física, mental, ceguera, sordera y a veces la muerte. Se ha demostrado la susceptibilidad extrema del cerebro del feto a los efectos neurotóxicos del metilmercurio ^[6].

Plomo (Pb): Mineral que existe naturalmente en la corteza terrestre, la mayor parte proviene de actividades como la minería, manufactura industrial y de quemar combustibles fósiles. El plomo tiene usos diferentes, fabricación de baterías, municiones, productos de metal (soldaduras y cañerías), etc. Básicamente se está expuesto por alimentos contaminados, aire y agua. La movilización del plomo desde el suelo al agua subterránea dependerá del tipo de compuesto de plomo y de las características del suelo. Son muy comunes los síntomas por prolongado tiempo en áreas donde se han usado pinturas con plomo y que están deteriorándose. En personas adultas, el plomo puede aumentar la presión sanguínea y causar infertilidad, trastornos nerviosos y dolor muscular en las articulaciones. También puede hacerlo sentirse irritable y afectar su capacidad para concentrarse y recordar. Los niños son más vulnerables a los efectos dañinos del plomo porque su cerebro y su sistema nervioso se están desarrollando ^[6].

Cadmio (Cd): El cadmio posee características químicas parecidas a las del zinc. Se presenta en la naturaleza y se puede originar como sub-producto de la minería de este metal y del plomo. Se emplea para galvanizar otros metales y prevenir la corrosión y en la fabricación de baterías y plásticos. Las principales fuentes a la que el hombre está expuesto se encuentran en el agua, los alimentos y el tabaco. El cadmio del agua se debe a menudo a las aleaciones de este metal utilizadas para galvanizar las tuberías de conducción del agua, sin embargo, no se ha identificado una sola fuente de contaminación ambiental ^[6].

Por otra parte, los metales pesados tienden a bioacumularse, lo cual significa un aumento en la concentración de un producto químico en el organismo biológico en un cierto plazo, comparada a la concentración del producto químico en el ambiente. En concentraciones pequeñas no suelen tener efectos, pero a medida que se va ascendiendo en la cadena trófica la concentración se va volviendo cada vez mayor.

Otro aspecto interesante de los peligros de los alimentos, es la presencia de químicos de origen natural potencialmente tóxicos o antinutrientes. Un ejemplo particular de ello es el contenido de altas concentraciones de ácido fítico (IP6, $C_6H_{18}O_{24}P_6$) en cereales infantiles, los cuales pueden ocasionar problemas de absorción de minerales. El ácido fítico se encuentra frecuentemente en la mayoría de las semillas y granos de cereales, ya que es la principal forma natural de almacenamiento de fósforo, representando del 60 al 90 % del fósforo total de dichas plantas. En general, la presencia del ácido fítico en los alimentos no implica la existencia de problemas de toxicidad graves, sin embargo, en vista de que interfiere con la función de los nutrientes esenciales, puede ser considerado una sustancia natural antinutriente ^[6]. El ácido fítico se enlaza a los minerales en el tracto gastrointestinal haciéndolos potencialmente inasequibles para el organismo. Como consecuencia de esto, el ácido fítico compromete los niveles de ciertos minerales, orientando las directrices a asegurar una adecuada biodisponibilidad de los mismos ^[6].

El sector ganadero es otro medio importante que contribuye a nuestra dieta diaria, por las vitaminas, minerales y sobre todo las proteínas que ellos proveen. El ganado de manera general se alimenta principalmente de las plantas, de las cuales ingieren los sustentos esenciales. Entre los nutrientes principales se encuentran los minerales, (Macronutrientes: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. Micronutrientes u oligoelementos: hierro, zinc, manganeso,

boro, cobre, molibdeno, etc). Al igual que las plantas de consumo humano, las de alimento animal pueden estar contaminadas con diversos compuestos químicos, pudiendo pasar a los humanos y manifestando toxicidad manifestada en párrafos anteriores.

En la década de los sesenta, durante la guerra de Vietnam, los estadounidenses utilizaron enormes cantidades de defoliantes (poderosos matamalezas) para despejar la selva. Luego, se estableció una causalidad directa entre dioxinas y determinadas patologías. En febrero de 1999 en Bélgica, aparece un nuevo episodio relacionado otra vez, con la contaminación de alimentos destinados al consumo humano, "las dioxinas de los huevos". En esta ocasión el origen se encuentra en la contaminación de concentrados destinados a la engorda de gallinas ^[7].

La contaminación abiótica de los alimentos de origen ganadero (no por microorganismos, virus y bacterias) no necesariamente puede ser de origen medioambiental y las fronteras de lo natural y lo accidental suele ser difusa en algunos casos. Ejemplo de frontera dudosa son aquellas sustancias que pueden aparecer en el alimento como consecuencia de un resultado tecnológico o culinario. Tal es el caso de los hidrocarburos aromáticos que se forman en el ahumado (benzopirenos) o los nitrosaminas que pueden formarse a partir de la combinación de nitritos (preservativos) y de aminas alimentarias. Está claro que ambas son sustancias indeseables, porque carecen de efectos positivos conocidos y poseen un riesgo potencial cancerígeno o pro cancerígeno. Más difícil es delimitar una frontera definida en el caso de las sustancias que, en determinadas dosis pueden considerarse normales en los alimentos y que, por el contrario, cuando su nivel sobrepasa un cierto límite, deben considerarse perjudiciales ^[7].

Otro aspecto importante es el uso de xenobióticos (medicamentos y aditivos) lo cual plantea un problema de salud pública en la medida que estos pueden

originar residuos en los alimentos derivados de los animales tratados. Estas sustancias se utilizan para curar, prevenir infecciones y para favorecer el crecimiento de los animales. Después de la administración de los mismos tiene lugar una metabolización que favorecerá su eliminación y por lo tanto la detoxificación. La mayor parte del producto es excretado por la orina y heces. Sin embargo, también podemos encontrar estos productos en la leche, huevos y en la propia carne del animal sacrificado.

Un caso reciente e importante a destacar es el escándalo desatado en la República Popular de China por la venta de leche en polvo para niños, contaminada con melamina (MEL, 1,3,5-triazine-2,4,6-triamine). Por su elevado contenido en nitrógeno han sido utilizados para adulterar alimentos, de esta forma simulan tener un mayor contenido proteico del producto, aunque haciéndolo tóxico. Este hecho causó la muerte de varios niños e intoxicación de miles y aumentó tras revelarse que las principales marcas lácteas del país también han distribuido leche líquida con esa sustancia tóxica ^[7].

Los alimentos marinos (el pescado, los mariscos, moluscos, crustáceos, entre otros) son una parte importante de una dieta saludable. El pescado y los mariscos contienen proteína de alta calidad y otros nutrientes esenciales que son bajos en grasas saturadas y contienen grasas omega-3. Una dieta bien balanceada que incluya una variedad de pescados y mariscos puede contribuir a la salud cardíaca y al crecimiento y desarrollo adecuado de los niños. Sin embargo, no cabe duda que en los últimos años, el medio ambiente marino se ha ido contaminando visiblemente, como resultado de las actividades del hombre. Grandes cantidades de sustancias, algunas nocivas, llegan al ecosistema acuático y parte de ellas proceden de residuos industriales, agrícolas o domésticos. Dentro de la variable lista de contaminantes, los metales pesados en cantidades de trazas, ocupan una posición única, ya que ellos no pueden ser descompuestos posteriormente y, una

vez depositados, permanecerán en el medio acuático, prácticamente sin ningún cambio cualitativo.

Los riesgos de dichos contaminantes en el pescado y mariscos dependen de la cantidad que se ingiera y sus niveles de contaminación. Por lo tanto, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) aconsejan que los alimentos de origen marino deben ser analizados periódicamente para tener un control estricto de los niveles de contaminación que pueden estar presentes ^[6].

En muchas ocasiones los tóxicos están presentes a unas concentraciones extremadamente bajas y en mezclas complejas de compuestos, por lo tanto, cualquier técnica que se utilice en el análisis de alimentos debe alcanzar o ser capaz de separar los compuestos de la matriz y la identificación de los contaminantes a niveles traza.

2.5.- Medidas preventivas y de análisis

La seguridad ha sido siempre una condición estrechamente relacionada con los alimentos, en el sentido de que, para ser considerados como tales, no deben producir ningún tipo de efecto negativo en el consumidor (siempre que, claro está, se trate de un consumo racional). Entonces, en razón de la extrema necesidad e importancia de ingerir sólo alimentos aptos e inoos, se puede entender genéricamente, como alimentos normales aquellos que no contienen sustancias extrañas ni agregados no autorizadas y se expenden bajo una denominación correcta acerca de su origen, naturaleza y calidad ^[1].

Cuando se evalúa un alimento, no sólo se tienen en cuenta su valor nutritivo y sus cualidades sensoriales u organolépticas, sino que por encima de todo debe

garantizarse su seguridad o, lo que es lo mismo, su inocuidad. A lo largo del último siglo, los avances logrados en las condiciones sanitarias de los alimentos en conjunto con el establecimiento de sistemas de higiene e inspección, han conducido a una situación de garantías mínimas sanitarias. A pesar de ello, el interés de la población por la seguridad alimentaria se ha convertido en una exigencia en la medida que se realizan nuevos hallazgos científicos y en tanto que los ciudadanos se hacen consumidores más responsables.

Para vigilar la seguridad alimentaria, diversas agencias gubernamentales de calidad se encargan de que la legislación se cumpla de forma rigurosa, mediante la aplicación de métodos analíticos adecuados para la detección de contaminantes o especies naturales tóxicas en alimentos de forma rápida y eficaz. Esto ha llevado a que el análisis en los alimentos englobe muchas disciplinas, ha estado fuertemente ligada al desarrollo de las modernas técnicas analíticas instrumentales y ha constituido un punto de encuentro entre la química analítica, bioquímica, microbiología, fisiología, toxicología, nutrición, etc.

En vista a lo anteriormente planteado la seguridad en los alimentos ha sido un tema de interés en el Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela y en ese sentido se han venido realizando una serie de ensayos en la implementación de técnicas y metodologías de análisis en diversos tipos de muestras. En este orden de ideas, en el presente trabajo se plantea la necesidad del montaje o adaptación de una técnica de análisis en la determinación de melamina en productos alimenticios y fundamentalmente en la leche en polvo.

2.6.- Métodos de extracción

La extracción es la separación selectiva de la(s) especie(s) de interés de una matriz determinada, como por ejemplo agua, suelos, sedimentos, tejidos

biológicos o alimentos ^[9]. Este es el paso crítico en los análisis, principalmente en matrices sólidas. Es muy importante y de interés la extracción cuantitativa del analito de las distintas matrices sin alterar la composición de las especies en estudio ^[10]. A continuación se presenta una explicación de estas técnicas:

- *Extracción líquido-líquido*: La extracción líquido-líquido es también llamada extracción con solvente, hoy en día es cada vez menos utilizada, esto es debido a que los factores de pre-concentración son bastante bajos (1:50 – 1:250) y los procedimientos requeridos consumen mucho tiempo de operación. La extracción líquido-líquido puede ser aplicada directamente a muestras que no hayan sido filtradas, aun en matrices complejas, además de permitir la transferencia del analito dentro de solventes orgánicos no polares. Este método sólo puede ser aplicado a muestras acuosas ^[11].
- *Extracción líquido-sólido*: Se basa en un principio muy similar al de la extracción líquido-líquido pero con la diferencia que se particiona el soluto entre 2 fases. Sin embargo, la partición entre una fase líquida (matriz) y una fase sólida (adsorbente) no es sencilla y se logra pasando la muestra líquida a través de una columna, cartucho, tubo o disco que contiene el adsorbente, el cual retiene al analito, y la recuperación subsecuente mediante la elución con el solvente adecuado. El mecanismo de retención depende de la naturaleza del adsorbente, y puede incluir adsorción simple, procesos para quelatar el analito, intercambio iónico o intercambio de par iónico. Los compuestos iónicos pueden ser selectivamente pre-concentrados usando cartuchos catiónicos o aniónicos. Los cartuchos para la extracción en fase sólida se han utilizado para análisis de especiación obteniéndose tiempo de análisis de 1.5 minutos, y mejorando los límites de detección.

- *Extracción con sonda de ultrasonido (UPS, Ultrasound probe sonication):* Este método se utiliza para remover partículas de un sustrato o para acelerar procesos de mezclado. El uso de baños ultrasónicos estándar operando a 40 KHz son muy fáciles de implementar y tienen una alta eficiencia. Aquí se induce la cavitación acústica, provocada por la formación de burbujas a partir de ondas sónicas en un líquido continuamente comprimido y descomprimido. Como resultado se obtienen temperaturas y presiones extremas generadas en el líquido, y como consecuencia, cuando un sólido está presente en el solvente, los compuestos presentes en el sólido pueden ser extraídos parcial o completamente dentro del medio líquido con mayor rapidez que en otros métodos clásicos.

2.7.- Sistemas Cromatográficos

Los Métodos Cromatográficos son técnicas de análisis que agrupa un conjunto de diversos procedimientos, los cuales son empleados en la separación, identificación y cuantificación de componentes químicos de mezclas complejas.

En principio la cromatografía es fundamentalmente una técnica de separación, cuya principal característica que la diferencia de otras técnicas de separación, es que pone en contacto de una manera continua y dinámica dos fases, pero dos fases que no se ligan entre sí, es decir dos fases inmiscibles. Una vez que los diferentes componentes de la muestra entran en contacto con ambas fases, sufren diferentes interacciones de orden físico químico, llamadas repartos. Estos no son más que una distribución de concentración de cada analito en cada una de las fases, como consecuencia de interacciones de orden físico-químicas de las diferentes especies de la muestra con ambas fases, tanto móvil como estacionaria. La naturaleza de dichas interacciones físico-químicas puede ser

variada, entre ellas las conocidas fuerzas Van der Waals (dipolo-dipolo, dispersión de London), puentes de hidrógeno, interacción iónica, exclusión por tamaño, afinidad bioquímica, etc.

Al final del proceso los diferentes componentes de la muestra se irán separando de acuerdo a su interacción con la fase estacionaria, aquellos que interactúan de una manera mayor con la fase estacionaria serán más fuertemente retenidos y tardarán más en eluir, mientras que aquellos compuestos que interactúen menos saldrán más rápidamente. Estableciéndose un orden de elución y separación de los diferentes componentes de la muestra.

La cromatografía se clasifica según la naturaleza de la fase móvil, así tenemos la cromatografía de líquidos, gases y fluidos supercríticos. La cromatografía de líquidos es una de la más utilizada debido a que no está limitada a la estabilidad térmica y volatilidad de las especies a analizar, la fase móvil participa activamente en el proceso de separación, lo cual implica otro parámetro disponible para aumentar la selectividad y posee una gran versatilidad en cuanto a fases estacionarias, por lo tanto posee muchos modos de separación.

2.7.1.- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

En cromatografía de líquidos, cuando se desarrolló la tecnología para trabajar con partículas de empaque menores a 10 micrómetros, esta se denominó cromatografía líquida de alta presión, debido al aumento de presión generado por las bombas para tal fin. Con el pasar del tiempo el término presión fue cambiado por eficiencia o rendimiento. En la actualidad tiene una gran aplicabilidad a sustancias de gran interés para la ciencia e industria como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, plaguicidas,

antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una gran variedad de sustancias inorgánicas [12].

Los componentes instrumentales básicos de un HPLC son: reservorios de eluentes, bombas generadoras de alta presión, sistema de inyección de muestra, columna, detector y procesador de la señal. Pueden existir configuraciones más complejas de acuerdo a las necesidades, como por ejemplo con desgasificadores en línea, automuestradores, inyectoros de volumen variable, etc. En la figura 1 se pueden observar los componentes fundamentales de un cromatógrafo de HPLC.

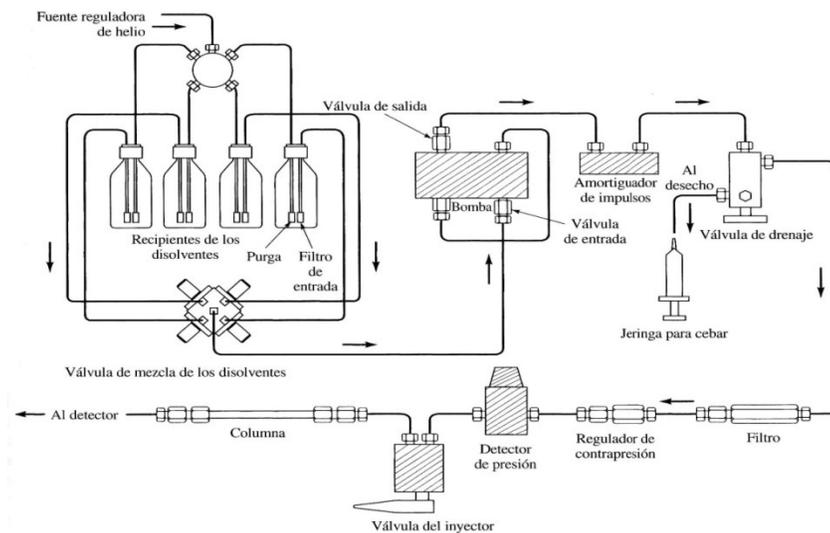


Figura 1.- Esquema de un equipo de HPLC

Las columnas en cromatografía de líquidos son el “corazón” del equipo, generalmente están elaboradas de un tubo de acero inoxidable o polietileno, de diámetro interno uniforme, rellenas de unas partículas de diámetro muy pequeño, constituidas por un soporte inerte en la cual normalmente se encuentra enlazada la fase estacionaria propiamente dicha.

HPLC se clasifica según la naturaleza de la fase estacionaria, si la fase estacionaria es sólida, entonces es una cromatografía Líquida-Sólida y si la fase estacionaria es líquida, hablamos de cromatografía Líquida-Líquida. Posteriormente cada una de ellas se puede sub clasificar según el tipo de interacción que este ocurriendo entre el soluto y la fase estacionaria.

2.8.- Modos de separación por HPLC

- *Cromatografía de adsorción:* Es el tipo de cromatografía líquido-sólido de la forma más clásica, introducida por primera vez a principios del siglo XX por Tswett, La sílice y la alúmina son las únicas fases estacionarias utilizadas, donde la primera es preferida debido a su mayor capacidad de carga y mayor diversidad de presentaciones. En general, la cromatografía líquido-sólido es más adecuada para muestras que sean solubles en disolventes no polares, por lo que presentan una solubilidad limitada en los disolventes acuosos.
- *Cromatografía de intercambio iónico:* Es un tipo de cromatografía líquido-sólido donde la fase estacionaria es un intercambiador iónico, para la separación y determinación de iones. Estos procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una disolución y los iones del mismo signo que están en la superficie de un sólido de masa molecular elevada y prácticamente insoluble. Al comienzo se empleaban intercambiadores iónicos naturales, como las arcillas y las zeolitas, pero a mediados de los años treinta se comenzaron a fabricar resinas sintéticas para disminuir la dureza del agua, para la desionización del agua y para la purificación de disoluciones. ^[13]

- *Cromatografía de exclusión por tamaño:* Es una técnica de análisis que se aplica particularmente a especies de elevado peso molecular. No hay interacción química entre los analitos y la fase estacionaria. El relleno está hecho por partículas de polímeros o sílice que contiene una red de poros uniformes donde son atrapados los componentes de la muestra. El tiempo de residencia va a depender del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Moléculas que son más grandes que el tamaño promedio de poro del relleno son excluidas, no serán retenidas y por lo tanto son las primeras en ser eluidas. Moléculas que poseen diámetros significativamente menores, resultan atrapadas por mayor tiempo. Se denomina Cromatografía de Filtración de Gel (GFC) cuando se emplean muestras poliméricas solubles en agua. La fase móvil es acuosa y el empaque es un gel hidrofílico. Para muestras poliméricas solubles en solventes orgánicos se denomina Cromatografía de Permeación de Gel (GPC), la fase móvil es orgánica y el empaque es de poliestireno entrecruzado (hidrofóbicos). GFC y GPC emplean el mismo mecanismo de separación.
- *Cromatografía de afinidad:* Se trata de un tipo especial de cromatografía de adsorción sólido-líquido en la que la sustancia de naturaleza bioquímica (anticuerpos, cofactores, inhibidores enzimáticos, lectinas y otras moléculas) denominadas ligandos de afinidad y enlazados químicamente en soportes sólidos adecuados, retienen a los solutos (analitos), también de naturaleza bioquímica, de manera reversible y selectiva. Las separaciones se basan en el acoplamiento "llave-cerradura" típico de la biología molecular.

- *La Cromatografía Quiral:* Los isómeros quirales son esteroisómeros, es decir moléculas que presentan los mismos elementos y enlaces pero distinta distribución espacial. Moléculas con un conjunto de esteroisómeros quirales que sean imágenes especulares se denominan enantiómeros. Los enantiómeros poseen las mismas propiedades físicas pero interaccionan diferente con la luz polarizada. La cromatografía quiral es de la más común para la separación de enantiómeros. Es capaz de separar mezclas racémicas de esteroisómeros.
- *Cromatografía de reparto:* Es el tipo de cromatografía líquido-líquido, donde el analito reparte su concentración entre dos fases. Cuando la fase estacionaria líquida está unida químicamente mediante un enlace covalente a un soporte sólido, le confiere mayor estabilidad y no puede ser removida con facilidad (sangrado de la columna). En tal caso, se le denomina cromatografía de fase enlazada. La Cromatografía de reparto puede ser de dos tipos: Si el grupo activo unido a la partícula de soporte es polar, entonces se llama: Cromatografía en Fase Normal (NPC, normal phase chromatography), Si el grupo activo unido a la partícula de soporte es no polar, entonces se llama: Cromatografía en Fase Inversa (RPC, reverse phase chromatography).
- *Cromatografía de fase normal (NPC):* Básicamente para compuestos polares, como aminas, anilinas, nitrogenados aromáticos, fenoles, pesticidas, etc. Normalmente la elución se comienza una fase móvil poco polar, como heptano, hexano, tetrahidrofurano, etc. y se va añadiendo solventes más polares como cloruro de metileno, cloroformo. Los métodos de cromatografía de reparto en fase normal y cromatografía de adsorción tienden a ser complementarios y en muchos casos se superponen.

- *Cromatografía de fase inversa (RP)*: Para compuestos no polares y de moderada polaridad. En la mayoría de las aplicaciones de RPC, la elución se lleva a cabo comenzando con una fase de elevada polaridad, como es el caso de una disolución acuosa conteniendo concentraciones diversas de un solvente de menor polaridad como metanol, acetonitrilo, THF. Posteriormente se va añadiendo solventes menos polares.
- *Cromatografía de pares iónicos*: La cromatografía de pares iónicos (o de formación de parejas de iones) es un tipo de cromatografía de reparto en fase inversa que es utilizada para la separación y determinación de especies iónicas. Aquí, la fase móvil está constituida por una disolución *tampón* acuosa que contiene un disolvente orgánico (generalmente metanol) y un compuesto iónico de carga opuesta a la del analito. Este compuesto iónico aporta un contraión, el cual es un ión que se combina con el ión del analito para formar la pareja de iones, la cual es una especie neutra que es retenida por el relleno de fase inversa. La elución de los pares iónicos es conseguida por una disolución acuosa de un disolvente orgánico soluble en agua.

2.9.- Melamina

Es un compuesto orgánico que se obtiene de la urea, con fórmula química $C_3H_6N_6$ y cuyo nombre IUPAC es 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina, véase figura 2. Es un trímero (está constituida por tres moléculas iguales) de cianamida, formando un heterociclo aromático, de naturaleza sólida, de color blanco ligeramente soluble en agua.

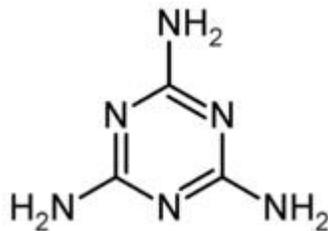


Fig. 2.- Estructura química de la Melamina

En su composición química la melamina tiene un alto contenido de nitrógeno (66,7 % por unidad de masa), el cual ha sido utilizado fraudulentamente para adulterar alimentos para animales o humanos, logrando simular en éstos productos una mayor cantidad proteica.

Una de las aplicaciones más comunes de la melamina es hacerla reaccionar con formaldehído, originando una resina melamina-formaldehído. A esta resina se le conoce como laminados (“formica”), la cual se usa principalmente como adhesivo para hacer la madera aglomerada que se usa en la construcción residencial y fabricación de muebles. En otras aplicaciones se emplea en la fabricación de etiquetas, fertilizantes y material plástico resistente y duro, empleado en la elaboración de vajillas (como imitación de porcelana).

2.6.1.- Toxicidad de la melamina

Consumida en pequeñas dosis posee baja toxicidad, los cuales no se metabolizan y se eliminan rápidamente en la orina, mientras que al ser consumidas en altas dosis se amalgama en el organismo en forma de cristales causando cálculos renales^[8]. También se ha relacionado con el apareamiento de cálculos de vejiga y alteraciones en el proceso de reproducción. Ha demostrado también tener efectos cancerígenos en animales bajo ciertas circunstancias, relacionándosele con cáncer de riñón y vejiga. No hay suficientes pruebas de riesgo carcinógeno en humanos, pero debemos tener en cuenta que las impurezas en su síntesis podrían ser tóxicas y peligrosas para la salud^[8].

Se sugieren límites de 1 mg/Kg para alimentos infantiles y 2.5 mg/Kg para otros alimentos con mínimo de 15 % de leche^[8]. En diciembre de 2008 un grupo de expertos internacionales reunido por la OMS fijó en 0,2 mg por kg de peso corporal el nivel diario tolerable de melamina en el cuerpo humano (IDTP). Un bebé de 5 kg pudiera tolerar 1 mg diario y un adulto de 50 kg pudiera tolerar 10 mg^[8].

Un escándalo a nivel mundial ocurrió recientemente, por la elaboración de productos lácteos para infantes, así como leche, yogures y helados contaminados con altas cantidades de melamina, fabricados en la República Popular de China. La mayoría de los bebés afectados había consumido la leche durante al menos tres meses. El problema comenzó, cuando se fabricó entre octubre del 2007 y agosto de 2008, una cantidad apreciable de "polvo de proteínas" (776 toneladas de melamina y malto dextrina), que se agregaba a la leche cruda para que aparentara poseer un mayor contenido proteínico. Se vendieron más de 600 toneladas de este aditivo por un valor total de 6,83 millones de yuanes (660.000 euros). Este "polvo de proteínas" fue vendido a productores de leche en las ciudades de Shijiazhuang, Tangshan, Xingtai y Zhangjiakou de Hebei. La leche

cruda adulterada con melanina se revendió al Grupo Sanlu, el principal fabricante lácteo involucrado en el escándalo. Al poco tiempo, tres meses después se comenzó a notar los efectos de este compuesto, especialmente en los recién nacidos de cierta población de la República Popular de China.

Posteriormente, más de 100 productos procedentes de China o Malasia se encontraron contaminados con melamina dentro de los que aparecieron café enlatado y otros productos que utilizan leche como materia prima, tales como dulces y pasteles. Alimentos como los famosos M&M's, los Nestle Kit Kat, galletas, caramelos, tortas, cremas y muchos otros han sido descubiertos en países como Indonesia, Korea, Canadá, Japón, Singapur, Nueva Zelandia, Bélgica, Alemania, Malasia, Sud Africa, Francia, Malta, Islas Solomon, Inglaterra, Holanda, Tailandia y Suiza.

Es tanto el escándalo causado por la melamina que ya gobiernos de todo el mundo sacaron del mercado el lácteo y derivados elaborados con leche procedentes de China, como forma de evitar cualquier intoxicación por estos productos sospechosos de contener éste tóxico. Más de 12 países en Asia, África y Europa prohibieron las importaciones de estos productos chinos después del escándalo. Otros países, desde Australia a Yemen, retiraron todo tipo de productos lácteos provenientes de China.

3.- JUSTIFICACION

La problemática desarrollada en la República Popular China, debido a la presencia de melamina en leche y sus derivados, haciéndolos pasar fraudulentamente por alimentos con altos contenidos de proteínas, ha despertado un interés mundial sobre los efectos que este tóxico puede provocar en la salud pública. Esto motivó que en muchos países se exigiera un control estricto en el contenido de melamina en alimentos, en especial aquellos provenientes del país del cual se originó dicho problema.

En vista a lo anteriormente planteado, el Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela, a través de su División de Servicios, esbozó la necesidad de desarrollar un método o la adaptación de una metodología ya establecida, que se ajustara a la instrumentación disponible, para la determinación de melamina en leche del consumo humano. Esto promovido por las continuas demandas de servicios a particulares, empresas e instituciones tanto del sector público como privado.

4.- ANTECEDENTES

Aunque la revisión que se presenta a continuación se refiere a la determinación de melamina en diversas matrices, se hizo énfasis en productos lácteos, el cual es nuestro interés particular:

- **Robert A. Yokley y colaboradores** (2000), estudiaron un método analítico para la determinación de residuos de ciromazina y melamina en suelos, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con detector UV-Visible (HPLC-UV, High Performance Liquid Chromatography-UV Visible Detector) y comparado con la técnica de Cromatografía de Gases con detector de masas (GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry Detector). Una porción seca de la muestra de suelo se extrajo dos veces sucesivamente con una mezcla de solventes, mediante agitación mecánica por 30 min cada vez. Para ello se empleó una mezcla de acetonitrilo y carbonato de amonio (0.050M) al 70 y 30 % respectivamente. Posteriormente es centrifugado y el sobrenadante es decantado y ajustado a pH 2 con HCl 4N. Una alícuota de la extracción se sometió a un cartucho de resina de intercambio catiónico para su purificación (SCX, AG 50W). La columna fue lavada sucesivamente con 50 mL de una mezcla de 90 % acetonitrilo y 10 % agua, luego con 50 mL de una mezcla 90 % metanol y 10 % agua y finalmente con 10 mL de metanol (siendo descartados todos los eluatos). Los analitos de interés fueron eluidos con 20 mL de 5 % hidróxido de amonio y 95 % metanol. Luego de ello, el extracto se llevó a sequedad en un rotavapor y finalmente se regeneró con agua, llevando a un volumen conocido. El análisis se realizó mediante HPLC-UV y confirmados mediante GS-MS. El análisis por HPLC-UV se hizo utilizando una columna Zorbax SCX y la fase móvil consistió en una mezcla de 25 % metanol y 75 % fosfato de potasio, se realizó isocráticamente con detección

a una longitud de onda de 214 nm. El límite de detección encontrado fue de 2,5 ng y el límite de cuantificación de 10 µg/L para ambas especies. Los tiempos de retención fueron de 8 min para la melamina y 16 min para la ciromazina. El análisis por GS-MS empleó una columna capilar J&W DB-Wax y el masas se operó en modo SIM, consiguiendo un límite de detección de 0,05 ng y un límite de cuantificación de 10 µg/L, para ambas especies. Empleando HPLC-UV la recuperación media del procedimiento fueron 97 % para la ciromazina y 95 % para la melamina y su dispersión expresadas como desviación estándar relativa fueron 16 y 11 %, respectivamente. Utilizando GC-MS la recuperación media del procedimiento fueron (107–92) % y las desviaciones estándar fueron (10 y 16) % para ciromazina y melamina, respectivamente. Los resultados demostraron ser una técnica válida, exacta y relativamente precisa para la determinación de ciromazina y melamina en el suelo. En el análisis realizado, se detectó melamina en todas las muestras de suelo analizadas en concentraciones que van desde 2 hasta 80 µg/L.^[14].

- **Michael S. Filigenzi y colaboradores** (2008) se dedicaron a la determinación de melamina y contaminantes añadidos al gluten de trigo y de arroz (proteínas que se incorporaron posteriormente en alimentos para mascotas), los cuales estaban relacionados con enfermedades renales. Para ello desarrollaron una metodología donde emplearon la técnica HPLC-MS-MS. Los alimentos analizados estaban implicados en numerosos casos de insuficiencia renal en gatos y perros. Los analitos fueron extraídos en una muestra homogeneizada de tejido del riñón, con una mezcla de acetonitrilo, agua y dietilamina en 50, 40, 10 % respectivamente. La muestra se centrifuga y una alícuota del sobrenadante se diluye con acetonitrilo y se le agrega un isótopo estable de melamina. La cuantificación

de las muestras se realizó utilizando el método estándar interno y las curvas de calibración entre 50 y 1000 ng/mL de cada analito. La columna utilizada fue Synergi polar RP, la fase móvil consistió en acetato de amonio en agua 10 mM, acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1 % en agua, realizado mediante un gradiente de elución. El método fue validado por el análisis de muestras de tejido del riñón (polvo), enriquecido con los analitos individuales. Este método fue utilizado con éxito para el diagnóstico postmortem de animales (toxicosis). El sistema cromatográfico arrojó una separación adecuada para los cuatro analitos. En particular, hubo una separación suficiente entre la melamina y los otros analitos ^[15].

- **Sheryl A. Tittlemier y colaboradores** (2009), El título de su trabajo fue “Melamina en fórmula infantil, vendidas en Canadá: ocurrencia y evaluación de riesgos”. Para ello se empleó un método de análisis que incorporó la extracción de líquida seguido por una segunda extracción en fase sólida por un cartucho de lecho mixto (fase reversa con intercambio iónico), y finalmente medida a través de HPLC-MS. Este fue validado para el análisis de melamina en líquido y en polvo de fórmulas para lactantes. El método utilizó dos isótopos estables de melamina etiquetados, para controlar la recuperación del analito y para dar cuenta de los efectos de matriz. Se realizó la primera extracción con 24 mL de agua y 1mL de HCl 1N, se agitó con un vortex por 5 segundos. El sobrenadante recuperado fue mezclado con diclorometano, se centrifugó y luego a 5 mL de la disolución acuosa se le realiza una extracción en un cartucho de lecho mixto (fase inversa con intercambio iónico). El cartucho se lava con metanol en HCl 1N y posteriormente el eluato es recuperado con hidróxido de sodio en metanol. Se seca y se regenera con acetonitrilo, agua al 90 y 10 % respectivamente. El análisis se realizó con una columna UPLC BEH HILIC, usando como fase móvil un gradiente de una mezcla de formato de amonio en ácido fórmico

0.01 % y ácido fórmico 0.01 % en acetonitrilo. El método fue sensible, preciso y exacto. Se analizaron 94 muestras de fórmula infantil que se encontraba en los supermercados principales en Ottawa-Canadá, para examinar si los niños canadienses estaban expuestos a niveles de fondo de la melamina, el tóxico fue detectado en 71 de los 94 productos analizados. El uso de HCl diluido, ayudó a la extracción por solvente para separar las fases durante las primeras centrifugaciones ^[16].

- **Lisa J. Mauer y colaboradores** (2009) Analizaron melamina en fórmula infantil (en polvo) utilizando espectroscopia infrarroja cercana y media (FTIR, Fourier Transform Infrared). El método fue capaz de diferenciar las muestras adulteradas conteniendo 1 µg/L de melamina con un nivel de confianza elevado. Estos métodos no destructivos requieren poca preparación de la muestra. El método por FTIR cercano tiene un tiempo de ensayo de 1 min, y un tiempo total de 2 min a la detección. Los métodos FTIR medio requieren hasta 5 minutos para la detección de melamina. Por lo tanto, FTIR permiten la detección rápida de 1 µg/L de melamina en la fórmula en polvo para lactantes. Las posiciones de número de onda de picos de absorción, la intensidad de pico, y anchuras de los picos son útiles para el grupo funcional y la identificación de la muestra. Los números de onda y las posiciones de las bandas de absorción son específicos de los grupos funcionales en una muestra, por lo que cada una de ellas tiene una única "huella digital", espectro de absorbancia. Así, las diferencias estructurales entre la melamina y de la compleja mezcla de los ingredientes presentes en la fórmula para infantes, son evidentes en los espectros. Los problemas encontrados en cuanto a la reproducibilidad, son los característicos de este tipo técnica ^[17].

- **Buu N. Tran y colaboradores** (2009) trabajaron en el sustituto de acetonitrilo como solvente de extracción, y se analizó melamina y ácido cianúrico en residuos de productos lácteos y alimentos para animales. Recientemente, la escasez mundial de acetonitrilo ha impulsado el desarrollo de métodos nuevos que utilizan el metanol como solvente orgánico en la extracción y en el análisis por cromatografía. El método se basa en una simple extracción de melamina y ácido cianúrico, utilizando una mezcla de metanol y agua, seguida de una dilución isotópica y posterior medida por cromatografía líquida de alta eficiencia-espectrometría de masas de triple cuadrupolo. La separación de la melamina y el ácido cianúrico se llevó a cabo en una columna Dionex Acclaim Trinidad P1, con el metanol y un buffer de acetato de amonio utilizado como fase móvil. El procedimiento de centrifugado se llevó a cabo en dos pasos sucesivos con una mezcla metanol-agua, para remover los componentes de la matriz. El porcentaje de recuperación fue de 101-119 % para melamina y 84-123 % para ácido cianúrico. Se logró excelente linealidad para los patrones, siendo éste un método simple, preciso y sensible para el análisis de los analitos. La separación de melamina y ácido cianúrico estuvo fuertemente afectada por el pH de la solución acuosa, los valores de pKa de melamina y ácido cianúrico son de 5.0 y 6.9 respectivamente. A pH 5 el ácido cianúrico está en una forma neutra y eluye en 2 min en una mezcla 90 - 10 de metanol-acetato de amonio 5 mM, mientras que la melamina se encontraba en forma catiónica y se mantuvo en estado estacionario. La melamina se eluyó sólo cuando la proporción de fase acuosa era de un 60%. El tiempo de retención de melamina osciló de 8 a 10 minutos. Los resultados obtenidos por el método de extracción y los datos de el análisis cuantitativos fueron comparables a los publicados por el la FDA, lo que demuestra que el nuevo método puede ser utilizado como monitor de melamina y sus análogos en los productos lácteos y alimentos para mascotas en el mercado ^[18].

- **Na Yan y colaboradores** (2009) Estos científicos determinaron melamina en leche líquida, yogurt, leche completa y pescado, mediante electroforesis capilar con detector de arreglo de diodos (detección de CZE-DAD). Las muestras fueron sometidas a un proceso de extracción con ácido tricloroacético 1%, mientras que 1 mL de cloroformo se utilizó para precipitar la grasa en las muestras reales. Después de la centrifugación y el filtrado, el extracto fue analizado por CZE-DAD directamente. El método propuesto fue aplicado con éxito dando como límites de detección y cuantificación para melamina 0.01y 0.05 $\mu\text{g/ mL}$, respectivamente, obteniendo una recuperación total que va desde 93 hasta 100%. Para evaluar su aplicabilidad, la metodología propuesta fue destinada al análisis de melamina en leche líquida, yogurt, leche entera en polvo, harinas de pescado y pescado, añadiéndosele 1mL de ácido tricloroacético al 10 %, 7 mL de agua desionizada y 1 mL de cloroformo, centrifugado y extraído en 15 mL de polipropileno. Los picos fueron identificados por comparación del tiempo de migración de melamina en muestras reales, así como por el máximo de absorción de longitud de onda. Los resultados cuantitativos y los porcentajes de recuperación del método, que se determinaron mediante la adición de diferentes cantidades de melamina a la matriz de la muestra fueron considerables ^[19].

5.- OBJETIVOS

Objetivo general:

El objetivo fundamental del presente trabajo, estuvo enfocado al desarrollo de una metodología para la determinación de melamina en leche en polvo, en el contexto de establecer si dicho compuesto había sido empleado en la adulteración del contenido proteico de la misma. Dicha metodología, debe ser simple en el tratamiento de la muestra y posterior análisis, todo esto con la finalidad, de obtener una respuesta rápida y concluyente, al ser aplicado a productos comercializados por los proveedores nacionales. La técnica a emplear fue la cromatografía líquida de alta eficiencia, con detección por espectroscopía molecular UV.

Objetivos específicos:

- Revisión bibliográfica de los métodos cromatográficos empleados para la determinación de melamina en leche.
- Desarrollo de un procedimiento experimental a manera preliminar, para tratar de adecuar condiciones de separación cromatográfica, en el análisis de melamina por HPLC, con detección UV. Para ello, se emplean solo patrones de melamina.
- Optimización del procedimiento cromatográfico, empleando un extracto de leche alterado con una cantidad conocida de melamina. Se determinan parámetros de interés.

- Construcción de las curvas de calibración y evaluación el método del sistema de tratamiento de muestra y medida. Aplicación del sistema para la evaluación de melamina en leches en polvo de comercialización nacional.

6.- PARTE EXPERIMENTAL

6.1.- Descripción de los equipos y reactivos utilizados

6.1.1.- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia

Cromatógrafo líquido de alta eficiencia marca Agilent, modelo 1100.

En la figura 3 se muestra un esquema del equipo de HPLC utilizado para la separación y cuantificación de melamina en leche.

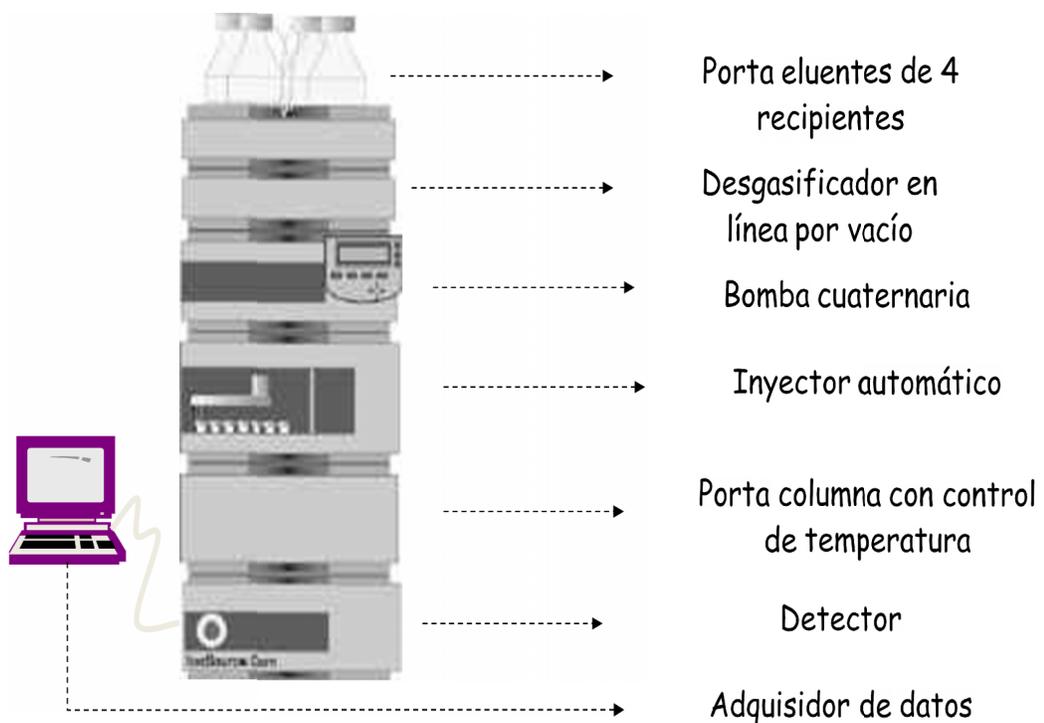


Fig. 3.- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Agilent, modelo 1100.

6.1.2.- Columna cromatográfica

Columna marca Merck, modelo HILIC-ZIC ® SeQuant™.

De 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro.

Tamaño de partícula de 4 µm y de 200 Å de poro.

6.1.3.- Agitador Mecánico (Vortex)

Agitador mecánico Vortex, marca thermolyne, modelo MAXI MIN, Plus™. Ver figura 4.



Fig. 4.- Agitador mecánico, modelo MAXI MIN, Plus™.

6.1.4.- Centrifuga

Centrifuga, marca THERMO electro corporation, modelo IEC centra CL2. Ver figura 5.

Especificaciones:

- Trabaja a un máximo de 8500 RPM.
- Acepta volúmenes de muestra 15-50 mL.



Fig. 5.- Centrífuga, modelo IEC centra CL2.

6.1.5.- Ultra-Centrífuga

Ultra-Centrífuga, marca Hettich Zentrifugen, modelo MIKRO 22R. Ver figura 6.

Especificaciones:

- Trabaja a un máximo de 22000 RPM.
- Acepta volúmenes de muestra de 0,2-2,0 mL.



Fig. 6.- Ultra-Centrífuga, modelo MIKRO 22R.

6.1.6.- Ultra-Sonido

Ultra-Sonido, marca Cole-Parmer, modelo US 8890. Ver figura 7.



Fig. 7.- Ultra-Sonido, modelo US 8890.

6.1.7.- Espectrofotómetro UV-Visible

Thermo Electron Corporation, modelo Genesys 10 uv. Ver figura 8.
Ancho de banda 5 nm, de un solo haz.



Fig. 8.- Espectrofotómetro UV, modelo Genesys 10uv.

6.1.8.- Agua 18 MΩ

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada de 18,0 MΩ, marca Thermolyne® modelo NANO pure. Ver figura 9.



Fig. 9.- Desionizador 18 MΩ, modelo NANO pure.

6.1.9.- Estándar de Melamina

Las disoluciones de melamina se realizaron con un estándar de melamina (Donado por Laboratorios Laminova, >99% de pureza). Se preparó una disolución de 1000 mg/L en agua-metanol, y a partir de ella se realizaron diluciones para preparar los diferentes patrones.

6.1.10.- Reactivos genéricos

Acetonitrilo (CH_3CN), marca Merck, Darmstadt, Alemania, 99% de pureza.

Acetato de Amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), marca Fisher Chem Alert, grado HPLC al 98.2% de pureza.

Acido Perclórico (HClO_4), marca Riedel-de Haën, Alemania, 75% de pureza y se trabajó a una concentración de 2.5% v/v.

6.-2 Metodología experimental

6.2.1.- Escogencia del modo de separación de melamina por HPLC

La primera fase de este estudio, consistió en hacer una evaluación bibliográfica del modo de separación por HPLC más acorde para la separación de melamina en leche. La retención cromatográfica de la melamina por HPLC está determinada por su fuerte carácter polar e hidrofílico (inherente a la misma), tales propiedades nos lleva a pensar que para este tipo de compuesto, el modo de separación más conveniente sería la Cromatografía Líquida de Fase Normal (NPLC, Normal Phase Liquid Chromatography). Sin embargo, de la revisión bibliográfica se encontró, que los modos de separación más empleados para la determinación de melamina son: la Cromatografía Líquida de Fase Inversa (RPLC, Reverse Phase Liquid Chromatography) y la Cromatografía de Intercambio Iónico (IC, ion-exchange Chromatography). La causa fundamental de no emplear fase normal, es el hecho de que NPLC utiliza fases móviles no acuosas, lo cual dificulta la solubilidad de dicho compuesto y otros componentes de la matriz de la muestra.

De los modos mencionados anteriormente para la determinación de melamina en leche, RPLC es el más frecuentemente empleado, pero como indicamos en el párrafo anterior, la retención de dicho compuesto por esta metodología está determinada por su estructura altamente polar, su fácil ionización y sus propiedades hidrofílicas, conllevando a la formación de derivados para su análisis. De manera tal, que RPLC con la formación de pares iónicos, es la metodología por excelencia para la separación de melamina.

Por otra parte, entre las dificultades para la determinación de melamina por RPLC con pares de iones, es la necesidad de un método previo de tratamiento de la muestra (purificación) ^[20], promovido por la gran cantidad de compuestos interferentes provenientes de la matriz. El tratamiento incluye la extracción en fase

sólida (SPE, Solid Phase Extraction), empleando una resina de intercambio catiónico fuerte, y seguidamente la evaporación de los solventes. Estas etapas previas, generalmente son laboriosas, requieren de tiempo adicional y mayor cantidad de consumibles, además de presentar las típicas dificultades de posibles pérdidas.

En tales circunstancias, optamos por un modo de separación “relativamente nuevo”, conocido como Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica. El cual es un método de separación para compuestos altamente polares e hidrofílicos, sin necesidad del cambio de su estructura química original (formación de derivados) y por otra parte, mediante esta metodología no se requiere de tratamientos extensivos previos, para este tipo de muestras. Cabe destacar, que en los planteamientos iniciales no estaba programado el empleo de esta modalidad cromatográfica, por lo tanto a continuación haremos una breve descripción del modo de separación por Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica. Esto a su vez, nos ayudó a tener juicios más claros al momento de hacer los cambios físico-químicos necesarios para mejorar la separación cromatográfica.

6.2.2.- Modo de separación por Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica

Introducción

Es bien conocido que la mayoría de las aplicaciones de separación cromatográfica de HPLC se realizan por el modo de RPLC, pero ciertos analitos, especialmente los altamente polares e hidrofílicos no son retenidos de una manera simple. Para solventar estos inconvenientes es favorable emplear la cromatografía de fase normal, sin embargo, en NPLC se emplean fases móviles no acuosas, lo cual dificulta la solubilidad de compuestos muy polares e hidrofílicos. En este orden de ideas, para resolver este tipo de inconvenientes han surgido otras alternativas, como lo es, el modo de separación relativamente nuevo, conocido como Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica (HILIC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography).

HILIC es una metodología muy similar a la tradicional NPLC, pero con la diferencia muy importante que emplea fases móviles semi-acuosas. Consecuentemente, en lo relativo a la solubilidad del analito en el eluyente y compatibilidad con la matriz es superior.

Se puede decir que HILIC es un modo de separación del tipo fase normal, pero utiliza eluentes del tipo fase inversa, donde el orden de elución es aproximadamente contrario al de RPLC. Un compuesto que eluye en el volumen muerto en una columna de RPLC, normalmente tiene alta retención en HILIC y viceversa, véase la figura 10.

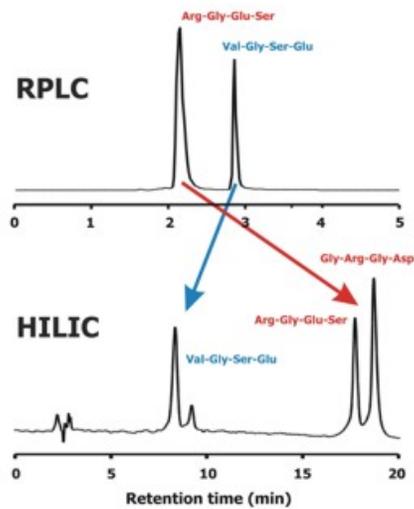


Fig. 10.- Orden de elución por RPLC Vs HILIC.

Cabe destacar que numerosos compuestos son posibles de separar por más de un modo cromatográfico, de manera que HILIC se superpone en sus aplicaciones con RPLC, NPLC e IC. En la figura 11 se ilustra el solapamiento entre los diferentes modos de separación cromatográficos. Sin embargo, compuestos que son problemáticos de separar por RPLC e IC como ácidos, bases, iones, azúcares, compuestos cargados y neutros hidrofílicos, son mucho más fáciles de separar por HILIC. Esto último, debido a la diferencia de selectividad de este modo de separación.

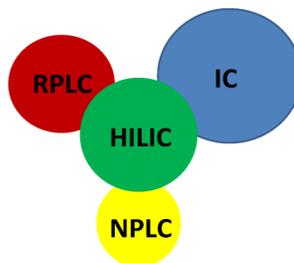


Fig. 11.- Superposición de los diferentes modos de separación por HPLC

Características del sistema

El mecanismo de separación por HILIC se basa en que la retención es causada por un reparto de las moléculas del analito entre el eluente (fase móvil) y una capa líquida enriquecida con agua de la fase estacionaria hidrofílica. A diferencia de la mayoría de los otros modos de HPLC, la fase móvil (una fracción) es parte integral de la fase estacionaria, por lo tanto, es crucial mantener una proporción de agua en el eluente (típicamente entre 3 y 60 %).

Cuanto más hidrofílico es el analito, mayor es el desplazamiento del equilibrio hacia la capa de agua inmovilizada en la fase estacionaria, y por lo tanto, presentará mayor retención. La principal función de la fase estacionaria es conservar el agua "atrapada" en la misma y dependiendo de la fase móvil, la fase estacionaria estará doblemente cargada formando un zwitterión, véase figura 12 (*zwitterión, del alemán "zwitter" "híbrido", "hermafrodita", es un compuesto químico que es eléctricamente neutro pero que tiene cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes. Los zwitteriones son especies polares y usualmente presentan una elevada solubilidad en agua y bastante baja en muchos disolventes orgánicos de carácter apolar*).

Lo expreso en el párrafo anterior, origina una subdivisión del modo de separación de HILIC, conocido como Zwitterionic HILIC.

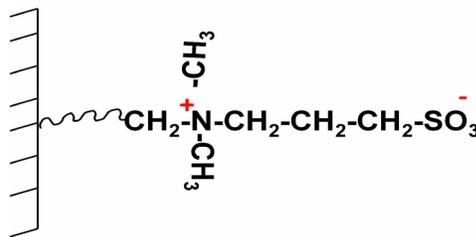


Fig. 12.- Grupo funcional de Zwitterionic-HILIC.

Mecanismo de separación

En cuanto a las fuerzas que gobiernan la retención, hay estudios que apuntan hacia un mecanismo de separación multimodal ^[21], como la formación de puentes de hidrógeno (dependiendo de la acidez o basicidad de los solutos), interacciones dipolo-dipolo (dependiendo del momento dipolar y la polarizabilidad de los solutos) y también puede ser influenciada por interacciones electrostáticas (inter-iónicas, ión-dipolo). Véase figura 13.

Para HILIC se emplean columnas con fases estacionarias hidrofílicas y eluentes en base agua, buffer y una alta concentración de un disolvente orgánico, miscible con agua (modificador orgánico). La retención y la selectividad en HILIC se verán afectados por el ajuste del eluente, mediante: 1^o la variación del modificador orgánico (tipo y concentración), 2^o el buffer (tipo y concentración) y 3^o el pH.

La “fuerza” del eluente es inversa a la observada para las separaciones por RPLC y en orden relativo de los disolventes más empleados se puede representar de la siguiente manera:

Acetona < iso-propanol ≈ propanol < acetonitrilo < etanol < metanol < agua

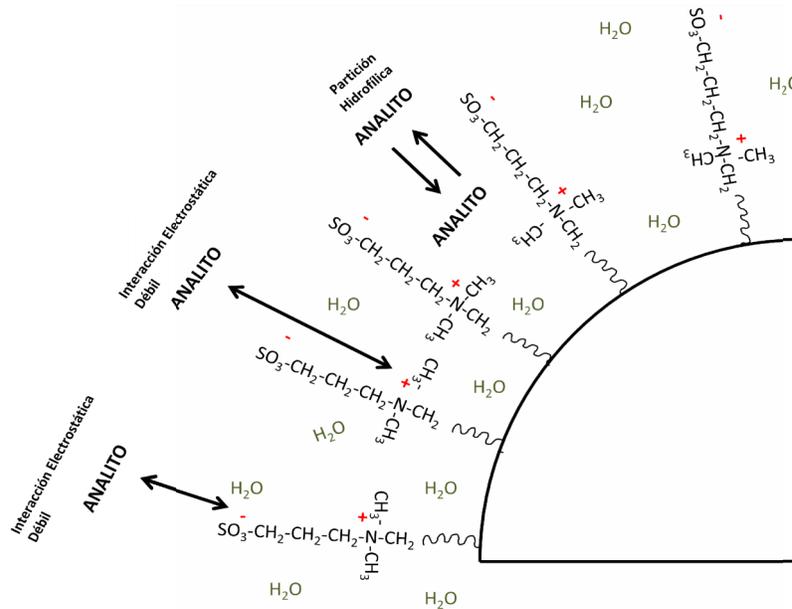


Fig. 13.- Ilustración del proceso de retención por HILIC.

Acetonitrilo es uno de los solventes que provee un mayor incremento en la retención en comparación con otros solventes orgánicos [21]. Por otra parte, proporciona una mayor solubilidad para muchos compuestos, excelente miscibilidad con el agua, buena retención y baja viscosidad, de manera tal, que el acetonitrilo es típicamente la primera opción como modificador orgánico para HILIC. Sin embargo, otros disolventes orgánicos polares como el metanol, etanol, propanol, isopropanol, dioxano, acetona y DMF, también pueden ser utilizados.

El factor de retención (k) aumenta con el incremento de la fracción del disolvente orgánico y en la figura 14 se ilustra este efecto. En el caso del acetonitrilo, el cambio en k es exponencial, con ligeros cambio del solvente, especialmente en la zona de alta proporción de modificador orgánico (mayor del 80 % de acetonitrilo).

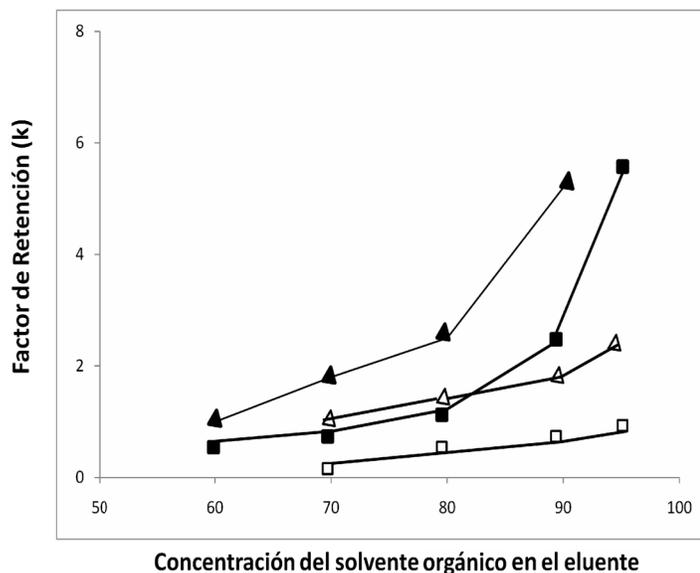


Fig. 14.- Efecto del modificador orgánico sobre la retención (k) en función de la concentración del acetonitrilo (símbolos rellenos) y metanol (símbolos sin rellenar). Columna Merck, Zic-HILIC de 150 x 4,6 mm. Leyenda: Citosina (triángulos), Adenina (cuadrados).

Para obtener resultados reproducibles se recomienda conservar al menos 3 % de agua en la fase móvil, en orden de mantener suficientemente hidratada las partículas de fase estacionaria [21].

El pH afecta la retención, ya que una molécula ionizada es más hidrófila y es más fuertemente retenida en HILIC, en comparación a su estado neutral. Por lo tanto, el pH es un factor importante, en vías de mantener las especies en la forma química más adecuada para su separación.

Los amortiguadores comúnmente recomendados son sales amoniacales de acetato y formiato, con sus respectivos ácidos, para ajustar el pH. Esto debido, a su excelente solubilidad en altas concentraciones de solventes orgánicos. También es posible emplear buffer de fosfatos, pero teniendo la precaución de su posible precipitación, además de su alta absorción en UV. El rango típico de pH está entre

3 y 8 para columnas HILIC base sílice y entre 2 y 10 para columnas HILIC base polimérica.

En lo que a la fuerza iónica del eluente respecta (concentración del buffer), en el caso que no haya interacción iónica entre la fase estacionaria y el analito, los compuestos hidrofílicos y polares, presentan mayor retención con el incremento de la fuerza iónica del eluente (ligeramente). Por otra parte, si hay interacción iónica, la retención decrece con la fuerza iónica del eluente. Por lo tanto, la fuerza iónica es una variable a tener en cuenta a la hora de realizar una separación adecuada ^[21].

En promedio, para HILIC la concentración del buffer debería estar en el rango de 5 a 45 mM, dependiendo de su solubilidad en el eluente. No es requerido de altas concentraciones de buffer, como es el caso de IC y RPLC con pares de iones. Una aplicación típica de HILIC utiliza acetonitrilo en una concentración entre 50-95 % en un búffer de acetato de amonio en el orden de 5 a 45 mM ^[21].

El gradiente de elución, el cual tiene la función de optimizar la separación de solutos que poseen un amplio rango de factores de retención (durante una misma corrida), posee la particularidad de que la columna debe ser reequilibrada con la concentración de partida del eluente, antes de realizar la próxima inyección. En el caso de HILIC, el gradiente es realizado mediante el aumento de la polaridad de la fase móvil, es decir un decrecimiento de la concentración del modificador orgánico (dirección opuesta al modo de RPLC). Con fases estacionarias cargadas, también es posible incrementar la concentración del buffer durante la realización del gradiente, a manera de disminuir las interacciones electrostáticas del soluto ^[21].

La literatura enfatiza ^[21], que la fase estacionaria en HILIC es menos tolerable a gradientes rápidos y a restablecer el equilibrio, con respecto a RPLC. Esto se debe a que el agua de la capa acuosa de la fase estacionaria es originada por el eluente y dependiente de su composición. Por otra parte, las caídas de presión

van aumentando durante el incremento del gradiente, es por ello que se requieren de solventes de baja viscosidad, como el acetonitrilo.

En cuanto al efecto de la temperatura sobre la columna, en las separaciones HILIC su consecuencia es a menudo muy pequeña, por lo general menos que en RPLC, pero en última instancia, depende de la naturaleza de la molécula retenida [21].

Cabe destacar que con fases estacionarias que cambian sus propiedades en función de las características del eluente (como es el caso de HILIC), existe una relación compleja de la retención, haciendo muy difícil predecir y optimizar la separación. La comprensión del mecanismo de retención por HILIC está aún en estudio y muchas de las ideas discutidas anteriormente parten de suposiciones o apreciaciones empíricas.

6.2.3.- Condiciones cromatográficas de partida para la determinación de melamina

Una vez evaluado el modo de separación de HPLC a utilizar, la siguiente etapa del procedimiento experimental, consistió a manera preliminar, en adecuar condiciones de separación cromatográfica, para el análisis de melamina en leche, empleando el modo de separación del tipo Zwitterionic HILIC.

Como mencionamos anteriormente, la fase móvil para la mayoría de las aplicaciones por HILIC, es acetonitrilo-agua, con una proporción del modificador orgánico que puede variar del 40 al 97 %, y un buffer ligeramente volátil (normalmente acetato de amonio). En nuestro caso en particular, partimos de ciertas condiciones cromatográficas reportadas por la literatura [21], las cuales fueron empleadas para la separación de compuestos con propiedades físico-

químicas similares a las del analito de interés (compuesto altamente polar-hidrofílico).

En este ensayo preliminar, empleamos patrones puros de melamina hasta encontrar una retención cromatográfica relativa aceptable. Partimos de una concentración relativamente baja de solvente orgánico en la fase móvil, y la fuimos modificando hasta obtener un cromatograma en un tiempo de retención correspondientemente moderado. Después de una serie de ensayos, las condiciones cromatográficas preliminares fueron las siguientes:

Columna: Sec-Quant ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm, 4 μm /200 Å)

Fase móvil: Acetonitrilo-Agua 70/30 (5,0 mM de acetato de amonio)

Flujo: 0,5 mL/min

$\lambda = 254 \text{ nm}$

Vol inyección: 25 μL

El cromatograma obtenido para un patrón de melamina se muestra en la figura 15.

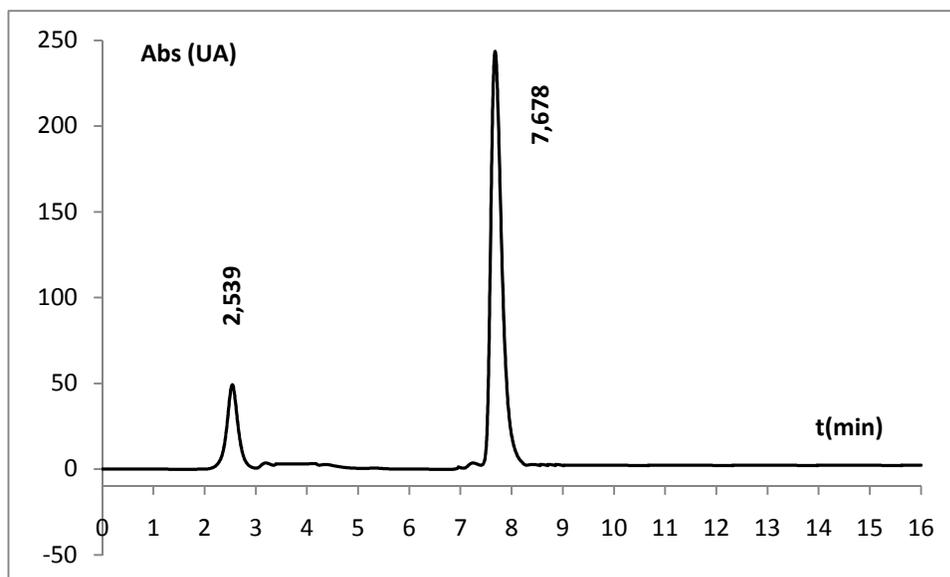


Fig. 15.- Cromatograma preliminar del patrón de melamina.

El tiempo de retención encontrado para el patrón de melamina fue de 7,678 min. Por otra parte, hallamos una pequeña banda a 2,539 minutos, la cual asumimos que corresponde al solvente de la melamina (agua-metanol), que se separa de la misma y probablemente no es retenida por la fase estacionaria. A esta señal le adjudicamos el valor correspondiente al tiempo muerto (t_0 , tiempo que tarda un analito que no interactúa con la fase estacionaria, desde el momento de la inyección hasta que alcanza el máximo de la banda de elución cuando llega al detector). Por lo tanto, el factor de retención (k) para la melamina fue de 2,03, que para un ensayo preliminar, se puede considerar una retención satisfactoria (entre 1 y 10).

El siguiente paso consistió en hacer un tratamiento de extracción “preparatorio” de una leche que asumimos que no contenía melamina (producto importado, garantizado). La idea fundamental fue establecer, si bajo las condiciones cromatográficas anteriormente descritas, algún componente del extracto de la leche, podía coeluir con la melamina.

El cromatograma obtenido del extracto de leche, bajo las condiciones cromatográficas anteriormente descritas se muestra en la figura 16. Se puede observar, la aparición de una serie de bandas, y una de ellas en las cercanías de la señal en estudio (7,197 min).

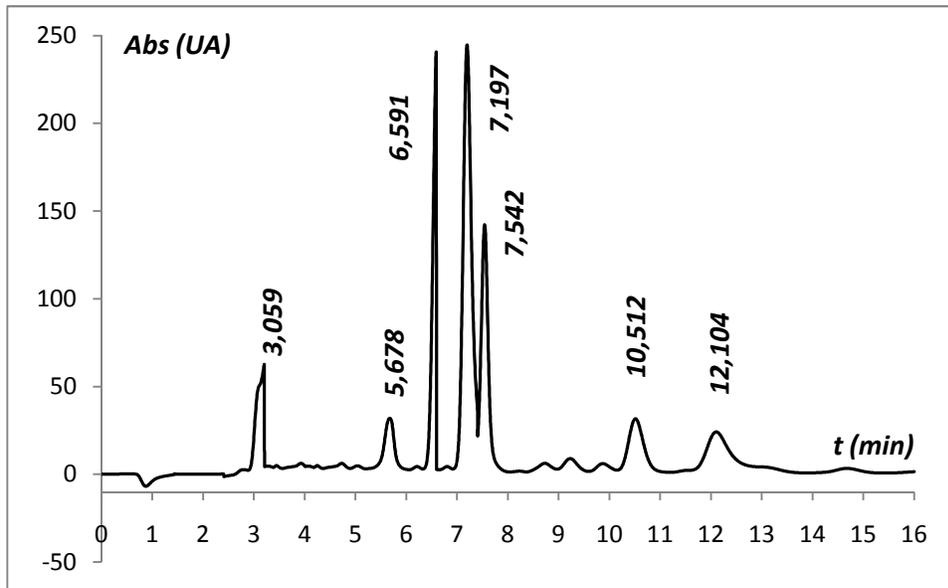


Fig. 16.- Cromatograma del extracto de leche sin alteración con melamina.

Seguidamente, para comprobar la posible interferencia, se procedió añadirle al extracto una cantidad conocida del patrón de melamina. La alteración fue realizada en la etapa final de la extracción, procedimiento conocido como post-spiked (alteración a posterior del tratamiento de muestra). Después de varios ensayos, se escogió una concentración del patrón que al diluirlo en el extracto de leche, las bandas interferentes quedaran en la misma proporción (aproximadamente), el cromatograma se muestra en la figura 17.

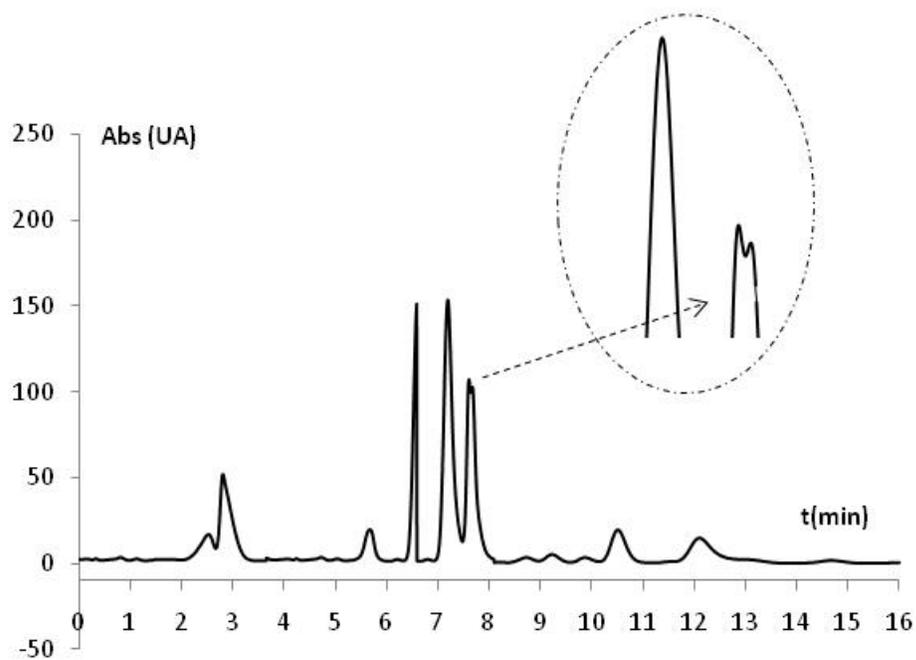


Fig. 17.- Cromatograma del extracto de leche alterado con melamina.

Al observar el cromatograma de la figura 17, se puede concluir que las condiciones preliminares no son satisfactorias, ya que se nota un solapamiento muy grande de una banda proveniente del extracto de leche con la banda de la melamina. Por lo tanto, se procedió a reajustar las condiciones operativas en el cromatógrafo, hasta obtener la mejor separación de melamina en el extracto de leche.

6.2.4.- Reajuste de las condiciones cromatográficas para la determinación de melamina en leche

La optimización del proceso de separación es un equilibrio entre la selectividad de la columna (k , α , factores termodinámicos) y la eficiencia de la misma (N , H , factores cinéticos). La performance de ambos factores puede ser medida a través de la resolución (R). En nuestro caso en particular, solo es posible modificar los

parámetros termodinámicos, ya que partimos de una columna “estándar” (150 x 4,6 mm, 4 μ m/200 A°), con condiciones de empaque garantizada por el fabricante. Por lo tanto, procedimos a variar solo las condiciones de selectividad en la columna (características del eluente y flujo volumétrico).

Concentración del modificador orgánico

Es importante recordar, que el mecanismo de retención por el modo HILIC es principalmente dependiente de la partición hidrofílica entre la fase estacionaria enriquecida con una capa de agua y la fase móvil menos polar, por lo tanto, se espera que un aumento del contenido del solvente orgánico (acetonitrilo) en la fase móvil, produzca un aumento del factor de retención de la melamina.

Ya que en este caso, la optimización del contenido acetonitrilo es una armonía entre un tiempo de retención moderado y una resolución adecuada, se consideró el estudio de un gradiente lineal de elución del 90 al 50 % de acetonitrilo en agua, como una forma de buscar la mejor separación, con la menor interferencia matricial y en el menor tiempo posible. Sin embargo, en los primeros ensayos y antes de lograr la forma del gradiente más apropiado, notamos que era necesario de un tiempo extremadamente largo para restablecer el equilibrio necesario al nivel básico inicial. Por lo tanto, la elución por gradiente no se consideró una opción para la separación de melamina en leche. En vista a lo anteriormente planteado, optamos por pruebas con eluciones isocráticas.

De la prueba preliminar, optamos por emplear una proporción del modificador orgánico por encima del 70 %, y después de numerosos ensayos, una separación de 30 minutos con eluente de acetonitrilo-agua 85/15 % fue considerada la mejor opción. Una mayor proporción en acetonitrilo de la relación anteriormente descrita, condujo a un desmejoramiento notable de las condiciones cromatográficas, fundamentalmente por los largos tiempos de retención y anchos de bandas.

Una vez encontradas las condiciones optimas de la proporción de acetonitrilo, se procedió a inyectar el extracto de leche sin alteración con melamina y de esta manera comparar con el cromatograma del extracto no alterado. El cromatograma del extracto de leche no alterado con melamina se presenta en la figura 18 y el extracto alterado en la figura 19.

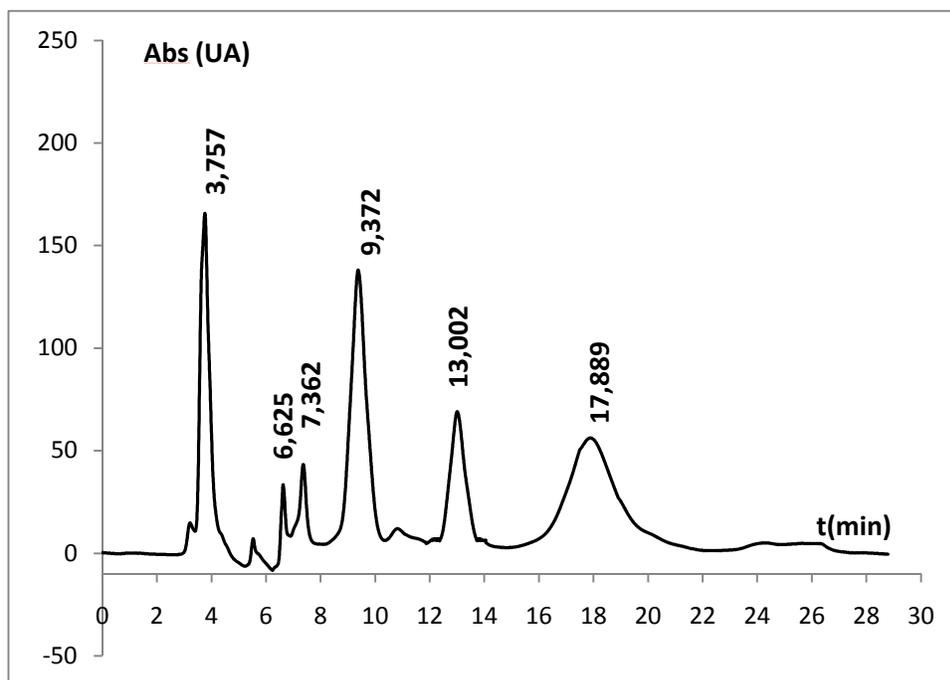


Fig.18.- Cromatograma del extracto de leche bajo las condiciones cromatográficas, 85-15 % Acetonitrilo-agua y 5,0 mM de Acetato de Amonio.

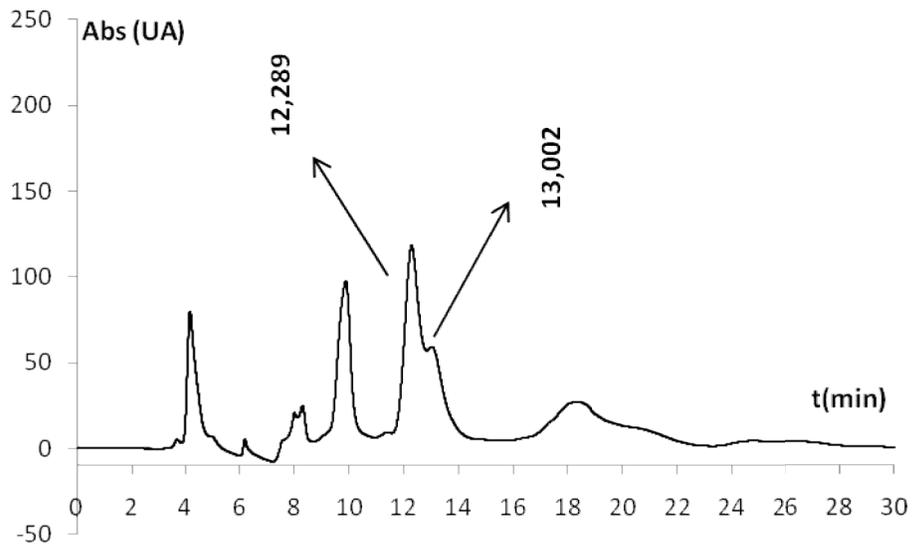


Fig. 19.- Cromatograma del extracto de leche contaminado con melamina bajo las condiciones cromatográficas, 85-15 Acetonitrilo-agua a 5,0 mM de Acetato de Amonio.

En el cromatograma correspondiente al extracto de leche sin alterar con melamina (figura 18), se observan aproximadamente el mismo número de bandas que presentó el cromatograma del ensayo preliminar, por supuesto con las bandas mucho más espaciadas.

En el cromatograma del extracto de leche alterado con melamina (figura 19) podemos observar una banda adicional en un tiempo de retención de 12,189 minutos, el cual debe corresponder a la melamina. Dicha banda presenta un solapamiento con otra correspondiente a los 13,002 minutos, a pesar de que la diferencia de los tiempos de retención entre ambas bandas es aproximadamente de un minuto, aún se existe una relativa superposición.

Si partimos del hecho que el tiempo muerto no debe variar, ya que el flujo se mantuvo constante a 0,5 mL/min, entonces el factor de retención de la melamina correspondió a 3,8. Este valor es aproximadamente a dos veces mayor al de la

condición preliminar (2,03 Vs 3,84). Esta fuerte variación en el factor de retención se debe en que nos encontramos en la zona de variación exponencial de k en función de la concentración del modificador orgánico (véase figura 14).

Hay que destacar que el solapamiento se ve acrecentado en la medida que la concentración de melamina es mayor, en este caso en particular la concentración de melamina estaba en el orden de 5,00 mg/L, para ensayos posteriores fue conveniente emplear patrones de menor concentración de melamina.

Concentración de la fuerza iónica del eluente

Partimos de una concentración inicial de un buffer de acetato de amonio 5 mM y la fuimos aumentando gradualmente hasta una concentración final de 45 mM. El pH se mantuvo a 6,8 unidades. Observamos que en la medida que aumentábamos la concentración del buffer, los tiempos de retención variaban muy ligeramente, pero el ancho de las bandas disminuyeron, lo que conllevó finalmente a una mejor separación.

La condición óptima fue a una concentración de 25 mM de acetato de amonio, el cromatograma se observa en la figura 20. Concentraciones por encima de este valor, las bandas cromatográficas presentaron una fuerte deformación (asimetrías).

La literatura reporta ^[21], que en el caso que no haya interacción iónica entre el analito y la fase móvil, los compuestos polares e hidrofílicos manifiestan muy ligeros cambios de la retención con un incremento de la fuerza iónica del eluente (concentración del buffer). La razón es que el incremento de la concentración de la sal, promueve un enriquecimiento del agua sobre la fase estacionaria. Por otra parte, si hay interacción iónica entre ambas especies, la retención decrece con la

fuerza iónica del eluente, debido a la competición del analito con los iones del buffer por los sitios activos de la columna.

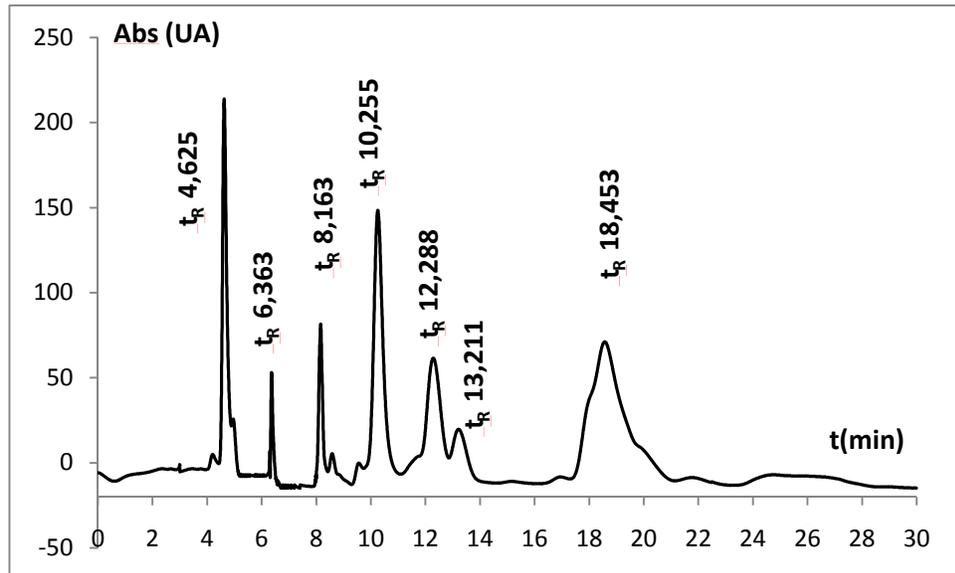


Fig. 20.- Cromatograma del extracto de leche bajo las mejores condiciones de 85-15 Acetonitrilo-agua a 25,0 mM de Acetato de Amonio.

Cuando la fuerza iónica se incrementó, la retención para la melamina decreció aunque muy ligeramente. Por lo tanto, pudiera significar que la interacción electrostática de la melamina con los grupos zwitterionic son muy débiles a las condiciones de pH (6,8 unidades).

Por otra parte, observamos que en la medida que aumentamos la fuerza iónica de 5 a 25 mM, la banda de melamina resultó ligeramente más estrecha, lo cual mejora ligeramente la resolución con respecto a la banda interferente. No poseemos una explicación satisfactoria, para tal compartimiento, aunque es posible atribuir al rompimiento de la débil interacción iónica entre la melamina y los

grupos sulfónicos de la fase estacionaria, corrigiendo la cola (tailing) de la banda cromatográfica.

Una vez modificado los parámetros de composición de la fase móvil, la siguiente etapa consistió en la modificación del flujo volumétrico, a ver si podíamos obtener una mejor resolución de la señal cromatográfica.

Selección del flujo volumétrico de fase móvil

Las condiciones de partida del flujo de fase móvil fue de 0,5 mL/min, que para una columna de 150 cm de longitud y un diámetro de 4,6 mm, pudiéramos decir que es un flujo típico ^[21]. La ecuación de *Van Deemter* establece que el flujo es una condición de compromiso, es decir, que hay un flujo óptimo donde la altura equivalente de plato es mínima. Por encima o por debajo de esta condición, la resolución cromatográfica puede empeorar. En este orden de ideas, se realizaron ligeros cambios del flujo, (por debajo y por encima) no encontrándose mejoras de la resolución. Por lo tanto, optamos por mantener la condición de flujo a 0,5 mL/min.

Volumen de inyección de muestra

Se emplearon distintos volúmenes de inyección, en aras de encontrar la mejor sensibilidad, sin producir la saturación de la columna y el detector. Se ensayaron los volúmenes de 25, 50 y 100 μL , con un patrón de moderada concentración. Se observó que por encima de 50 μL , la señal tendía a saturarse, por lo tanto optamos por este valor.

Selección de la longitud de onda de trabajo

Con la composición final del eluente, se procedió a optimizar la longitud de onda de trabajo. Para ello, con espectrofotómetro UV-visible convencional y con la

composición final del eluente, se procedió a realizar para el barrido de longitudes de onda en el ultravioleta. Con la composición del eluente procedimos a hacer el blanco (valor de offset) y posteriormente hicimos el barrido con un patrón de melamina disuelto en el eluente. El barrido se muestra en la figura 21.

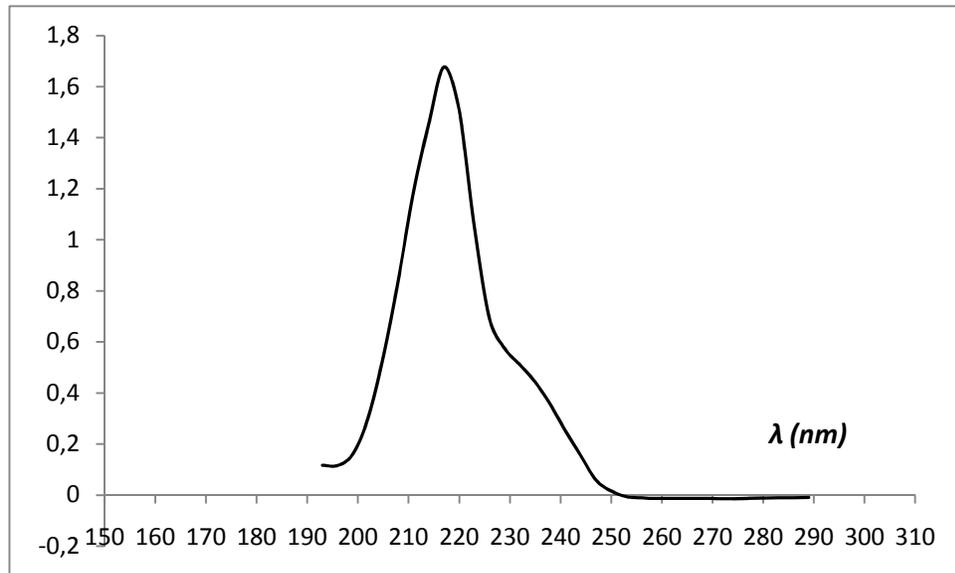


Fig. 21.- Barrido de longitudes de onda para un patrón de melamina, en un solvente de 85-15 Acetonitrilo-agua a 25,0 mM de Acetato de Amonio.

El barrido indicó, que el máximo de longitud de onda de trabajo está en el orden de los 220 nanómetros, ligeramente menor a la empleada para la mayoría de las publicaciones (240 nm). Esto se debe fundamentalmente a que estamos corrigiendo el fondo con la concentración apropiada del eluente. A su vez esto nos permitió trabajar a una mayor sensibilidad.

Condiciones finales de la separación cromatográfica

Columna: Sec-Quant ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm, 4 μ m/200 A $^\circ$)

Fase móvil: Acetonitrilo-agua 85/15 (25,0 mM de acetato de amonio)

Flujo: 0,5 mL/min

λ = 220 nm

Vol inyección: 50 μ L

El cromatograma de un patrón de melamina, con las condiciones finales de separación se muestra en la figura 22. El tiempo final de análisis fue de 30 minutos. La reproducibilidad en el tiempo de retención estuvo del orden del 0,5 % y en el área es de 3 %, (medidas como coeficiente de variación respectivamente). Aunque el tiempo de retención de la melamina fue de 12,196 minutos, el tiempo real de análisis corresponde 30 minutos (debido a los diferentes componentes de la muestra). El factor de retención correspondió a un valor de 3,89.

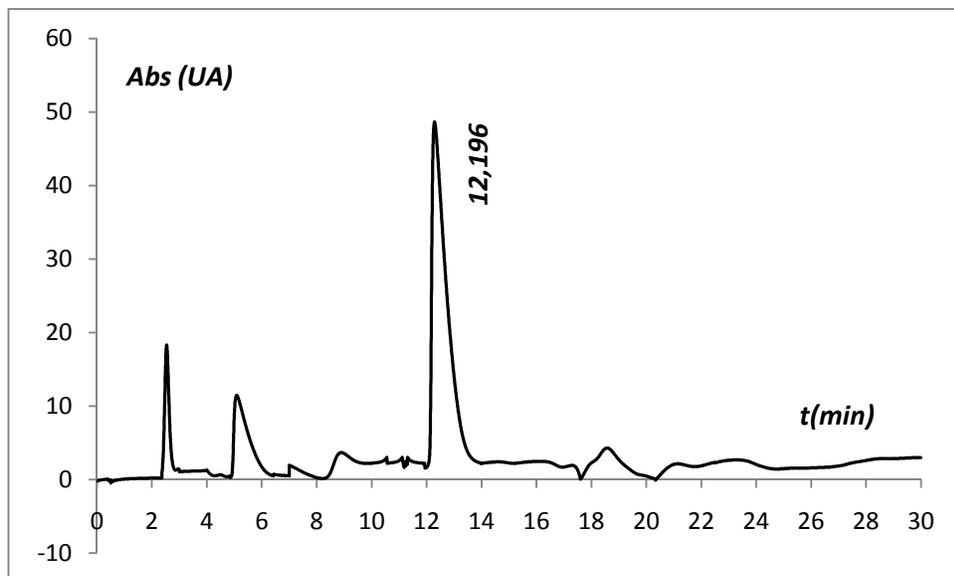


Fig. 22.- Cromatograma de un patrón de melamina en las óptimas condiciones cromatográficas

Los valores de reproducibilidad para el tiempo de retención y el área fueron 0,5 y 3,0 respectivamente, están expresadas como el coeficiente de variación para un N de 5 replica de las medidas.

Se observó una ligera fluctuación en la línea base, y esto se atribuye a que el equipo en determinado momentos presentó desperfectos en la válvula de purga.

6.2.5.- Curvas de calibración de la melamina bajo las condiciones cromatográficas establecidas

Para la realización de las curvas de calibración escogimos dos rangos de concentraciones, la primera para un nivel relativamente alto, de 1 a 20 mg/L (ppm) aproximadamente. La segunda curva se realizó con patrones de menor concentración de 100 a 500 µg/L (ppb) aproximadamente. En la tabla 1 se muestran los resultados de ambos rangos de concentraciones, las medidas de las señales se realizaron por triplicado.

“Patrones Altos”		“Patrones Bajos”	
Conc (mg/L)	Áreas (UA)	Conc (µg/L)	Áreas (UA)
20,46	11973,0	517,0	262,6
20,46	12377,9	517,0	257,0
20,46	12486,5	517,0	275,3
16,73	9774,3	304,9	145,0
16,73	10286,4	304,9	144,3
16,73	10021,1	304,9	150,4
12,06	6992,6	217,4	115,8
12,06	6991,3	217,4	118,8
12,06	6930,2	217,4	114,0
9,13	5282,6	125,8	40,41
9,13	5417,7	125,8	40,03
9,13	5560,5	125,8	41,72
4,06	2857,7		
4,06	2987,8		
4,06	2867,9		
2,33	1278,7		
2,33	1313,0		
2,33	1380,0		
1,02	583,6		
1,02	568,4		
1,02	559,4		

Tabla. 1.- Se representan las áreas obtenidas en función de los rangos de concentración empleados

Los resultados de la regresión lineal por mínimos cuadrados de ambos rangos de concentración se muestran en las figura 23 y 24 respectivamente.

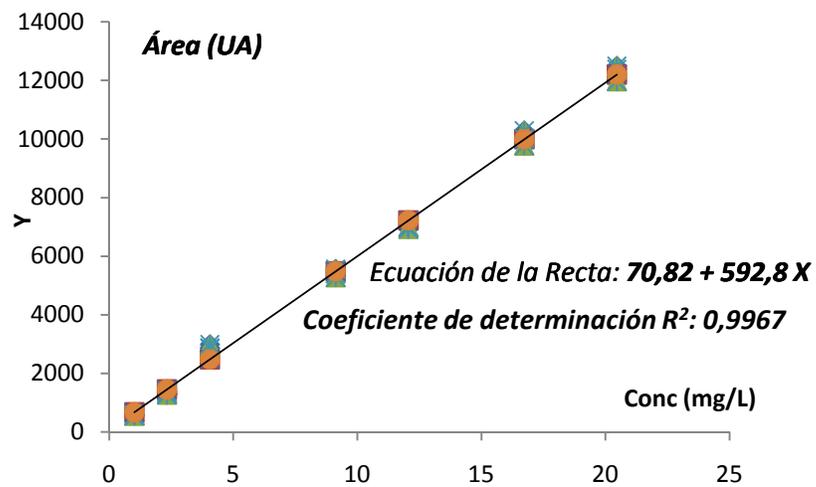


Fig. 23.- Curva de calibración, por ajustes por mínimos cuadrados para el rango de concentraciones de 1 a 20 mg/L.

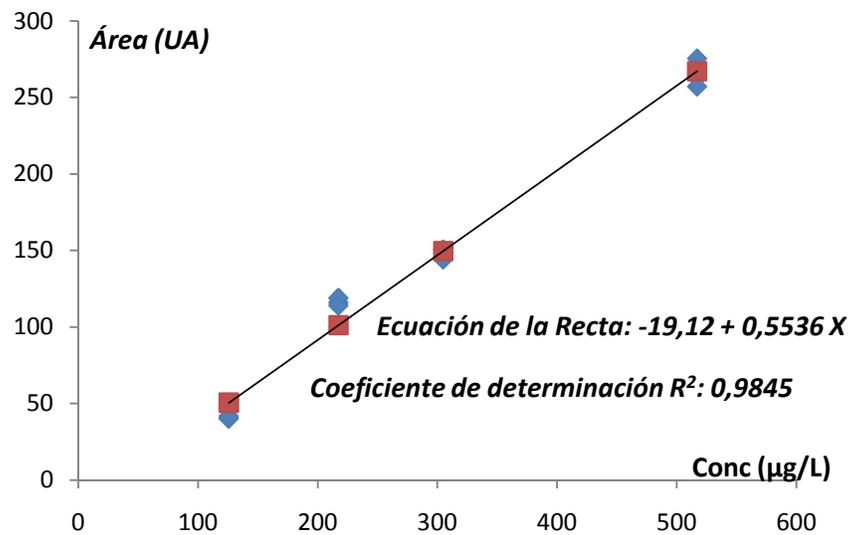


Fig. 24.- Curva de calibración, por ajustes por mínimos cuadrados para el rango de concentraciones de 100 a 500 µg/L.

Los resultados indican, que el rango de concentraciones establecidos de 1 a 20 mg/L, presenta mejor linealidad. La ecuación a emplear va a depender del rango de concentración donde se encuentre las muestras.

6.2.6.- Tratamiento previo de las muestras de leche

El tratamiento de muestra seguido es el mismo que hemos realizado hasta ahora (preliminar), es un procedimiento de extracción por solubilización del analito de interés y precipitación de sustancias indeseadas, el cual fue tomado de la literatura ^[24], pero haciendo ligeras modificaciones, entre ellas la eliminación de un paso de refrigeración, el cual es realizado a una temperatura de 4,0 °C.

En líneas generales, consistió en una primera etapa para la precipitación de las proteínas en medio de ácido perclórico, al cual a su vez ayuda a solubilizar la melamina (al protonar los grupos aminos). Seguidamente se centrifuga y el sobrenadante es diluido en acetonitrilo, posteriormente una alícuota del sobrenadante se centrifugó, pero en una ultracentrífuga a fin de eliminar cualquier partícula en suspensión. Finalmente, es medido en el equipo de HPLC.

A continuación presentamos los pasos detallados el procedimiento de extracción seguido:

1. Se pesó 2,0 gr de leche en polvo (con una precisión del 0,1 mg) y se colocó en un tubo polimérico de centrifuga de 50 mL.
2. Se le añadió 7,5 mL de ácido perclórico (2,5 %) y la agitamos en un vortex para homogeneizar, por 1 minuto aproximadamente.

3. Seguidamente se le añadió 7,5 mL de acetonitrilo, y colocamos nuevamente la disolución en el agitador vortex, por 1 minuto aproximadamente. Esto con la idea de garantizar la solubilidad de la melamina.
4. Esta disolución se colocó en ultrasonido por un tiempo aproximado de 20 minutos.
5. Se centrifugó por 15 minutos a 3900 RPM (revoluciones por minuto). En esta etapa se extrae la melamina en disolución ácida y deben precipitar al fondo del tubo las proteínas.
6. Del sobrenadante se tomó aproximadamente de 0,5 mL de solución y se diluyó con 0,5 mL de acetonitrilo, se llevó al vortex por unos minutos más.
7. Finalmente, se llevó a la ultracentrifuga por 20 minutos a 14000 RPM. El sobrenadante totalmente transparente se transfirió en viales para ser inyectados directamente al cromatógrafo.

6.2.7.- Niveles permitidos de melamina en leche y niveles de contaminación encontrados en leche

El siguiente análisis, nos permitió discernir la cantidad real mínima que debe tener una leche para ser considerada contaminada. Esto a su vez, nos permitió determinar las cantidades mínimas de melamina que deberíamos utilizar para adulterar la leche cruda (pre-spike), en vías de establecer si dicha cantidad podía ser analizada con el procedimiento de extracción y medida anteriormente desarrollado.

Niveles permitidos de melamina en leche

En diciembre de 2008 un grupo de expertos internacionales reunido por la OMS (Organización Mundial de la Salud) ^[22], fijó en 0,2 mg por kg de peso corporal tolerable de melamina en el cuerpo humano (nivel diario). Un bebé de 5 kg pudiera tolerar 1 mg diario y un adulto de 50 kg pudiera tolerar 10 mg, para lo cual pudiera tomar hasta 10 litros de leche diaria si preocupación.

En conclusión la OMS establece, que en leche en polvo para infantes, el valor máximo de melamina es de 1 mg/kg, en leche líquida (incluida leche como materia prima), leche en polvo y otros productos con más de 15 % de leche, el valor máximo de melamina es de 2,5 mg/kg.

Partiendo del hecho, que el máximo permitido de melamina en leche es de 2,5 mg/Kg, significa, que en base al método de extracción y medida propuesto, la concentración en el extracto final debería estar en el rango de 100 a 200 µg/L. Esto implicaría utilizar la segunda curva de calibración y trabajar en el "extremo" de la metodología desarrollada.

Sin embargo, una contaminación correspondiente a 2,5 mg/Kg, no tiene sentido desde el punto de vista de alterar el contenido proteico, ya que eso corresponde a un aumento muy marginal. Por otra parte, aunque con la metodología desarrollada es posible medirlo (con poca precisión), no es el objetivo fundamental de este trabajo.

Niveles de contaminación de melamina encontrados en leche

El principal fabricante lácteo involucrado en el escándalo de contaminación de leche con melamina, fue Zhang Heshe y Zhang Taizhen, los cuales fueron acusados por haber añadido 35 kilos de "polvo de proteínas" a 70 toneladas de leche cruda. Por otra parte, Yang Jingmin y Gu Guoping, agregaron 24 kilos de

esta sustancia a 40 toneladas de leche, y 16,7 kilos a 120 toneladas, respectivamente^[23].

De los casos anteriores, el de menor adulteración corresponde al de 16,7 kilos en 120 toneladas, lo cual significa una concentración de 139 mg/Kg, empleamos este valor como cantidad mínima de contaminación reportada. En base a 139 mg/Kg de melamina en la leche cruda, debe corresponder en el extracto final un valor de 10 mg/L aproximadamente. A continuación evaluaremos el método de tratamiento de muestra y medida propuesto.

En base a lo anteriormente expuesto, la siguiente etapa consistió en alterar la muestra original, antes del tratamiento de extracción (pre-spike) con cantidades similares a lo expuesto anteriormente.

6.2.8.- Muestras de leche alteradas antes del tratamiento de muestra (pre-spike)

La idea fundamental de esta etapa fue alterar una leche que no contenía melamina, con una cantidad conocida de la misma y someterla al proceso de extracción y análisis. Para ello, a 2 gramos de leche (medidos al 0,1 mg precisión) le añadimos una alícuota de un estándar conocido de melamina, de manera tal que la concentración de melamina en la leche correspondiera a 140 mg/L y por consiguiente en el extracto final 10,0 mg/L aproximadamente. Posteriormente lo homogenizamos en un vortex y lo dejamos reposar por varias horas. Seguidamente le hicimos el procedimiento de extracción y medida, el cromatograma se muestra en la figura 25.

De la figura 26 podemos observar que aunque la banda de melamina se encuentra solapada con una banda proveniente de la matriz de la leche, es posible determinar una contaminación del orden de 140 mg/Kg en la leche cruda.

A continuación procedimos a adulterar con diferentes concentraciones de melamina, para observar la potencialidad del método extracción análisis. El la figura 27 se observa una secuencia con las contaminaciones sucesivas de 34,8; 69,5; 139,08 y 278,0 mg/Kg respectivamente.

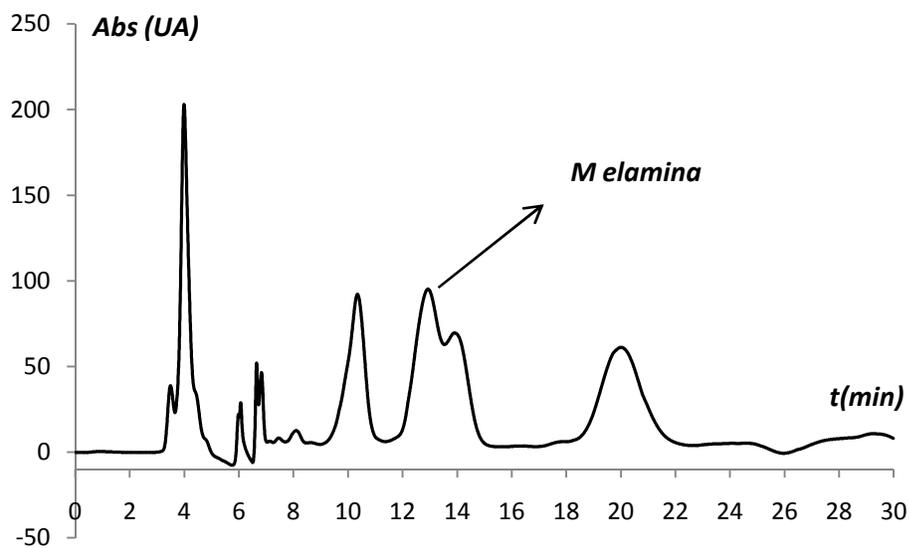


Fig. 25.- Cromatograma de un extracto de leche en las óptimas condiciones cromatográficas

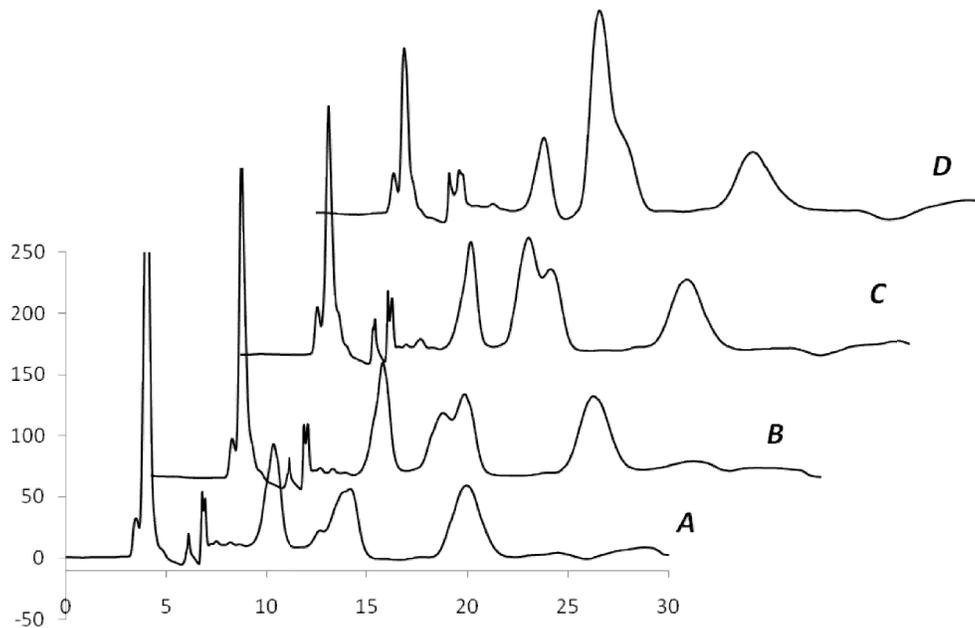


Fig. 26.- Cromatogramas de leche cruda alteradas con melamina, para valores de alteración en la leche cruda de A) 34,8; B) 69,5; C) 139,0 y D) 278,0 mg/Kg respectivamente.

De estos resultados podemos observar, que es posible detectar hasta cantidades de 35 mg/Kg en la leche cruda original. En base a esta información, procedimos a medir las muestras, bajo las condiciones de tratamiento de muestra y medidas desarrolladas anteriormente.

5.2.8.- Muestras de leche de consumo nacional

Seguidamente procedimos a medir cinco muestra de distribución nacional, la denominamos CAMP, CASA, S-S, VZLA y ZM, el cromatograma de cada una de ellas se muestran en las figuras 27, 28, 29, 30 y 31 respectivamente.

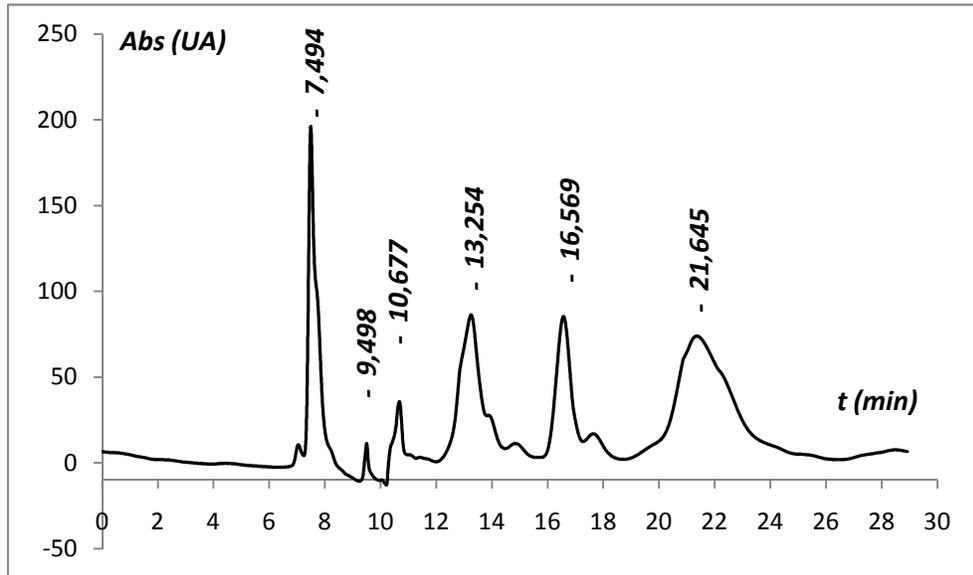


Fig. 27.-Cromatogramas de leche CAMP

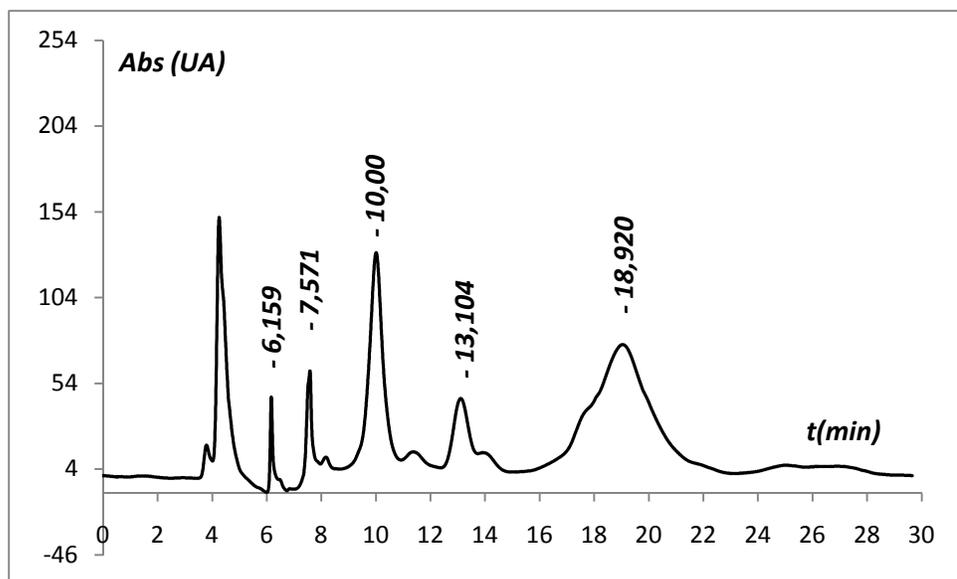


Fig. 28.-Cromatogramas de leche CASA

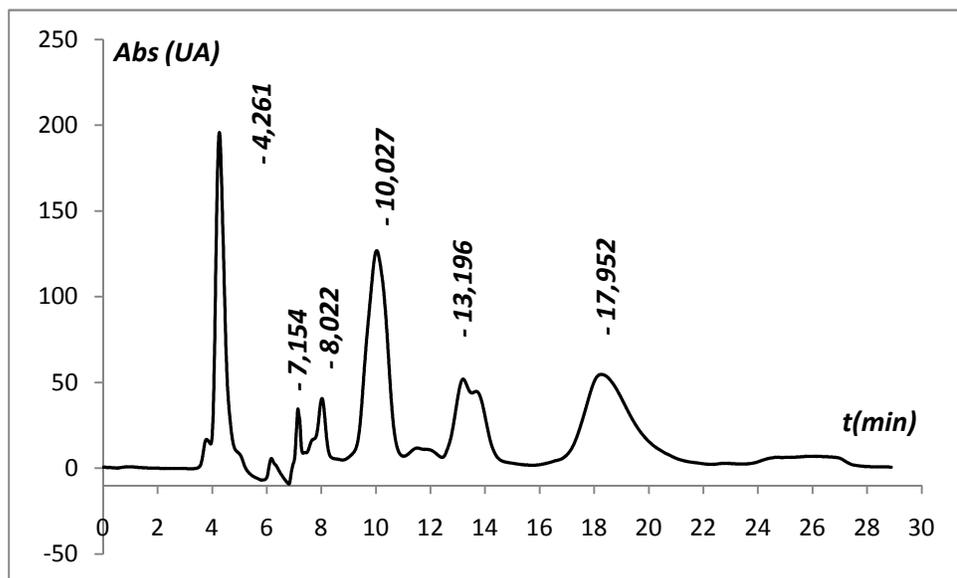


Fig. 29.-Cromatogramas de leche S-S

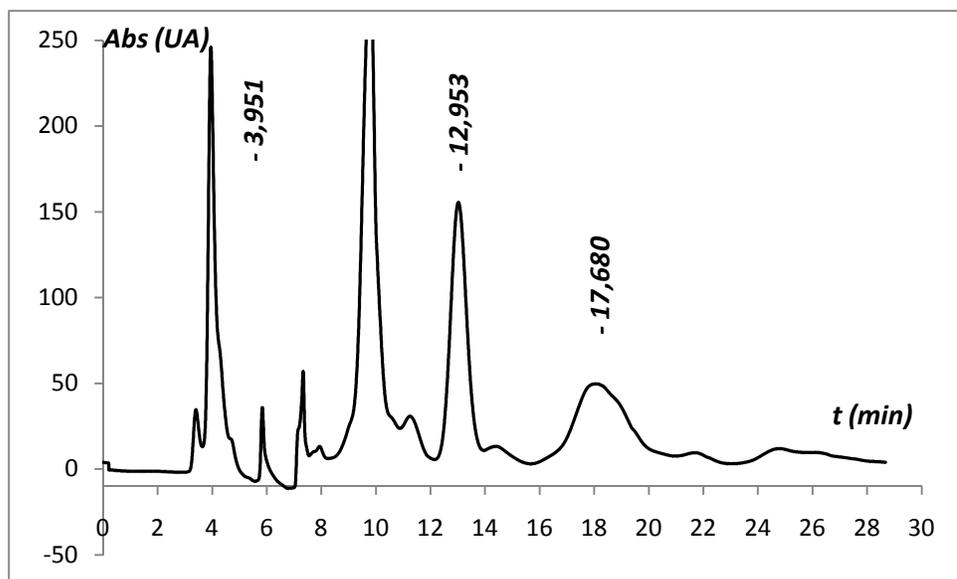


Fig. 30.-Cromatogramas de leche VZLA

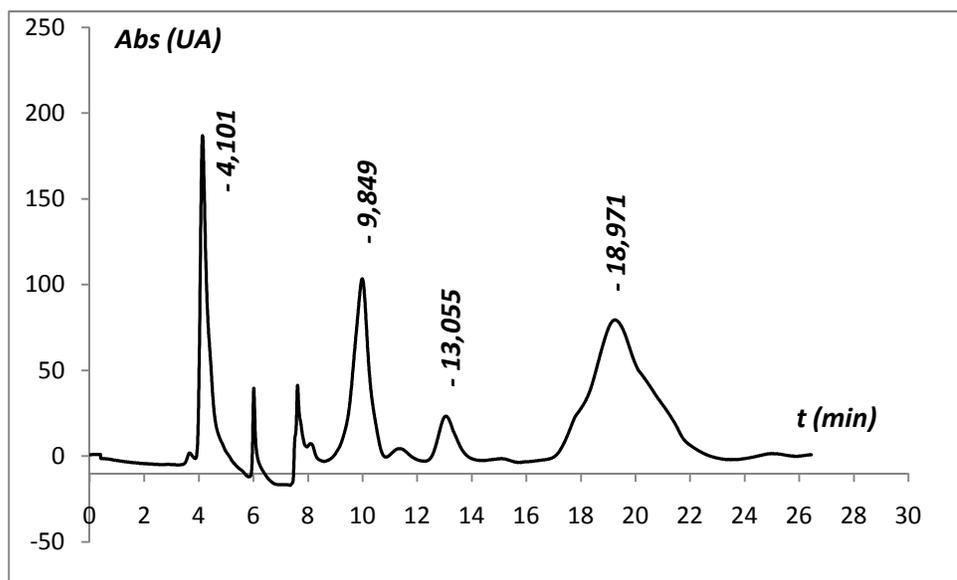


Fig. 31.-Cromatogramas de leche ZM

De los cromatogramas anteriores se puede observar, que no hay aparición de una banda en la zona de 12,0 minutos, donde debería aparecer la melamina. Para comprobar esto, a cada uno de ellos se le alteró con una cantidad suficientemente grande de melamina. El cromatograma se muestra en la figura 32.

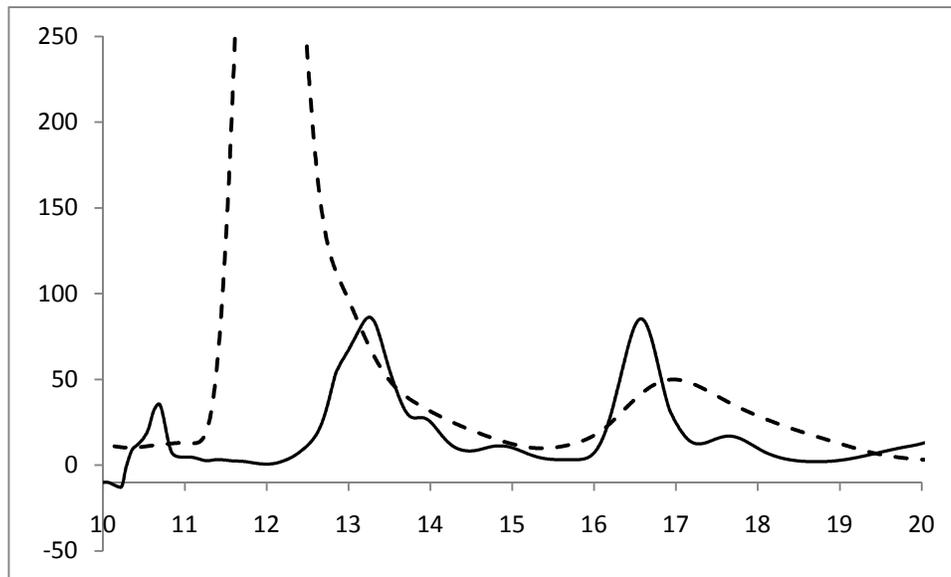


Fig. 32.-Cromatogramas de leche, alterada con melamina en el orden de 70 mg/Kg

Como se puede observar del cromatograma de la figura 32, en el caso de que haya una fuerte contaminación de melamina, se observaría una fuerte banda que comienza en 12 minutos y abarcaría un ancho de más de dos minutos aproximadamente.

7.- CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método cromatográfico por HPLC-UV, en la modalidad de Zwitterionic HILIC para la determinación de melamina en leche en polvo.
- Las condiciones de mejor separación se encontraron con una elusión isocrática mediante una columna Sec-Quant ZIC-HILIC (150 x 4,6 mm, 4 μm /200 Å), fase móvil: Acetonitrilo-agua 85/15 (25,0 mM de acetato de amonio), flujo: 0,5 mL/min, λ : 220 nm y un Vol. de Inyección: 50 μL . La reproducibilidad en el tiempo de retención y en el área fueron satisfactorias: 0,5 y 3,0 % respectivamente, expresadas como el coeficiente de variación para un N de 5. El tiempo de retención de la melamina fue de 12,3 minutos, que corresponde a un factor de retención de 3,89.
- En base a las condiciones de separación fue posible establecer un rango dinámico lineal de concentraciones en dos niveles. Un primer rango entre 1 y 20 mg/L, con una linealidad bastante aceptable (R^2 de 0,9967) y un segundo rango para concentraciones menores, entre 100 y 500 $\mu\text{g/L}$, con una linealidad moderada (R^2 de 0,9845).
- El tratamiento de la muestra fue simple y rápido, mediante las etapas de disolución, centrifugación, decantación y ultra-centrifugación respectivamente. Se eliminó la etapa de extracción fase sólida, características de las separaciones por RPLC para este tipo de muestras, las cuales implican mayor tiempo de análisis y la posibilidad de pérdidas.
- Al alterar un extracto de leche con melamina, el tiempo total de análisis fue de 30 minutos por muestra. Se observó un ligero solapamiento a 13,2 minutos por una banda de la matriz de la muestra de leche.

- En base al método de extracción y medida, es posible medir en el extracto cantidades cercanas a 3 mg/L, el cual corresponde a 30 mg/Kg en la leche cruda original. Para efectos de estudio de contaminación es satisfactorio, más no, para efectos de detectar el mínimo permisible (2,5 mg/Kg).
- En base a los estudio de contaminación reportados por la literatura, encontramos que las contaminación realizadas son relativamente grandes, 35 Kilos en 70 toneladas, 24 kilos en 40 toneladas y 16,7 kilos en 120 toneladas, que corresponden a 500, 600 y 139 mg/Kg respectivamente. Si asumimos, que son valores “procedentes” para contaminación con fines de adulteración proteica, el método desarrollado es suficientemente satisfactorio, ya que es capaz de detectar hasta 30 mg/Kg.
- Se recomienda una columna de mayor longitud, para establecer una resolución completa de la melamina, lo cual nos permitiría medir con bastante precisión cantidades en el orden de 2,5 mg/Kg en sólido original y 100 µg/L en el extracto.

8.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- [1] Gallego Luis. Tóxicos naturales en alimentos. Editorial Mexico 2003. Pag. 50-73.
- [2] Linderner Erns. Toxicología de los alimentos. Editorial Acribia, 2da. Edición. España, 1995. Pág. 163-167.
- [3] ATSDR, Department of Health and Human services Agency for toxic Substances & Disease Registry, julio 2006.
- [4] Tumris Altug. Introduction to toxicology and food. CRC Press, 2003.
- [5] R.A.Yorley, L.C.Mayer. Development Resources. Chemical support department. North Carolina,USA.2008.
- [6] Williams Phillip I. Burson James L. Industrial toxicology. Editorial Lifetime learning publications, New York 1985. Pág. 197-207.
- [7] Adams Mike. Grocery Warning. True publishing international, ltd, 2005. Pag. 20-91.
- [8] Breidbach Andreas. Melamine. JRC Scientific and technical reports. 2009.
- [9] Skoog, Holler, Nieman. *Principios de Análisis Instrumental*. Editorial Mc-Graw Hill. Quinta Edición. España, 2001. Pag 215, 245-248, 785-818.

[10] Heikki Leinonen. Ion exchangers and their use in waste water treatment. Ion Exchange Resins: Classification and Properties. Francis J. de Silva. Essentials of Ion Exchange.

[11] Velásquez J. Comparación de técnicas de extracción: Soxhlet y acelerada con solvent (ASE) de hidrocarburos aromáticos policíclicos en particulado atmosférico depositado en túneles del area metropolitana de caracas y su análisis por HPLC-UV y FLD. Tesis especial de grado, Facultad de Ciencias, UCV (2005).

[12] Goncalves I. *Determinación de metabolitos de la anilina, benceno, hexano, tolueno y xileno en orina humana mediante técnicas cromatográficas*. U.C.V. Caracas, (2000).

[13] Weiss J. *Ion chromatography*. Editorial VCH. Alemania, 1995. Pag. 32-180.

[14] Robert A. Yokley. Analytical Method for the determination of cyromazine and melamine residues in soil using HPLC-UV and GC-MSD development resources/chemical support department, novartis crop protection, Inc., Greensboro, North Carolina 27419.

[15] Michael S. Filigenzi. Diagnostic Determination of Melamine and Related Compounds in Kidney Tissue by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. California Animal Health and Food Safety Laboratory System, Toxicology Laboratory University of California, Davis, California 95616.

[16] Sheryl A. T Tittlemier. Melamine in Infant Formula Sold in Canada: Occurrence and Risk Assessment Food Research Division, Banting Research Centre 2203D, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada K1A0L2.

[17] Mauer Lisa. Melamine detection in infant formula powder using near-and mid-infrared spectroscopy. Journal of agricultural and food chemistry. 2009.

[18] Tran Buu. Use of methanol for the efficient extraction and analysis of melamine and cyanuric acid residues in dairy products and pet foods. Journal of agricultural and food chemistry. 2010.

[19] Yan Na. Determination of melamine in dairy products, fish feed, and fish by capillary zone electrophoresis with diode array detection. Journal of agricultural and food chemistry. 2009.

[20] Heftmann E. Chromatography, Part A: Fundamentals and techniques. Part B: Applications, Elsevier, Amsterdam. 2004.

[21] Merck SeQuant AB. A practical Guide to HPLC. Copyright. 2005-2008.

[22] García Grettel. Melamina en productos lácteos. La Habana Cuba. 2008.

[23] Lang Li. A fast method for determination of Melamine in liquid milk , and milk powder by HPLC with UV detection. Technical Article. American Laboratory. 2009.