UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

CARINA DE FÁTIMA NASCIMENTO

Desenvolvimento de procedimento analítico limpo e com alta sensibilidade para a determinação de melamina em leite

Piracicaba
2014

CARINA DE FÁTIMA NASCIMENTO

Desenvolvimento de procedimento analítico limpo e com alta sensibilidade para a determinação de melamina em leite

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

Piracicaba

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Nascimento, Carina de Fátima

Desenvolvimento de procedimento analítico limpo e com alta sensibilidade para a determinação de melamina em leite / Carina de Fátima Nascimento; orientador Fábio Rodrigo Piovezani. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

63 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Adulteração de alimentos 2. Análise de alimentos 3. Análise fluorimétrica 4. Método de separação 5. Química ambiental I. Título

CDU 661.717 + 343.347.1) : 637.12

A Deus, pelo dom da vida, por tudo que tenho e

pela pessoa que sou.

Aos meus pais, Vicente e Conceição, pelo amor sem limites,

dedicação e incentivo durante todo esse tempo.

Aos meus irmãos, Patrícia e Gustavo, pela sinceridade

e por toda amizade.

À minha sobrinha Ana Clara,

pelos momentos de alegria.

Dedico!

Ao meu namorado, José Marcos,

dedico esse trabalho pelo

carinho, compreensão, apoio e

paciência em cada instante.

Dedico!

Ao meu orientador, Fábio, pelo incentivo,

orientação e por compartilhar

suas experiências e conhecimentos.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar oportunidade de chegar até aqui e estar comigo a todo tempo;

Aos meus queridos pais Vicente Paulo do Nascimento e Conceição Aparecida Nascimento, aos meus irmãos Patrícia Nascimento Gomes e Gustavo Henrique Nascimento, à minha sobrinha linda Ana Clara, por todo apoio, carinho, dedicação e por estarem sempre presentes em todos os momentos;

A toda minha família e principalmente aos meus avôs Joaquim e Maria Conceição, pelo apoio, incentivo e por estarem sempre presentes;

Ao querido José Marcos e sua família por todo carinho, incentivo e por sempre estarem presentes nos momentos que precisei;

À Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela infra-estrutura e apoio institucional oferecido para a conclusão deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelos auxílios e bolsa;

Ao querido Prof. Fábio, pela orientação e amizade;

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Analítica “Henrique Bergamim Filho”: Prof. Boaventura F. Reis, Prof. Francisco J. Krug, Prof. Elias A. G. Zagatto e Prof^{a}. Maria Fernanda Giné pela convivência;

Aos funcionários deste mesmo laboratório: Sheila Perdigão, Fátima Patreze, Iolanda Rufini (Tatinha), Cláudia M. F. Correia, Waldemir Barros e Otávio Matsumoto, pelos apoios em laboratório e pessoal;

Aos funcionários da Pós-Graduação Fábio, Neuda, Daiane e Sônia pelo apoio;

À Professora Wanessa pelo apoio e discussões sobre o trabalho;

Ao Dr. Diogo Rocha, pela proposta de trabalho e por toda a ajuda;

Aos amigos de laboratório: Andréia Cardoso, Andressa Adame, Alex Batista, Márcia Barrientos e Rejane Frizzarin pela convivência agradável;

Ao Professor Valdemar Luiz Tornisielo e ao técnico Rodrigo Pimpinato do Laboratório de Ecotoxicologia pela disponibilização do HPLC utilizado na avaliação de exatidão do procedimento proposto;

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pela disponibilização do espectrofluorímetro para realização dos experimentos de tempo de vida de fluorescência. À Andréia Cardoso pelo auxílio com este experimento na UP.

A todos os outros funcionários deste Centro que, de forma direta e indireta, também tiveram contribuições;

Aos meus amigos do CENA: Lidiane Nunes, Marcelo Braga, Gabriel Carvalho, Carla Kamogawa, Tuane Dias, Felisberto Junior, Gláucia Vieira, Milton Sasaki, Diogo Silva, Ana Clara Vida, Claudinéia Silva, Eliézer de Oliveira e Ticiane Tahim;

Às minhas amigas de república Kênia Oliveira e Natália Leite pela convivência, companheirismo e amizade;

Aos amigos que fiz em Piracicaba: Juliano Toledo, Guilherme Hipólito, Sílvia Paiva, Guilherme Franco, Rafael Butke, Aijânio Gomes, Ingrid Kelly, Karina Lima, Jussara Pereira e Camila Leite. Muito obrigada pela amizade e pelos momentos divertidos que passei com vocês;

Aos meus queridos amigos de Lavras, em especial Stefane Alves, Kassiana Magalhães e Aline dos Anjos, que estiveram sempre perto mesmo com a distância;

A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

"A persistência é o caminho do êxito"

Charles Chaplin

RESUMO

NASCIMENTO, C. F. **Desenvolvimento de procedimento analítico limpo e com alta sensibilidade para a determinação de melamina em leite.** 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A melamina é um composto tóxico ilegalmente empregado para adulterar o teor de proteínas em leite. A ingestão de pequenas quantidades de melamina pode causar complicações renais e até mesmo a morte de animais e humanos. Os procedimentos usuais para a determinação de proteínas são baseados na quantificação de nitrogênio total e não permitem detectar a adulteração. Neste trabalho, um procedimento rápido e limpo foi desenvolvido para a determinação de melamina como adulterante em leite. Triton X-114 foi utilizado para o *clean-up* da amostra e como fluoróforo. A determinação da melamina foi baseada na supressão da fluorescência do surfactante na fase pobre após a extração em ponto nuvem. Resposta linear foi observada entre 1,0 e 6,0 mg L^{-1} de melamina, descrita pela equação de Stern-Volmer $I°/I = 0,999 + 0,0165\ C_{MEL}$ ($r = 0,999$). O limite de detecção foi estimado em 0,8 mg L^{-1} (nível de confiança de 95 %), o que permite a detecção de 320 µg de melamina em 100 g de leite. Coeficientes de variação ($n = 8$) foram estimados em 0,4 e 1,4 % na ausência e na presença do analito, respectivamente. Recuperações entre 95 e 102% e os coeficientes angulares das curvas de calibração obtidas na presença e ausência de leite indicaram a ausência de efeitos da matriz. Os resultados para diferentes amostras de leite concordaram com os obtidos por cromatografia líquida de alto desempenho a um nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: Leite. Melamina. Extração em ponto nuvem. Triton X-114. Fluorescência. Adulteração.

ABSTRACT

NASCIMENTO, C. F. **Development of a green and highly sensitive analytical procedure for the determination of melamine in milk**. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Melamine is a toxic compound illegally used to adulterate the protein content in milk. The ingestion even of low amounts of melamine can lead to renal complications and death of animals and humans. Usual procedures for the determination of total nitrogen are not selective for the determination of non-protein nitrogen. In this work, a fast and environmentally friendly procedure was developed for the determination of melamine as a milk adulterant. Triton X-114 was used for sample clean-up and as a fluorophore. Determination of melamine was based on fluorescence quenching of surfactant in the poor phase after cloud point extraction in the presence of melamine. A linear response was observed from 1.0 and 6.0 mg L^{-1} melamine, described by the Stern-Volmer equation $I°/I = 0.999 + 0.0165\ C_{MEL}$ ($r = 0.999$). The detection limit was estimated at 0.8 mg L^{-1} level (95% confidence level), which enables detection of as low as 320 µg in 100 g of melamine of milk. The coefficients of variation ($n = 8$) were estimated at 0.4 % or 1.4 % in the absence or presence of the analyte, respectively. Recoveries within 95-102 % and similar slopes of calibration graphs obtained with and without milk indicated the absence of matrix effects. The results for different milk samples agreed with those obtained by high performance liquid chromatography at the 95% confidence level.

Keywords: Milk. Melamine. Cloud point extraction. Triton X-114. Fluorescence. Adulteration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da melamina 27
Figura 2 - Estruturas químicas da amelina, amelida e ácido cianúrico 28
Figura 3 - Estrutura molecular do Triton X-114 33
Figura 4 - Tratamento do leite com acetonitrila, metanol ou ácido tricloroacético 41
Figura 5 - Extração em ponto nuvem em leite 41
Figura 6 - Espectro de excitação da melamina 10 mg L^{-1} em solução aquosa 42
Figura 7 - Espectro de emissão da melamina 10 mg L^{-1} em solução aquosa 43
Figura 8 - Espectros de emissão do Triton X-114 44
Figura 9 - Influência da temperatura na fluorescência do Triton X-114 45
Figura 10 - Influência da acidez na fluorescência do Triton X-114 46
Figura 11 - Efeito da concentração do ácido tricloroacético 48
Figura 12 - Efeito da concentração do Triton X-114 49
Figura 13 - Cromatograma de uma amostra de leite contendo melamina 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alimentos contaminados por melamina.....28
Tabela 2 - Limites para melamina em alimentos definidos em alguns países 30
Tabela 3 - Intensidades de fluorescência de melamina em soluções aquosas.....43
Tabela 4 - Supressão de fluorescência do Triton X-114 em diferentes temperaturas 47
Tabela 5 - Estudo de adição e recuperação da melamina em amostras de leite.....51
Tabela 6 - Concentrações de melamina determinadas pelos procedimentos proposto e de referência. 53
Tabela 7 - Procedimentos para a determinação de melamina em leite.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMC	Concentração micelar crítica
EC	Eletroforese capilar
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração líquido-líquido
FDA	Food and Drug Administration
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
HPCE	Cromatografia de alta eficiência com eletroforese capilar
HPLC	Cromatografia a líquido de alta eficiência
HPLC-MS	Cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas
IARC	Agência Internacional para pesquisa sobre o Câncer (do inglês International Agency for Research on Cancer)
MALDI-MS	Espectrometria de massas assistida por dessorção da matriz/ionização por laser
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFTE	Politetrafluoroetileno
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP-HPLC-DAD	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TERF	Transferência de energia de ressonância de fluorescência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 25
2. REVISÃO DE LITERATURA 27
2.1. Melamina 27
2.1.1. Procedimentos para a determinação de nitrogênio total 29
2.1.2. Toxicidade e episódios de contaminação por melamina 29
2.1.3. Procedimentos de melamina 31
2.2. Extração em ponto nuvem 33
2.3. Supressão de fluorescência 34
3. MATERIAIS E MÉTODOS 36
3.1. Fluorescência 36
3.1.1. Instrumentos e acessórios 36
3.1.2. Reagentes e soluções 36
3.1.3. Procedimentos 36
3.1.3.1. Medidas do tempo de vida de fluorescência 36
3.1.3.2. Medidas fluorimétricas com a variação da temperatura e acidez 37
3.1.3.3. Otimização do procedimento 37
3.1.3.4. Preparo de amostra 38
3.1.3.5. Procedimento de referência 39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
4.1. Clean-up das amostras de leite 40
4.2. Fluorescência da melamina e do Triton X-114 42
4.3. Influência da temperatura e da acidez na intensidade de fluorescência do Triton X-114 45
4.6. Características analíticas e aplicação 49
4.7. Procedimento de referência 51
5. CONCLUSÕES 55
REFERÊNCIAS 56

1. INTRODUÇÃO

A adulteração de alimentos é uma atividade praticada há muito, tendo como finalidade aumentar a quantidade de matéria-prima e obter maiores lucros [1]. As adulterações causam problemas econômicos, sociais e de segurança alimentar, gerando produtos de baixa qualidade. Os principais alvos de adulteração são alimentos que necessitam de diversas etapas de processamento antes de chegar ao consumidor [1,2].

Os produtos lácteos são de consumo universal e desempenham um papel importante na alimentação. O leite e seus derivados são alimentos completos, ricos em proteínas, vitaminas (*e.g.* A, B12 e D) e sais minerais (*e.g.* cálcio, fósforo, magnésio, zinco e potássio), que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da estrutura óssea e dentária [3]. Devido ao elevado valor nutricional, o leite é um produto muito valorizado no mercado, o que o torna vulnerável a adulterações [1].

Dentre as análises de controle de qualidade realizadas no leite, a avaliação dos sólidos presentes está entre as principais, sendo avaliado o teor de proteínas e de gorduras, que define a remuneração ao fornecedor [4]. A adulteração do teor de proteínas é feita através da adição de compostos ricos em nitrogênio, seguida da diluição do leite com água, aumentando o volume do produto final. O teor de proteína deve estar de acordo com a legislação, que estabelece o valor de 2,9 % (m/m) [5]. A determinação do teor de proteínas é usualmente realizada pelos métodos de Kjeldalh e Dumas, baseados na quantificação de nitrogênio total [6].

Compostos como a ureia [7], melamina [6], sacarose [2], óleos vegetais [2] e sais de sódio [2] são os mais utilizados na adulteração do leite. A ureia é um componente natural do leite, que pode ser encontrado entre 180 e 400 mg por litro constituindo grande parte dos compostos nitrogenados não-proteicos (*ca.* 55%). Acima de 700 mg por litro no leite, a ureia pode causar diversos problemas no ser humano, como indigestão, úlceras e deficiência renal [4,8].

A melamina é um composto sintético, pouco solúvel em água a temperatura ambiente, muito empregado como adulterante do teor de proteínas devido ao elevado teor de nitrogênio (66% m/m). A adição de 90 mg de melamina em um litro de leite é suficiente para aumentar em *ca.* 1% o teor aparente de proteína [4].

Os principais procedimentos para a determinação de melamina em leite são de alto custo, além de consumirem quantidades significativas de solventes orgânicos. Tendo em vista essas dificuldades, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um procedimento analítico limpo e rápido empregando extração em ponto nuvem para o preparo de amostras, visando à determinação fluorimétrica de melamina em leite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Melamina

A melamina (Figura 1) é um trímero de cianamida, denominado 1,3,5-triazina-2,4,6-triamina ($C_3H_6N_6$), que apresenta-se como um sólido branco e inodoro [9,10]. É um composto comercial que pode ser sintetizado a partir da ureia, gerando um produto com até 99% de pureza [11,12]. Devido à sua resistência a altas temperaturas (*ca.* 120°C) e estabilidade, é empregado na fabricação de plásticos, resinas, laminados, revestimentos, filtros comerciais, colas, louças, utensílios de cozinha e adesivos [13]. A melamina também pode ser empregada como fertilizante de liberação controlada [14].

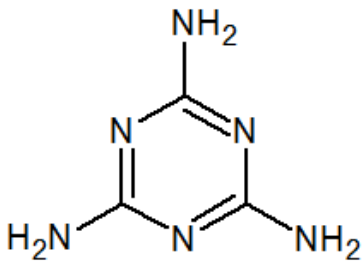

Figura 1 - Estrutura química da melamina

Sob condições ácidas, a melamina pode ser hidrolisada em subprodutos como amelina, amelida e ácido cianúrico [15,16], (Figura 2). A melamina apresenta características ácido-base (pka = 5,0) e os seus subprodutos apresentam pka iguais a 4,5 e 9,4 (amelina); 1,8, 6,9 e 13,5 (amelida) e 6,9 (ácido cianúrico) [15]. Dentre os subprodutos, o ácido cianúrico apresenta maior toxicidade, devido à formação de complexo cristalino com a melamina, de alto peso molecular e com baixa solubilidade em água; com a ingestão diária, ocorre acumulação dos cristais nos túbulos renais [16,17].

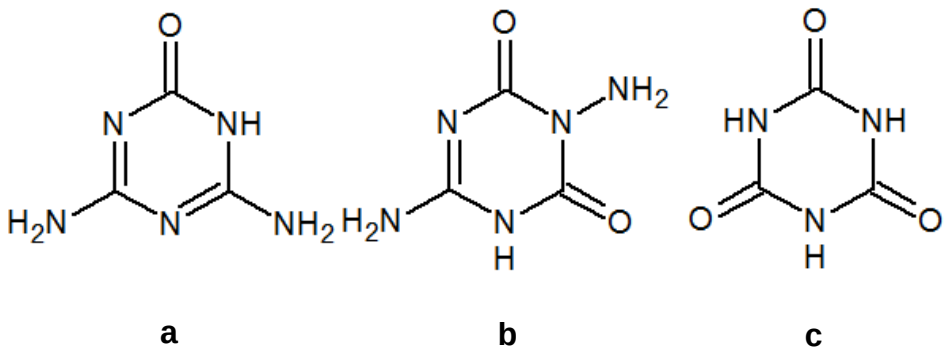

Figura 2 - Estruturas químicas da amelina (a), amelida (b) e ácido cianúrico (c) [8]

A adulteração deliberada de leite por produtores tem sido uma atividade cada vez mais constante em vários países, sendo observados os principais casos de adulteração por melamina na China e nos EUA [9]. Por apresentar elevado teor de nitrogênio e baixo custo, a melamina foi utilizada como adulterante em alimentos como rações para animais, leite e derivados, para aumentar o valor aparente de proteína bruta [18]. Na Tabela 1 são indicadas as quantidades de melamina encontradas em alguns tipos de alimentos adulterados por melamina. A adição de melamina no leite não pode ser detectada pelos métodos para a quantificação de proteínas, baseados na determinação de nitrogênio total. Os métodos mais utilizados são por via úmida (Kjeldahl) [19,20] e por via seca (Dumas) [20,21], porém estes não são seletivos para nitrogênio proteico.

Tabela 1 - Alimentos contaminados por melamina [10,11]

Amostras	Concentração de melamina detectada (mg kg^{-1})
Farinha	10,6-59,6
Ração para suínos	30-120
Ração para peixe	53-400
Leite	3300

2.1.1. Procedimentos para a determinação de nitrogênio total

O método de Kjeldahl permite determinar nitrogênio total e, indiretamente, o teor de proteínas. Consiste na completa digestão das amostras com ácido sulfúrico concentrado a altas temperaturas, na presença de catalisadores como cobre, mercúrio, selênio e titânio, num período de 2 a 4 horas. Nestas condições, o nitrogênio orgânico é convertido em íon amônio, que é separado por destilação de amônia, após alcalinização do meio. A amônia é indiretamente quantificada na solução aceptora pela titulação com um ácido padronizado. Apesar de ser um método muito utilizado para a determinação de nitrogênio, apresenta diversas desvantagens como: elevado tempo de digestão, toxicidade dos catalisadores, riscos de perda da amostra durante a digestão, produção de gases nocivos e de resíduos tóxicos, além da decomposição incompleta de alguns compostos (*e.g.* piridina) [19,20].

O método de Dumas é totalmente automatizado e foi proposto especificamente para medir o teor de nitrogênio em menos tempo (*ca.* 5 min). Baseia-se na oxidação das substâncias orgânicas em um forno a alta temperatura (1050 °C). Os gases de combustão (O_2, CO_2, H_2O) são eliminados e o óxido de nitrogênio é posteriormente convertido a nitrogênio, utilizando um catalisador de cobre. A mistura é transportada para uma célula de condutividade térmica, gerando uma resposta proporcional à quantidade de nitrogênio [21]. Alguns inconvenientes são os altos custos dos equipamentos e de sua manutenção [21].

2.1.2. Toxicidade e episódios de contaminação por melamina

De acordo com a Agência Internacional para pesquisa sobre o Câncer (IARC), não há evidências de carcinogenicidade da melamina em animais e humanos [9,17,22]. Entretanto, o organismo humano não consegue metabolizar a melamina e sua ingestão pode originar cristais insolúveis, causando danos no sistema urinário levando à insuficiência renal e, em casos extremos, a morte [9,17].

Os primeiros episódios de contaminação por melamina ocorreram em 1970, na Itália, onde foram encontrados resíduos desta substância em peixes [23]. Em

2007, nos EUA, houve um surto de morte de animais de pequeno porte. As investigações desse surto indicaram presença de melamina e seus subprodutos nas rações, oriunda dos glutens de trigo e proteínas de arroz contaminados, que foram importados da China [24]. Nestas investigações, foram encontrados *ca.* 8,5% de melamina nas rações [24,25].

Um ano após o surto de contaminação das rações, outros episódios de adulterações de alimentos por melamina ocorreram na China. Os principais alvos foram o leite e fórmulas infantis que tiveram os teores de proteínas adulterados. Aproximadamente 300 mil bebês ficaram doentes e 6 morreram, sendo as principais causas infecções urinárias e acúmulo de cristais nos rins [9,19,20,25].

Após estes surtos de contaminação, agências reguladoras como a Organização Mundial da Saúde (OMS) [22] e Food and Drug Administration (FDA) [26] estabeleceram limites de 2,5 e 1,0 mg kg^{-1} melamina para a ingestão diária por adultos e crianças, respectivamente, para o leite e seus derivados [27,28]. Alguns países estabeleceram os seus próprios limites em alimentos, como indicado na Tabela 2. Ressalte-se que, apesar dos casos sérios de contaminação, não foram definidos limites na China [17].

Tabela 2 - Limites para melamina em alimentos definidos em alguns países [17]

País	**Alimento**	**Limite (mg kg^{-1})**
EUA	Leite e derivados	2,5
Austrália	Leite em pó e fórmula infantil	1,0
	Leite e derivados	2,5
Canadá	Leite em pó e fórmula infantil	1,0
	Leite e derivados	2,5
Rússia	Alimentos em geral	1,0
Nova Zelândia	Matérias-prima de alimentos	5,0
	Leite em pó e fórmula infantil	1,0

2.1.3. Procedimentos de melamina

Os primeiros procedimentos para a determinação de melamina foram desenvolvidos em 1980 [23]. A melamina é uma base fraca e pode ser extraída em condições ácidas, alcalinas e neutras, porém as extrações mais comuns são da espécie protonada (pH ≤ 3), e da forma neutra, que geralmente é encontrada nos alimentos [17].

As amostras de alimentos geralmente têm matrizes complexas e contém grandes quantidades de proteínas, carboidratos e aglomerados de gorduras. Desta forma, os procedimentos geralmente envolvem etapas de separação, pré-concentração e derivatização [17].

Na China, onde ocorreram os principais casos de contaminação em humanos, foi estabelecido um procedimento de referência para a determinação de melamina em leite e produtos lácteos, empregando cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) [10,29-32]. Além disso, foram desenvolvidos diversos procedimentos utilizando HPLC para a determinação de melamina e de seus subprodutos em amostras de arroz, trigo e milho [29], leite [10,30], geleia real [32], carne de cordeiro [33], entre outros. O HPLC apresenta sensibilidade adequada para a determinação de melamina em alimentos, com limite de detecção de até 5 µg L^{-1} [10]. Entretanto, além do alto custo do equipamento, estes procedimentos requerem um moroso preparo das amostras e são consumidas grandes quantidades de solventes orgânicos (*e.g.* metanol e acetonitrila) como eluentes. Por exemplo, para a determinação de melamina em leite por HPLC, foi utilizado no preparo de amostra 30 mL de acetonitrila para cada 5 mL de leite [31].

Outros procedimentos analíticos para a determinação de melamina em leite são baseados em cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) [33,34], devido à alta sensibilidade e especificidade, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) [35,36], cromatografia de alta eficiência com eletroforese capilar (HPCE) [37], eletroforese capilar (EC) [38] e cromatografia de troca catiônica [39]. A maioria dos procedimentos necessita de *clean-up* das amostras, devido à complexidade das matrizes. Na determinação da

melamina, os processos para separação e pré-concentração mais empregados são as extrações líquido-líquido (ELL) [17] e em fase sólida (EFS) [30,40].

Os procedimentos que utilizam espectrometria de massas assistida por dessorção da matriz/ionização por laser (MALDI-MS) [41], ressonância magnética nuclear (RMN) [23] e transferência de energia de ressonância de fluorescência (TERF) [42], requerem equipamentos de alto custo e um demorado preparo das amostras, com diversas etapas como agitação, sonificação, centrifugação, EFS. Na literatura, foram propostos procedimentos alternativos para a determinação de melamina, baseados em quimiluminescência [18,43], imunoensaios [44], fluorimetria [15], espectrofotometria UV-vis [9,27] e espectrometria Raman [45].

A quimiluminescência apresenta alta sensibilidade para a determinação de melamina, porém o preparo de amostra é muito demorado [17,18]. Os imunoensaios (*e.g.* ELISA) são muito seletivos, porém os kits são de alto custo, inviabilizando análises de rotina [17].

Os procedimentos fluorimétricos descritos na literatura [15,42,46-48] apresentam diversos inconvenientes. Por exemplo, o procedimento baseado na inibição da oxidação do vermelho de acridina por permanganato de potássio [15] requer um reagente caro (vermelho de acridina) e um complexo preparo da amostra, com diversas etapas como extração, centrifugação, sonicação, filtração e EFS demorando *ca.* 60 minutos, além da utilização de diversos reagentes como ácido tricloroacético, metanol e ácido clorídrico. Outros procedimentos fluorimétricos, como a supressão de fluorescência do complexo carbonílico de Ru (II) [46], imunoensaio de fluorescência polarizada [47], fluorescência de pontos quânticos (QDs) de CdTe [48] e TERF entre QDs de CdTe e Rodamina B [42] apresentam alta sensibilidade, mas o preparo de amostra é demorado (*ca.* 60 min) e consome grandes quantidades de reagentes. Estas características tornam os procedimentos inadequados para análises de rotina.

O desenvolvimento de procedimentos rápidos, limpos e de baixo custo é, portanto, necessário para a determinação de melamina em leite em análises de controle de qualidade.

2.2. Extração em ponto nuvem

A extração em ponto nuvem é uma alternativa limpa para ELL visando a pré-concentração do analito e/ou *clean-up* da amostra. Uma solução homogênea contendo surfactante não iônico acima da concentração micelar crítica (CMC) torna-se turva quando aquecida ou mediante a adição de sais, em um fenômeno denominado ponto nuvem. Atingido o ponto nuvem, ocorre a formação de duas fases macroscópicas, sendo uma rica em agentes tensoativos contendo as espécies hidrofóbicas e de pequeno volume e uma fase pobre, com concentração de surfactante próxima à CMC [49-53].

A maior densidade da fase rica facilita o isolamento por centrifugação. O surfactante não-iônico Triton X-114 (Figura 3) tem sido o mais empregado nos procedimentos de extração, por apresentar ponto nuvem próximo à temperatura ambiente (entre 23 e 25°C) [49,50], biodegradabilidade e baixo custo [50], reduzindo assim o impacto ambiental. O Triton X-114 apresenta CMC entre 0,20 e 0,35 mmol L^{-1} a 25°C; abaixo destes valores o surfactante encontra-se predominantemente na forma de monômeros e, quando atingida a CMC, o processo de formação das micelas é favorecido [52]. Espécies hidrofóbicas (*e.g.* micelas de gorduras e proteínas) podem ser extraídas para fase rica em surfactantes [53].

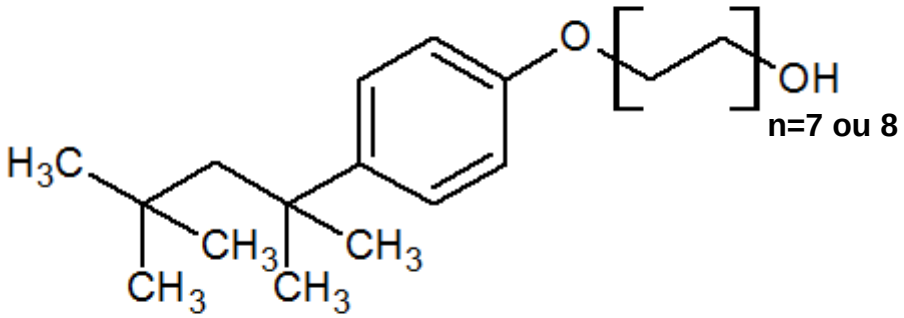

Figura 3 - Estrutura molecular do Triton X-114

A extração em ponto nuvem foi aplicada em amostras de leite para a determinação de proteínas (*e.g.* caseína) [50], utilizando o Triton X-114 e um sal (*e.g.* KH_2PO_4) para a separação em baixa temperatura (*ca.* 25°C), evitando a desnaturação das proteínas. Outras aplicações enfocaram a determinação de penicilina [54], adrenalina [55], manganês [56] e sulfonamidas [57] em leite. Em todas as aplicações os analitos foram determinados na fase rica em surfactante e, em grande parte, foi utilizada a técnica de HPLC [49,53,54,57]. Procedimentos combinando espectrofluorimetria com a extração em ponto nuvem foram desenvolvidos para outras matrizes (*e.g.* urina humana) [58].

2.3. Supressão de fluorescência

A fluorescência é um processo de luminescência no qual ocorre a excitação de átomos ou moléculas através da absorção de radiação eletromagnética. As espécies excitadas sofrem relaxação ao seu estado de menor energia (estado fundamental) liberando fótons [59,60]. A emissão de fluorescência ocorre em um intervalo de tempo muito curto (*ca*. 10^{-5} s). Todas as moléculas que absorvem radiação apresentam potencial para emitir fluorescência, porém a maioria das espécies perde energia por meio de relaxação não radiativa, não emitindo fluorescência. A maioria das moléculas fluorescentes são compostos aromáticos [59]. O aumento da fluorescência ocorre quando as moléculas são rígidas ou em baixas temperaturas, que diminui o número de colisões que levariam a perdas de energia por relaxação colisional. A melamina e o Triton X-114 são exemplos de moléculas fluorescentes [58,61].

A redução da intensidade de fluorescência por interações intermoleculares é denominada supressão de fluorescência, que pode ser estática ou dinâmica [60]. A supressão estática deve-se à formação de um complexo não emissor entre o fluoróforo e o supressor, enquanto a supressão dinâmica ocorre pela colisão das moléculas do fluoróforo com o supressor [60]. A supressão de fluorescência é quantitativamente expressa pela equação de Stern-Volmer (Equação 1).

$$\frac{I^{\circ}}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \qquad (1)$$

Na Equação 1, I° e I são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente. Os valores de K_D e k_q são as constantes de supressão e a constante bimolecular, respectivamente. [Q] é a concentração do supressor e τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor [60]. A equação de Stern-Volmer indica que um gráfico de I^o/I em função de [Q] deve ser uma linha reta com coeficiente linear próximo a unidade.

A diferenciação da supressão pode ser realizada por experimentos com medidas de fluorescência variando a temperatura, viscosidade e, principalmente, medidas do tempo de vida de fluorescência após a interrupção da irradiação [60]. Com o aumento da temperatura, observa-se aumento do coeficiente angular da curva I^o/I em função de [Q] para supressão dinâmica e o inverso para supressão estática [60]. Como a supressão estática ocorre devido à formação de um complexo não emissor de radiação, à medida que a temperatura aumenta, tende a ocorrer a dissociação de complexos fracamente ligados, ocasionando o aumento da intensidade de fluorescência. Por outro lado, em altas temperaturas ocorre o aumento de colisões favorecendo a perda de energia da espécie por relaxação não-radiativa e, portanto, aumentando a supressão, caso esta seja do tipo dinâmico [60]. Por esta razão, a supressão dinâmica é também chamada de colisional. Efeito similar é observado com a diminuição da viscosidade do meio. Se o tempo de vida da fluorescência não sofre variação na presença do supressor a supressão é do tipo estático; quando ocorre diminuição do tempo de vida, a supressão é considerada dinâmica, ou seja, ocorre a transferência de energia do fluoróforo excitado para o supressor [60].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fluorescência

3.1.1. Instrumentos e acessórios

Todos os espectros de excitação e emissão foram obtidos em um espectrofluorímetro (Agilent) utilizando uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico. Uma mesa agitadora (Tecnal), um banho termostatizado (Marconi) e uma centrífuga (Quimis) foram utilizados para homogeneização das soluções, controle de temperatura e para promover a separação de fases.

3.1.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18,0 MΩ cm). Solução estoque de melamina (Merck, Alemanha) foi preparada por dissolução de 100,0 mg do reagente em *ca*. 40,0 mL de água a 40 °C e ajuste de volume para 100,0 mL. As soluções de referência (1,0 a 6,0 mg L^{-1}) foram preparadas diariamente a partir da diluição do estoque em água.

Solução estoque de Triton X-114 (Sigma, Alemanha) foi preparada na concentração de 12 mmol L^{-1} em água. Solução de ácido tricloroacético (Merck, Alemanha) 0,3 mol L^{-1} foi preparada pela dissolução de 4,902 g de reagente em 100,0 mL de água.

3.1.3. Procedimentos

3.1.3.1. Medidas do tempo de vida de fluorescência

A solução de Triton X-114 foi preparada na concentração de 0,35 mmol L^{-1} (valor correspondente a CMC do surfactante) [52]. Em 5,0 mL da solução de Triton

X-114 foi adicionado 10,0 mL de água. A solução foi agitada, aquecida por 10 min a temperatura controlada de 50 °C e centrifugada por 5 min numa rotação de 5000 rpm. O tempo de vida foi medido na ausência e na presença de melamina (3,0 mg L^{-1}), com excitação e emissão do Triton X-114 em 235 e 302 nm, respectivamente.

3.1.3.2. Medidas fluorimétricas com a variação da temperatura e acidez

As medidas de fluorescência com a variação de temperatura foram realizadas com solução de Triton X-114 12,0 mmol L^{-1} e solução de ácido tricloroacético 0,3 mol L^{-1}. Foram utilizados 2,0 mL da solução de Triton X-114, 1,0 mL da solução de ácido tricloroacético e 7,0 mL de água. A solução foi agitada por 5 min, aquecida por 10 min a temperatura controlada de 50 °C e centrifugada por 5 min numa rotação de 5000 rpm; a fase pobre foi separada da fase rica e dividida em 2 tubos. A um dos tubos foi adicionado 6,0 mg L^{-1} de melamina. Os tubos contendo a fase pobre foram aquecidos às temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C por 10 min cada. Em cada temperatura foram medidas as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de melamina (excitação: 235 nm e emissão: 302 nm).

O efeito da acidez foi avaliado com solução preparada a partir de 2,0 mL de solução de Triton X-114 12,0 mmol L^{-1} e 8,0 mL de água com pH ajustado de 2 a 10. A solução foi agitada por 5 min, aquecida por 10 min a temperatura controlada de 50 °C e centrifugada por 5 min a 5000 rpm; separou-se a fase pobre da fase rica e a fase pobre foi dividida em 2 tubos. A um dos tubos foi adicionado 6,0 mg L^{-1} de melamina. Em cada pH foram medidas as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de melamina.

3.1.3.3. Otimização do procedimento

A otimização do procedimento foi realizada avaliando os efeitos das concentrações de ácido tricloroacético e Triton X-114. O efeito do ácido tricloroacético foi avaliado nas concentrações de 0,1 a 0,3 mol L^{-1}, adicionando

1,0 mL da solução a 0,5 mL de leite. A mistura foi agitada e centrifugada. Para extração em ponto nuvem, foi adicionado 7,0 mL de água e 2,0 mL de solução de Triton X-114 12,0 mmol L^{-1} a 1,0 mL do sobrenadante da mistura anterior. A mistura foi agitada por 5 min, aquecida por 10 min a temperatura controlada de 50 °C e centrifugada por 5 min a 5000 rpm. As medidas de fluorescência foram realizadas na fase pobre, utilizando fendas de excitação e emissão correspondentes à resolução de 2,5 nm (excitação: 235 nm e emissão: 302 nm).

O efeito da concentração de Triton X-114 foi avaliado entre 6,0 e 18,0 mmol L^{-1}, mantendo a concentração de ácido tricloroacético em 0,3 mol L^{-1}. A solução foi agitada, aquecida e centrifugada conforme descrito acima. Nas medidas de fluorescência da fase pobre foram utilizadas fendas de excitação e emissão referente à resolução de 5,0 nm.

3.1.3.4. Preparo de amostra

Amostras de diferentes tipos de leite (integral UHT, desnatado UHT e pasteurizado tipo A e leite em pó integral) foram obtidas no comércio local. O leite em pó foi preparado conforme as instruções do rótulo. Para a precipitação das proteínas, utilizou-se 0,5 mL de leite para 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético 0,3 mol L^{-1}, a solução foi agitada por 5 min e centrifugada por 5 min a 5000 rpm.

Para a extração em ponto nuvem, foi adicionado 12 mL de água e 2,0 mL de solução de Triton X-114 12 mmol L^{-1} a 1,0 mL do sobrenadante da mistura preparada anteriormente. A solução foi agitada por 5 min, aquecida em banho de água a 50 °C por 10 min e centrifugada por 5 min a 5000 rpm. A solução ficou em repouso em banho de gelo por 10 min para facilitar a separação das fases. O procedimento de extração em ponto nuvem foi realizado em triplicata.

A fluorescência do Triton X-114 foi medida na fase pobre em surfactante a 302 nm, com excitação em 235 nm. As fendas de excitação e emissão foram ajustadas para se obter uma resolução de 5 nm. O software fornecido pelo fabricante foi utilizado para a aquisição de dados.

3.1.3.5. Procedimento de referência

O procedimento de referência foi baseado em cromatografia micelar [10]. Foi utilizado um aparelho de HPLC (Agilent1200), com detector de UV DAD com uma coluna cromatográfica C18 (Agilent, 0,46 x 10 cm, 3,5 µm), com tamanho de poros de 95 Å.

A fase móvel foi composta por solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) 0,05 mol L^{-1} (Merck, Alemanha, 99% de pureza) em tampão fosfato 0,1 mmol L^{-1}, pH 3, contendo n-propanol 7,5% (Merck, Alemanha).

O preparo das amostras de leite foi realizado diluindo 1,0 mL de leite em 10,0 mL da solução de SDS 0,05 mol L^{-1}. Foram utilizadas amostras de diferentes tipos de leite (integral UHT, desnatado UHT, pasteurizado tipo A e em pó integral, preparado conforme as instruções do rótulo). As soluções de referência (1,0 a 6,0 mg L^{-1} melamina) foram preparadas em meio de leite integral, de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

As amostras foram analisadas por HPLC após a homogeneização do leite com a solução de SDS, utilizando fase móvel a vazão de 1,0 mL min^{-1} e detecção espectrofotométrica (210 nm). Após as análises, a limpeza da coluna foi realizada com água e metanol por 2 horas cada, numa vazão de 1,0 mL min^{-1}, para remoção do SDS.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Clean-up das amostras de leite

O leite é uma matriz muito complexa e necessita de um preparo de amostra eficiente, de modo que as determinações de melamina não apresentem interferência de espécies concomitantes. Cada 100 g leite em média é composto por 2,9 g de proteína e 3,1 g de gordura [15]. Os procedimentos para a determinação de melamina em leite utilizam solventes orgânicos como acetonitrila [42,45], metanol [47] e clorofórmio [48] ou ácido tricloroacético [46] para a desnaturação de proteínas. Neste processo, ocorre a separação da fase aquosa (soro do leite), que contém o analito, da fase orgânica, rica em proteínas e micelas de gorduras [15]. Para o isolamento das fases, o procedimento mais utilizado é a filtração (*e.g.* membrana de 0,45 µm), porém necessita de membranas compatíveis com o solvente utilizado no *clean-up* da amostra (*e.g.* membranas de celulose regeneradas, poliamida (Nylon) e politetrafluoroetileno (PTFE)) [63]. Alguns procedimentos substituem a filtração pela EFS [40], utilizando um cartucho de extração e metanol como eluente. Essas etapas de preparo de amostra tornam os procedimentos morosos, com alto custo e prejudiciais ao meio ambiente devido à utilização de solventes tóxicos.

O *clean-up* do leite com acetonitrila, metanol ou ácido tricloroacético, seguido de filtração, mostrou-se ineficiente para a remoção das espécies concomitantes presentes no leite, pois a solução resultante apresentava coloração amarelada, sendo indicativo da presença da gordura do leite. Na Figura 4 é mostrado que ocorreu a separação das proteínas e da gordura com a adição dos reagentes. Com acetonitrila e metanol (tubos ***a*** e ***b)***, essa separação não foi eficiente, formando uma borda amarela de gordura na fase sobrenadante. O ácido tricloroacético, muito utilizado para a precipitação de proteínas, foi uma alternativa para o *clean-up* das amostras de leite [9,46]. Com este reagente, não houve a formação de borda amarela, indicando que a gordura ficou na solução (Figura 4c). O soro do leite após a centrifugação apresentou-se com pequenas gotículas de gordura e coloração

esbranquiçada que também são prejudiciais para as medidas por fluorescência. Desta forma, para a remoção da gordura foi necessário avaliar outro tipo de *clean-up* previamente às medidas de fluorescência. A estratégia aplicada foi a utilização da extração em ponto nuvem para remoção da gordura do soro do leite, após o *clean-up* com o ácido tricloroacético. Nestes procedimentos, as espécies hidrofóbicas que estão presentes em solução (*e.g.* aglomerados de gordura) interagem com os sistemas micelares e são extraídas para a fase rica em surfactante. A fase pobre, onde se encontra predominantemente a melamina, apresenta-se límpida (Figura 5) podendo ser utilizada diretamente nas medidas por fluorescência.

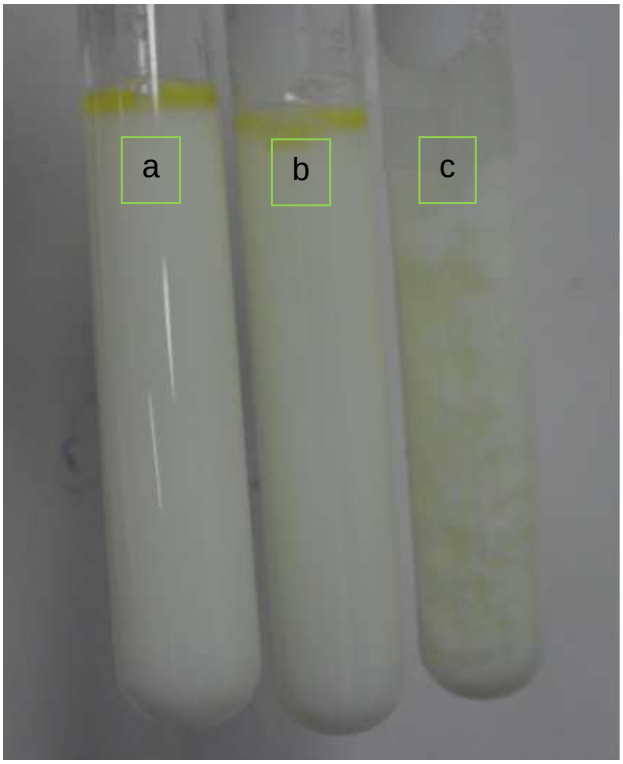

Figura 4 - Tratamento do leite com acetonitrila (a), metanol (b) ou ácido tricloroacético (c)

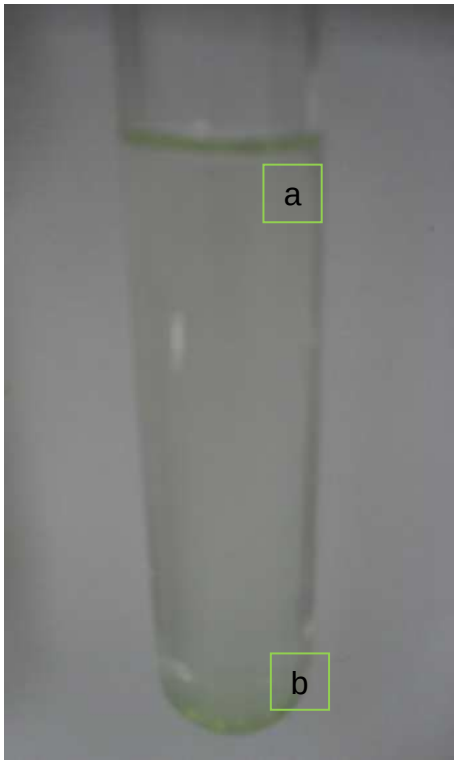

Figura 5 - Extração em ponto nuvem em leite: fase pobre em surfactante (a) e fase rica em surfactante (b)

4.2. Fluorescência da melamina e do Triton X-114

Em solução aquosa, melamina apresenta fluorescência com máximos de excitação e emissão em 250 e 367 nm [61], respectivamente, conforme espectros apresentados nas Figuras 6 e 7. Na Tabela 3, observa-se que a intensidade de fluorescência aumenta com a concentração de melamina.

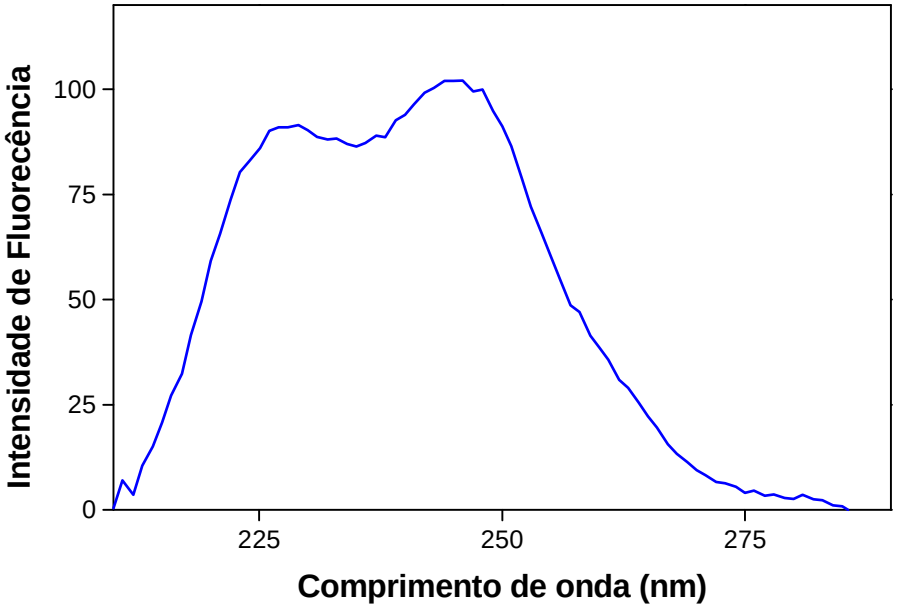

Figura 6 - Espectro de excitação da melamina 10 mg L^{-1} em solução aquosa (larguras de fenda correspondentes à resolução de 10 nm). Emissão medida em 367 nm.

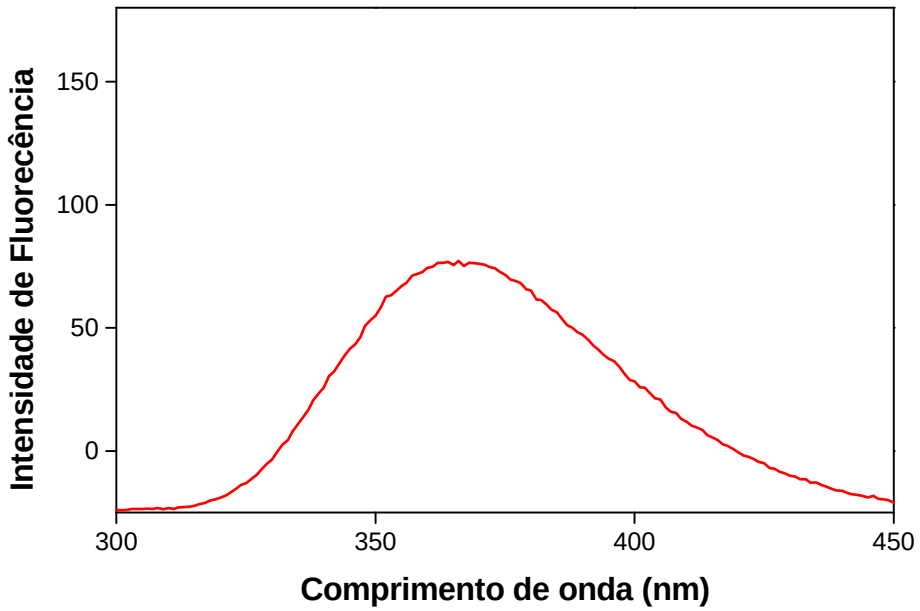

Figura 7 - Espectro de emissão da melamina 10 mg L^{-1} em solução aquosa (larguras de fenda correspondentes à resolução de 10 nm). Excitação medida em 250 nm.

Tabela 3 - Intensidades de fluorescência de melamina em soluções aquosas

Concentração de melamina (mg L^{-1})	Intensidade de Fluorescência
0,05	72,5
1,0	170,7
3,0	316,1
5,0	494,8
8,0	720,8

O Triton X-114 é um surfactante não iônico fluorescente, com máximos de excitação e emissão em 225 e 302 nm [58], respectivamente. O espectro de emissão do Triton X-114 é mostrado na Figura 8. Na presença de melamina as medidas de fluorescência do Triton X-114 forma afetadas. Em função da concentração relativamente alta do surfactante utilizada nos procedimentos de extração em ponto nuvem, todos os espectros utilizando o surfactante foram obtidos utilizando fendas de excitação e emissão correspondentes a resolução de 5 nm.

Foi observada supressão de fluorescência do Triton X-114 com a adição de melamina (Figura 8). A equação de Stern-Volmer é obedecida, com relação linear entre I^o/I e a concentração de melamina (r=0,999), com coeficiente linear próximo de 1,0. Além disso, a banda correspondente à emissão da melamina (367 nm) não foi observada na presença do surfactante, mesmo com a adição de 200 mg L^{-1}. Portanto, a determinação da melamina foi baseada no seu efeito supressor sobre a fluorescência do Triton X-114 na fase pobre em surfactante e a resposta analítica foi baseada na razão I^o/I.

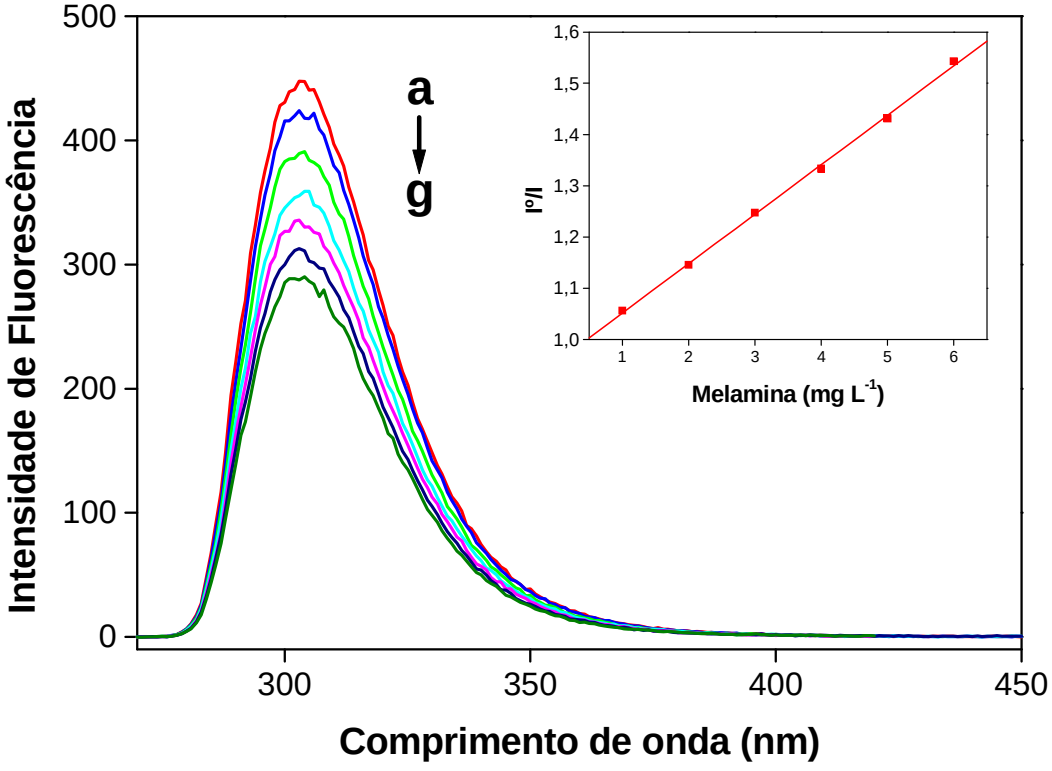

Figura 8 - Espectros de emissão do Triton X-114 na ausência (**a**) e na presença de melamina nas concentrações de 1 (**b**), 2 (**c**), 3 (**d**), 4 (**e**), 5 (**f**) e 6 mg L^{-1} (**g**)

4.3. Influência da temperatura e da acidez na intensidade de fluorescência do Triton X-114

As avaliações de temperatura e acidez da influência da intensidade de fluorescência do Triton X-114 foram realizadas na ausência de leite. A intensidade de fluorescência usualmente diminui com o aumento da temperatura [59,60]. Este efeito foi observado na intensidade de fluorescência do Triton X-114 tanto na presença, quanto na ausência de melamina (Figura 9).

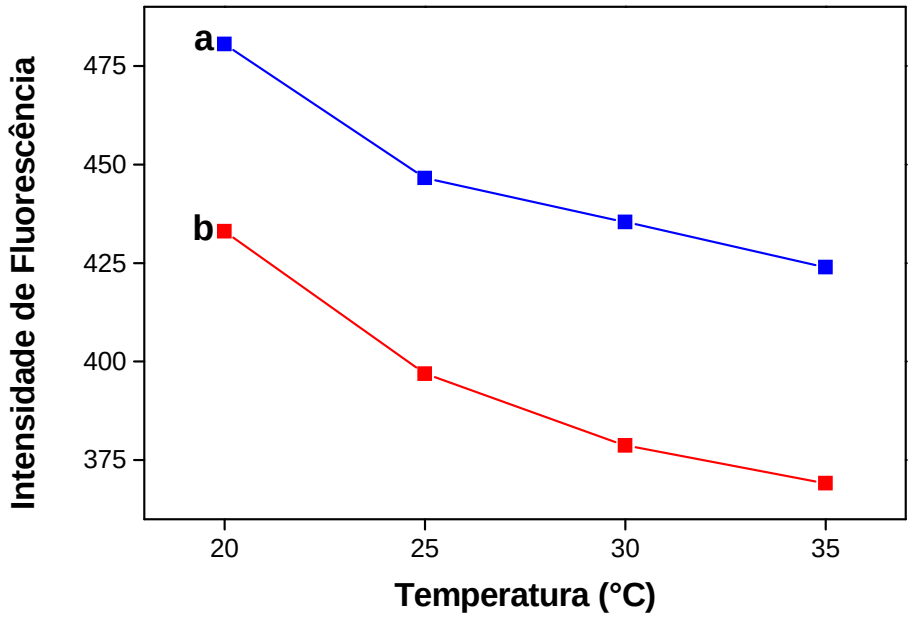

Figura 9 - Influência da temperatura na intensidade de fluorescência do Triton X-114 na ausência (a) e na presença de melamina (b)

A resposta analítica foi máxima na temperatura de 30 ^{o}C (I°/I = 1,15). Entretanto, a menor dependência com a temperatura foi observada entre 20 a 25 °C, (I°/I = 1,11 e 1,12, respectivamente). Visando evitar a necessidade de rigoroso controle de temperatura, as medidas foram realizadas a temperatura ambiente (23-25 °C).

A intensidade de fluorescência do Triton X-114 aumenta com o pH, tanto na ausência, quanto na presença de melamina (Figura 10). A maior intensidade de fluorescência do Triton X-114 ocorre em meio alcalino, o que está de acordo com

estudos anteriores [58]. Porém, a resposta analítica foi máxima e praticamente constante entre pH 2 e 4 (I°/I = 2,131 e 2,065, respectivamente), intervalo que inclui o pH da solução após a precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (pH 3). Desta forma, nenhum ajuste de acidez foi necessário para a medida de supressão de fluorescência, evitando uma etapa adicional de tratamento da amostra.

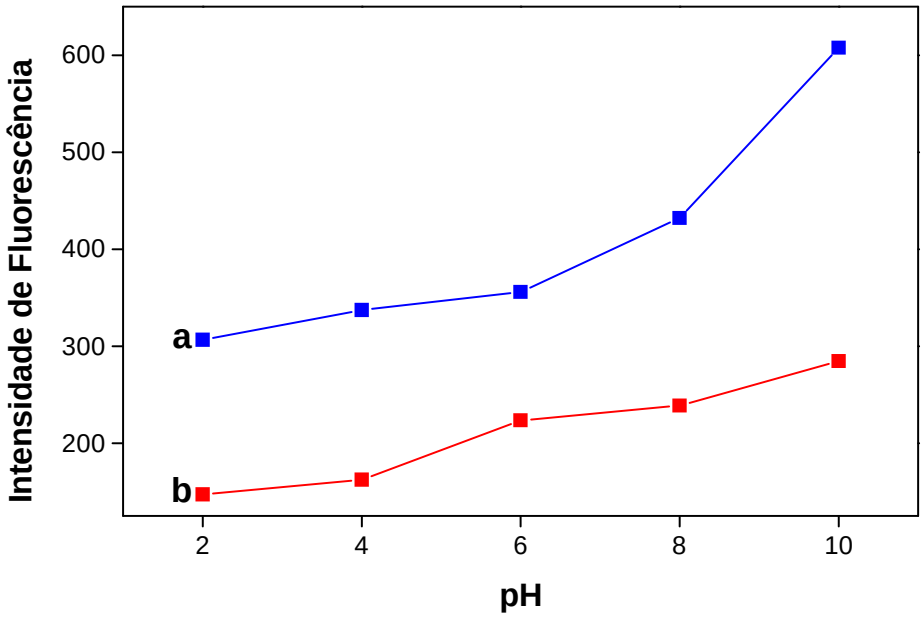

Figura 10 - Influência da acidez na intensidade de fluorescência do Triton X-114 (12,0 mmol L^{-1}) na ausência (a) e na presença de melamina (b)

4.4. Supressão de fluorescência

A causa da supressão de fluorescência foi identificada por medidas de tempo de vida do fluoróforo e medidas da intensidade de fluorescência em diferentes temperaturas na ausência e presença de melamina. Nas medidas do tempo de vida do Triton X-114 foi observada a redução de 10,8 para 5,5 ns na presença de melamina, indicando que o processo de supressão é dinâmico (colisional) [60].

Também foram realizados experimentos envolvendo medidas de fluorescência em diferentes temperaturas (20 a 35°C), Tabela 4. Os coeficientes angulares aumentaram com a temperatura (0,0589 L mg^{-1} a 20 ^{o}C e 0,0610 L mg^{-1} a 35 ^{o}C), comportamento indicativo de supressão dinâmica. O aumento da

temperatura favorece o aumento de colisões entre o supressor e o fluoróforo, diminuindo a intensidade de fluorescência. Desta forma, este experimento confirma a conclusão das medidas de tempo de vida.

Tabela 4 - Supressão de fluorescência do Triton X-114 em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	K_D
20	**0,0589**
25	**0,0591**
30	**0,0595**
35	**0,0610**

4.5. Otimização do procedimento

Os efeitos das concentrações de ácido tricloroacético e Triton X-114 no *clean-up* da amostra foram avaliados visando obter valores próximos de intensidade de fluorescência para extratos de leite e soluções de referência. Como demonstrado na Figura 11, com o aumento da acidez ocorre a atenuação da fluorescência do Triton X-114, o que está de acordo com o observado no experimento com variação de pH (Figura 10).

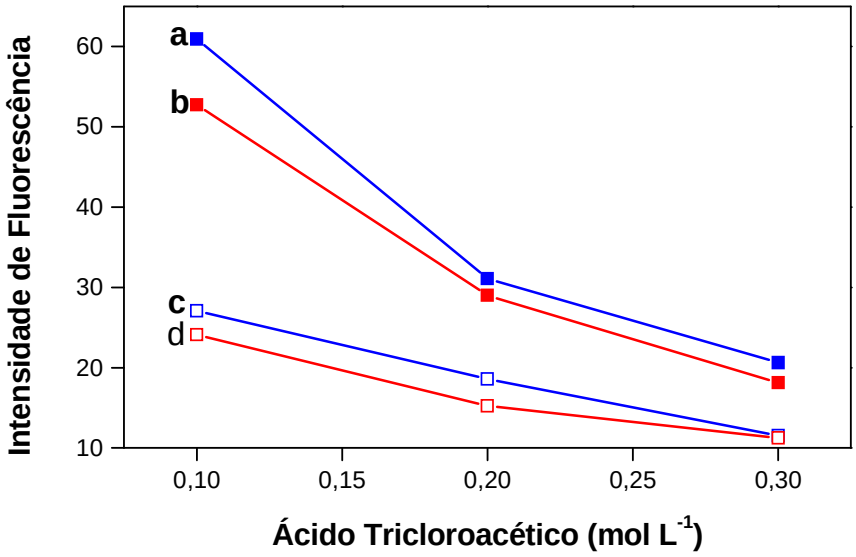

Figura 11 – Efeito da concentração do ácido tricloroacético na ausência (a,c) e presença de leite (b,d) e na ausência (a,b) e presença de melamina (c,d).

Em concentrações mais baixas de ácido tricloroacético (0,1 mol L^{-1}) suspensões turvas foram obtidas a partir do leite, indicando a incompleta precipitação de proteínas, o que poderia causar espalhamento de radiação nas medidas de fluorescência. Para concentrações mais elevadas (0,3 mol L^{-1}), sem a adição de melamina, intensidades de fluorescência similares (I^o) foram obtidas na ausência e na presença de leite. Nesta concentração de ácido tricloroacético, após o *clean-up*, foi visualizado que o soro do leite apresenta-se mais límpido em relação às menores concentrações. Conforme a avaliação do efeito da acidez (Figura 10), a relação I^o/I não variou significativamente entre pH 2,0-4,0 e o pH próximo a 3,0 foi adequado para a quantificação de melamina.

O Triton X-114 deve remover gorduras quantitativamente para evitar interferência e apresentar um sinal de referência adequado (I^o). O efeito da concentração de surfactante foi avaliado usando o soro do leite (após precipitação de proteínas) e a solução de referência (Figura 12).

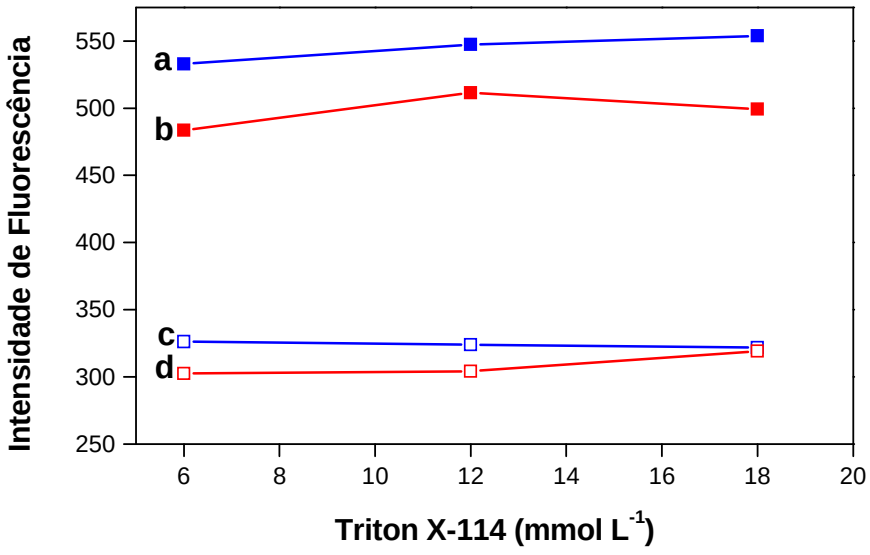

Figura 12 – Efeito da concentração do Triton X-114 na ausência (a,c) e presença de leite (b,d) e na ausência (a,b) e presença de melamina (c,d)

Na Figura 12 pode ser visualizado que não há diferenças significativas entre as intensidades de fluorescência nas diferentes concentrações de Triton X-114. Como esperado, a concentração de surfactante na fase pobre permanece próxima à CMC [51,52]; o aumento da concentração de Triton X-114 causa apenas o aumento do volume da fase micelar. Além disso, a intensidade de fluorescência na presença de melamina não foi afetada pela concentração de Triton X-114, o que indica que a remoção do analito para a fase rica durante o *clean-up* da amostra não foi significativa. Isto era esperado devido ao pH 3,0 do extrato antes da extração em ponto nuvem, condição em que > 99% de melamina encontra-se na forma protonada (pKa = 5) [15]. As relações mais próximas I^o/I foram atingidas com 12 mmol L^{-1} de Triton X-114 (1,69 e 1,68 na presença e ausência de leite, respectivamente). Esta concentração de surfactante foi então escolhida para estudos posteriores.

4.6. Características analíticas e aplicação

Após otimização do procedimento proposto, resposta linear foi observada entre 1,0 e 6,0 mg L^{-1} de melamina, com limite de detecção estimado em 0,8 mg L^{-1}

(nível de confiança de 95%). Este limite permite a detecção de adulteração de 320 µg de melamina em 100 gramas de leite, com custo de R$ 0,24/determinação.

Os coeficientes de variação foram estimados em 0,4% e 1,4% (n = 8) na ausência e na presença de melamina, respectivamente. O procedimento apresentou sensibilidade adequada para a determinação de melamina no leite, mesmo após a diluição de 45 vezes durante o preparo da amostra. Em cada determinação, foram consumidos 6,4 mg de Triton X-114 e 294 mg de ácido tricloroacético.

Com base na relação I°/I e na equação de Stern-Volmer, foram obtidas curvas de calibração com água (Equação 2) e leite (Equação 3), com coeficientes de correlação (r) de 0,999 e 0,993, respectivamente. As recuperações de melamina foram estimadas em 4 diferentes tipos de leite, enriquecidos com melamina 2,00 e 4,00 mg L^{-1}, resultando em valores entre 95 e 102% (Tabela 5). Estes resultados indicam a ausência de efeitos de matriz e a viabilidade de se quantificar melamina em leite utilizando soluções de referência preparadas em água.

$$\frac{I^{\circ}}{I} = 0{,}999 + 0{,}0165 \ C_{MEL} \qquad (2)$$

$$\frac{I^{\circ}}{I} = 1{,}000 + 0{,}0161 \ C_{MEL} \qquad (3)$$

Tabela 5 - Estudo de adição e recuperação da melamina em amostras de leite

Amostra	Melamina (mg L^{-1})		Recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
Leite em pó integral	2,00	1,92	96
	4,00	3,80	95
Leite integral UHT	2,00	2,00	100
	4,00	4,04	101
Leite desnatado	2,00	2,02	101
	4,00	3,96	99
Leite pasteurizado	2,00	2,04	102
integral	4,00	4,00	100

4.7. Procedimento de referência

A melamina é um composto hidrofílico e apresenta pouca afinidade com colunas C18 ou C8, quando se utiliza fase móvel com solventes como acetonitrila e metanol [63]. Existem algumas alternativas para a separação da melamina do leite como a utilização de outros tipos de coluna ou a utilização de fase móvel que possui a capacidade de alterar as propriedades de retenção da melamina na coluna.

O procedimento de referência foi proposto por Rambla-Alegre *et al.* (2010), sendo a determinação da melamina em leite baseada em HPLC utilizando fase móvel micelar. O procedimento é simples e não necessita de *clean-up* da amostra. A fase móvel micelar, utilizando o surfactante SDS, promove a solubilização de substâncias hidrofóbicas (*e.g.* gorduras e proteínas) [10].

A cromatografia líquida micelar é uma técnica de HPLC de fase reversa, que apresenta diversas vantagens como a seletividade e versatilidade [64]. Os surfactantes (*e.g.* SDS) modificam a natureza da fase estacionária e solubilizam as

micelas de gordura e proteínas impedindo a sua precipitação na coluna; os monômeros de SDS também competem com as proteínas evitando ligação com a melamina [10,64]. Assim as proteínas e outras substâncias hidrofóbicas são eluídas em menor tempo (*ca.* 3 min) e a melamina permanece retida na coluna, sendo eluida *ca*. 8,26 min como demonstrado na Figura 13. Para a separação eficiente, é necessário que a melamina esteja protonada para que possa interagir com o SDS ligado à fase estacionária. Em sua forma neutra, a melamina seria eluída juntamente com as espécies concomitantes presentes no leite [10]. O SDS foi utilizado por ser um surfactante aniônico, solúvel em água, de baixo custo e baixa CMC [10]. A utilização de um álcool de cadeia curta (n-propanol), juntamente com o SDS, melhora a eficiência de solubilização das proteínas [10].

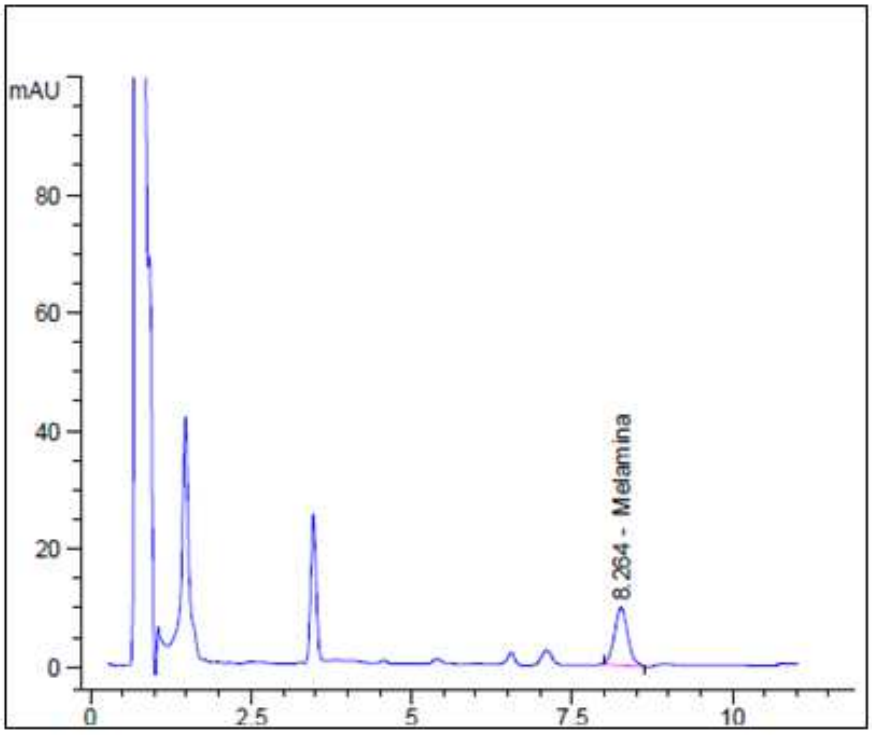

Figura 13 - Cromatograma de uma amostra de leite contendo melamina obtido pelo procedimento de referência [10]

A avaliação comparativa entre os procedimentos proposto e o referência foi realizada com diferentes tipos de leite (pó integral, integral UHT, pasteurizado

desnatado tipo A e semi-desnatado UHT) enriquecidos com melamina 2,5 mg L^{-1}. De acordo com a Tabela 6, as concentrações de melamina encontradas não diferem significativamente a 95% de confiança.

Tabela 6 - Concentrações de melamina determinadas pelos procedimentos proposto e de referência.

Amostra	Melamina (mg L^{-1})*	
	Fluorescência	HPLC [10]
Leite em pó integral	2,50 ± 0,14	2,44 ± 0,01
Leite integral UHT	2,60 ± 0,14	2,60 ± 0,01
Leite semi-desnatado UHT	2,73 ± 0,11	2,58 ± 0,01
Leite pasteurizado desnatado	2,43 ± 0,21	2,85 ± 0,07
Leite semi-desnatado UHT	2,71 ± 0,14	2,63 ± 0,01

*Valores médios e incertezas estimados por medidas em triplicata

O procedimento cromatográfico apresenta algumas desvantagens, como o alto tempo de análise e uma etapa de limpeza da coluna para a remoção do SDS, necessitando em média de 4 horas.

Na Tabela 7 é apresentada uma comparação das características analíticas obtidas em diferentes procedimentos para a determinação de melamina em leite. O procedimento proposto é mais ambientalmente amigável e requer um dos mais simples pré-tratamentos da amostra, utilizando apenas o ácido tricloroacético e a extração em ponto nuvem no preparo de amostra. Em relação aos demais procedimentos o procedimento proposto gasta *ca.* 40 mim. nas determinações. A faixa de resposta linear inclui o limite estabelecido pela OMS [22] e FDA [26]. Em comparação com o procedimento fluorimétrico anteriormente descrito [15], o processo proposto é simples (evita derivatização química e complexo preparo de amostra). Muitos dos procedimentos citados necessitam de diversas etapas de *clean-up,* [15,45] e a maioria utiliza solventes orgânicos [18,37,42] ou reagentes tóxicos como o acetato de chumbo [30,46].

Tabela 7 - Procedimentos para a determinação de melamina em leite

Técnica	Tratamento da amostra	Faixa Linear (mg L^{-1})	RSD (%)	Referência
Fluorescência	TCA e extração em ponto nuvem comTriton X-114	1,0-6,0	1,4 (n=8)	Este trabalho
Espectrometria de UV-vis	TCA e quitosana estabilizada com nanopartículas de ouro	0,1-100	4,2 (n=8)	[9]
HPLC	SDS e tampão fosfato pH 3	0,2-100	< 7,6 (n=6)	[10]
Fluorescência	TCA e cloreto de metileno seguido por EFS com eluição com metanol:solução de HCl	0,00021-1,6	2,3 (n=6)	[15]
Quimiluminescência	TCA e acetonitrila	0,2-80	3,7 (n=11)	[18]
RP-HPLC-DAD	TCA e acetato de chumbo seguido por EFS com eluição com metanol:água	0,1-50	3,1 (n=11)	[30]
HPCE	TCA e acetonitrila seguido por EFS com eluição com metanol:água	0,8-80	1.22 (n=6)	[37]
MALDI-TOF MS	TCA, acetonitrila e clorofórmio seguido por EFS com eluição com metanol:água	—	≤ 14 (n=11)	[41]
Fluorescência	TCA, acetonitrila e clorofórmio	0,63-504,40	2,9-3,5 (n=3)	[42]
Espectroscopia de Raman	Tratamento com acetonitrila,filtração e diluição	0,005- 0,1	2,54-4,60 (n=5)	[45]
Fluorescência	TCA e acetato de chumbo	0,0003-0,1	1,9 (n=3)	[46]
Fluorescência	metanol:água	24,1-964,4	19 (n=3)	[47]
Fluorescência	TCA e clorofórmio	10-100	1,4 (n=11)	[48]

EFS: extração em fase sólida; SDS: Dodecilsulfato de sódio; TCA: ácido tricloroacético

5. CONCLUSÕES

Um procedimento simples, limpo e rápido foi desenvolvido para a determinação de melamina no leite adulterado, sendo explorada, pela primeira vez, a supressão de fluorescência de Triton X-114. Tratamento do leite com ácido tricloroacético e extração ponto nuvem foram utilizados para a desnaturação de proteínas e remoção de lipídios, respectivamente, evitando assim os efeitos da matriz. O procedimento proposto requer um simples preparo da amostra, evita etapas de pré-concentração e derivatização química para a determinação de melamina. Evita-se, portanto, a utilização de reagentes tóxicos e solventes orgânicos.

O procedimento atende aos limites estabelecidos pelas agências reguladoras como a OMS e FDA. As características analíticas, como precisão e sensibilidade foram favoráveis para a determinação de baixas concentrações de melamina. O procedimento apresentou respostas concordantes com procedimento de referência.

Através das medidas do tempo de vida do fluoróforo e de fluorescência em função da temperatura foi possível determinar que o processo de supressão da fluorescência é dinâmico.

O procedimento proposto é atraente para determinação de adulteração em leite, podendo ser utilizado em análises de rotina, devido ao seu baixo custo por determinação.

REFERÊNCIAS

1. SOUZA, S. S.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M.; FARIA, J. A. F.; CELEGHINI; R. M. S.; FERREIRA, M. M. C.; GRANATO, D.; SANT'ANA, A. S. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. **Food Chemistry**, Barking, v. 124, p. 692-695, 2011.

2. BARUI, A. K.; SHARMA, R.; RAJPUT, Y. S. Detection of non-dairy fat in milk based on quantitative assay of anionic detergent using azure A dye. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 24, p. 44-47, 2012.

3. PANA, X. D.; WUA, P.; YANG, D. J.; WANGA, L. Y.; SHENA, 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**, Guildford, v. 30, p. 545-548, 2013.

4. ABERNETHY, G; HIGGS, K. Rapid detection of economic adulterants in fresh milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1288, p. 10-20, 2013.

5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 04 de novembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 nov. 2011. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br. Acesso em: 05 nov. 2013.

6. OHLSSON, A. H.; FAUERBACH, J. A.; SACCO, N. J.; BONETTO, M. C.; CORTÓN, E. Voltamperometric discrimination of urea and melamine adulterated skimmed milk powder. **Sensors**, Basel, v. 12, p. 12220-12234, 2012.

7. CLARK, S.; FRANCIS, P. S.; CONLAN, X. A.; BARNETT, N. W. Determination of urea using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after automated derivatisation with xanthydrol. **Journal Chromatography A**, Amsterdam, v. 1161, p. 207-213, 2007.

8. NIKOLELI, G. P.; DIMITRIOS, P. NIKOLELIS, D. P; METHENITIS, C. Construction of a simple optical sensor based on air stable lipid film with incorporated urease for the rapid detection of urea in milk. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 675, p. 58-63, 2010.

9. GUAN, H.; YU, J.; CHI, D. Label-free colorimetric sensing of melamine based on chitosan-stabilized gold nanoparticles probes. **Food Control**, Guildford, v. 32, p. 35-41, 2013.

10. RAMBLA-ALEGRE, M.; PERIS-VICENTE, J.; MARCO-PEIRO, S.; BELTRAN-MARTINAVARRO, B.; ESTEVE-ROMERO, J. Development of an analytical methodology to quantify melamine in milk using micellar liquid chromatography and validation according to EU Regulation 2002/654/EC. **Talanta**, London, v. 81, p. 894-900, 2010.

11. SHARMA, K.; PARADAKAR, M. The melamine adulteration scandal. **Food Security**, Heidelberg, v. 2, p. 97-107, 2010.

12. WU, Y.; ZHANG, Y. Analytical chemistry, toxicology, epidemiology and health impact assessment of melamine in infant formula: Recent progress and developments. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 56, p. 325-335, 2013.

13. LE, T.; YAN, P.; XU, J.; HAO, Y.A novel colloidal gold-based lateral flow immunoassay for rapid simultaneous detection of cyromazine and melamine in foods of animal origin. **Food Chemistry**, Barking, v. 138, p. 1610-1615, 2013.

14. BRETTI, C.; STEFANO, C.; LANDO, G.; SAMMARTANO, S. Thermodynamic properties of melamine (2,4,6-triamino-1,3,5-triazine) in aqueous solution. Effect of ionic medium, ionic strength and temperature on the solubility and acid–base properties. **Fluid Phase Equilibria**, Amsterdam, v. 355, p. 104-113, 2013.

15. FENG, W.; LV, C.; LIPING, Y.; CHENG, J.; YAN, C. Determination of melamine concentrations in dairy samples. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 47, p. 147-153, 2012.

16. DORNE, J. L.; DOERGE, R. D.; VANDENBROECK, M.; GREMMELS, J. F.; MENNES, W.; KNUTSEN, H. K.; VERNAZZA, F.; CASTLE, L.; EDLER, L.; BENFORD, D. Recent advances in the risk assessment of melamine and cyanuric acid in animal feed. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 270, p. 218-229, 2013.

17. SUN, F.; MA, W.; XU, L.; ZHU, Y.; LIU, L.; PENG, C.; WANG, L.; KUANG, H.; XU, C. Analytical methods and recent developments in the detection of melamine. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 29, p. 1239-1249, 2010.

18. ZHANG, J.; WU, M.; DONGHU, C.; CANÇÃO, Z. Ultrasensitive determination of melamine in milk products and biological fluids by luminol-hydrogen peroxide chemiluminescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 24, p. 1038-1042, 2011.

19. DOMINI, C.; VIDAL, L.; CRAVOTTO, G.; CANALS, A. A simultaneous, direct microwave/ultrasound-assisted digestion procedure for the determination of total Kjeldahl nitrogen. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 16, p. 564-569, 2009.

20. SHARIFI, M.; ZEBARTH, B. J.; BURTON, D. L.; GRANT, C. A.; HAJABBASI, M. A.; ABBASSI-KALO, G.; Sodium hydroxide direct distillation: a method for estimating total nitrogen in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 40, p. 2505-2520, 2009.

21. SAINT-DENIS, T.; GROUPY, J. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 515, p. 191-198, 2004.

22. WHO. Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597951_eng.pdf?ua=1 Acesso em: 06 nov. 2013.

23. LACHENMEIER, D. W.; HUMPFER, E.; FANG, F.; SCHUTZ, B.; DVORTSAK, P.; SPROLL, C.; SPRAUL, M. NMR-Spectroscopy for Nontargeted Screening and Simultaneous Quantification of Health-Relevant Compounds in Foods: The Example of Melamine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 7194-7199, 2009.

24. DOBSON, R. L. M.; MOTLAGH, S.; QUIJANO, M.; CAMBRON, R. T.; BAKER, T. R.; PULLEN, A. M.; REGG, B. T.; BIGALOW-KERN, A. S.; VENNARD, T.; FIX, A.; REIMSCHUESSEL, R.; OVERMANN, G.; SHAN, Y.; DASTON, G. P. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 106, p. 251-262, 2008.

25. CHAN, E. Y. Y.; GRIFFIHS, S. M.; CHAN, C. W. Public-health risks of melamine in milk products. **Lancet**, London, v. 372, p. 1444-1445, 2008.

26. US Food and Drug Adminstration. **LIB 4422 Melamine and Cyanuric Acid Residues in Foods.** Disponível em: http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071673.htm. Acesso em: 06 nov. 2013.

27. CHANSUVARNA, W.; PANICHA, S.; IMYIM, A. Simple spectrophotometric method for determination of melamine in liquid milks based on green Mannich reaction. **Spectrochimica Acta. Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Oxford, v. 113, p.154-158, 2013.

28. EHLING, S.; TEFERA, S.; HO, I. P. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, p. 1319-1325, 2007.

29. FILAZI, A.; SIRELI, U. T.; EKICI, H.; CAN, H. Y.; KARAGOZ, A. Determination of melamine in milk and dairy products by high performance liquid chromatography. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 95, p. 602-608, 2012.

30. SUN, H.; LIXIN, W.; AI, L.; LIANG, S.; WU, H. A sensitive and validated method for determination of melamine residue in liquid milk by reversed phase high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 686-691, 2010.

31. ZHENG, X. L.; YU, B. S.; KE-XIAN LI, K. X.; DAI, Y.N. Determination of melamine in dairy products by HILIC-UV with NH_2 column. **Food Control**, Guildford, v. 23, p. 245-250, 2012.

32. ZHOU, J.; ZHAO, J.; XUE, X.; CHEN, F.; ZHANG, J.; LI, Y.; WU, L.; CHEN, L. Determination of melamine in royal jelly and lyophilized powder using ultrasonically assisted extraction by ion-pair HPLC with UV detection. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 33, p. 167-173, 2010.

33. LV, X.; WANG, J.; WU, L; QIU, J.; LI, J.; WU, Z.; QIN, Y. Tissue deposition and residue depletion in lambs exposed to melamine and cyanuric acid-contaminated diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 943–948, 2010.

34. WANG, P.; LEE, R.; CHENA, C.; CHOU, C.; LEE, M. Determination of cyromazine and melamine in chicken eggs using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 752, p. 78-86, 2012.

35. MIAO, H.; FAN, S.; WU, Y.; ZHANG, L.; ZHOU, P.; LI, J.; CHEN, H.; ZHAO, Y. Simultaneous determination of melamine, ammelide, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical and Environmental Sciences**, San Diego, v. 22, p. 87-94, 2009.

36. TOTH, J. P.; BARDALAYE, P. C. Capillary gas chromatographic separation and mass spectrometric detection of cyromazine and its metabolite metamine. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 408, p. 335-340, 1987.

37. WEN, Y.; LIU, H.; HAN, P.; GAO, Y.; LUAN, F.; LI, X. Determination of melamine in milk powder, milk and fish feed by capillary electrophoresis: a good alternative to HPLC. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 90, p. 2178-2182, 2010.

38. XIA, J.; ZHOU, N.; LIU, Y.; CHEN, B.; WUC, Y.; YAO, S. Simultaneous determination of melamine and related compounds by capillary zone electrophoresis. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 912-918, 2010.

39. ONO, S.; FUNATO, T.; INOUE, Y.; MUNECHIKA, T.; YOSHIMURA, T.; MORITA, H.; RENGAKUJI, S.; SHIMASAKI, C. Determination of melamine derivatives, melame, meleme, ammeline and ammelide by high-performance cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 815, p. 197-204, 1998.

40. TITTLEMIER, S. A.; LAU, B. P. Y.; NARD, C. M.; CORRIGAN, C.; SPARLING, M.; GAERTNER, D.; PEPPER, K.; FEELEY, M. Melamine in infant formula Sold in Canada: Occurrence and risk assessment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 5340–5344, 2009.

41. SU, X.; ZHOU, H. Y.; CHEN, F. C.; GAO, B. X.; LIU, Z. W.; ZHANG, Y. H.; LIU, F.; LIU, F.; LI, Z. R.; GAO, Z. X. Modified SBA-15 matrices for high-throughput screening of melamine in milk samples by MALDI-TOF MS. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 338, p. 39-44, 2013.

42. TANG, G.; DU, L.; SU, X. Detection of melamine based on the fluorescence resonance energy transfer between CdTe QDs and Rhodamine B. **Food Chemistry**, Barking, v. 141, p. 4060-4065, 2013.

43. ZENG, H. J.; YANG, R., WANG, Q.; LI, J.; QU, L. Determination of melamine by flow injection analysis based on chemiluminescence system. **Food Chemistry**, Barking, v. 127, p. 842-846, 2011.

44. FODEY, T. L.; THOMPSON, C. S.; TRAYNOR, I. M.; HAUGHEY, S. A.; KENNEDY, D. G.; CROOKS, S. R. H. Development of an optical biosensor based immunoassay to screen infant formula milk samples for adulteration with melamine. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 83, p. 5012-5018, 2011.

45. MA, P.; LIANG, F.; SUN, Y.; JIN, Y.; CHEN, Y.; WANG, X.; ZHANG, H.; GAO, D.; SONG, D. Rapid determination of melamine in milk and milk powder by surface-enhanced Raman spectroscopy and using cyclodextrin-decorated silver nanoparticles. **Microchimica Acta**, Heidelberg, v. 180, p. 1173-1180, 2013.

46. ATTIA, M. S.; BAKIR, E.; ABDEL-AZIZ, A. A.; ABDEL-MOTTALEB, M. S. A. Determination of melamine in different milk batches using a novel chemosensor based on the luminescence quenching of Ru(II) carbonyl complex. **Talanta**, London, v. 84, p. 27–33, 2011.

47. WANG, Q.; HAUGHEY, S. A.; SUN. Y.; EREMIN, S. A.; LI, Z.; LIU, H.; XU, Z.; SHEN, Y.; LEI, H. Development of a fluorescence polarization immunoassay or the detection of melamine in milk and milk powder. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 399, p. 2275–2284, 2011.

48. ZHANG, M.; CAO, X.; LI, H.; GUAN, F.; GUO, J.; SHEN, F.; LUO, Y.; SUN, C.; ZHANG, L. Sensitive fluorescent detection of melamine in raw milk based on the inner filter effect of Au nanoparticles on the fluorescence of CdTe quantum dots. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, p. 1894–1900, 2012.

49. CARABIAS-MARTINEZ, R.; GONGALO, E. R.; ÁLVAREZ, J. D.; PINTO, C. G.; MENDEZ, J. H. Prediction of the behaviour of organic pollutants using cloud point extraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1005, p. 23-34, 2003.

50. LOPES, A. S.; GARCIA, J. S.; CATHARINO, R. R.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, M. A. Z. Cloud point extraction applied to casein proteins of cow milk and their identification by mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 590, p. 166-172, 2007.

51. COELHO, L. M.; ARRUDA, M. A. Z. Preconcentration procedure using cloud point extraction in the presence of electrolyte for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta. Part B - Atomic Spectroscopy**, Oxford, v. 60, p. 743-748, 2005.

52. BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C. **Extração em ponto nuvem princípios e aplicações em química analítica**. 1. ed. Bahia: UESB, 2006.

53. ROCHA, D. L.; BATISTA, A. L.; ROCHA, F. R. P.; DONATI, G. L.; NÓBREGA, J. A. Greening sample preparation in inorganic analysis.**Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 45, p. 79-92, 2013.

54. KUKUSAMUDE, C.; SANTALAD, A.; BOONCHIANGMA, S.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S.; CHAILAPAKUL, O. Mixed micelle-cloud point extraction for the analysis of penicillin residues in bovine milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, London, v. 81, p. 486-492, 2010.

55. QIN, H.; GONG, Y.; MIAO, C. Ultrasonic-thermostatic-assisted cloud point extraction coupled to high-performance liquid chromatography for the analysis of adrenalines residues in milk. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 234, p. 543-550, 2012.

56. ROD, A. R.; BORHANI, S.; SHEMIRANI, F. Cloud point pre-concentration and flame atomic absorption spectrometry: application to the determination of manganese in milk and water samples. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 223, p. 649-653, 2006.

57. ZHANG, W.; DUAN, C.; WANG, M. Analysis of seven sulphonamides in milk by cloud point extraction and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry,** Barking, v. 126, p. 779-785, 2011.

58. TABRIZI, A. B. Cloud point extraction of salicylic acid from human urine and its spectrofluorimetric determination. **Chemia Analityczna**, Warsaw, v. 52, p. 823-833, 2007.

59. HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 1999.

60. LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006.

61. HUANG, H.; LI, L.; MA, Q.; FENG, Y. Q.; HE, Z. K. Determination of melamine in milk by fluorescent spectrophotometry with cetyltrimethyl ammonium bromide. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 38, p. 249-252, 2010.

62. CARVALHES. **Chromafil**. Disponível em: ftp://ftp.mn-net.com/portugues/Cromatografia/Chromafil/Fl.%20Chromafil%20PT.pdf Acesso em: 03 jan. 2014.

63. DIONEX CORPORATION. **Rapid determination of melamine in liquid milk and milk powder by HPLC on the acclaim mixed-mode WCX-1 column with Uv detection**. Sunnyvale, CA, 2009. 7 p. (Application Note, 221). Disponível em: http://www.dionex.com. Acesso em: 03 de jan. de 2014.

64. GIL-AGUSTÍ, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Anserine and carnosine determination in meat samples by pure micellar liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1189, p. 444-450, 2008.