

UNED

Facultad
de Ciencias

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA
MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE MELAMINA EN
MUESTRAS DE LECHE

Autor/a: Carolina Garrido Rubio

Tutor/a: D^a. Rosa M^a. Garcinuño Martínez

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Septiembre de 2017

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE MELAMINA EN MUESTRAS DE
LECHE

Carolina Garrido Rubio

Septiembre 2017

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
SIGLAS Y ABREVIATURAS	11
1 Introducción	13
1.1 La leche	16
1.1.1 Sustancias más utilizadas en la adulteración de la leche.....	17
1.2 La melamina	18
1.2.1 La melamina como adulterante en el sector lácteo	19
1.2.2 Toxicidad de la melamina	20
1.2.3 Legislación	22
2 Objetivo.....	24
3 Determinación de melamina en leche: evolución de las técnicas analíticas y de los métodos de preparación de la muestra.....	25
3.1 Métodos de <i>screening</i>	26
3.1.1 Espectroscopía de infrarrojo	27
3.1.2 Espectroscopía de fluorescencia	28
3.1.3 Espectroscopía Raman	30
3.1.4 Inmunoensayos	32
3.1.5 Técnicas colorimétricas	33
3.2 Técnicas de confirmación.....	35
3.2.1 Técnicas cromatográficas	35
3.2.1.1 Cromatografía líquida	35
3.2.1.2 Cromatografía de gases	39
3.2.2 Técnicas no cromatográficas	41
3.2.2.1 Electroforesis capilar	41
3.2.2.1 Técnicas electroquímicas	43

3.2.2.2	Otras técnicas.....	44
4	Conclusiones	45
5	Bibliografía	47
6	ANEXO. Tablas-resumen de la bibliografía consultada.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Porcentaje de artículos sobre adulteración alimentaria clasificados por tipo de alimento, referido a la base de datos confeccionada por la revista Journal of Food Science en 2012 (Moore et al., 2012)</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2 Esquema de los principales adulterantes de la leche, las técnicas analíticas más utilizadas para la detección de estos adulterantes y su clasificación en función de la dificultad del pretratamiento de la muestra (Azad and Ahmed, 2016)</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3 Estructura química de la melamina o 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina</i>	<i>18</i>
<i>Figura 4 Estructura química del ácido cianúrico, amelida y amelina</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5 Metabolismo de la melamina y el complejo de formación melamina-ácido cianúrico que forma los cristales que precipitan en el sistema urinario (Santos et al., 2013)</i>	<i>21</i>
<i>Figura 6 Espectro de la concentración de melamina original de la muestra (25 ppm) tras 3, 25, 50, 75 y 100 veces de dilución (Rajapandiyar et al., 2015).....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 7 Espectro de absorción de AgNPs en ausencia de melamina (línea amarilla) y en presencia de melamina (línea roja). La fotografía muestra el cambio de color de las nanopartículas de plata (Kumar et al., 2015).</i>	<i>34</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Contenido máximo establecido para la melamina en productos alimenticios según Reglamento (UE) 594/2012 de 5 de julio</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 2 Datos comparativos entre diferentes métodos de preparación de la muestra en espectroscopía de fluorescencia (Nascimento et al., 2014)</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 3 Comparativa de técnicas de cromatografía líquida consultadas y sus límites de detección</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 4 Comparación del tiempo de análisis en función del método de preparación de la muestra.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 5 Comparación de la técnica de electroforesis capilar con otras técnicas para la determinación de melamina</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 6 Comparación de técnicas electroquímicas para la determinación de melamina (Rovina et al., 2015)</i>	<i>44</i>

SIGLAS Y ABREVIATURAS

BRC	<i>British Retail Consortium. Consorcio británico de venta al por menor</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin. Albúmina de suero bovino</i>
CAPSA	<i>Corporación Alimentaria Peñasanta S.A.</i>
CE-UV	<i>Capillary Electrophoresis - Ultraviolet detection. Electroforesis capilar con detección ultravioleta</i>
CGIA	<i>Immuno chromatographic Assay. Ensayo inmunocromatográfico</i>
CPE	<i>Cloud Point Extraction. Extracción por punto nube</i>
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis. Electroforesis capilar en zona</i>
DL	<i>Dosis Letal</i>
DLLME	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. Microextracción líquido-líquido dispersiva</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria</i>
EKS	<i>Electrokinetic Supercharging. Sobrealimentación electrocinética</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Ensayo Inmunosorbente Ligado a Enzimas</i>
FAO	<i>Food and Agricultural Organization. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura</i>
FPIA	<i>Fluorescence Polarization Immunoassay. Inmunoensayo de polarización fluorescente</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer. Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia</i>
FTIR-ATR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance. Espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada</i>
FTIR-DRIFT	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform. Espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier- Reflectancia infrarroja difusa</i>
HPTLC-MS	<i>High Performance Thin Layer Chromatography coupled to Mass Spectrometry. Cromatografía de alta resonancia en capa fina acoplado a espectrometría de masas</i>
IFS	<i>International Food Standard. Norma Internacional para los Alimentos</i>
LOD	<i>Limit of Detection. Límite de detección</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification. Límite de cuantificación</i>
MCR	<i>Multivariate Curve Resolution. Resolución de curva multivariante</i>

MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer. Polímero de impresión molecular</i>
MIR	<i>Mid Infrared Region. Región del infrarrojo medio</i>
MS	<i>Mass Spectrometry. Espectrometría de masas</i>
MSPD	<i>Matrix Solid Phase Dispersion. Dispersión de matriz en fase sólida</i>
NIR	<i>Near Infrared Region. Región del infrarrojo cercano</i>
NNP	<i>Non Protein Nitrogen. Nitrógeno no proteico</i>
PCB	<i>policlorobifenilo</i>
PMME	<i>Polymer Monolith Microextraction. Microextracción con polímero monolítico</i>
PWFI	<i>Planar Waveguide Fluorescence Immunosensor. Inmunosensor de fluorescencia de onda plana</i>
QDs	<i>Quantum Dots. Puntos cuánticos</i>
SB-ATR	<i>Single Bounce Attenuated Total Reflectance. Reflectancia total atenuada por rebote sencillo</i>
SCX	<i>Strong Cation Exchange. Intercambio catiónico fuerte</i>
SERS	<i>Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Espectroscopía Raman de superficie mejorada</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction. Extracción en fase sólida</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance. Resonancia de plasmón superficial</i>
UCNPs	<i>Up-Conversion Nanoparticles. Nanopartículas de conversión ascendente</i>
UHPLC-PDA	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to Photodiode Array. Cromatografía Líquida de ultra-alta resolución acoplado a detector de matriz de fotodiodos</i>
UV-Vis	<i>Ultravioleta-Visible</i>

1 INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es un asunto que está despertando cada vez más interés entre los consumidores y en parte es debido a la aparición de ciertas intolerancias o alergias alimentarias, cuya presencia está aumentando entre la población del primer mundo, así como ciertas enfermedades oncológicas cuyo origen se está relacionando con determinados hábitos alimenticios.

Cuando a los malos hábitos en la alimentación se le suma la adulteración de esos alimentos para obtener o mejorar ciertas propiedades, las probabilidades de una reacción adversa en el organismo del consumidor se multiplican.

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) define un alimento adulterado como: “aquel que ha sido modificado por el hombre, alterando sus características, por ejemplo, extrayendo o sustituyendo alguno de los componentes propios del alimento. Esto puede encubrir una calidad inferior del producto.” Si por otra parte vemos la definición de “adulterar” que ofrece la Real Academia de la Lengua Española: “Alterar fraudulentamente la composición de una sustancia”, podemos decir que un alimento adulterado es aquel que se modifica intencionadamente para obtener un beneficio económico, disimular deficiencias en la calidad de las materias primas o defectos en la elaboración.

El fraude alimentario se convierte en un delito cuando ya no involucra sólo actos aleatorios, sino que se vuelve una actividad organizada para engañar deliberadamente a quienes compran esos alimentos (Manning and Soon, 2016).

Es importante diferenciar la protección de los alimentos que sufren una contaminación no intencionada, de la denominada Defensa Alimentaria (*Food Defense*). Esta se centra en la protección de los productos alimenticios frente a la adulteración intencionada, ya sea por agentes biológicos, químicos, físicos o radiactivos (Manning and Soon, 2016). Tal es la importancia de este concepto que se ha incluido un “Plan de Defensa Alimentaria” entre los requisitos de certificación de las principales normas de calidad alimentaria como son IFS (*International Food Standard*) y BRC (*British Retail Consortium*). Estos planes incluyen apartados tales como: controles de personal, instalaciones, materiales, procesos, almacenamiento, transportes y sistemas (Herman, 2013).

En 2012 la revista *Journal of Food Science* realizó una recopilación de artículos de revistas científicas que hacían referencia a la adulteración de alimentos, con la finalidad de confeccionar una base de datos correspondiente al periodo 1980-2010. El resultado fue más de 1000 artículos de 677 referencias diferentes. Los artículos se clasificaron en tres tipos de fraude alimentario: la sustitución, la adición y la eliminación de algún componente. La primera representó el 95% de los casos encontrados, la segunda el 5% y la tercera el 1% (Moore et al., 2012).

Para un análisis posterior, el conjunto de artículos académicos fue clasificado por tipo de ingrediente adulterado como puede verse en la Figura 1. De las 17 categorías de ingredientes de la base de datos, los aceites, la leche, los zumos de frutas, los concentrados, las mermeladas, purés y conservas y las especias representaron más del 50% de los registros académicos (Moore et al., 2012).

En concreto, los siete alimentos más adulterados resultaron ser:

1. Aceite de oliva
2. Leche
3. Miel
4. Azafrán
5. Zumo de naranja
6. Café
7. Zumo de manzana

La producción de aceite de oliva es un proceso caro por lo que el producto final tiene un alto coste. La principal adulteración que sufre es la mezcla de aceite de oliva virgen con otros más económicos como pueden ser el aceite de palma o el aceite de soja (Rashvand et al., 2016).

En el caso de la miel, se ha descubierto que algunos envases incluso ya no contienen miel sino una adición de diferentes jarabes de azúcar (Tosun, 2013).

Por otra parte, el azafrán es conocido por ser una de las especias más caras debido a su necesaria recolección artesanal. Fruto de esta situación se ha comenzado a vender azafrán adulterado con estigmas de otras plantas como la gardenia. Para ayudar a camuflar este fraude, se añaden ciertos colorantes artificiales que enmascaran el diferente color de esos "aditivos" (Guijarro-Díez, 2017).

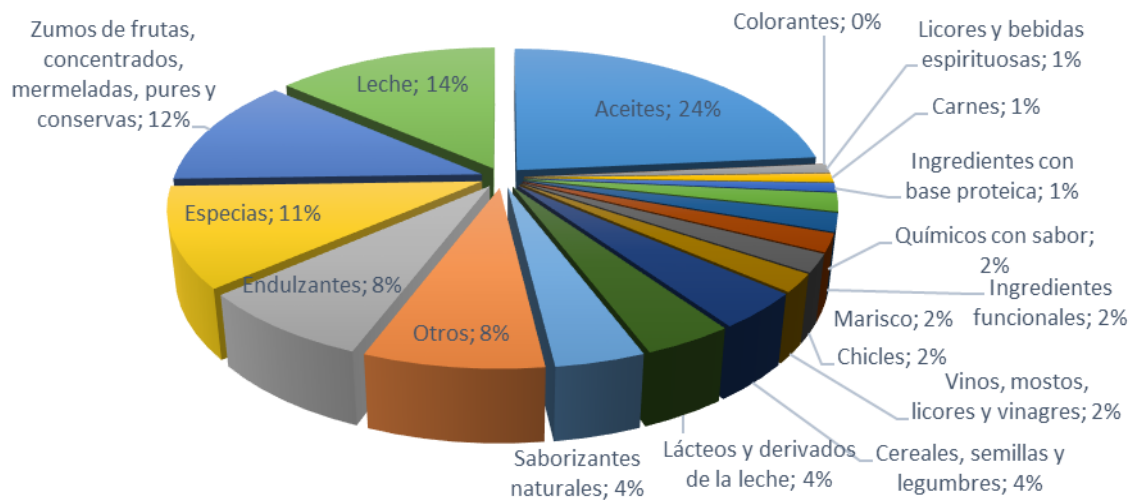


Figura 1 Porcentaje de artículos sobre adulteración alimentaria clasificados por tipo de alimento, referido a la base de datos confeccionada por la revista Journal of Food Science en 2012 (Moore et al., 2012)

En los zumos de frutas la adulteración consiste en añadir sustancias como jarabe de maíz o extracto de pimentón que en principio no son nocivas.

En la producción de café se suelen utilizar adulterantes como cereales, nueces y leguminosas que hacen mejorar su apariencia y volumen, pero que disminuyen la calidad del producto final, siendo un engaño para el consumidor (Salcedo et al., 2012).

Como se ha podido comprobar, la leche ocupa el segundo lugar de la lista con un 14% de los artículos que tratan su adulteración. La leche ha venido sufriendo manipulaciones que han causado serios peligros para la salud humana a lo largo de la historia reciente.

Uno de los últimos escándalos relacionados con este alimento fue el que se produjo en septiembre de 2008, cuando el Gobierno chino anunció que grandes cantidades de unas determinadas marcas de leche en polvo de consumo infantil contenían un aditivo llamado melamina, un componente que se utiliza en los procesos de síntesis para fabricar resinas, plásticos y pegamentos (Xiu, C., & Klein, 2010). El resultado fue cerca de 300.000 bebés intoxicados y 6 de ellos muertos a causa de la ingesta de leche en polvo adulterada con melamina. La principal razón de su añadido a la leche es que el valor nutricional de muchos alimentos se mide por su contenido en proteínas, y este se cuantifica con la determinación del nitrógeno total. La adición de melamina resultó ser un barato potenciador del contenido en nitrógeno de este alimento y por ello comenzó a utilizarse en la fabricación de leche en polvo para consumo infantil y en alimentos para mascotas (Zolotov, 2010).

Hubo determinadas marcas internacionales que se vieron afectadas por este escándalo como la marca suiza Nestlé con la parte de la producción fabricada en China. *Dairy Farm UHT*, fue retirada de los comercios hongkoneses después de que una serie de pruebas indicara que tenía melamina, aunque en poca cantidad.

También la cadena de cafeterías *Starbucks*, al haber comprado leche supuestamente contaminada al proveedor *Mengniu Dairy*, retiró la leche de sus 300 locales en China (Reuters, 2008).

Toda esta controversia que arrastra la industria alimentaria ha llevado a dar un giro al plan estratégico de algunas compañías. Sin ir más lejos, recientemente la Corporación Alimentaria Peñasanta S.A. (CAPSA), dedicada a la producción de leche y derivados lácteos, anunciaba un nuevo marco de Responsabilidad Social Corporativa. Declaró que ha reducido a cero prácticamente el uso de aditivos en su proceso productivo (el 98% de sus productos no llevan ningún tipo de aditivos ni conservantes artificiales, ni estabilizantes) (CAPSA FOOD, 2017).

Establece de esta manera su diferencia con el resto de marcas, dando un valor añadido a su producto. Al primar lo natural y ecológico, acoge a un sector cada vez más grande de consumidores que demandan una mayor transparencia en el uso aditivos artificiales.

1.1 La leche

Desde siempre la leche ha sido un alimento básico en nuestra dieta en cuya ingesta se basa la mayor parte de la nutrición infantil. Un vaso de leche al día proporciona a un niño de 5 años: el 21% de las necesidades de proteína, el 8% de calorías y micronutrientes clave. Además nos aporta calcio, magnesio, selenio, riboflavina, vitamina B12 y vitamina B5 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015).

El consumo en los países en vías de desarrollo se está incrementando (se ha duplicado desde la década de 1960) como consecuencia del aumento del poder adquisitivo, el crecimiento demográfico y los consiguientes cambios alimenticios, especialmente zonas de Asia oriental en países muy poblados como China, Indonesia y Vietnam. Por el contrario, el consumo en los países desarrollados se está reduciendo, aunque todavía es mucho mayor en comparación con los anteriores. En total, más de 6.000 millones de personas en el mundo consumen leche y productos lácteos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2015).

1.1.1 *Sustancias más utilizadas en la adulteración de la leche*

Como hemos comentado antes, la leche ha visto aumentada su producción y consumo en las últimas décadas debido a su alto poder nutricional. Como resultado, se ha convertido en un objetivo constante de adulteración. Hecho que constituye un riesgo para la salud de los consumidores (Nascimento et al., 2016).

La adulteración “no peligrosa” muchas veces consiste en la dilución o adición de sustancias para aumentar el volumen, disimular una baja calidad del producto o la sustitución de elementos originales de la leche buscando un rendimiento económico. Por ejemplo, adición de proteínas vegetales, mezcla de leche de distintas especies, adición de suero, etc. (R.H. Stadler, 2011).

Los adulterantes que producen graves consecuencias en la salud humana son principalmente la urea, el sulfato de amonio, el ácido bórico, la sosa cáustica, el ácido benzoico, el ácido salicílico, el peróxido de hidrógeno, los azúcares y la melamina. Mediante la adición de estas sustancias se consiguen alterar ciertos parámetros de calidad de la leche como (Azad and Ahmed, 2016):

- Porcentaje de sólidos no grasos (sulfato de amonio, azúcares...)
- Porcentaje de proteínas cuantificado mediante el contenido en nitrógeno (urea, melamina, suero de queso...)
- Vida útil (ácido salicílico, ácido benzoico, peróxido de hidrógeno...)

La detección de adulterantes en la leche puede llevarse a cabo fácilmente. Sin embargo, su cuantificación requiere técnicas de diferente complejidad en función de la naturaleza del adulterante. En la Figura 2 se muestra un esquema que resume las principales formas de adulteración de la leche, las sustancias que se utilizan y las técnicas analíticas para su determinación. También se indica la dificultad de pretratamiento de las muestras en función de la técnica que se vaya a utilizar posteriormente. Se representan en verde las que pueden ser analizadas directamente o con muy poca preparación, seguidas de amarillo las de dificultad y/o tiempo de preparación intermedio y en rojo las que requieren una extracción más compleja.

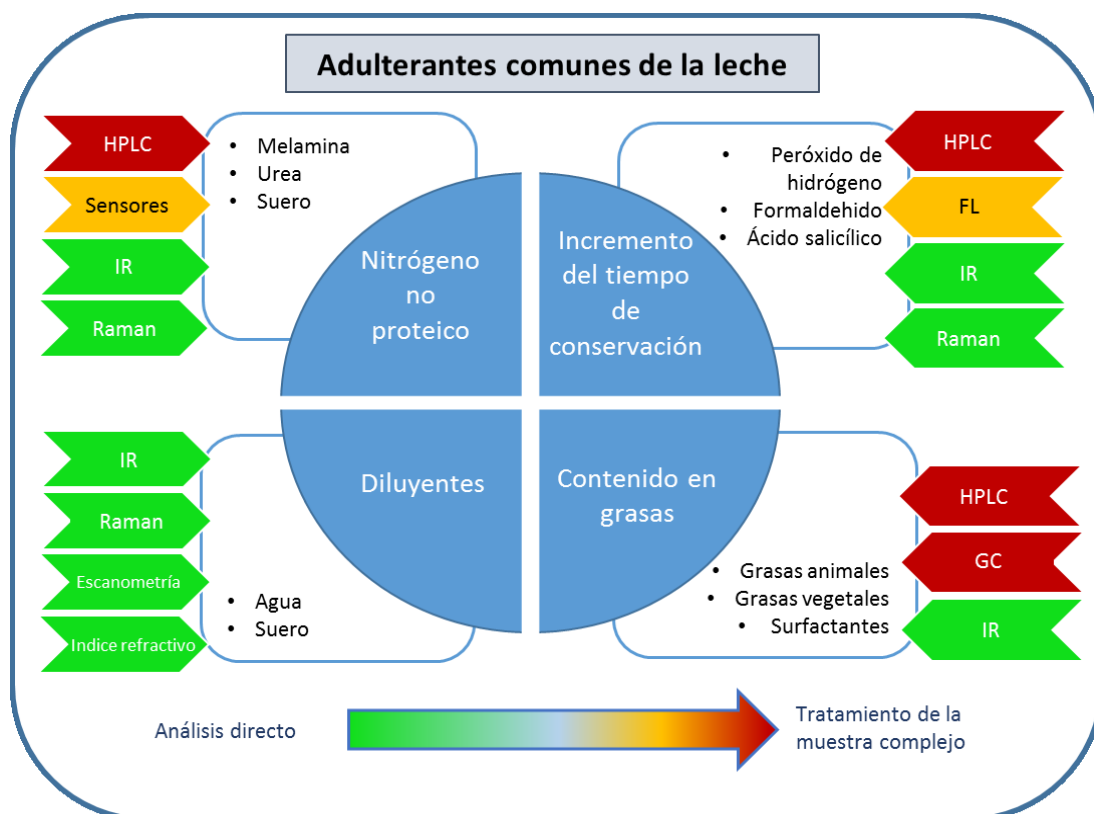


Figura 2 Esquema de los principales adulterantes de la leche, las técnicas analíticas más utilizadas para la detección de estos adulterantes y su clasificación en función de la dificultad del pretratamiento de la muestra (Azad and Ahmed, 2016)

1.2 La melamina

La melamina, o 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina, es un compuesto químico de fórmula $C_3H_6N_6$ (Figura 3). A temperatura ambiente es un polvo blanco cristalino, fuertemente polar, ligeramente soluble en agua, pero insoluble en los disolventes comunes. Se suele combinar con formaldehído para formar la resina de melamina que se utiliza en la fabricación de

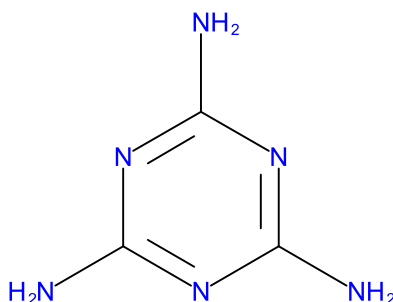
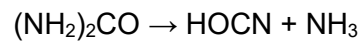


Figura 3 Estructura química de la melamina o 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina

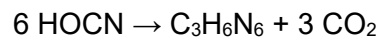
termoplásticos. Cuando se mezcla con resinas, la melamina tiene propiedades ignífugas debido a la liberación de gas nitrógeno que se produce cuando se quema o carboniza (Sharma et al., 2010). También se utiliza en la fabricación de pinturas, fertilizantes y pesticidas. Otros procesos que utilizan melamina son: la fabricación de adhesivos utilizados en muebles, productos de limpieza, vajillas, etc.

Para la producción de este compuesto, en la actualidad se emplea urea. La síntesis tiene lugar en dos pasos (Escobar,.A, Sosa,.D & Ponce, 2010):

1. La reacción endotérmica de descomposición de la urea en ácido cianúrico y amoníaco.



2. La polimerización del ácido cianúrico para formar la melamina y la liberación de dióxido de carbono. Este proceso es exotérmico.



En el transcurso de estas reacciones químicas pueden originarse productos intermedios como son: el ácido cianúrico, la amelida y la amelina (Figura 4).



Figura 4 Estructura química del ácido cianúrico, amelida y amelina

1.2.1 La melamina como adulterante en el sector lácteo

Ya hemos mencionado que el valor nutricional de la leche se mide, entre otros parámetros, por su contenido en proteínas. La cantidad de proteínas en la leche se suele medir calculando el nitrógeno total y las técnicas rutinarias que se venían utilizando para esta estimación (métodos Kjeldahl y Dumas) no distinguían el nitrógeno no proteico (NNP, *Not Protein Nitrogen*) del que sí lo era (De Lourdes Mendes Finete et al., 2013).

Conocida esta circunstancia, ciertas industrias dedicadas al sector lácteo utilizaron este fenómeno para disminuir sus costes de producción. De tal manera que, al añadir determinadas sustancias, se mantenía el contenido en nitrógeno total de la leche a pesar de que en realidad el valor nutricional en cuanto a proteínas no era tal.

Como ya hemos visto, la estructura de la melamina contiene en una sola molécula 6 átomos de nitrógeno. Por lo tanto, un gramo de melamina en un litro de leche puede llegar a elevar su porcentaje de proteínas un 0.4% de manera ficticia. Por otra parte, la solubilidad de la melamina es de 3.1 g por litro de agua. Se deduce por tanto que en un litro de leche es posible incrementar el porcentaje de proteínas en un 1.2% de manera fraudulenta (Hau et al., 2009).

Es importante comentar que en un principio la melamina no se consideraba nociva para la salud de los consumidores ya que no está identificada como una sustancia cancerígena en humanos (Zolotov, 2010), aunque sí se ha podido relacionar su presencia con la aparición de tumores en el aparato urinario de ratas y ratones (Hau et al., 2009). A pesar de no tener relación aparente con alteraciones de tipo cancerígeno en seres humanos, este tipo de adulteración alimentaria puede provocar graves consecuencias en la salud de los consumidores si no se establecen unos límites.

1.2.2 Toxicidad de la melamina

Cuando se ingiere, la melamina se elimina directamente por el tracto urinario (aproximadamente un 90% de la melamina se elimina a las 24 horas). La mayoría de estudios se han realizado para una exposición laboral y siempre por inhalación o contacto con la piel. Por lo tanto, existe poca información acerca de sus efectos a largo plazo por ingesta en humanos. Sin embargo, sí se ha estudiado la toxicidad de la melamina en ratas, cerdos, ovejas, etc. La toxicidad puede ser aguda o crónica: la aguda se traduce normalmente en trastornos del tracto urinario mientras que la crónica puede causar infertilidad y malformaciones fetales o cáncer de vejiga (Hau et al., 2009).

Tras un estudio en ratas, la toxicidad en animales se ha calculado en un DL50¹ de 3,161 g/kg peso corporal (Hau et al., 2009).

¹ Cantidad de una sustancia que provoca la muerte del 50% de la población de una determinada especie

Cuando por degradación microbiológica se encuentran presentes derivados de la melamina, esto puede dar lugar a la formación de un complejo denominado cianurato de melamina (Figura 5) (Escobar,.A, Sosa,.D & Ponce, 2010). Este complejo es el resultado de la combinación de la melamina con el ácido cianúrico mediante enlaces de hidrógeno, el cual se presenta en forma de cristales. La formación de estos cálculos puede acarrear severas consecuencias debido a que, en los peores casos, llegan a obstruir el sistema urinario y provocar la muerte.

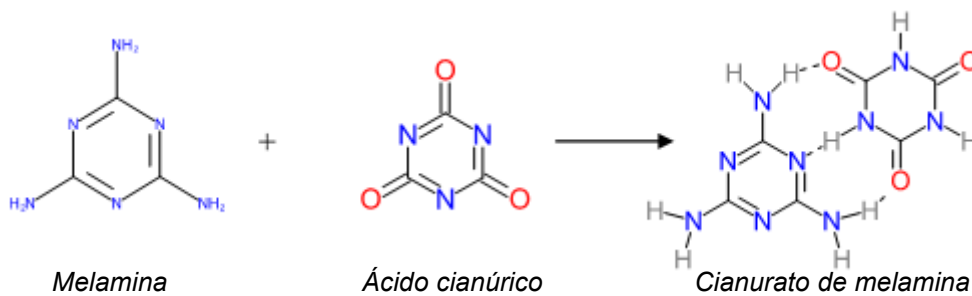


Figura 5 Metabolismo de la melamina y el complejo de formación melamina-ácido cianúrico que forma los cristales que precipitan en el sistema urinario (Santos et al., 2013)

Precisamente esto fue lo que sucedió en el escándalo ocurrido con la leche en polvo infantil en China. Se detectaron obstrucciones en el sistema urinario de niños (6 de ellos fallecidos por fallo renal) producidas por este tipo de cálculos (Skinner et al., 2010). Datos oficiales apuntan que 52.837 niños recibieron tratamiento para la melamina ingerida a través de la leche infantil. De ellos, el 99,2% eran menores de 3 años y los mayores mostraron problemas tiempo más tarde (Hau et al., 2009).

Las analíticas realizadas mediante técnicas bioquímicas demostraron que los cálculos estaban formados por melamina y ácido cianúrico. Estos cálculos pudieron verse mediante tomografía axial computarizada y ultrasonidos, ya que las radiografías no llegaban a mostrarlos (Hau et al., 2009).

Los niños que no presentaban estos síntomas sí que mostraban, sin embargo, dificultad al orinar, sangre en orina, hipertensión, oliguria, etc. Los estudios también han concluido que los efectos son más graves cuanto menor es la edad del individuo. Por otra parte, el cese de administración de melamina produce enseguida una mejoría en la afectación renal. Los cálculos formados por melamina y ácido cianúrico se disuelven fácilmente y sus tamaños pueden variar desde más de un 1 cm (provocan obstrucción urinaria) hasta menores de 4 mm (pueden eliminarse por sí solos) (Yasui et al., 2014).

1.2.3 Legislación

La adulteración se ha convertido en una práctica penalizada por organismos que regulan y establecen la normativa que define la autenticidad de un alimento. La Organización Mundial de la Salud ha determinado que la melamina no es un componente cuya presencia en la leche tenga justificación. A esta decisión se han sumado la FAO y el Códex Alimentarius. Debido al lamentable suceso de la leche infantil en China, la comisión europea estableció en la **Decisión 2008/798/EC el 14 de octubre de 2008** un límite máximo de 2,5 mg de melamina/kg de alimento y se prohibieron los productos importados desde China que contuviesen leche o derivados lácteos.

El **Reglamento (UE) 594/2012 de 5 de julio de 2012**, modificó el Reglamento (CE) 1881/2006, y fijó el contenido máximo de determinados contaminantes como ocratoxina A, PCBs (policlorobifenilos) no similares a las dioxinas y melamina en productos alimenticios. En lo que concierne a la melamina el Reglamento estableció sus límites tal y como se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1 Contenido máximo establecido para la melamina en productos alimenticios según Reglamento (UE) 594/2012 de 5 de julio

Sección 7: Melamina y sus análogos estructurales

Productos alimenticios		Contenido máximo (mg/kg)
7.1	Melamina	
7.1.1.	Productos alimenticios a excepción de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación (*)	2.5
7.1.2.	Preparados en polvo para lactantes y preparados de continuación en polvo	1

(*) No se aplica el contenido máximo en el caso de los productos alimenticios cuyo contenido en melamina se pueda demostrar que es superior a 2.5 mg/kg y consecuencia del uso autorizado de ciromazina como insecticida. El contenido de melamina no superará el de ciromazina.

Por su parte, la EFSA (European Food Safety Authority) en 2010, estableció una dosis diaria máxima recomendada de 0,2 mg de melamina por kg de peso corporal (European Food Safety Authority, 2010).

En España se aplica la normativa europea y además, la adulteración de alimentos está contemplada en el Código penal (Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre) en sus artículos 365-367 del capítulo III "De los delitos contra la salud pública". Esta conducta está

penalizada con condenas de 2 a 6 años de cárcel así como multas, cuya cuantía se impone en relación al valor del beneficio obtenido con dicha adulteración.

2 OBJETIVO

El fraude alimentario tanto en las materias primas como en los productos elaborados, está cada vez más presente en el mercado de los países desarrollados e incluso en los que se encuentran en vías de desarrollo. En los últimos años los adulterantes se van asemejando más a los productos originales, por lo que se necesitan métodos muy específicos y selectivos para poder detectarlos.

En este trabajo se ha querido hacer una recopilación de los artículos más relevantes de los últimos 8 años relacionados con la determinación de uno de estos adulterantes de la leche: la melamina. Con ello se pretende dar una visión global de las ventajas y desventajas que ofrece cada técnica y poder apreciar las mejoras de cada una de ellas en los últimos años. Para llevar a cabo esta revisión se han consultado publicaciones de las siguientes bases de datos: [Science Direct](#), [PubMed](#) y [Springer Link](#).

3 DETERMINACIÓN DE MELAMINA EN LECHE: EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS Y DE LOS MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En el periodo 2009-2016 se han publicado numerosos artículos relacionados con la adulteración de la leche, de lo que se deduce que se está tomando conciencia del problema que supone para la salud de los consumidores esta práctica. En el proceso de búsqueda de información para esta revisión bibliográfica, llama la atención que los estudios sobre la determinación de melamina ocupa un gran porcentaje (Nascimento et al., 2016). Será en la determinación de este adulterante en la que nos centraremos a partir de ahora.

Como ya se ha mencionado, la determinación de los adulterantes en alimentos requiere de técnicas con una gran sensibilidad y selectividad, debido a la gran similitud que tienen con los componentes naturales del propio alimento. En el caso de la leche, se trata de una matriz especialmente compleja por la variedad de sustancias que contiene. La leche se compone principalmente de proteínas como la caseína, grasas, azúcares como la lactosa o la sacarosa y suero. Estos componentes interactúan con la melamina y esto puede dar lugar a errores en su detección y cuantificación, bien sea por una sobredetección al realizarse una mala separación de las moléculas nitrogenadas, o porque la melamina se camufle con otros compuestos similares y resulte un valor más bajo que el real.

Por lo tanto, la mayoría de las técnicas de determinación de melamina en leche requiere de un paso previo de pretratamiento de la muestra. El grado de dificultad de este pretratamiento dependerá de la técnica que queramos utilizar después para realizar el análisis y también del nivel de sensibilidad que necesitemos obtener.

El objetivo principal del pretratamiento es el de extraer y preconcentrar la melamina que pueda existir en la leche para aumentar la sensibilidad de su determinación. La melamina es un compuesto soluble en disolventes polares orgánicos. Esto hace de la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) uno de los métodos más utilizados para pretratar las muestras. Algunas técnicas además necesitan de pasos adicionales, como el lavado y la derivatización, de los que hablaremos más adelante.

A parte de los tratamientos de la muestra para preconcentrar el analito, es muy común el marcado de la melamina con un isótopo interno estándar $^{13}\text{C}_3$ (Xu et al., 2009) (Pan et al.,

2012). Se utiliza habitualmente como patrón interno que ayuda a mejorar la fiabilidad y precisión del método (Wu et al., 2009).

Se puede realizar una clasificación general de las técnicas que se utilizan para determinar melamina en leche, agrupándolas en dos grupos: métodos de *screening* y técnicas confirmatorias.

Los métodos de *screening* permiten averiguar la presencia o no de un analito en la muestra y suelen ser una opción económica y rápida. A veces, estos métodos permiten una detección semicuantitativa, es decir, se puede conocer si existe una cantidad de analito dentro de unos rangos, diferenciando por ejemplo si esta es alta, baja o intermedia, pero sin saber con exactitud cuál es su concentración. Aunque algunos de estos métodos tienen una alta sensibilidad, la cuantificación y confirmación de la presencia del analito debe realizarse mediante otras técnicas denominadas confirmatorias. Naturalmente, las técnicas confirmatorias también pueden aplicarse directamente sin un paso previo de *screening* y, aunque requieren de equipos más costosos, a cambio ofrecen una fiabilidad con la que otros métodos no cuentan.

A continuación, trataremos de describir la evolución que han experimentado las técnicas analíticas para la determinación de la melamina en leche. Lo haremos mediante una clasificación cronológica tanto de las técnicas de análisis, como de los métodos de pretratamiento de la muestra que se han hallado en las bases de datos consultadas.

3.1 Métodos de *screening*

Los métodos de *screening* tienen la ventaja de ser rápidos y sencillos de utilizar, a la vez que pueden detectar melamina a concentraciones muy bajas sin necesidad de sofisticados equipos. Esta posibilidad hace que los métodos de *screening* sean idóneos para análisis rutinarios, por ejemplo las técnicas de detección visual en granjas de producción lechera.

Los métodos de *screening* más utilizados para la detección de melamina en leche son: la espectroscopía de infrarrojo, la espectroscopía de fluorescencia, la espectroscopía Raman, los inmunoensayos y las técnicas colorimétricas, los cuales se detallarán a continuación.

3.1.1 *Espectroscopía de infrarrojo*

La espectroscopía de infrarrojo es una de las técnicas de *screening* más utilizadas por lo que se ha podido comprobar en las publicaciones consultadas.

Es una técnica que ofrece una sensibilidad bastante aceptable y la mayor ventaja que presenta es su escaso o nulo pretratamiento de la muestra. Son determinaciones generalmente muy rápidas que se ajustan a las exigencias de un análisis rutinario sin la necesidad de equipos muy costosos.

El análisis de la melamina suele realizarse en los rangos del infrarrojo medio (MIR, *Mid-Infrared Region*) y cercano (NIR, *Near-Infrared Region*). La mayoría de las veces se combina con transformada de Fourier como método matemático para el desarrollo del interferograma.

Mauer et al., 2009, realizaron un estudio con tres técnicas diferentes de espectroscopia de infrarrojos medio y cercano para analizar melamina en leche infantil en polvo. En dos de ellas utilizaron las técnicas de muestreo para la recogida de los espectros: espectroscopía de reflectancia difusa y la reflectancia total atenuada. Tras las determinaciones se obtuvieron tiempos para la detección de melamina de 2 min para infrarrojo cercano y de 5 min para espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (FTIR-ATR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance*) y con reflectancia difusa (FTIR-DRIFT, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform*). Todos alcanzaron un límite de detección (LOD, *Limit of Detection*) de 1 ppm, que aunque no es demasiado alto comparado con otras técnicas, puede resultar útil en caso de necesidad de análisis rápidos y fiables.

Se ha demostrado que se pueden alcanzar sensibilidades menores a 1 ppm (LOD = 0.76 +/- 0.11 ppm) mediante el uso de algoritmos multivariantes de corrección para el análisis del espectro obtenido (Balabin and Smirnov, 2011).

Otra variación de la espectroscopía de infrarrojo es la reflectancia total atenuada por rebote sencillo (SB-ATR, *Single Bounce Attenuated Total Reflectance*). Alcanzando unos límites de detección y cuantificación de 2.5 ppm y 15 ppm respectivamente. Lo más llamativo de esta técnica es su corta duración. Tan solo se necesitan entre 1 y 2 min para realizar el ensayo sin que se precise pretratar la muestra (Jawaid et al., 2013).

Aunque no es apropiado para el tipo de matriz que nos ocupa en este trabajo, cabe mencionar un método más novedoso que, si bien no sirve para detectar melamina en

concentraciones muy bajas, sí puede ser utilizado como método de *screening* en muestras sólidas heterogéneas. Se trata de la combinación de imágenes hiperespectrales del infrarrojo cercano con el método de curva multivariante (MCR, *Multivariate Curve Resolution*) y ha hecho posible determinar tres adulterantes simultáneamente sin tener ninguna información previa sobre ellos. Estos eran urea, melamina y almidón. El límite de detección para la melamina fue de 500 ppm. En principio puede resultar un valor muy elevado pero ha de tenerse en cuenta que la determinación no es nada fácil de realizar en muestras sólidas heterogéneas, donde una pequeña cantidad de adulterante puede concentrarse en un punto específico del área explorada (Forchetti and Poppi, 2016).

3.1.2 Espectroscopía de fluorescencia

El espectro de fluorescencia de la melamina en leche muestra un pico aproximadamente en los 540 nm con una longitud de onda óptima de 467 nm. Al tiempo que aumenta la concentración de melamina, crece primeramente la intensidad de la fluorescencia para después descender. Este fenómeno se denomina extinción de la fluorescencia (Chen et al., 2016).

La espectroscopía de fluorescencia se ha aplicado en la determinación de melamina mediante la medición de la extinción de la intensidad de luminiscencia de sustancias fluoróforas en presencia de este adulterante. Se han utilizado sustancias como el complejo de carbonilo de rutenio (II) (Attiaa, et al., 2011), o el Tritón X-114 (Nascimento et al., 2014). En este último, se comprobó cómo la presencia de melamina reducía el tiempo de fluorescencia del Tritón X-114 de 10.8 ns a 5.5 ns. Los límites de detección logrados mediante esta técnica fueron 0.042 ppm (Attiaa et al., 2011) y 0.8 ppm (Nascimento et al., 2014).

También se ha utilizado el efecto inhibitor de la melamina sobre la reacción de decoloración de la oxidación no catalítica del rojo de acridina por el permanganato de potasio en un medio de ácido sulfúrico (Feng, et al., 2012). Tras un proceso de pretratamiento de la muestra con extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida, se alcanzó uno de los mejores límites de detección hasta el momento con esta técnica: 0.06 ppb.

Por otra parte, se ha combinado la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) y la afinidad de la melamina con las nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs, *Up-Conversion*

Nanoparticles) para desarrollar otra técnica (Wu et al., 2015). La presencia de las nanopartículas de oro disminuye la fluorescencia natural de las UCNPs ya que se unen a su superficie. Cuando se agrega melamina y esta forma agregados con las AuNPs (nanopartículas de oro), estas liberan a las UCNPs y la fluorescencia comienza a intensificarse de nuevo. Mediante este método se alcanzaron límites de detección de 2.3 ppb en muestras de leche fresca.

El mismo fundamento fue el que emplearon (Zhu et al., 2016) para analizar melamina en leche. La diferencia es que ellos utilizaron puntos cuánticos de CdTe (CdTe QDs, CdTe *Quantum Dots*) en lugar de UCNPs. Mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) se detectó una concentración mínima de 8 ppb con una buena selectividad.

PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS EN ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Esta técnica requiere generalmente una limpieza de la muestra previa y una desnaturalización de las proteínas con ácido tricloroacético. La suspensión resultante puede contener especies hidrofóbicas que interfieran en el análisis por lo que se precisa de un segundo paso de extracción con acetonitrilo o metanol (Liu et al., 2012).

Se ha conseguido realizar pretratamientos con técnicas más verdes. Por ejemplo, Nascimento et al., 2014 sustituyeron la extracción en fase sólida por una extracción por punto nube (CPE, *Cloud Point Extraction*), la cual no requiere usar disolventes orgánicos.

En la Tabla 2 se muestran los datos comparativos de distintos tratamientos de muestra previos a su análisis por fluorescencia. Se puede ver que el experimento de Feng et al., 2012, fue el de mayor tiempo de análisis y mayores pasos de pretratamiento, pero también resulta ser el más sensible de los recogidos.

Tabla 2 Datos comparativos entre diferentes métodos de preparación de la muestra en espectroscopía de fluorescencia (Nascimento et al., 2014)

Detección	Tratamiento de la muestra	Rango lineal (mg/L)	LOD (ppb)	Recuperación (%)	Tiempo de análisis (min)	Ref.
Fluorescencia	Ácido tricloroacético y CPE* con Triton X-114	1.0-6.0	800	95-101	20	Nascimento et al., 2014
	Ácido tricloroacético y cloruro de metileno; SPE**, evaporación del solvente y redisolución	0.0002-1.6	0.06	98-111	100	Feng et al., 2012
	Ácido tricloroacético, acetonitrilo y cloroformo	0.0063-0.504	12	99-104	20	Tang et al., 2013
	Ácido tricloroacético y acetonitrilo	0.001-1	0.6	95-99	90	Liu et al., 2012
*CPE: Cloud Point Extraction;						
**SPE: Solid Phase Extraction						

3.1.3 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica que puede aportar datos a un análisis para detectar la presencia o no de la melamina en leche. Es un método de *screening* rápido que en principio no necesita pretratamiento de la muestra.

Con el tiempo la técnica ha evolucionado mucho en la detección de melamina en leche. Okazaki et al., 2009 obtuvieron un límite de detección de un 1% (10.000 ppm) en muestras de leche en polvo que no sufrieron extracción de melamina.

Con los años y la necesidad de detectar cada vez niveles más bajos de concentración, se han aplicado técnicas más ambiciosas como espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*). Por ejemplo, Hu et al., 2014, combinaron esta técnica con polímeros de impresión molecular, fabricándolos con una afinidad especial por la melamina. De esta manera se crea una especie de “anticuerpo

artificial” consiguiendo un límite de detección del orden de 1,5 ppm y un límite de cuantificación de 4,9 ppm. Un dato reseñable en este experimento es que se necesitaron menos de 20 min para llevarlo a cabo, incluyendo la preparación de la muestra.

Otra aplicación que se ha encontrado en la bibliografía consiste en aprovechar la afinidad que tiene la melamina para formar agregados con la plata y el oro y combinarlo con SERS. Rajapandiyam et al., 2015 diseñaron unos sustratos cilíndricos de polimetacrilato de metilo que recubrieron con nanopartículas de plata. La muestra, tanto de leche líquida como en polvo, solo precisó de una dilución simple para ser analizada y se obtuvieron valores de detección del orden de 2 ppm.

Esta técnica fue mejorada utilizando nanopartículas de Au@SiO₂ en vez de plata. Se consiguió reducir la dispersión de la señal Raman. Se llegaron a detectar concentraciones menores a 1 ppm en un tiempo de análisis de 15 min aunque sin contar con la preparación de las nanopartículas de Au@SiO₂ (Li et al., 2016).

PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS EN ESPECTROSCOPIA RAMAN

Generalmente la espectroscopía Raman no precisa ningún pretratamiento de la matriz que se pretende analizar. Sin embargo, la necesidad de alcanzar mayores sensibilidades ha hecho que se fueran incorporando métodos de extracción asociados a esta técnica.

Como por ejemplo, la aplicación de polímeros de impresión molecular que utilizaron Hu et al., 2014 como sorbente para la extracción en fase sólida de la melamina, preconcentrando así este analito.

Las demás operaciones de pretratamiento consisten en diluciones simples con ácido clorhídrico (Li et al., 2016) o con agua (Rajapandiyam et al., 2015). Aunque sencillo, este paso de dilución es muy importante debido a los niveles de concentración tan bajos de los que hablamos. Rajapandiyam et al., 2015, por ejemplo, realizaron una dilución de 75 veces para obtener una señal óptima de la melamina en el espectro (Figura 6).

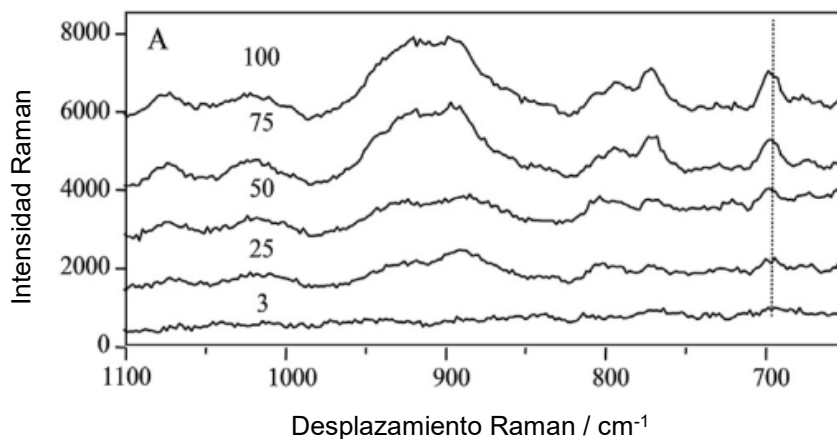


Figura 6 Espectro de la concentración de melamina original de la muestra (25 ppm) tras 3, 25, 50, 75 y 100 veces de dilución (Rajapandiyan et al., 2015)

3.1.4 Inmunoensayos

Los inmunoensayos se basan en las reacciones antígeno-anticuerpo para medir la presencia de un analito en una muestra. La alta especificidad de estas reacciones confiere a esta técnica una selectividad muy elevada.

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) es un tipo de inmunoensayo bastante recurrente debido a su simplicidad y escaso coste. Se debe tener claro que es un método semicuantitativo ya que su desviación estándar suele tener un valor elevado (Lutter et al., 2010). Aunque puede alcanzar valores de sensibilidad superiores a la cromatografía líquida, las reacciones cruzadas de los anticuerpos con otras sustancias hacen que sea preciso confirmar los resultados mediante otras técnicas (Liu et al., 2012). Se ha intentado mejorar la sensibilidad del ELISA preparando anticuerpos monoclonales mediante la unión del hapteno de la melamina con la proteína transportadora BSA (*Bovine Serum Albumin*). Para verificar la especificidad del anticuerpo se añadieron otros componentes muy similares a la melamina como competidores (amelida, amelina y ácido cianúrico) y se comprobó la buena selectividad del método (menos de un 1% de reacciones cruzadas). El límite de detección para la melamina en leche y en leche en polvo fueron 0.1 ppm y 0.2 ppm respectivamente (Yin et al., 2010).

Otro tipo de técnica relacionada es el inmunoensayo con polarización fluorescente (FPIA, *Fluorescence Polarization Immunoassay*). Se ha comprobado que realizando un simple proceso de dilución se puede determinar melamina en leche con un nivel de detección de

9.3 ppb (Wang et al., 2011). La mayor ventaja de este ensayo es el tiempo empleado en el análisis que fue de 15 min.

Existe en la bibliografía otra técnica con valores similares de tiempo y sensibilidad. Se trata del inmunosensor de fluorescencia de guía de ondas planas (PWFI, *Planar Waveguide Fluorescence Immunosensor*) (Guo et al., 2013). La melamina reacciona con anticuerpos fluorescentes marcados previamente. A medida que se produce esta reacción, disminuye su fluorescencia, lo cual puede detectarse y relacionarse con la concentración. Se detectó con un LOD = 6.6 ppb que es uno de los valores de concentración más bajos encontrados, en un tiempo de tan sólo 20 min.

Entre los artículos publicados se halló otro tipo de inmunoensayo que fue utilizado por primera vez para la detección de melamina. El ensayo inmunocromatográfico (CGIA, *Immunochemical Assay*) se basa en la reacción competitiva entre el antígeno y el analito de la muestra para un anticuerpo limitado, que corresponde a un conjugado oro coloidal-Ac. En esta técnica no se observaron reacciones cruzadas por lo que presenta una buena selectividad además de un tiempo de análisis muy corto (3-5 min) y un límite de detección muy aceptable de 0.1 ppm. Si se tiene especial atención a las condiciones de operación como pH, formación de sales o dilución de la muestra que pueden interferir en el comportamiento de los anticuerpos, esta técnica puede ser considerada muy válida para análisis cualitativo de melamina en leche (Gong et al., 2014).

3.1.5 Técnicas colorimétricas

Las técnicas colorimétricas que se han encontrado en la bibliografía con respecto a la determinación de la melamina, se basan en la capacidad de esta para disminuir la estabilidad de las nanopartículas de metales como el oro o la plata. Este fenómeno causa un cambio de color muy visible que hace evidente la presencia de melamina (Liu et al., 2012).

Guo et al., 2010 desarrollaron un experimento con leche y leche en polvo para lactantes en el que utilizaron nanopartículas de oro. Permitted una detección visual del contenido en melamina (la disolución cambia del rojo al morado) con un límite de 1 ppm (leche líquida) y 4.2 ppm (leche en polvo). Se utilizó después un espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-Vis) para completar el ensayo con una sensibilidad mayor llegando a 0.15 ppm y 2.5 ppm respectivamente.

El cambio de color se debe al agregado que forman la melamina y las nanopartículas de oro, y se demostró que son los tres grupos amino de la melamina los responsables de esta reacción. Por su parte, Xing et al., 2013, consiguieron mejorar esta técnica mediante una fase de extracción previa con ácido acético. El límite de detección disminuyó hasta las 70 ppb. También se utilizan nanopartículas de plata en este tipo de técnicas cuyo comportamiento es similar al de las nanopartículas de oro. El cambio de color que suele visualizarse es del amarillo al rojo (Figura 7). Las sensibilidades logradas mediante en este tipo de determinación fueron de 0.292 ppm (Ping et al., 2011) y 0.04 ppm (Kumar et al., 2015) demostrando que puede ser una técnica cualitativa apta incluso para concentraciones muy bajas de melamina.

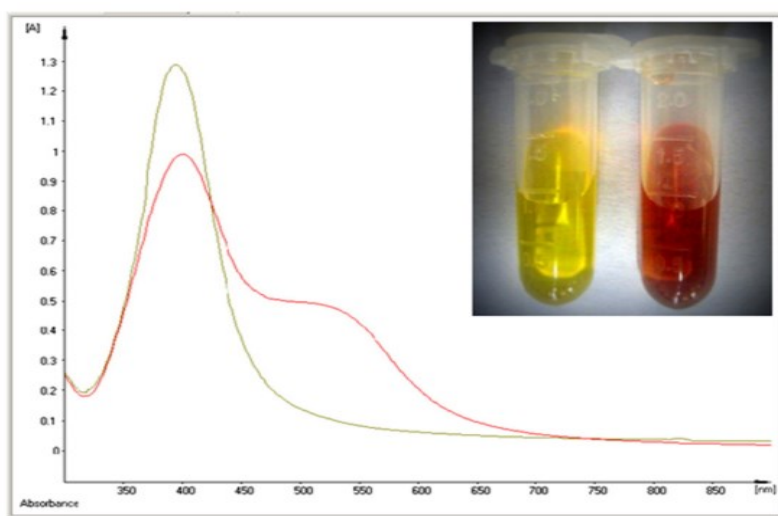


Figura 7 Espectro de absorción de AgNPs en ausencia de melamina (línea amarilla) y en presencia de melamina (línea roja). La fotografía muestra el cambio de color de las nanopartículas de plata (Kumar et al., 2015).

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS CON NANOPARTÍCULAS

Las técnicas colorimétricas generalmente sólo precisan de una pequeña fase de extracción previa y para ello se suelen utilizar disolventes orgánicos como ácido tricloroacético (Ping et al., 2011), ácido acético (Xing et al., 2013), cloroformo (Ping et al., 2011) y metanol (Rovina et al., 2015).

3.2 Técnicas de confirmación

Las técnicas de confirmación suelen caracterizarse por tener una fiabilidad mayor que las que hemos visto hasta el momento. Por eso a veces suelen utilizarse para asegurar que los resultados obtenidos son correctos.

Las técnicas de confirmación por excelencia han venido siendo las cromatográficas. Sin embargo, los avances en otras técnicas como la electroforesis capilar, están abriéndose camino en esta categoría y está demostrado que pueden utilizarse con fiabilidades similares a la cromatografía.

3.2.1 Técnicas cromatográficas

3.2.1.1 Cromatografía líquida

La cromatografía líquida es una de las técnicas más utilizadas en la determinación de melamina en leche por su alta sensibilidad y selectividad. En la bibliografía podemos encontrar múltiples combinaciones con otras técnicas, lo que ayuda a obtener un mayor rendimiento.

Una de las variaciones más comunes es la cromatografía líquida en fase reversa (RPLC, *Reverse Phase Liquid Chromatography*). El problema es que la melamina, al ser un compuesto polar, no suele quedar retenida en las columnas de fase reversa y, por lo tanto, no puede ser separada del resto de componentes. Para solventar este problema se puede añadir una sustancia que forme un “par iónico” con la muestra, como puede ser el 1-octanosulfonato de sodio (Jing and Lu, 2009). Este método llega a tener un LOD de 0.03 ppm.

Por otra parte, se ha comprobado que se alcanzan mayores sensibilidades al acoplar la espectrometría de masas a la cromatografía. En el caso de RPLC, el par iónico mencionado anteriormente no es compatible con espectrometría de masas (MS, *Mass Spectrometry*). Se ha comprobado que el ácido heptafluorobutírico (HFBA) resulta una buena alternativa para hacer posible la combinación RPLC-MS. Utilizando HFBA junto con metanol se ha

llegado a alcanzar un LOQ de 8 ppb de melamina en leche y 15 ppb en leche en polvo (Wu et al., 2009).

Otra posibilidad de combinar la cromatografía líquida es con espectroscopía de fluorescencia. Mediante esta técnica, Finete et al., 2014 determinaron la concentración de melamina en leche de vaca UHT utilizando como fase móvil una disolución de cloruro de amonio en lugar de acetonitrilo, que venía siendo la más utilizada. Una opción mucho más económica y respetuosa con el medio ambiente al no utilizar disolventes orgánicos, mediante la cual se obtuvieron unos excelentes límites de detección y cuantificación (LOD = 1 ppb y LOQ = 3 ppb).

Mediante cromatografía en capa fina acoplada a espectrometría de masas (HPTLC-MS, *High Performance Thin Layer Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) se ha comprobado que también se pueden alcanzar unos buenos resultados en cuanto a sensibilidad (LOD = 2.7 ppb y LOQ = 8.1 ppb) (Rani et al., 2014). Además de ser una técnica sencilla y rápida, apta para análisis rutinarios de muestras de leche fresca, también es una técnica que reduce drásticamente el tiempo y dificultad de pretratamiento de la muestra, como veremos en el apartado correspondiente.

Se ha demostrado que la cromatografía líquida con detección mediante espectroscopía UV-Vis también puede aplicarse a la detección de melamina en muestras de leche y leche en polvo. Si bien es cierto que requiere un importante pretratamiento de la muestra, los resultados alcanzan niveles de detección de 1 ppm (Faraji and Adeli, 2016).

Para la determinación de melamina en leche en polvo, se ha encontrado en la bibliografía la técnica cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a fotodiodo array (UHPLC-PDA, *Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to Photodiode Array*). Esta técnica, que igualmente exige un pretratamiento con disolventes orgánicos (hexano, acetonitrilo) es capaz de detectar, además de melamina, adulterantes como formaldehído y urea. Un inconveniente es que para cada determinación se necesita un procedimiento de preparación de la muestra diferente, a excepción de la melamina y el formaldehído. Esto impide un análisis simultáneo de los adulterantes. Los límites de detección y cuantificación para la melamina mediante esta técnica fueron 0.05 ppm y 0.17 ppm respectivamente (Ahmad et al., 2016).

Sin duda, la técnica por excelencia para la determinación que nos ocupa en este trabajo es la cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem. Es la que ofrece mejores límites de detección y fue la técnica propuesta por la FDA (*Food and Drug Administration*) para la determinación de ácido cianúrico y melamina en leche (Liu et al.,

2012). En la bibliografía se encuentran recogidos experimentos que no conllevan apenas proceso de pretratamiento de muestra con LOD = 0.05 ppm (Lutter et al., 2010). Y también otros con mayores necesidades en cuanto a sensibilidad que requieren un tratamiento de la muestra más elaborado con LOD = 0.2 ppb (Wang et al., 2016).

En la Tabla 3 se resumen algunas de las técnicas cromatográficas comentadas hasta ahora para facilitar así una comparativa entre sus límites de detección. Cabe decir que, para una mejor valoración, ha de tenerse en cuenta el tiempo necesario para llevar a cabo estas determinaciones, así como la dificultad de preparación de la muestra como veremos a continuación.

Tabla 3 Comparativa de técnicas de cromatografía líquida consultadas y sus límites de detección

Técnica analítica	Muestra	Límite de detección (ppm)	Referencia
Cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) (par iónico 1-octanosulfonato de sodio)	Leche	0.03	<i>Jing and Lu, 2009</i>
Cromatografía líquida con espectroscopía de fluorescencia (HPLC-Fluo)	Leche de vaca UHT	0.001	<i>Finete et al., 2014</i>
Cromatografía en capa fina acoplada a espectrometría de masas (HPTLC-MS)	Leche fresca	0.0027	<i>Rani et al., 2014</i>
Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	Leche en polvo	0.0002	<i>Wang et al., 2016</i>

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Para la determinación con cromatografía líquida el pretratamiento de la muestra generalmente requiere una extracción líquida con un disolvente polar y, en algunas ocasiones, además una etapa de purificación empleando la extracción en fase sólida (Liu et al., 2012). Las sustancias más utilizadas son el ácido trifluoroacético, el ácido acético y el ácido tricloroacético (Finete et al., 2014), el acetonitrilo (Braekevelt et al., 2010) además del metanol (Ahmad et al., 2016) y el cloroformo (Wu et al., 2009).

La extracción en fase sólida suele realizarse con cartuchos de intercambio iónico (Braekevelt et al., 2010). Este paso es uno de los puntos débiles de la cromatografía ya que requiere un tiempo adicional importante en el análisis y además, una mala extracción puede derivar en un resultado poco fiable.

Existe un caso en el que se ha diseñado un método de pretratamiento para la extracción en línea de la melamina. Se trata de la microextracción con polímero monolítico (PMME, *Polymer Monolithic Microextraction*) y acoplándolo a una columna de cromatografía líquida junto con un detector UV, se obtuvo un LOD de 0.024 ppm (Peng et al., 2010). Es una variación de la extracción en fase sólida que tiene la ventaja de ser un proceso continuo de extracción y análisis de melamina en leche.

En ocasiones se requiere de un último paso para alcanzar un nivel de sensibilidad alto en la determinación. Consiste en realizar una derivatización.

La derivatización es una modificación química de un compuesto para obtener otro que tenga propiedades más adecuadas para el procedimiento analítico que se necesita y que a la vez sea estable. En el caso análisis con detectores UV-Vis, se ha demostrado recientemente que la derivatización previa con cloruro de Dabsyl (cloruro de 4-(dimetilaminoazobenceno-4-sulfonilo)), aumenta la sensibilidad de la determinación de melamina y su hidrofobicidad (Faraji and Adeli, 2016).

El cloruro de Dabsyl reacciona con el grupo amino (entre otros) de las sustancias como la melamina, formando otro mucho más detectable incluso utilizando espectroscopía UV-Vis (Jansen et al., 1991). En este experimento en concreto, completaron el pretratamiento con una microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) utilizando 1-octanol.

Las técnicas que incluyen espectrometría de masas tienen un pretratamiento generalmente más sencillo debido a la ya alta sensibilidad del propio método y no precisan muchas veces de extracción en fase sólida (Lutter et al., 2010).

También es cierto que las sensibilidades requeridas son cada vez mayores con lo que a pesar de los buenos resultados de la espectrometría de masas acoplada a HPLC, se están realizando nuevos pretratamientos para concentrar la melamina. Por ejemplo, se ha probado realizar una dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, *Matrix Solid Phase Dispersion*) y utilizar como sorbente un polímero de impresión molecular (MIP, *Molecularly Imprinted Polymer*) cuyas propiedades de reconocimiento molecular lo hacen altamente específico y selectivo. Este método de pretratamiento no llevó más de 30 min y, seguido

de LC-MS/MS, ha arrojado uno de los mejores resultados en cuanto a sensibilidad se refiere con un LOD de 0.2 ppb de melamina en una muestra de leche en polvo (Wang et al., 2016).

Por otra parte, existen variaciones dentro de la cromatografía líquida que no precisan apenas de un pretratamiento y descartan completamente el uso de disolventes orgánicos (al menos en el pretratamiento de la muestra). Un ejemplo es el experimento que realizaron Rani et al., 2014, en el cual analizaron el contenido de melamina en muestras de leche mediante HPTLC-MS. Tan solo precisaron un baño de ultrasonidos y un filtrado con papel de filtro de 0.5 μm para alcanzar unos valores de concentración del orden de ppb.

3.2.1.2 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es otra técnica muy utilizada para la determinación de melamina en leche, así como para la confirmación de otras técnicas. Se debe a su relativo bajo coste de mantenimiento y uso y su alta sensibilidad cuando se acopla a espectrometría de masas (Liu et al., 2012).

Entre los experimentos encontrados en la bibliografía, podemos destacar la utilización de una columna doble en GC-MS (Xu et al., 2009). La primera se trata de una columna de polaridad débil y la segunda, una de polaridad mucho más fuerte fabricada con polietilenglicol. Ambas se acoplaron mediante un conector de columnas capilares hecho de cuarzo. El propósito de estas adaptaciones era alcanzar una detección directa de la melamina obteniendo a la vez una buena sensibilidad. Se consiguió un LOD = 0,01 ppm para muestras de leche y leche en polvo sin paso previo de derivatización.

El resto de datos presentes en las investigaciones consultadas no arrojaron mejores valores de sensibilidad aun habiendo realizado un proceso completo de extracción de la melamina, como por ejemplo Lutter et al., 2010 que consiguieron un LOD = 0,05 ppm. Por su lado, Pan et al., 2012, obtuvieron una sensibilidad de 0,01 ppm para la melamina y 0,025 ppm para el ácido cianúrico (se trataba de una técnica de determinación simultánea).

Comparando los resultados de Xu et al., 2009 (sin derivatización) con Lutter et al., 2010 y Pan et al., 2012 (con derivatización) comprobamos que tienen órdenes de magnitud similares. Se puede decir, por tanto, que se deben realizar muchos ajustes en una técnica para alcanzar una determinada sensibilidad y a la vez prescindir del paso de derivatización.

PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS EN CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases precisa normalmente de varias etapas de preparación de la muestra. Normalmente son una extracción líquida mediante disolventes orgánicos, una extracción en fase sólida y un último paso de derivatización. Como ya hemos comentado, este último paso tiene la finalidad de mejorar alguna propiedad del analito mediante la ligera modificación de su estructura química. Por ejemplo, mejorar su facilidad de extracción.

El disolvente que más frecuentemente se encuentra en la bibliografía es el acetonitrilo o el ácido tricloroacético (Xu et al., 2009). Por otro lado, la extracción en fase sólida suele realizarse mediante intercambio catiónico fuerte (SCX, *Strong Cation Exchange*) (Lutter et al., 2010).

En la Tabla 4 se realiza una comparación de los tiempos de análisis de cada técnica en función del método de preparación de la muestra.

Tabla 4 Comparación del tiempo de análisis en función del método de preparación de la muestra

Preparación de la muestra	Técnica analítica	Tiempo de análisis	Referencia
Dispersión de la matriz en fase sólida	LC-MS/MS	30 min aprox.	Wang et al., 2016
Desproteización con ácido acético y ácido tricloroacético	HPLC-Fluo	30 min aprox.	Finete et al., 2014
Extracción en fase sólida + Derivatización	GC-MS	1 h aprox	Pan et al., 2012
Microextracción en línea mediante polímero monolítico	HPLC-UV	32 min aprox.	Peng et al., 2010

La derivatización es un paso que, aunque requiere de un tiempo adicional en la determinación, sí proporciona una clara diferencia en cuanto a la sensibilidad. En los artículos encontrados se utiliza bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) como reactivo (Pan et al., 2012) para llevarla a cabo. Aunque existen excepciones que, aun omitiendo este paso, consiguen resultados muy competitivos (Xu et al., 2009).

3.2.2 Técnicas no cromatográficas

3.2.2.1 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica basada en la migración de partículas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. Se utiliza en la separación de melamina por su alta eficiencia y rentabilidad. Además, proporciona una serie de ventajas como que precisa de muy poca cantidad de muestra y reactivo para su análisis, a la vez que ofrece una alta velocidad de separación. En lo que se refiere a la sensibilidad, se ha aplicado en varias ocasiones en la determinación de melamina en leche obteniendo muy buenos resultados de detección como veremos a continuación.

Un momento clave a la hora de trabajar con esta técnica es la fase de inyección de la muestra. Tanto la velocidad de inyección como la presión influyen considerablemente en la separación de los analitos. Lu et al., 2014 realizaron un análisis mediante electroforesis capilar en zona (CZE, *Capillary Zone Electrophoresis*) en el que decidieron cambiar la inyección hidrodinámica (la más utilizada) por un sistema de alimentación electrocinética (EKS, *Electrokinetic Supercharging*). La alimentación electrocinética consiste en la aplicación de una diferencia de voltaje mientras que la hidrodinámica se basa en una diferencia de presión. Este tipo de alimentación preconcentra la melamina antes de ser analizada. Se alcanzaron valores de detección extraordinariamente positivos (LOD = 0.7 ppb) el cual representa uno de los mejores encontrados entre todas las técnicas de la bibliografía.

Más recientemente se intentó evitar el paso previo de pretratamiento con disolventes orgánicos. Se realizó una modificación de la superficie interna del capilar de sílice fundida a base de un revestimiento mixto de dos polímeros: polidopamina y poli (2-metil-2-oxazolona) parcialmente hidrolizado. Se consiguió detectar mediante electroforesis capilar con detector ultravioleta (CE-UV, *Capillary Electrophoresis - Ultraviolet detection*) a un límite de 0.097 ppm en muestras de leche en polvo (Zhang et al., 2015) siendo este un buen resultado de detección para constar tan solo de un paso experimental.

La técnica de electroforesis capilar es en definitiva una alternativa económica y con unos niveles de selectividad y sensibilidad muy aceptables para la determinación de melamina en muestras de leche reales.

En la Tabla 5 se muestra una comparativa de los resultados alcanzados mediante algunas de las técnicas que se han mencionado hasta ahora. Podemos observar que la EKS-CZE es la técnica que arroja un mejor límite de detección, incluso por delante de la HPTLC-MS, habitualmente la más sensible.

Tabla 5 Comparación de la técnica de electroforesis capilar con otras técnicas para la determinación de melamina

Técnica analítica	Rango lineal (ppm)	Límite de detección (ppm)	Muestra a analizar	Referencia
ELISA	0.005-0.135	0.1-0.2	Leche y leche en polvo	<i>Yin et al., 2010</i>
GC-MS	0.05-2	0.01	Leche y leche en polvo	<i>Xu et al., 2009</i>
HPTLC-MS	1-50	0.0027	Leche y leche en polvo	<i>Rani et al., 2014</i>
EKS-CZE	0.005-0.2	0.0007	Leche y leche en polvo	<i>Lu et al., 2014</i>
CE-UV	6.25-100	0.097	Leche en polvo	<i>Zhang et al., 2015</i>

PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS EN ELECTROFORESIS CAPILAR

Para el análisis mediante electroforesis capilar, la mayoría de las muestras de leche necesita de un tratamiento previo de extracción o preconcentración de la melamina. Esta fase se suele realizar mediante adición de disolventes polares como la acetona (Lu et al., 2014), acetato de sodio (Kong et al., 2014) o acetonitrilo (Chen et al., 2011). A continuación, se somete la mezcla a una serie de pasos de centrifugación y aplicación de ultrasonidos tras lo cual se consigue la preconcentración deseada de la melamina.

Como hemos mencionado en el apartado anterior, recientemente se ha realizado un avance en lo que respecta a la utilización de estos disolventes en la fase de extracción. Zhang et al., 2015, consiguieron por primera vez realizar una determinación de la melamina mediante electroforesis capilar combinado con detección ultravioleta omitiendo el paso previo de extracción y alcanzando unos resultados de sensibilidad más que aceptables.

3.2.2.1 Técnicas electroquímicas

Los métodos electroquímicos ofrecen una buena competitividad en cuanto a detección y simplicidad del análisis. Araujo De and Paixão, 2013 desarrollaron un método que se basa en la reducción del par iónico de cloruro de cobre de melamina ($\text{MELH}^+ [\text{CuCl}_2]^-$), el cual se forma a través de la disolución de un electrodo de cobre en un medio que contiene melamina. La formación de este complejo produce un cambio en la señal voltamperométrica directamente relacionada con la concentración de melamina. Tiene la ventaja de ser muy selectivo con respecto a otras sustancias orgánicas presentes en la leche. Se obtuvo un límite de detección de 0.107 ppm, lo cual resulta muy aceptable para un equipo portátil que puede trasladarse fácilmente y ser usado *in situ*.

Rovina et al., 2015 diseñaron un nuevo biosensor electroquímico basado en la modificación de un electrodo de oro con quitosán, nanopartículas de óxido de calcio y un líquido iónico para analizar melamina en productos lácteos. Se incrementó la superficie del electrodo haciéndolo más eficiente en la inmovilización de melamina y, por lo tanto, en su sensibilidad de detección. Este sensor resultó ser una de las técnicas más sensibles encontradas con un límite de detección de 9.6×10^{-16} M que equivale a un orden de ppq (partes por cuatrillón). Esta alta sensibilidad lo hace adecuado para ser utilizado en inspecciones alimentarias o en laboratorios de investigación.

En la Tabla 6 se recogen algunos experimentos en los que se ha determinado melamina en leche mediante técnicas electroquímicas utilizando electrodos modificados. A la vista de los resultados esta técnica es sin duda una de las opciones más competitivas a la hora de analizar melamina en leche.

Tabla 6 Comparación de técnicas electroquímicas para la determinación de melamina (Rovina et al., 2015)

Método	Muestra	Límite de detección	Referencia
Electrodo de oro modificado con CHIT/CaONPs/[EMIM][Otf]	Leche en polvo	9.6×10^{-16} M	Rovina et al., 2015
Electrodo de composite grafito-epoxy utilizando cloruro de bismuto	Leche fresca	2.5×10^{-12} M	Zhu et al., 2011
Electrodo de cobre con formación de complejo MELH ⁺ [CuCl ₂] ⁻	Leche	0.107 ppm	Araujo de, and Paixão, 2013
Electrodo de carbón de pantalla impresa modificado por película de polímero	Productos lácteos y comida para mascotas	98.3 ppb	Chen-et al., 2011

3.2.2.2 Otras técnicas

Se ha encontrado en la bibliografía una reciente publicación que desarrolla una técnica para la determinación simultánea de urea y melamina en leche en polvo (Ma et al., 2016). Se trata de la técnica de huella química no lineal. No precisa de pretratamiento y utiliza “H⁺ + Ce⁴⁺ + BrO₃⁻ + ácido malónico” como sistema de reacción. Para ello hace reaccionar una mezcla de ácido sulfúrico, ácido malónico, sulfato de amonio cérico, bromuro de sodio, agua doblemente destilada y una cantidad conocida de leche en polvo. Tras una serie de análisis de muestras con concentraciones conocidas de urea y melamina, se obtuvo una relación lineal múltiple entre el contenido de estos adulterantes y el tiempo inductivo (tiempo que tarda en comenzar la reacción química) de la reacción de la mezcla de leche en polvo correspondiente. Por último, se obtiene el contenido en melamina y urea mediante el método clásico de mínimos cuadrados.

A través de esta técnica se consiguió un límite de detección para la urea y la melamina de 0.33 ppm y 0.05 ppm respectivamente.

Comparado con la cromatografía de líquidos de alta resolución, este método resulta mucho más económico, de fácil manejo y además no precisa de ningún tipo de pretratamiento de la muestra. Eso sí, siempre y cuando el contenido total de urea y melamina se encuentre dentro del rango 0-800 ppm.

4 CONCLUSIONES

Tras una revisión de los últimos trabajos relacionados con el análisis de la melamina en leche, se puede decir que es una determinación analítica que despierta gran interés. Desde el problema ocurrido en China con las intoxicaciones con leche infantil en polvo, se está avanzando considerablemente en el diseño de nuevas estrategias de análisis.

En el intento de establecer un mayor control de la seguridad alimentaria, la legislación en cuanto a niveles de melamina en alimentos se ha vuelto más exigente. Esto ha llevado a un incremento de los análisis rutinarios y de las inspecciones alimentarias en los últimos años. Por esta razón, el diseño se centra en general en técnicas que requieran poco tiempo de determinación además de un grado de detección exigente.

Es por esto que se tiende en muchas ocasiones al uso de métodos *in situ* y de *screening* ya que se ha demostrado que cuentan cada vez con mejores datos de sensibilidad, lo que permite prescindir de los sofisticados equipos cromatográficos, salvo excepciones.

Entre las técnicas de *screening* más competentes en cuanto a niveles de sensibilidad se puede destacar la espectroscopía de fluorescencia, pese a que requiere casi siempre una fase previa de extracción de la melamina que aumenta el tiempo de la determinación.

Si lo que se busca es una mayor rapidez en la detección de melamina, una buena opción es la espectroscopía de infrarrojo. No requiere pretratamiento de la muestra y el tiempo del análisis se encuentra entre 1 y 5 minutos.

Por otra parte, entre los métodos de confirmación, la técnica más ambiciosa y que mejores resultados arroja hasta el momento es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Por algo es la que actualmente recomienda la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*).

Sin embargo, se ha comprobado que la electroforesis capilar también es una buena opción si se precisan alcanzar niveles de detección muy bajos. Tiene la ventaja adicional de ser más económico que la cromatografía y requerir muy poca cantidad de muestra y de reactivo.

Hemos comentado que la mayoría de estas determinaciones necesita una extracción previa de la melamina para alcanzar los niveles de detección deseados. En relación con este aspecto, los métodos para la extracción de la melamina también han sufrido una evolución. La química verde es algo que se está teniendo en cuenta a la hora de desarrollar

nuevas estrategias de preparación de las muestras y esto lleva a utilizar cada vez menos cantidades de disolventes orgánicos e incluso muchas técnicas omiten su uso.

Una vez valorados todos estos aspectos, se podría deducir que:

- Hay un claro impacto en la evolución de las técnicas de determinación de melamina en leche debido a los casos de intoxicaciones por adulteración de leche infantil
- Existe un especial interés en desarrollar técnicas más rápidas debido al aumento de análisis rutinarios. En este caso destaca, entre las técnicas de *screening*, la espectroscopía de infrarrojo la cual requiere muy pocos minutos para realizarse.
- Se está intentando sustituir los disolventes orgánicos por otras sustancias más ecológicas y respetuosas con el medio ambiente como, por ejemplo, el cloruro amónico
- Al mismo tiempo, la sensibilidad del método es un tema muy importante a la hora de hablar de seguridad alimentaria. Los métodos de confirmación necesitan más tiempo de ejecución, aunque sus resultados alcanzan el orden de las ppb holgadamente
- La necesidad de pretratar las muestras constituye un reto para los próximos años. Más concretamente se busca la reducción de los tiempos de extracción de la melamina, así como la cantidad de los reactivos utilizados

En definitiva, la gran preocupación que está despertando la seguridad alimentaria, requiere de avances muy importantes en las técnicas analíticas para la determinación de adulterantes. Para una mayor difusión del control de los alimentos, se pretende que en los próximos años las estrategias para el análisis sean cada vez más accesibles económicamente, rápidas y fiables.

5 BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, S. A.; Ahmed, M.; Qadir, M. A.; Shafiq, M. I.; Batool, N.; Nosheen, N.; Ahmad, M.; Mahmood, R. K.; Khokhar, Z. U. Quantitation and Risk Assessment of Chemical Adulterants in Milk Using UHPLC Coupled to Photodiode Array and Differential Refractive Index Detectors. *Food Anal. Methods* **2016**, *9* (12), 3367–3376.

Araujo De, W. R.; Paixão, T. R. L. C. Use of Copper Electrode for Melamine Quantification in Milk. *Electrochim. Acta* **2013**, *117*, 379–384.

Azad, T.; Ahmed, S. Common Milk Adulteration and Their Detection Techniques. *Int. J. Food Contam.* **2016**, *3* (1), 22.

Balabin, R. M.; Smirnov, S. V. Melamine Detection by Mid- and near-Infrared (MIR/NIR) Spectroscopy: A Quick and Sensitive Method for Dairy Products Analysis Including Liquid Milk, Infant Formula, and Milk Powder. *Talanta* **2011**, *85* (1), 562–568.

Braekevelt, E.; Lau, B. P.-Y.; Feng, S.; Ménard, C.; Tittlemier, S. a. Determination of Melamine, Ammeline, Ammelide and Cyanuric Acid in Infant Formula Purchased in Canada by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A, Chemis* **2010**, *28* (6), 1610–1615.

CAPSA FOOD <http://www.capsafood.com/es/prensa/> (accessed Mar 20, 2017).

Chen, J.; Lei, X.; Peng, B. Study on the Fluorescence Spectra of Melamine in Pure Milk. *J. Opt.* **2016**.

Chen X, Yuan HP, Cao YH, C. Q. On-Line Preconcentration and Sensitive Determination of Melamine in Milk Powder and Animal Feeds Samples by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Chin J Anal Chem* **2011**, *39*, 1418–1422.

Escobar, A, Sosa, D & Ponce, P. Melamina, Un Problema Potencial Para La Salud Animal Y Humana Como Adulterante En Los Alimentos Con Énfasis En La Leche. *Rev. Salud Anim.* **2010**, *32* (1), 22–31.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Melamine in Food and Feed. *EFSA J.* **2010**, *8* (December 2009), 1–145.

Faraji, M.; Adeli, M. Sensitive Determination of Melamine in Milk and Powdered Infant Formula Samples by High-Performance Liquid Chromatography Using Dabsyl Chloride

- Derivatization Followed by Dispersive Liquid liquid Microextraction. *Food Chem.* **2016**, *221*, 139–146.
- Feng, W., Lv, C., Liping, Y., Cheng, J., & Yan, C. Determination of Melamine Concentrations in Dairy Samples. *LWT - Food Sci. Technol.* **2012**, *47* (1), 147–153.
- Finete, V. de L. M.; Gouvêa, M. M.; Marques, F. F. de C.; Pereira Netto, A. D. Validation of a Method of High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection for Melamine Determination in UHT Whole Bovine Milk. *Food Control* **2014**, *51*, 402–407.
- Forchetti, A. P.; Poppi, R. J. LWT - Food Science and Technology Use of NIR Hyperspectral Imaging and Multivariate Curve Resolution (MCR) for Detection and Quanti Fi Cation of Adulterants in Milk Powder. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *76*, 337–343.
- Gong, Y.; Zhang, M.; Wang, M.; Chen, Z.; Xi, X. Development of Immuno-Based Methods for Detection of Melamine. *Arab. J. Sci. Eng.* **2014**, *39* (7), 5315–5324.
- Guangchao Tang, Liping Du, X. S. Detection of Melamine Based on the Fluorescence Resonance Energy Transfer between CdTe QDs and Rhodamine B. *Food Chem.* **2013**, *141* (14), 4060–4065.
- Guijarro-Díez, M. Castro Puyana M. Crego, A. L. Marina, M. L. Detection of Saffron Adulteration with Gardenia Extracts through the Determination of Geniposide by Liquid Chromatography–mass Spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *55*, 30–37.
- Guo, H.; Zhou, X.; Zhang, Y.; Song, B.; Liu, L.; Zhang, J.; Shi, H. Highly Sensitive and Rapid Detection of Melamine in Milk Products by Planar Waveguide Fluorescence Immunosensor (PWF). *Sensors Actuators, B Chem.* **2013**, *194*, 114–119.
- Guo, L.; Zhong, J.; Wu, J.; Fu, F.; Chen, G.; Zheng, X.; Lin, S. Visual Detection of Melamine in Milk Products by Label-Free Gold Nanoparticles. *Talanta* **2010**, *82* (5), 1654–1658.
- Hau, A. K.; Kwan, T. H.; Li, P. K. Melamine Toxicity and the Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20* (2), 245–250.
- Herman, E. A. La Defensa Alimentaria Dos Líneas Conceptos. In Seminario Sobre El material Biológico y la Bioseguridad en el Marco de la Convención de Armas Biológicas; Santiago de Chile, 2013.
- Hu, Y.; Feng, S.; Gao, F.; Li-Chan, E. C. Y.; Grant, E.; Lu, X. Detection of Melamine in Milk Using Molecularly Imprinted Polymers-Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Food Chem.* **2014**, *176*, 123–129.

- Jansen, E. H. J. M.; Workspace., . Author links open the author; Berg, R. H. van den; Workspace., . Author links open the author; Both-Miedema, R.; Workspace., . Author links open the author; Doorn, L. Advantages and Limitations of Pre-Column Derivatization of Amino Acids with Dabsyl Chloride. *J. Chromatogr. A* **1991**, *553*, 123–133.
- Jawaid, S.; Talpur, F. N.; Sherazi, S. T. H.; Nizamani, S. M.; Khaskheli, A. A. Rapid Detection of Melamine Adulteration in Dairy Milk by SB-ATR-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Chem.* **2013**, *141* (3), 3066–3071.
- Jing, W.; Lu, B. Quantitative Liquid Chromatography Analysis of Melamine in Dairy Products Using Agilent $\hat{\text{e}}^{\text{TM}}$ S 1120 Compact LC and 1200 Rapid Resolution LC Application Note. *Food Saf.* **2009**.
- Kong, Y.; Yuan, J.; Wang, Z.; Hou, Z.; Yu, J.; Jin, H.; Xie, M.; Chang, N.; Xu, W.; Zhao, Y.; et al. Assay of Melamine in Milk Products with a pH-Mediated Stacking Technique in Capillary Electrophoresis. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37* (6), 717–724.
- Kumar, N.; Kumar, H.; Mann, B.; Seth, R. Colorimetric Determination of Melamine in Milk Using Unmodified Silver Nanoparticles. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *156*, 89–97.
- Li, R.; Yang, G.; Yang, J.; Han, J.; Liu, J.; Huang, M. Determination of Melamine in Milk Using Surface Plasma Effect of Aggregated Au@SiO₂ Nanoparticles by SERS Technique. *Food Control* **2016**, *68*, 14–19.
- Liu, Y.; Todd, E. E. D.; Zhang, Q.; Shi, J.; Liu, X. Recent Developments in the Detection of Melamine. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2012**, *13* (7), 525–532.
- De Lourdes Mendes Finete, V.; Gouvêa, M. M.; De Carvalho Marques, F. F.; Netto, A. D. P. Is It Possible to Screen for Milk or Whey Protein Adulteration with Melamine, Urea and Ammonium Sulphate, Combining Kjeldahl and Classical Spectrophotometric Methods. *Food Chem.* **2013**, *141* (4), 3649–3655.
- Lu, Y.; Wang, D.; Kong, C.; Jia, C.; Breadmore, M. C. Analysis of Melamine in Milk Powder and Liquid Milk by Capillary Zone Electrophoresis After Electrokinetic Supercharging. *Food Anal. Methods* **2014**, *8* (5), 1356–1362.
- Lutter, P.; Savoy-Perroud, M. C.; Campos-Gimenez, E.; Meyer, L.; Goldmann, T.; Bertholet, M. C.; Mottier, P.; Desmarchelier, A.; Monard, F.; Perrin, C.; et al. Screening and Confirmatory Methods for the Determination of Melamine in Cow's Milk and Milk-Based Powdered Infant Formula: Validation and Proficiency-Tests of ELISA, HPLC-UV, GC-MS and LC-MS/MS. *Food Control* **2010**, *22* (6), 903–913.

- M.S. Attiaa, E. Bakira, Ayman A. Abdel-azizb, M. S. A. A. Determination of Melamine in Different Milk Batches Using a Novel Chemosensor Based on the Luminescence Quenching of Ru(II) Carbonyl Complex. *Talanta* **2011**, *84* (1), 23–33.
- Ma, Y.; Dong, W.; Bao, H.; Fang, Y.; Fan, C. Simultaneous Determination of Urea and Melamine in Milk Powder by Nonlinear Chemical Fingerprint Technique. *Food Chem.* **2016**, *221*, 898–906.
- Manning, L.; Soon, J. M. Food Safety, Food Fraud, and Food Defense: A Fast Evolving Literature. *J. Food Sci.* **2016**, *81* (4), R823–R834.
- Mauer, L. J.; Chernyshova, A. A.; Hiatt, A.; Deering, A.; Davis, R. Melamine Detection in Infant Formula Powder Using near- and Mid-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (10), 3974–3980.
- Moore, J. C.; Spink, J.; Lipp, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* **2012**, *77* (4).
- Nascimento, C. F.; Rocha, D. L.; Rocha, F. R. P. A Fast and Environmental Friendly Analytical Procedure for Determination of Melamine in Milk Exploiting Fluorescence Quenching. *Food Chem.* **2014**, *169*, 314–319.
- Nascimento, C. F.; Santos, P. M.; Pereira-Filho, E. R.; Rocha, F. R. P. Recent Advances on Determination of Milk Adulterants. *Food Chem.* **2016**, *221*, 1232–1244.
- Okazaki, S.; Hiramatsu, M.; Gonmori, K.; Suzuki, O.; Tu, A. T. Rapid Nondestructive Screening for Melamine in Dried Milk by Raman Spectroscopy. *Forensic Toxicol.* **2009**, *27* (2), 94–97.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, F. <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/es/> (accessed Feb 14, 2017).
- Pan, X. D.; Wu, P. gu; Yang, D. J.; Wang, L. Y.; Shen, X. H.; Zhu, C. Y. Simultaneous Determination of Melamine and Cyanuric Acid in Dairy Products by Mixed-Mode Solid Phase Extraction and GC-MS. *Food Control* **2012**, *30* (2), 545–548.
- Peng, X. T.; Shi, Z. G.; Feng, Y. Q. Rapid and High-Throughput Determination of Melamine in Milk Products and Eggs by Full Automatic On-Line Polymer Monolith Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Food Anal. Methods* **2010**, *4* (3), 381–388.

- Ping, H.; Zhang, M.; Li, H.; Li, S.; Chen, Q.; Sun, C.; Zhang, T. Visual Detection of Melamine in Raw Milk by Label-Free Silver Nanoparticles. *Food Control* **2011**, *23* (1), 191–197.
- R.H. Stadler, W. J. F. B. S. A. M. T. Contaminants of Milk and Dairy Products: Contamination Resulting from Farm and Dairy Practices. *Encycl. Dairy Sci. (Second Ed.* **2011**, 887–897.
- Rajapandiyam, P.; Tang, W. L.; Yang, J. Rapid Detection of Melamine in Milk Liquid and Powder by Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate Array. *Food Control* **2015**, *56*, 155–160.
- Rani, R.; Medhe, S.; Srivastava, M. HPTLC-MS Analysis of Melamine in Milk: Standardization and Validation. *Dairy Sci. Technol.* **2014**, *95* (2), 257–263.
- Rashvand, M.; Omid, M.; Mobli, H.; Firouz, M. S. Adulteration Detection in Olive Oil Using Dielectric Technique and Data Mining. *Sens. Bio-Sensing Res.* **2016**, *11*, 33–36.
- Reuters. EL UNIVERSO ¿Qué es la melamina?
<http://www.eluniverso.com/2008/09/22/0001/14/05CE6F4963E548BBB6180D0E9B7CD5AC.html> (accessed Mar 5, 2017).
- Rovina, K.; Siddiquee, S.; Wong, N. K. Development of Melamine Sensor Based on Ionic Liquid/nanoparticles/chitosan with Modified Gold Electrode for Determination of Melamine in Milk Product. *Sens. Bio-Sensing Res.* **2015**, *4*, 16–22.
- Salcedo, A. J. G.; Delgado, F. G.; Rincón, F. Z. Determinación de Adulterantes En Café Tostado Molido Utilizando La Técnica Foto- Acústica Determination of Adulterants in Ground Roasted Coffee Using Photoacoustic Technique. **2012**, *44* (3).
- Sharma, K.; Paradakar, M. The Melamine Adulteration Scandal. *Food Secur.* **2010**, *2* (1), 97–107.
- Skinner, C. G.; Thomas, J. D.; Osterloh, J. D. Melamine Toxicity. *J. Med. Toxicol.* **2010**, *6* (1), 50–55.
- Tosun, M. Detection of Adulteration in Honey Samples Added Various Sugar Syrups with ¹³C/¹²C Isotope Ratio Analysis Method. *Food Chem.* **2013**, *138* (2–3), 1629–1632.
- Wang, Q.; Haughey, S. A.; Sun, Y. M.; Eremin, S. A.; Li, Z. F.; Liu, H.; Xu, Z. L.; Shen, Y. D.; Lei, H. T. Development of a Fluorescence Polarization Immunoassay for the Detection of Melamine in Milk and Milk Powder. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399* (6), 2275–2284.

- Wang, Y.; Gao, L.; Qin, D.; Chen, L. Analysis of Melamine in Milk Powder by CNT-MIP with Matrix Solid Phase Dispersion and LC-MS/MS. *Food Anal. Methods* **2016**.
- Wu, Q.; Fan, K.; Sha, W.; Ruan, H.; Zeng, R.; Shieh, C. Highly Sensitive Detection of Melamine Based on Reversed Phase Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Chinese Sci. Bull.* **2009**, *54* (5), 732–737.
- Wu, Q.; Long, Q.; Li, H.; Zhang, Y.; Yao, S. An Upconversion Fluorescence Resonance Energy Transfer Nanosensor for One Step Detection of Melamine in Raw Milk. *Talanta* **2015**, *136*, 47–53.
- Xing, H. bo; Wu, Y. gen; Zhan, S. shan; Zhou, P. A Rapid Colorimetric Detection of Melamine in Raw Milk by Unmodified Gold Nanoparticles. *Food Anal. Methods* **2013**, *6* (5), 1441–1447.
- Xiu, C., & Klein, K. K. Melamine in Milk Products in China: Examining the Factors That Led to Deliberate Use of the Contaminant. *Food Policy* **2010**, *35* (5), 463–470.
- Xu, X. min; Ren, Y. ping; Zhu, Y.; Cai, Z. xuan; Han, J. long; Huang, B. fen; Zhu, Y. Direct Determination of Melamine in Dairy Products by Gas Chromatography/mass Spectrometry with Coupled Column Separation. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *650* (1), 39–43.
- Yasui, T.; Kobayashi, T.; Okada, A.; Hamamoto, S.; Hirose, M.; Mizuno, K.; Kubota, Y.; Umemoto, Y.; Kawai, N.; Tozawa, K.; et al. Long-Term Follow-up of Nephrotoxicity in Rats Administered Both Melamine and Cyanuric Acid. *BMC Res. Notes* **2014**, *7* (1), 87.
- Yin, W.; Liu, J.; Zhang, T.; Li, W.; Liu, W.; Meng, M.; He, F.; Wan, Y.; Feng, C.; Wang, S.; et al. Preparation of Monoclonal Antibody for Melamine and Development of an Indirect Competitive ELISA for Melamine Detection in Raw Milk, Milk Powder, and Animal Feeds. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (14), 8152–8157.
- Zhang, Y.; Chen, L.; Zhang, C.; Liu, S.; Zhu, H.; Wang, Y. Talanta Polydopamine-Assisted Partial Hydrolyzed Poly (2-Methyl-2-Oxazolinze) as Coating for Determination of Melamine in Milk by Capillary Electrophoresis. *Talanta* **2015**, *150*, 375–387.
- Zhu, J.; Chang, H.; Li, J. J.; Li, X.; Zhao, J. W. Dual-Mode Melamine Detection Based on Gold Nanoparticles Aggregation-Induced Fluorescence “turn-On” and “turn-Off” of CdTe Quantum Dots. *Sensors Actuators, B Chem.* **2016**, *239*, 906–915.
- Zhu, Y.; Zhang, Y.; Li, J.; Han, Y.; Dong, G.; Zhang, H.; Al, E. T. Determination of Melamine in Fresh Milk by Electrochemistry with Solid Phase Microextraction at Bismuthyl Chloride Modified Graphite Epoxy Composite Electrode. *Sci. Res.* **2011**, *2011* (September), 612–618.

Zolotov, Y. A. The Mystery of the Melamine Story. *J. Anal. Chem.* **2010**, 65 (10), 987–987.

6 ANEXO. TABLAS-RESUMEN DE LA BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN						
Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentario	Ref.
Cromatografía de gases de doble columna y espectrometría de masas (GC-MS)	Leche y leche en polvo	Melamina	0,01 ppm	0,05 ppm	*No realiza paso de derivatización *La muestra se marcó con isótopo estándar intermedio $^{13}\text{C}_3$, $^{15}\text{N}_3$ y se extrajo la melamina con ácido tricloroacético 1% + solución de acetato al 2.2% para precipitación de las proteínas + purificación mediante intercambio iónico en cartucho *Más económico que un método GC con derivatización o un LC-MS/MS de inyección directa de la muestra *La doble columna ensancha las bandas de compuestos muy polares como la melamina en columnas de polaridad débil	Xu et al., 2009
	Leche de vaca y leche infantil en polvo	Melamina	0,05 ppm	-	GC-MS *Necesario pretratamiento de la muestra: precipitación de proteínas con acetonitrilo y extracción en fase sólida mediante intercambio catiónico fuerte (SCX-SPE). Precisa un último paso de derivatización. *Mejora la selectividad de los métodos de <i>screening</i> y hace posible su cuantificación. LC-MS/MS *Pretratamiento mucho más simple sin necesidad de extracción en fase sólida. *La selectividad y fiabilidad más alta	Lutter et al., 2011
	Leche	Melamina y ácido cianúrico	Melamina: 0,01 ppm Ácido cianúrico: 0,025 ppm	-	*Pretratamiento con mezcla acetonitrilo/agua y purificado mediante intercambio catiónico fuerte con grafito y extracción en fase sólida en columna de modo mixto (25-30 min).	Pan et al., 2012
CROMATOGRAFÍA						

MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN

Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentario	Ref.
CROMATOGRAFÍA	Cromatografía líquida en fase reversa + espectrometría de masas (RPLC-MS)	Leche y leche en polvo	Melamina	-	Leche en polvo: 0,015 ppm Leche líquida: 0,008 ppm	<p>Wu et al., 2009</p> <p>* Marcado con isótopo ¹³C315N3-melamina *Extracción de la melamina con ácido heptafluorobutírico y metanol (80:20) y lavado con cloroformo *Tiempo de experimento: aprox. 35 min *Pequeño pretratamiento en línea de la muestra con ácido tricloroacético</p>
	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a microextracción en línea mediante polímero monolítico (PMME-HPLC-UV)	Productos lácteos y huevos	Melamina	0,024 ppm	0,08 ppm	<p>Peng et al., 2010</p> <p>*PPME puede acoplarse mejor a HPLC que otros métodos de extracción y construir así un sistema automático de análisis *Tiempo total del ensayo: 32 min</p>
	Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS)	Leche infantil en polvo	Triazinas: melamina, amelina, amelida y ácido cianúrico	Melamina: 0,008 ppm Amelina: 0,003 ppm Amelida: 0,0008 ppm Ácido cianúrico: 0,01 ppm	-	<p>Braekvelt et al., 2010</p> <p>*Marcado con isótopos ¹³C-MEL, ¹³C-AMN y ¹³C-AMD *Pretratamiento de extracción con acetronitrilo-agua 1:1 *Purificado de la muestra con extracción en fase sólida mediante intercambio iónico</p>
	Cromatografía líquida de alta resolución con espectroscopia de fluorescencia (HPLC-Fluo)	Leche entera de vaca UHT	Melamina	0,001 ppm	0,003 ppm	<p>Finete et al., 2014</p> <p>*Uso de cloruro de amonio como principal fase móvil reduce los costes y el impacto sobre el medio ambiente *Pretratamiento de desproteímitización con ácido acético y ácido tricloroacético *Tiempo del análisis: 15 min (sin contar el pretratamiento de la muestra)</p>
	Cromatografía líquida de alta resolución en capa fina con espectrometría de masas HPTLC-MS	Leche	Melamina	0,0027 ppm	0,0081 ppm	<p>Rani et al., 2014</p> <p>*Apenas necesita pretratamiento de la muestra. Tan sólo ultrasonidos y un filtrado *Fase móvil para la columna: iso-propanol/diclorometano/agua *Sencillo y rápido</p>

MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN						
Técnica	Matriz	Análito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentario	Ref.
Cromatografía de líquidos de alta resolución con espectroscopía ultravioleta-visible (HPLC-UV-Vis)	Leche y leche infantil en polvo	Melamina	0,001 ppm	-	*Pretratamiento de microextracción con 1-octanol, seguido de derivatización con cloruro de Dabsyl *La dabsylización incrementa la sensibilidad del método y también la hidrofobia de la melamina con los compuestos polares	Faraji and Adeli, 2016
	Leche	Formaldehído Melamina Urea Azúcares	Formaldehído: 0,012 ppm Melamina: 0,05 ppm Urea: 0,027 ppm Azúcares (sacarosa): 0,026 ppm	Formaldehído: 0,04 ppm Melamina: 0,17 ppm Urea: 0,09 ppm Azúcares (sacarosa): 0,9 ppm	*Pretratamiento: extracción en fase líquida con metanol *Método que detecta varios compuestos aunque para cada determinación se necesitan extracciones distintas (formaldehído-melamina, urea y azúcares)	Ahmad et al., 2016
	Leche en polvo	Melamina	0,2 ppb	-	*El pretratamiento de la muestra se basa en la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) Utiliza como sorbente polímeros de impresión molecular (MIPs) usando nanotubo de carbono como soporte (CNT). Tiempo: 30 min	Wang et al., 2016
Electroforesis capilar en zona (CZE)	Leche	Melamina	Leche: 0.7 ppb	-	*Pretratamiento: 42 min aprox. Utiliza acetona *Alimentación electrocinética (EKS) de la muestra al equipo de electroforesis. Esto realiza una preconcentración de la muestra *Método barato, sencillo y rápido *Tiene una sensibilidad de 3 a 4 órdenes de magnitud mayor de las reportadas hasta el momento *No precisa fase de extracción con disolvente en el pretratamiento	Lu et al., 2014
	Leche en polvo	Melamina	0,097 ppm	-	*Se modifica la superficie interna del capilar de sílice fundida a base de un revestimiento mixto de dos polímeros (PDA/PMOXA-EI) *Se consiguió una más eficiente separación y con ello una sensibilidad mucho mayor y en un solo paso	Zhang et al., 2015
CROMATOGRAFÍA						
ELECTROFORÉISIS CAPILAR						

MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN						
Técnica	Matriz	Análito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentario	Ref.
Método electroquímico con electrodo de cobre	Leche	Melamina	0,107 ppm	-	*Formación del complejo MELH+[CuCl ₂]- que produce un cambio en la señal voltamperométrica directamente relacionada con la concentración de melamina. *Método muy selectivo con respecto a otras sustancias orgánicas *Barato, rápido y preciso *Válido para ser transportado y realizar análisis rápidos <i>in situ</i> *Medioambientalmente respetuoso al no tener que contaminar la muestra con sal de cobre para su análisis	Araujo De and Paixão, 2013
Sensor electroquímico basado electrodo de oro modificado con quitosán y nanopartículas de óxido de calcio	Leche	Melamina	9.6×10^{-16} M	-	*Pretratamiento con ácido tricloroacético y metanol *El electrodo modificado ha incrementado la superficie del electrodo haciéndolo más eficiente en la inmovilización de la melamina y, por lo tanto, en su sensibilidad de detección. *Método muy sensible que puede ser idóneo para inspecciones alimentarias o ser usado en laboratorios de investigación	Rovina et al., 2015
Método de huella digital química no lineal	Leche en polvo	Melamina y urea	Urea: 0,33 ppm Melamina: 0,05 ppm	-	*Detecta simultáneamente urea y melamina *No necesita pretratamiento de la muestra *Método barato y rápido para análisis *Análisis y correlación de datos por mínimos cuadrados parciales	Ma et al., 2016
MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS						
OTROS MÉTODOS						

MÉTODOS DE SCREENING							
Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentario	Ref.	
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	Espectroscopia infrarrojo medio y cercano (NIR, FTIR-ATR, FTIR-DRIFT)	Leche infantil en polvo	Melamina 1 ppm	-	*No precisa pretratamiento de la muestra *Tiempo de la determinación: 2 min para NIR y 5 min para FTIR	Mauer et al., 2009	
	Espectroscopia de infrarrojo cercano y medio (NIR/MIR)	Leche, leche en polvo y leche infantil en polvo	Melamina < 1 ppm	-	*Se necesita un pequeño pretratamiento de la muestra y un método de algoritmo multivariante (regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), PLS-polinomial, red neural artificial (ANN), regresión vectorial soportada (SVR)) para alcanzar el límite de detección menor de 1 ppm. *Relación entre el espectro MIR/NIR de las muestras y la concentración de melamina no es lineal con lo que se requiere de un método de regresión lineal para predecir el contenido en melamina.	Balabin and Smimov, 2011	
	Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada por rebote sencillo (SB-ATR/FTIR)	Leche y leche en polvo	Melamina 2,5 ppm	15 ppm	*No necesita pretratamiento de la muestra *Tiempo del análisis muy rápido: 1 - 2 min *Utiliza PLS para la calibración/validación del método	Jawaid et al., 2013	
	Combinación de imágenes hiperespectrales del infrarrojo cercano con método de curva multivariante	Leche en polvo	Melamina Urea Almidón Melamina: 500 ppm		*Detección de adulterantes incluso en muestras heterogéneas *Utiliza el método de curva multivariante para establecer el modelo de calibración y cuantificar los datos *Dentro de la técnica NIR la sensibilidad es buena pero no sirve para el límite legal que se exige como máximo en la industria alimentaria para la melamina (2,5 mg/L)	Forchetti and Poppi, 2016	

MÉTODOS DE SCREENING						
Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentario	Ref.
Espectroscopía de fluorescencia	Leche	Melamina	0,8 ppm	-	<ul style="list-style-type: none"> * Utiliza Triton X-114 como fluoróforo * Cuantificación de melamina en relación a la extinción de la fluorescencia del Triton X-114 * Pretratamiento con ácido tricloroacético y un segundo paso de purificación con extracción por punto nube (en vez de usar acetoneitrilo o metanol) * Tiempo del análisis: 20 min * Método respetuoso con el medio ambiente 	Nascimento et al., 2014
Nanosensor basado en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre nanopartículas de conversión ascendente (UPNPs) y nanopartículas de oro (AuNPs)	Leche	Melamina	0,0023 ppm	-	<ul style="list-style-type: none"> * Efecto de extinción de la fluorescencia de AuNPs en UCNPs (La presencia de las nanopartículas de oro hace que la fluorescencia de las nanopartículas de conversión ascendente disminuya ya que se une a su superficie. Cuando se agrega melamina, tiende a unirse superficialmente a las nanopartículas de oro. Estas liberan a las de conversión ascendente y la fluorescencia comienza a recuperarse. Se deduce con esto que a mayor concentración de melamina, mayor será la fluorescencia emitida por las nanopartículas de conversión ascendente) 	Wu et al., 2015
Fluorescencia inducida por agregado de nanopartículas de oro y espectroscopía por resonancia de plasmones superficiales (SPR)	Leche	Melamina	0,008 ppm	-	<ul style="list-style-type: none"> * En SPR (resonancia de plasmones superficiales) la presencia de nanopartículas de oro inhibe la fluorescencia de los <i>quantum dots</i> CdTe (puntos cuánticos de CdTe). Al añadir melamina, las AuNPs se agregan con ésta y permiten que la fluorescencia de los CdTe QDs se active. * Con lo cual la fluorescencia de los CdTe QDs es proporcional a la concentración de melamina en presencia de AuNPs. * Sensibilidad y selectividad del método muy alta * Pretratamiento con ácido tricloroacético y acetoneitrilo 	Zhu et al., 2016
ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA						

MÉTODOS DE SCREENING						
Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentario	Ref.
Espectroscopia Raman	Leche infantil en polvo	Melamina	10.000 ppm	-	*No se realiza ningún método de extracción previo *Método de <i>screening</i> rápido	Okazaki et al., 2009
Espectroscopia Raman de superficie mejorada con biosensores de polímeros de impresión molecular (MIP-SERS)	Leche	Melamina	1,513 ppm	4,919 ppm	*Se utilizan los polímeros de impresión molecular como sorbente para la extracción en fase sólida (SPE) y enriquecer así la muestra *Tiempo de análisis: 18 minutos incluido el pretratamiento de la muestra	Hu et al., 2014
Espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS) utilizando nanopartículas de plata AgNPs	Leche y leche en polvo	Melamina	2 ppm	-	*Los sustratos cilíndricos de SERS utilizados en este trabajo presentan alta sensibilidad en la detección, lo que permite minimizar el efecto de matriz mediante un procedimiento de dilución simple El sustrato cilíndrico SERS se prepara mediante decoración de nanopartículas de plata (AgNPs) sobre un soporte sólido de varilla de polimetacrilato de metilo (PMMA) por reacción de espejo de plata.	Rajapandiyam et al., 2015
Espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS) utilizando nanopartículas de Au@SiO ₂	Leche	Melamina	< 1 ppm	-	*Pretratamiento rápido con ácido clorhídrico *En vez de AuNPs se utilizan Au@SiO ₂ NPs en sustrato de cobre para eliminar ciertas distorsiones en la señal *Tiempo del análisis: 15 min sin contar la preparación de las nanopartículas *Se mejoró la técnica SERS mediante la aplicación del aumento del campo electromagnético superficial local (LSEF). Mejora obtenida de la técnica con resonancia de plamones superficiales (SPR)	Li et al., 2016
ESPECTROSCOPIA RAMAN						

MÉTODOS DE SCREENING						
Técnica	Matriz	Análito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentario	Ref.
ELISA	Leche de vaca y leche infantil en polvo	Melamina	-	-	ELISA: Es un método rápido pero que puede dar lugar a falsos positivos por interferencias de la muestra o reacciones cruzadas de otros compuestos.	Lutter et al., 2010
Immunoensayo basado en ELISA	Leche y leche en polvo	Melamina	Leche: 0,1 ppm Leche en polvo: 0,2 ppm	-	*Se basa en la preparación de anticuerpos monoclonales de la melamina, uniendo el hapteno de la melamina con la proteína transportadora por vía del método carbodimida. *Para verificar la especificidad del anticuerpo se añadieron otros componentes muy similares a la melamina (amelida, amelina y ácido cianúrico) como competidores. *Validación del método mediante LC-MS	Yin et al., 2010
Immunoensayo de polarización fluorescente (FPIA) mediante anticuerpo policlonal	Leche y leche en polvo	Melamina	0,0093 ppm	-	*Pretratamiento de la muestra sencillo mediante centrifugación, extracción con metanol-agua y dilución con borato de sodio *Reacciones cruzadas (21,2%) con la sustancia insecticida ciproflumetoxil *Confirmación con HPLC-MS en laboratorio de referencia *Tiempo del ensayo (sin pretratamiento de la muestra): 15 min	Wang et al., 2010
Immunoensayo con inmunosensor de fluorescencia de onda plana PWFI	Leche, leche infantil en polvo y yogur	Melamina	0,0066 ppm	-	*Pretratamiento con ácido tricloroacético y acetoneitrilo. *Reacciones cruzadas en poca medida *La melamina reacciona con los anticuerpos fluorescentes marcados previamente. A medida que la melamina reacciona con los anticuerpos, disminuye su fluorescencia, lo cual puede cuantificarse *Muy sensible y rápido (20 min por análisis)	Guo et al., 2013
INMUNOENSAYOS						

MÉTODOS DE SCREENING

Técnica	Matriz	Analito	Límite de detección	Límite de cuantificación	Comentario	Ref.
Ensayo inmunocromatográfico basado en coloides de oro	Leche y leche en polvo	Melamina	Leche: 0,1 ppm Leche en polvo: 100 ppm	-	*Primera vez que se usa esta técnica (CGIA) para detectar melamina *Especial cuidado con los anticuerpos a causa del pH, sales, otros compuestos orgánicos, etc *No se observan reacciones cruzadas con otros elementos orgánicos *Tiempo del análisis: 3-5 min *Método especialmente útil para análisis cualitativos rápidos <i>in situ</i>	Gong et al., 2014
Colorimetría mediante nanopartículas de oro y espectrometría UV-Vis	Leche y leche en polvo	Melamina	Método colorimétrico sólo: Leche en polvo: 4,2 ppm Leche líquida: 1 ppm Con UV-Vis: Leche en polvo: 2,5 ppm Leche líquida: 0,15 ppm	-	*Método portátil para screening <i>in situ</i> *Pequeño pretratamiento de la muestra con ácido tricloroacético y cloroformo *Tiempo para la detección de melamina: 30 min	Guo et al., 2010
Colorimetría mediante nanopartículas de plata y espectrometría UV-Vis	Leche	Melamina	0,292 ppm	-	*Pequeño pretratamiento de la muestra con ácido tricloroacético y cloroformo *Cambio de color del amarillo al rojo al reaccionar las nanopartículas de plata con la melamina. *Puede ser un método para detección de melamina <i>in situ</i>	Ping et al., 2011
Colorimetría mediante nanopartículas de oro y espectrometría UV-Vis	Leche	Melamina	< 0,07 ppm	-	*Pequeño pretratamiento con ácido acético y centrifugado *Cambio de color de rojo a azul-violeta *Tiempo del análisis: 20 min	Xing et al., 2013
Colorimetría mediante nanopartículas de plata no modificadas y espectrometría UV-Vis	Leche	Melamina	0,04 ppm	0,12 ppm	*La presencia de melamina promueve la agregación de las nanopartículas de plata y se produce un cambio de color de la muestra del amarillo al rojo. *No necesita de equipos de medida *Se puede comprobar mediante espectroscopía UV-Vis *Método cualitativo con muy alta sensibilidad	Kumar et al., 2015
INMUNOENSAYOS						
COLORIMETRÍA						