



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias



TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y Control
de Calidad Químicos**

**Determinación de melamina en leche en polvo y queso mediante
diferentes técnicas analíticas**

Autora:

Raquel Sánchez Martínez

Tutores:

Dr. Luis Debán Miguel

Dra. M^a Isabel Campos Labadie

Departamento de Química Analítica

ÍNDICE

1. LISTADO DE ABREVIATURAS	3
2. RESUMEN EN ESPAÑOL Y EN INGLÉS.....	4
3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	5
3.1. La leche	6
3.2. Adulteración de la leche: sustancias más utilizadas.....	6
3.3. La melamina.....	7
3.4. La melamina como adulterante en la leche	9
3.5. Toxicidad de la melamina	9
3.6. Antecedentes bibliográficos	10
4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	13
5. TÉCNICAS UTILIZADAS	14
5.1. Espectroscopía de absorción molecular ultravioleta-visible	14
5.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	14
5.3. Espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS)	15
5.4. Espectroscopía Raman	17
6. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS	18
6.1. Reactivos.....	18
6.2. Materiales.....	18
6.3. Equipos.....	19
7. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.....	20
7.1. Preparación de los patrones.....	20
7.2. Muestras de leche en polvo y queso tratadas con melamina.....	20
7.3. Espectroscopía de absorción molecular ultravioleta-visible	22
7.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	23
7.5. Espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS)	27

7.6. Espectroscopía Raman	38
8. CONCLUSIONES	43
9. BIBLIOGRAFÍA	44
10. ANEXOS	49
10.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	49
10.2. Espectroscopía Raman.....	56
11. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	59

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (High performance Liquid Chromatography)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)
NIR	Infrarrojo cercano (Near Infrared)
NIRS	Espectroscopía del infrarrojo cercano (Near Infrared Spectroscopy)
PLS	Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares)
PLSR	Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares Regression)
R²	Coefficiente de determinación en calibración
R²_{cv}	Coefficiente de determinación en Validación Cruzada
RMSEC	Raíz Media Cuadrática del Error Típico de Calibración (Root Mean Square Error of Calibration)
RMSECV	Raíz Media Cuadrática del Error Típico de Validación Cruzada (Root Mean Square Error of Cross Validation)
RMSEP	Raíz Media Cuadrática del Error Típico de Predicción (Root Mean Square Error of Prediction)
RPD	Desviación residual de predicción (Residual Predictive Deviation)
UV	Ultravioleta

2. RESUMEN EN ESPAÑOL Y EN INGLÉS

RESUMEN

La leche es un alimento básico en nuestra dieta, sobre todo en los primeros meses de vida. La aparición de leche en polvo para bebés adulterada con grandes cantidades de melamina dio lugar a problemas para la salud en los bebés que la consumieron. La melamina es un compuesto químico que se utilizó para aumentar el contenido proteico de la leche de manera fraudulenta. En este trabajo se pone a punto un procedimiento para la determinación de melamina en muestras de leche en polvo y queso mediante HPLC/UV-Visible que sirve como método de referencia para su determinación mediante espectroscopía NIR, lo que supondría una ventaja debido a que las medidas se realizan en tiempo real. También se lleva a cabo la identificación de melamina mediante espectroscopía Raman.

Palabras clave: melamina, leche en polvo, queso, HPLC, UV-Visible, NIRS, Raman.

ABSTRACT

Milk is a basic food in our diet, especially in the first months of life. The appearance of baby milk powder adulterated with large amounts of melamine caused health problems in the babies who consumed it. Melamine is a chemical compound that was used fraudulently to increase the protein content of milk. In this work, a method to determine melamine in milk powder and cheese samples by HPLC/UV-Visible is set up, which is used as a reference method for its determination by NIR spectroscopy, which would be an advantage due to the measurements are made in real time. In addition, melamine is identified by Raman spectroscopy.

Key words: melamine, milk powder, cheese, HPLC, UV-Visible, NIRS, Raman.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El aumento del número de personas con intolerancias o alergias alimentarias, y las consecuencias derivadas de la venta y consumo de alimentos procesados sin control riguroso de los mismos, está dando lugar a un elevado interés por la seguridad alimentaria, tanto por parte de los consumidores como por los Organismos Estatales correspondientes. Uno de los mayores problemas lo originan las adulteraciones, lo que además de constituir un fraude, incrementa exponencialmente las probabilidades de reacciones perjudiciales para el organismo [1].

La definición de alimento adulterado dada por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) es la siguiente: “Aquel que ha sido modificado por el hombre, alterando sus características, por ejemplo, extrayendo o sustituyendo alguno de los componentes propios del alimento” [2].

La dada por la Real Academia de la Lengua Española para el término “adulterar” es: “Alterar fraudulentamente la composición de una sustancia” [3].

En consecuencia, se puede decir que un alimento adulterado es aquel que ha sido modificado intencionadamente para conseguir un beneficio económico, ocultar deficiencias en la calidad de las materias primas o defectos aparecidos durante la elaboración del mismo [4].

El fraude alimentario se considera un delito cuando se convierte en una actividad organizada para engañar deliberadamente a quienes compran esos alimentos [1].

En el año 2012 la revista “Journal of Food Science” llevó a cabo una recopilación de artículos de revistas científicas que hacían referencia a la adulteración de alimentos y de aquí se obtuvo que los siete alimentos más adulterados eran: aceite de oliva, leche, miel, azafrán, zumo de naranja, café y zumo de manzana [5]. La adulteración de la leche ha provocado en los últimos años importantes problemas en la salud humana.

En septiembre de 2008 hubo un escándalo en China relacionado con la leche en polvo para consumo infantil debido a que se le había añadido una sustancia llamada melamina [6], la cual se utiliza en la fabricación de resinas, pegamentos y plásticos [7]. Como consecuencia de ello

unos 300.000 niños fueron intoxicados y 6 de ellos murieron. Esta sustancia se añadió a la leche para conseguir un aumento del contenido en proteínas del alimento, es decir de su valor nutricional, ya que este se cuantifica a través del nitrógeno total que tenga el alimento y porque además se conseguía una producción más económica [8].

Toda esta polémica ha dado lugar a que la industria alimentaria haya cambiado sus procesos de producción inclinándose por productos prácticamente sin estabilizantes, ni aditivos ni conservantes artificiales. Pasan a tener importancia los alimentos naturales y ecológicos.

3.1. La leche

La leche es un alimento que siempre ha formado parte de nuestra dieta, sobre todo durante los primeros años de vida. Un vaso de leche contiene el 21% de proteína y el 8% de calorías y micronutrientes necesarios para un niño de 5 años, aportando también calcio, magnesio, selenio, riboflavina y vitaminas B12 y B5 [9].

3.2. Adulteración de la leche: sustancias más utilizadas

La leche se ha vuelto objeto de adulteración debido a que presenta un alto valor nutricional lo que ha dado lugar a que se haya producido un incremento en su producción y consumo en los últimos años [10]. La adulteración puede suponer un riesgo para la salud de las personas que consuman esa leche, pero también puede no serlo si se trata de una adulteración que sólo conlleve la dilución o adición de alguna sustancia que aumente el volumen, o que falsee un producto de baja calidad o que reemplace sustancias de la propia leche por otras más económicas todo ello con el fin de alcanzar un beneficio económico [11].

Hay una serie de adulterantes como la urea, el sulfato de amonio, la sosa cáustica, el ácido bórico, el ácido benzoico, el ácido silícico, el peróxido de hidrógeno, los azúcares y la melamina que se utilizan para modificar determinados parámetros de la calidad de la leche como son el porcentaje de sólidos no grasos, o el de proteínas o la duración del producto y que suponen un peligro para la salud humana [12].

Llevar a cabo una detección de adulterantes en la leche se puede realizar sin problemas, sin embargo, cuantitativamente, en función del adulterante será necesario utilizar unas técnicas de mayor o menor complejidad. Las técnicas analíticas que se utilizan para determinar las distintas sustancias que se emplean como adulterantes aparecen recogidos en la Figura 1 [12].

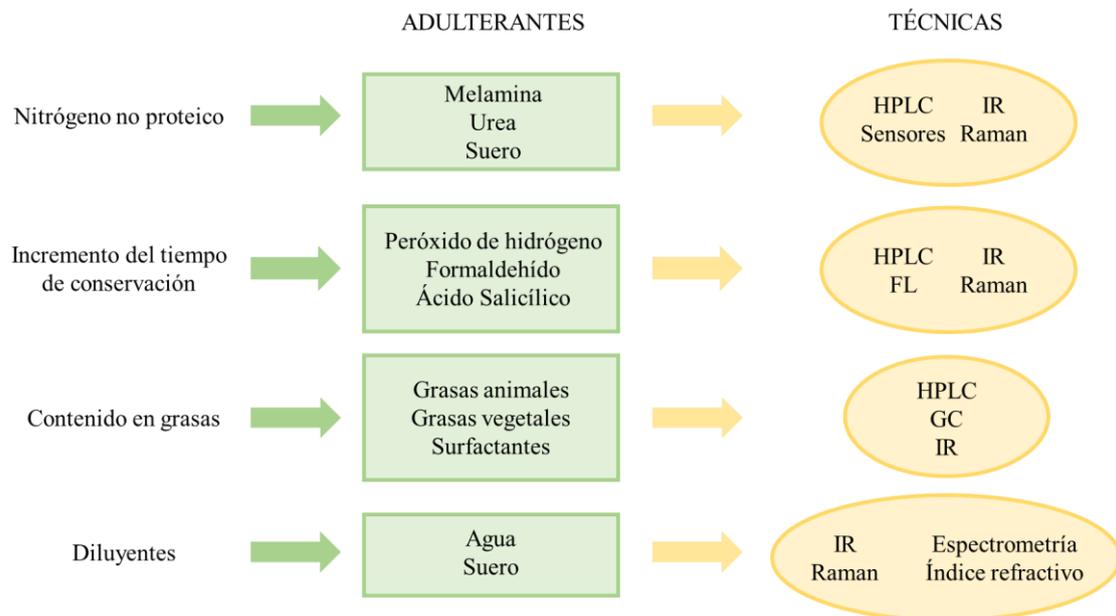


Figura 1. Esquema de los distintos adulterantes de la leche y las diferentes técnicas analíticas para su determinación

3.3. La melamina

La melamina, según la IUPAC: 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina, es un compuesto químico de fórmula empírica $C_3H_6N_6$ (Figura 2) que a temperatura ambiente es un polvo cristalino de color blanco, fuertemente polar, poco soluble en agua e insoluble en disolventes comunes [13].

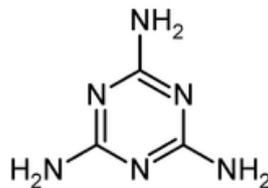


Figura 2. Estructura química de la melamina

Presenta distintas utilidades [14]:

- Da lugar a la resina de melamina (Figura 3) cuando se la combina con formaldehído en la fabricación de termoplásticos
- Presenta propiedades ignífugas cuando se mezcla con resinas, debido a que cuando se quema o carboniza libera gas nitrógeno
- En la fabricación de pinturas, de fertilizantes, de pesticidas, de productos de limpieza, ...

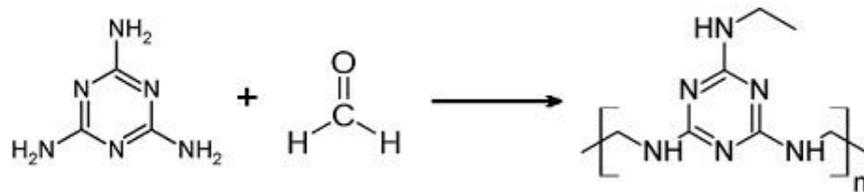
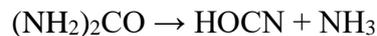


Figura 3. Síntesis de resina de melamina-formaldehído

La síntesis de la melamina a partir de la urea se produce en dos pasos [13]:

1. Reacción de descomposición de la urea en ácido cianúrico y amoníaco. Es una reacción endotérmica.



2. Reacción de polimerización del ácido cianúrico que da lugar a la melamina y se libera dióxido de carbono. Se trata de una reacción exotérmica.



Como productos intermedios pueden formarse el ácido cianúrico, la amelida y la amelina (Figura 4).

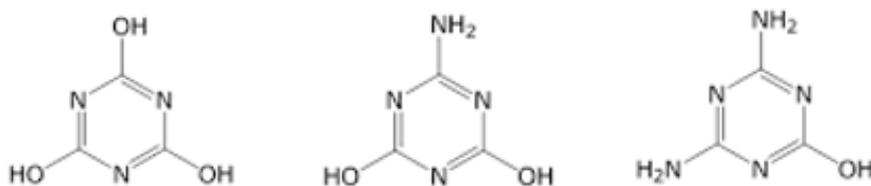


Figura 4. Estructuras químicas del ácido cianúrico, amelida y amelina, respectivamente

3.4. La melamina como adulterante en la leche

El valor nutricional de la leche viene medido por su contenido en proteínas, entre otros parámetros, y para ello se calcula el nitrógeno total mediante los métodos de Kjeldahl y Dumas, los cuales no distinguen entre el nitrógeno no proteico y el proteico [15]. Debido a esto, determinadas industrias dedicadas al sector lácteo lo utilizaron para reducir sus costes en la producción añadiendo determinadas sustancias que conservaban el nitrógeno total de la leche, aunque nutricionalmente desde el punto de vista proteico no era así.

Si añadimos un gramo de melamina a un litro de leche se puede aumentar hasta un 0.4% el porcentaje de proteínas de un modo no real debido a que la molécula de melamina aporta 6 átomos de nitrógeno por molécula. Además, la solubilidad de la melamina en agua es de 3.1 g/L por lo que se puede aumentar en un 1,2% el porcentaje de proteínas en un litro de leche de forma falsa [16].

Cuando se comenzó a utilizar la melamina como adulterante de la leche no era considerada perjudicial para la salud de los consumidores porque no estaba clasificada como una sustancia cancerígena en los humanos [8], aunque posteriormente sí se la ha podido relacionar con la aparición de tumores en el aparato urinario de ratas y ratones [16]. Para evitar graves consecuencias en la salud humana se han establecido por los diferentes países unos límites que en ningún caso superan el nivel de traza [17]–[20].

3.5. Toxicidad de la melamina

Una vez ingerida la melamina, se elimina directamente por el aparato urinario (a las 24h de haberla ingerido se elimina el 90%). Los estudios realizados sobre melamina en humanos han sido por inhalación o contacto cutáneo, pero hay escasa información sobre sus efectos al ser ingerida [21]. En cambio, sí se ha realizado el estudio de toxicidad de la melamina en animales como ratas, ovejas, cerdos... obteniéndose como resultado la aparición de una toxicidad aguda, que da lugar a trastornos en el aparato urinario, o crónica que puede producir infertilidad o malformaciones fetales o cáncer de vejiga [16].

En el año 2008 se tomó una medida de emergencia en la Unión Europea que prohibía la importación de productos lácteos originarios de China debido al elevado porcentaje de melamina que presentaban. Esto fue debido a un estudio llevado a cabo sobre niños consumidores de estos productos y que dio como resultado la observación de formación de cristales en el aparato urinario que causaban lesiones tubulares proximales e incluso obstrucciones llegando a provocar incluso la muerte. También se observó que cuanto menor era la edad del individuo más graves eran los efectos. Estos cristales se forman al combinarse la melamina con el ácido cianúrico mediante enlaces de hidrógeno dando lugar a un complejo llamado cianurato de melamina (Figura 5) [11][15].

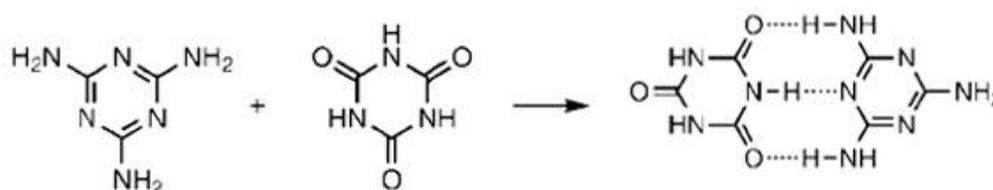


Figura 5. Interacción entre la melamina y el ácido cianúrico para formar cianurato de melamina

3.6. Antecedentes bibliográficos

La mayor parte de la bibliografía propone para la detección de melamina la cromatografía de líquidos o de gases acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS) y cromatografía de líquidos de alta resolución con detector UV (HPLC-UV) [23]–[26].

En el año 2015, A. Fashi, M. R. Yaftian, y A. Zamani determinaron melamina mediante HPLC con detector UV a 240 nm, utilizando como fase estacionaria una columna C18 y como fase móvil fosfato y metanol (95:5) con un flujo de 0,8 mL/min. Realizaron una extracción previa con electromembrana de microextracción (LPME) [27]. Posteriormente, en el año 2018, J. Maleki, F. Nazari, J. Yousefi, R. Khosrokhavar, y M. J. Hosseini determinaron melamina mediante HPLC con detector UV a 244 nm, utilizando como fase estacionaria una columna C18 y como fase móvil 1-octanosulfonato de sodio, ácido cítrico y acetonitrilo (80:20) con un flujo de 1 mL/min. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención fue de 5 minutos. Previamente extrajeron la melamina con tricloroanisol (1%) y acetonitrilo en proporción 3:1, realizando una agitación en el ultrasonidos durante 30 minutos y posteriormente centrifugaron la disolución durante 10 minutos a 10000 rpm. Por último, la filtraron con cartuchos de extracción en fase

sólida (SPE) [28]. En el año 2021 R. Abedini y col. determinaron melamina mediante HPLC con detector UV a 242 nm, utilizando como fase estacionaria una columna C18 y como fase móvil metanol con un flujo de 1 mL/min. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención fue de 16 minutos. Previamente realizaron una extracción de la melamina con ácido tricloroacético (1%) y acetonitrilo en proporción 3:1. Se agitó la disolución en el ultrasonidos durante 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos y por último filtraron la disolución con papel de filtro y con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) [29].

Estas técnicas presentan alta sensibilidad y especificidad aunque, en comparación con otras técnicas, necesitan de una preparación de las muestras, realización de calibrados y utilización de reactivos o gases inertes que faciliten el desplazamiento de los analitos sobre las columnas. En GC-MS hay que llevar a cabo una derivatización previa [17], lo que hace la determinación aún más laboriosa. Por último, los equipos con detector de masas son de mantenimiento y coste elevados.

Hay otros métodos rápidos y sensibles, pero menos precisos, como son: el ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), el inmunoensayo enzimático (EIA), electroquimioluminiscencia, sensores electroquímicos, electroforesis capilar, fluorescencia, análisis por infrarrojo, espectroscopía Raman, ensayos colorimétricos, ... [30]–[35]

La espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) se presenta como una técnica alternativa a la determinación de muchos compuestos [36]–[38], entre ellos la melamina [18]. Esta técnica se empezó a desarrollar hacia 1950 y a ser utilizada en el análisis químico en procesos industriales y en la investigación científica durante la década de los años 80. Su amplia utilización en el campo de la Química Analítica se establece en los últimos veinte años cuando los progresos en el campo de la informática han permitido utilizar métodos de cálculo avanzados para extraer mayor información de los barridos espectrales [39].

Hay numerosos artículos científicos sobre el análisis de melamina en leche en polvo mediante NIRS. En el año 2016, R. Yang, R. Liu, G. Dong, K. Xu, Y. Yang, and W. Zhang analizaron melamina en el intervalo de concentración 0,01-3 g/L [40]. En el año 2017, P. F. Scholl y col. la midieron en el rango de concentración 0-0,39 % [41]. En ese mismo año, R. Henn, C. G. Kirchler, M. E. Grossgut, and C. W. Huck la analizaron en el intervalo 0-5,5 % [42]. En el año 2020, D. F. Ting, L. P. Pui, and M. I. realizaron experimentos similares, pero en este caso en el

intervalo de concentración 10-100 % [19]. En el año 2021, W. Liang, Z. Zhu, B. Yang, X. Zhu, and W. Guo en el rango de 1 a 400 ppm [18]. En todos estos trabajos se obtuvieron buenos ajustes, demostrando así la viabilidad de la tecnología NIRS como método analítico para cuantificar este contaminante en la leche en polvo.

4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Objetivos:

- a) Determinación de melamina por diferentes técnicas analíticas: HPLC con detector UV-Visible, espectroscopía NIR y espectroscopía Raman.
- b) Comparar y discutir los resultados obtenidos al aplicar dichas técnicas analíticas.
- c) Proponer en su caso, el procedimiento más adecuado para la determinación de melamina en muestras de queso y leche en polvo.

Plan de trabajo:

- 1) Estudio para la determinación de melamina por HPLC/UV-Vis.
- 2) Estudio para la determinación de melamina por espectroscopía NIR.
- 3) Estudio para la determinación de melamina por espectroscopía Raman.
- 4) Estudio para la extracción de melamina en muestras lácteas contaminadas.
- 5) Determinación en muestras de productos lácteos: leche en polvo y queso.
- 6) Discusión de resultados.

5. TÉCNICAS UTILIZADAS

5.1. Espectroscopía de absorción molecular ultravioleta-visible

La espectroscopía ultravioleta-visible se basa en el proceso de absorción molecular de la radiación UV-Visible (190-850 nm) (Figura 6), el cual produce transiciones electrónicas. Con esta técnica se mide la cantidad de radiación transmitida al atravesar una disolución.

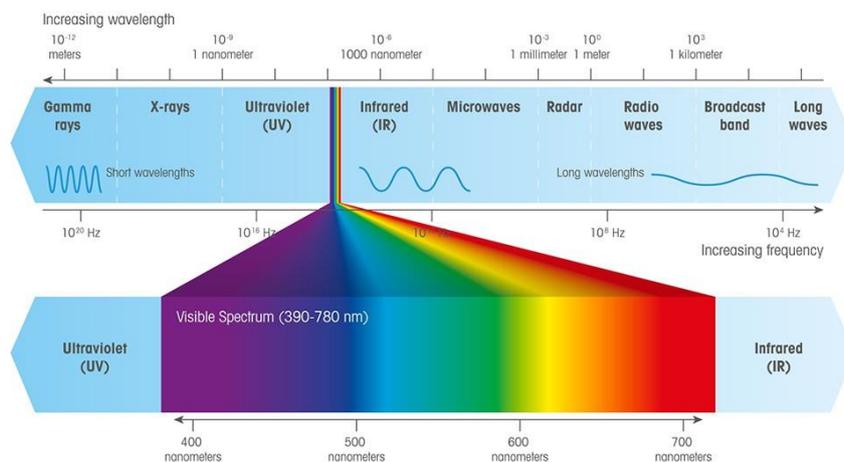


Figura 6. Espectro electromagnético

En este trabajo, la técnica se emplea para conocer la longitud de onda de máxima absorción de la melamina para utilizarla en su determinación por HPLC con detector UV-Visible. El espectro obtenido también se emplea para comprobar posibles interferencias de otros compuestos presentes en nuestro tipo de muestra.

5.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La técnica de HPLC se utiliza para llevar a cabo la separación de los componentes de una mezcla en función de la interacción entre los analitos al pasar por una columna (fase estacionaria) y la fase móvil portadora de la muestra, identificándolos a la salida mediante el detector apropiado (Figura 7).

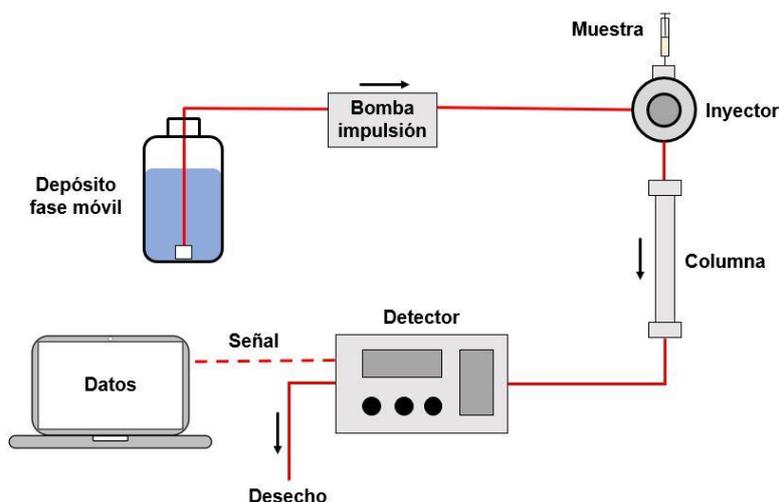


Figura 7. Esquema de un equipo de HPLC

En este trabajo, se inyectan patrones de diferentes concentraciones de melamina para posteriormente determinar esta sustancia en muestras de leche en polvo y queso.

5.3. Espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS)

El análisis de infrarrojo cercano se basa en el estudio de la interacción de la radiación electromagnética en la región del infrarrojo cercano (Figura 8) con la materia.

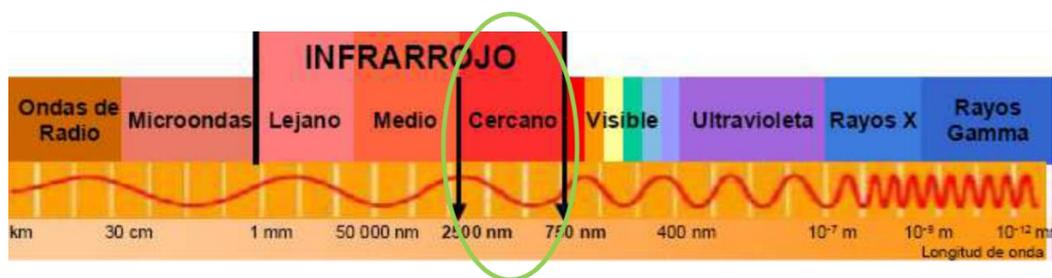


Figura 8. Espectro electromagnético, en verde aparece señalada la zona NIR

El NIR comprende una zona del espectro en la que los componentes de la muestra que va a ser estudiada presentan una baja absorción comparada con las demás regiones del IR. La radiación incidente produce la vibración de los enlaces covalentes en las uniones: C-H, O-H y N-H. Esto da lugar a que aparezca una banda en el espectro NIR, que no solo se debe a dichas uniones, sino también a las interacciones moleculares entre diferentes moléculas presentes en la muestra. La luz que incide sobre la muestra puede interactuar con ella por diversos mecanismos, empleándose las distintas formas de análisis: transmitancia, reflectancia, transreflectancia e

interactancia-reflectancia, según la presentación de la muestra: sólida, líquida o muestras líquidas semitransparentes o semisólidas (Figura 9) [43].

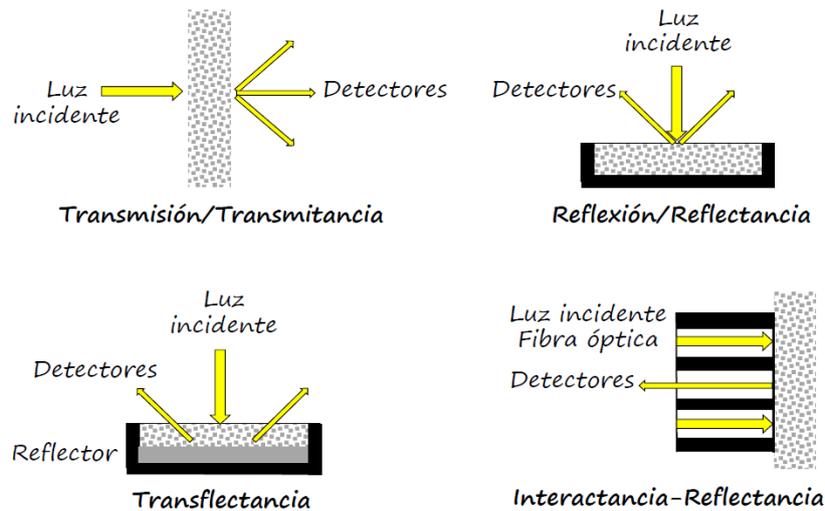


Figura 9. Mecanismos de interacción entre la luz y la muestra en NIRS

Las ventajas que presenta esta técnica son:

- Es precisa, rápida y de un bajo coste económico por medida.
- No es destructiva ni invasiva y tampoco necesita tratamiento previo de la muestra ni utilización de reactivos.
- Permite la determinación de varios componentes de la muestra simultáneamente (previa calibración por componente).

Como desventajas:

- Elevado coste del equipo.
- Para su puesta a punto es necesario el tratamiento quimiométrico de los datos obtenidos junto con diferentes pretratamientos espectrales mediante el empleo de programas estadísticos y métodos multivariantes.
- Es una técnica que se necesita de otras referentes para su calibración.

En este trabajo, esta técnica se utiliza para cuantificar melamina en diferentes muestras. El mecanismo que se ha utilizado es interactancia-reflectancia, en el cual se utiliza una sonda láser de fibra óptica, la cual hace incidir radiación sobre la muestra recogiendo la energía reflejada por la muestra.

5.4. Espectroscopía Raman

A través de la espectroscopía Raman se puede obtener información acerca de la estructura y características químicas tanto de compuestos inorgánicos como orgánicos. Esta técnica mide la radiación dispersada por un compuesto cuando se hace incidir sobre él una radiación de luz monocromática. Para llevar a cabo esta técnica la muestra no necesita un tratamiento previo, lo que supone una ventaja.

En este trabajo se utiliza esta técnica para diferenciar el espectro de las muestras lácteas en estado natural (producto comercial de queso y leche en polvo) de cuando estas han sido contaminadas con melamina.

6. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

6.1. Reactivos

- Melamina 99% Sigma-Aldrich
- Agua desionizada PURELAB Classic, Elga
- Ácido acético glacial $\geq 99,8\%$ Sigma-Aldrich
- Ácido acético para HPLC $\geq 99,8\%$ Sigma-Aldrich
- Leche en polvo para lactantes “Almirón”
- Queso de oveja añejo “Flor de Esgueva”

6.2. Materiales

- Vasos de precipitados
- Probetas
- Matraces aforados
- Pipetas
- Embudo cónico
- Aro con nuez
- Soporte metálico
- Filtro de papel
- Filtros de nylon de $0,45 \mu\text{m}$
- Tubos Falcon de 50 mL
- Espátula
- Varilla de vidrio
- Jeringa
- Cubeta de cuarzo

6.3. Equipos

- Desionizador PURELAB Classic
- Balanza Sartorius Entris 2241-1S (precisión de 0,0001 g)
- Balanza Precisa 40SM-20^a (precisión de 0,00001 g)
- Agitador vibrador oscilante Vibromatic P Selecta
- Espectrofotómetro UV-Visible Agilent 8453
- Equipo de HPLC con detector UV-Visible Agilent Technologies 1200 series
- Espectrómetro Raman BWS415 B&W Tek con haz de luz láser de excitación de 785 nm
- Espectrómetro NIR MPA (Multi Purpose Analyzer) Bruker Optics con haz de luz láser de He-Ne de 633 nm

7. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

7.1. Preparación de los patrones

Se prepara una disolución madre de 100 ppm de melamina en agua desionizada. Para ello se pesan 10 mg de la melamina comercial, se disuelve en un volumen de agua desionizada y se enrasa en un matraz aforado de 100 mL. A partir de esta y del modo conveniente, se preparan disoluciones patrón de 80, 65, 50, 25, 15, 10, 4, 2 y 1 ppm.

7.2. Muestras de leche en polvo y queso tratadas con melamina

Se preparan diferentes muestras de leche en polvo y queso con cantidades conocidas de melamina. Para ello se mezcla 1 g de leche en polvo o queso con diferentes cantidades de melamina comprendidas entre 0,001 g y 1 g. Las cantidades pesadas se detallan en la siguiente tabla, junto con la concentración de melamina en % (Tablas 1 y 2):



Figura 10. Muestras de leche en polvo contaminadas con melamina

Tabla 1. Cantidades de leche en polvo y melamina a mezclar para preparar las diferentes muestras contaminadas

m leche en polvo (g)	m melamina (g)	% melamina
1,0000	0,0011	0,11
1,0000	0,0020	0,20
1,0000	0,0032	0,32
1,0001	0,0041	0,41
1,0001	0,0051	0,51
1,0000	0,0061	0,61
1,0000	0,0070	0,70
1,0001	0,0080	0,79
1,0001	0,0090	0,89
1,0000	0,0100	0,99
1,0004	0,0153	1,51
1,0004	0,0201	1,97
1,0005	0,0251	2,45
1,0000	0,0303	2,94
1,0000	0,0350	3,38
1,0000	0,0403	3,87
1,0002	0,0452	4,32
1,0000	0,0500	4,76
1,0001	0,0550	5,21
1,0000	0,0600	5,66
1,0000	0,0700	6,54
1,0000	0,0750	6,98
1,0001	0,0800	7,41
1,0000	0,0901	8,27
1,0000	0,0950	8,68
1,0000	0,1002	9,11
1,0000	0,1050	9,50
1,0001	0,1102	9,93
1,0000	0,1151	10,32
1,0006	0,2004	16,68
1,0000	0,4004	28,59
1,0002	0,8006	44,46
1,0007	1,0001	49,98

Tabla 2. Cantidades de queso y melamina a mezclar para preparar las diferentes muestras contaminadas

m queso (g)	m melamina (g)	% melamina
1,1167	0,0160	1,41
1,0105	0,1003	9,03
1,0105	0,2007	16,57
1,0041	0,4003	28,51
1,0051	0,8009	44,35
1,0073	1,0005	49,83

Las muestras de leche en polvo y queso se almacenan a 4°C.

7.3. Espectroscopía de absorción molecular ultravioleta-visible

Para determinar la longitud de onda de máxima absorción de la melamina, se realizan barridos entre 190 y 850 nm de disoluciones patrón de melamina de diferente concentración. Se obtienen espectros de máxima longitud de onda a 204 nm (Figura 11).

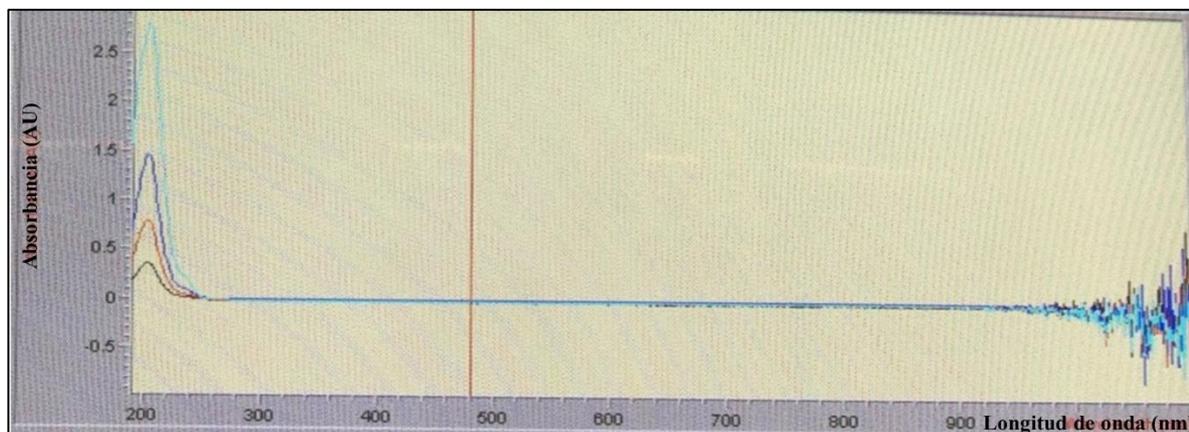


Figura 11. Espectros UV-Visible de las disoluciones patrón de melamina de 1, 2, 4 y 10 ppm

7.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Para determinar melamina por esta técnica, se utiliza un equipo de HPLC con detector UV-Visible (Figura 12).



Figura 12. Equipo de HPLC/UV-Visible utilizado en este trabajo

En base a las experiencias previas realizadas por espectroscopía de absorción molecular y a la bibliografía consultada, la longitud de onda elegida es la de la máxima absorción de la melamina, 204 nm.

Con respecto a la fase móvil, se estudiaron diversas mezclas, teniendo en cuenta las características de polaridad de la melamina. Se elige como fase móvil agua y ácido acético (1%) en proporción 90:10.

Como fase estacionaria se utiliza una columna cromatográfica de C18 (Kromaphase de dimensiones 150x4,6 mm y tamaño de partícula 5 μm).

En estas condiciones se obtiene un pico bien definido a unos 12 minutos (Figura 13).

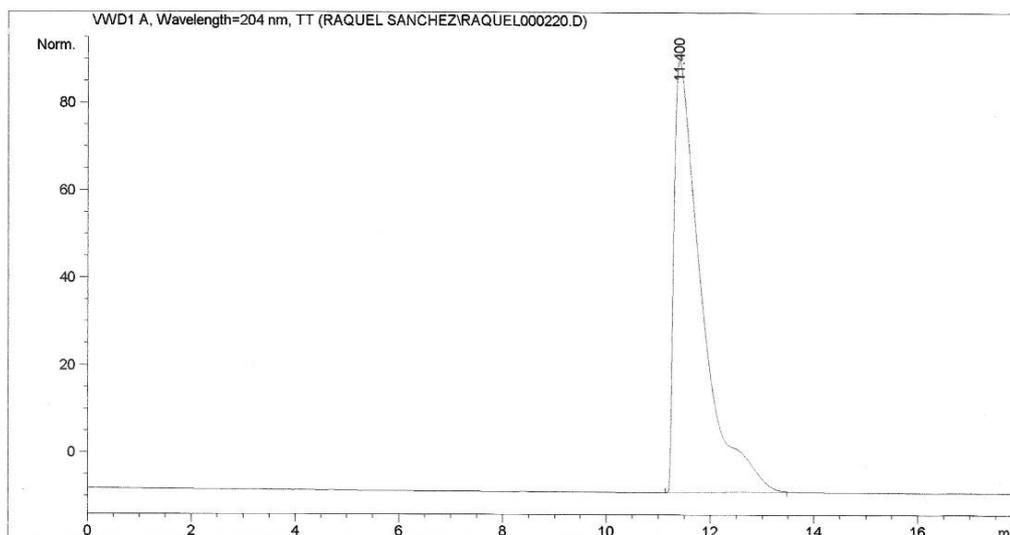


Figura 13. Cromatograma de la disolución patrón de 100 ppm de melamina

Las **condiciones** de trabajo se recogen en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3. Condiciones HPLC

Fase móvil	Agua y ácido acético (1%) en proporción 90:10
Fase estacionaria	Columna de C18
Longitud de onda	204 nm
Temperatura	20°C
Velocidad de flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	5 µL

Una vez establecidas las condiciones óptimas de medida, se realiza una **línea de calibrado** con diferentes disoluciones patrón de melamina en agua. Los cromatogramas aparecen recogidos en el anexo en el apartado de HPLC.

Tabla 4. Áreas de los picos y sus correspondientes tiempos de retención de las diferentes disoluciones patrón de melamina medidas por HPLC/UV-Visible

Concentración (ppm)	Área pico
100,00	3655,2
80,00	2958,6
65,00	2413,7
50,00	1838,1
25,00	1008,1
12,50	577,1
6,25	155,4
3,13	56,3

En la siguiente gráfica (Figura 14) se representa el área de pico frente a la concentración y de este modo se obtiene la línea de calibrado:

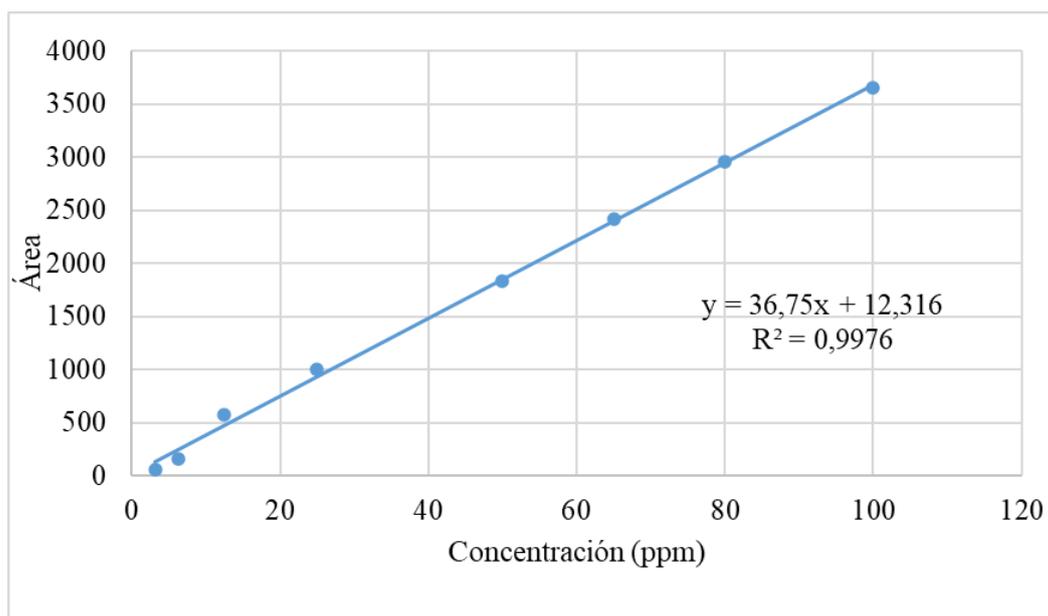


Figura 14. Línea de calibrado para HPLC con patrones de melamina

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) son 1,07 ppm y 3,26 ppm, respectivamente.

Determinación en muestras

Extracción

Se procede a extraer la melamina de las muestras tratadas con dicho compuesto siguiendo el siguiente procedimiento:

Se pesa una cantidad del orden de 0,1 g de cada una de las muestras tratadas con melamina, se introducen en un tubo Falcon y se añaden 10 mL de disolución de ácido acético al 2%. Se preparan también muestras de leche en polvo y queso sin tratar a fin de que sirvan de referencia. Se agita automáticamente durante 20 min (≈ 550 unidades/minuto) (Figura 15) y se deja decantar durante 10 minutos.



Figura 15. Agitador vibrador oscilante Vibromatic P Selecta

A continuación, se realiza un primer filtrado con papel para eliminar partículas en suspensión, posteriormente se realiza un segundo filtrado con filtro de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ hasta disolución transparente.

Determinación

Una vez extraída la melamina de las muestras, se procede a determinar su concentración por HPLC a fin de conocer la efectividad en el proceso de extracción. Los resultados se reflejan en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos recogidos de los análisis por HPLC de las extracciones de melamina en leche en polvo y queso

Muestra masa leche en polvo o queso (g) / masa melamina (g)	Área pico	% extracción
1,0000 g leche en polvo / 0,0100 g melamina	23879,0	126,64
1,0000 g leche en polvo / 0,1002 g melamina	42721,8	89,36
1,1167 g queso / 0,0160 g melamina	8692,3	36,90
1,0105 g queso / 0,1003 g melamina	17975,9	42,47
1,0105 g queso / 0,2007 g melamina	29478,8	38,45
1,0041 g queso / 0,4003 g melamina	57732,3	18,20
1,0073 g queso / 1,0005 g melamina	61177,5	10,13
Leche en polvo	-	-
Queso	-	-

Los resultados de la tabla anterior nos muestran que el % extraído en las muestras de queso es menor que en las de leche en polvo, lo que puede deberse a que al añadir la melamina a muestras de queso comercial, se dificulta la homogeneización por tratarse de un sólido bastante compacto, lo que no ocurre con la leche en polvo. También puede deberse a la baja solubilidad de la melamina en agua (3 g/L).

Al analizar las muestras de leche en polvo y queso sin contaminar el equipo no detecta presencia de melamina.

Los cromatogramas de las muestras aparecen recogidos en el anexo en el apartado de HPLC.

7.5. Espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS)

La determinación se lleva a cabo con un espectrómetro de infrarrojo cercano por Transformada de Fourier FT-NIR modelo MPA (Multi Purpose Analyzer) de Bruker Optics, que abarca desde 15.000 hasta 3.600 cm^{-1} (660-2780 nm) con una sonda de fibra óptica para medidas en reflexión (Figura 16).



Figura 16. Equipo NIRS utilizado en este trabajo

En primer lugar, se procede al desarrollo de la calibración de melamina analizando un total de 130 muestras de leche en polvo contaminadas con diferentes cantidades de melamina, a efectos de buscar la interrelación entre los espectros NIR y la concentración de melamina en las muestras.

Dada la dificultad de homogeneización en el proceso de adición de la melamina al queso, indicada anteriormente, los resultados obtenidos sobre este tipo de muestra fueron poco representativos, por lo que se decidió poner a punto el método solo para la leche en polvo.

Se miden las muestras de leche en polvo contaminadas (Tabla 1) en un rango espectral entre 4000 y 12500 cm^{-1} (Figura 17). Se realizan cuatro espectros por muestra, dos de ellos se toman a 16 barridos y otros dos a 32, y empleando dos resoluciones: 8 y 16 cm^{-1} . Cada muestra se mide por triplicado.



Figura 17. Sonda láser de fibra óptica del equipo NIRS

Una vez obtenidas las medidas espectrales de las muestras de leche en polvo contaminadas con melamina, se lleva a cabo el desarrollo del modelo de predicción para la determinación de melamina.

El modelo de predicción (calibración) se ha desarrollado mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR), utilizando el software quimiométrico OPUS/QUANT y empleando el método de validación cruzada, que consiste en que un grupo de muestras se saca del conjunto de calibración y se utiliza para validar el modelo desarrollado con el grupo de muestras restante. Este proceso se repite sucesivamente hasta que todas las muestras han sido analizadas.

En el proceso de calibración se obtiene el error de calibración (RMSEC) y el coeficiente de determinación R^2 . Para la obtención del modelo en validación cruzada se establece un subconjunto de validación excluyendo un 10% del conjunto de muestras de calibración. Para evaluar la precisión de los modelos desarrollados se emplea el error de predicción en validación cruzada (RMSECV), el coeficiente de determinación (R^2_{CV}) y la desviación residual de predicción (RPD), que evalúan la capacidad de predicción del modelo. Cuanto mayor sea el valor de R^2_{CV} y de RPD y menor el de RMSECV, mejor será el modelo.

Con el fin de optimizar el proceso de calibración se realizan los siguientes procesos:

1. Detección y eliminación de valores atípicos (outliers)

Las estadísticas derivadas de los conjuntos de datos que incluyen valores atípicos son frecuentemente engañosas. Un outlier es una observación que es numéricamente distante del resto de los datos. Para su detección se emplean la distancia de Mahalanobis, que indica cómo de diferente es el espectro de la muestra del espectro promedio de la población, y el residuo espectral, que es la diferencia entre el espectro medido y el que se espera teóricamente a partir del análisis de los factores del modelo de calibración.

2. Aplicación de pre-procesamientos matemáticos

Debido a que normalmente la señal de absorción es débil, es necesario procesar matemáticamente los datos espectrales para extraer información valiosa acerca de las propiedades químicas de las muestras.

Para comprobar la robustez de los modelos de calibración desarrollados y determinar la capacidad real de predicción de dichos modelos, se realiza un proceso de validación externa, que consiste en aplicar el modelo a un conjunto de muestras que no pertenecen al grupo de calibración y cuyo rango de concentración está dentro de la aplicabilidad del modelo de calibración obtenido. De este proceso se obtiene el error estándar de predicción (RMSEP) y la desviación residual de predicción (RPD).

El primer estudio que se lleva a cabo es para determinar el número de barridos y la resolución que se vayan a utilizar para realizar el modelo de calibración. Para ello, se lleva a cabo la medida espectral de 93 muestras empleándose 16 y 32 barridos a dos resoluciones de 8 y 16 cm^{-1} (Tabla 6). Las medidas se hacen por triplicado, por lo que también se evalúa la influencia en el modelo empleándose los 3 espectros individuales y el espectro promedio.

Tabla 6. Resultados obtenidos en la calibración y validación cruzada de melamina

Parámetro	Resol.	Nº de barridos	Modelo	CALIBRACIÓN						VALIDACIÓN CRUZADA		
				Nº de muestras	Rango de frecuencias	Pre-procesamiento	Factores PLS	R ²	RMSEC	R ² _{cv}	RMSECV	RPD
Melamina (%)	8	16	3 espectros	93	7502,4-4246,9	Eliminación de desnivel constante	9	99,41	0,230	98,32	0,365	7,77
	8	16	promedio	31	9400,2-6098,3 y 5450,3-4246,9	Sustracción de línea recta	7	99,68	0,184	98,28	0,369	7,66
	8	32	3 espectros	93	9400,2-6098,3 y 5450,3-4246,9	Normalización de min-max	8	99,32	0,243	98,35	0,361	7,79
	8	32	promedio	31	9400,2-6098,3 y 5450,3-4246,9	Primera derivada + normalización vectorial (SNV)	5	99,60	0,198	98,65	0,327	8,74
	16	16	3 espectros	93	7506,2-6094,5 y 5454,2-4597,9	Primera derivada + sustracción de línea recta	10	99,55	0,201	97,85	0,413	6,82
	16	16	promedio	31	6804,2-6094,5 y 5454,2-4597,9	Primera derivada + sustracción de línea recta	10	99,80	0,156	98,75	0,315	8,99
	16	32	3 espectros	93	9404-7498,5 y 5454,2-4243	Corrección de dispersión multiplicativa	5	98,95	0,297	98,28	0,369	7,62
	16	32	promedio	31	6102,2-4597,9	Eliminación de desnivel constante	8	99,49	0,239	98,42	0,354	7,98

Como se puede observar en la Tabla 6 (marcado en negrita), al realizar el promedio de los espectros de la combinación de 16 barridos con resolución de 16 cm^{-1} , se obtienen los mejores resultados, presentando el más alto valor del coeficiente de determinación con el menor error de predicción.

Una vez determinada la metodología para el análisis espectral, se procedió a analizar el resto del conjunto de muestras de calibración. En la siguiente imagen (Figura 18) aparecen recogidos los espectros de todas las muestras analizadas. Se puede observar que todas las muestras presentan espectros similares y que tienen picos en común con el espectro de la melamina (color azul), y cuanto mayor es la concentración de melamina en la muestra, mayor intensidad presentan los picos en determinados intervalos del espectro de infrarrojo.

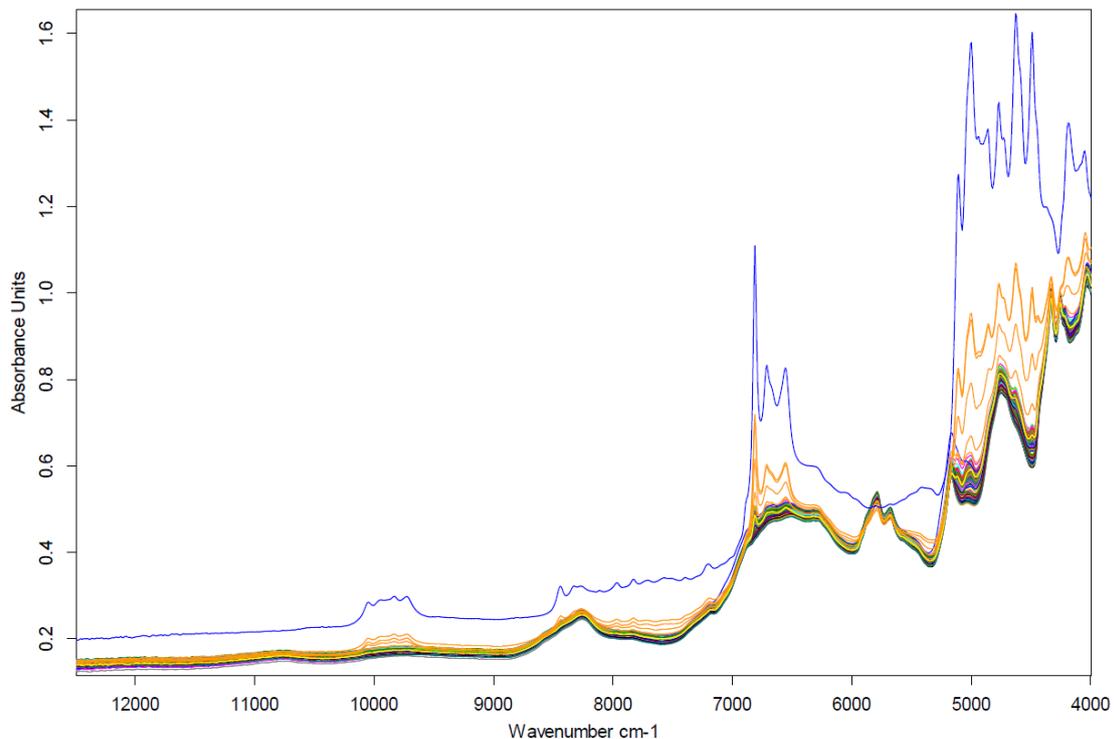


Figura 18. Espectros NIR de las muestras de leche en polvo contaminadas con melamina

Como el rango de concentración es muy amplio (0-50%), las calibraciones y validaciones se realizan en diferentes intervalos respecto a la concentración de melamina: 0-1%, 0-10% y 0-50%. Los datos se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados obtenidos en la calibración y validación cruzada de melamina

Parámetro	Rango concent.	Resol.	Nº de barridos	Modelo	CALIBRACIÓN						VALIDACIÓN CRUZADA		
					Nº de muestras	Rango de frecuencias	Pre-procesamiento	Factores PLS	R ²	RMSEC	R ² _{cv}	RMSECV	RPD
Melamina (%)	0-50%	16	16	promedio	128	9404-7498,5 y 5778,2-5446,5	Normalización vectorial SNV	7	99,61	0,435	99,40	0,519	12,90
	0-10%	16	16	promedio	123	9404-5446,5	Corrección de dispersión multiplicativa	8	98,81	0,364	98,30	0,419	7,66
	0-1%	16	16	promedio	44	9404-5446,5	Corrección de dispersión multiplicativa	10	93,52	0,081	76,05	0,135	2,05

En las siguientes imágenes (Figuras 19-21) se representan los valores predichos por el equipo frente a los valores reales, una vez eliminados los outliers. Se observan 2 líneas: una de color verde que representa la recta de calibración ideal ($R^2=1$) y otra de color azul que es la obtenida en el modelo de predicción construido para cada rango del parámetro.

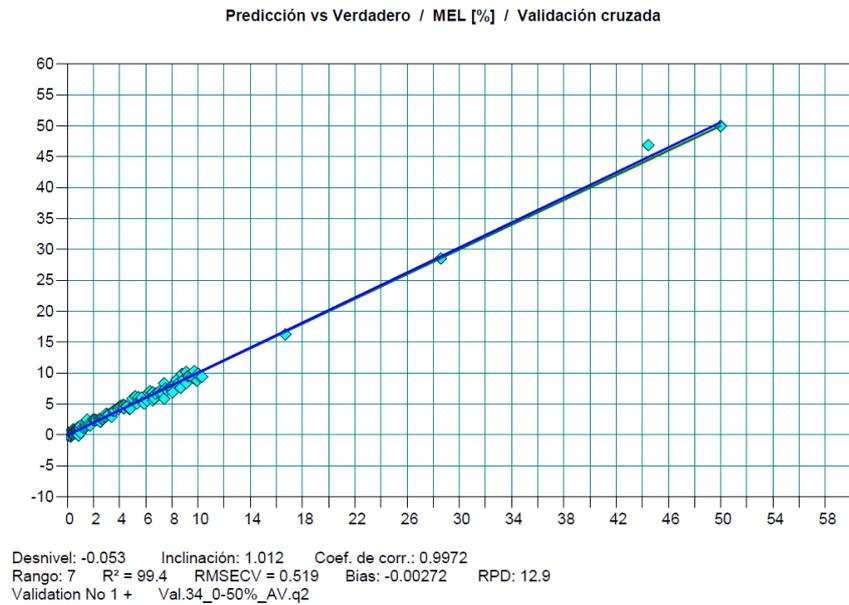


Figura 19. Gráfico de predicción NIR en el intervalo de concentración 0-50%

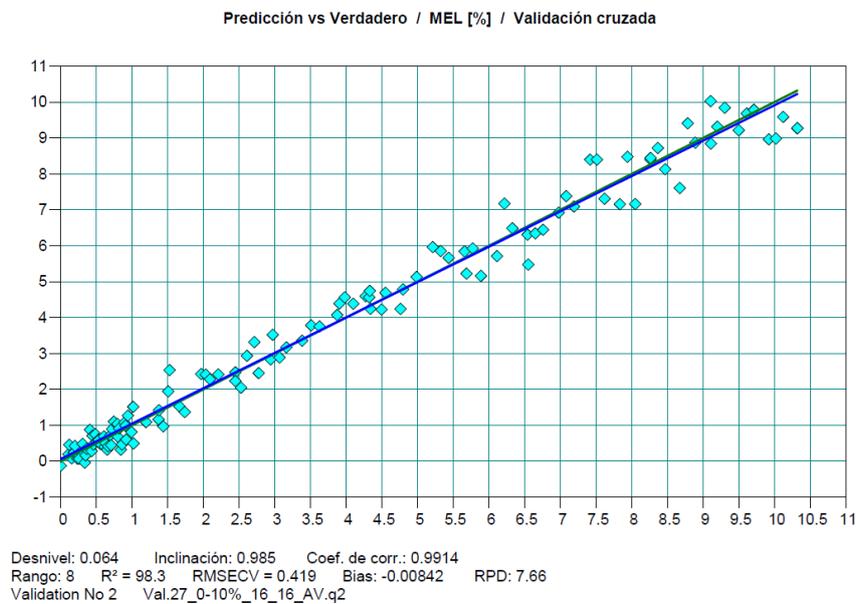


Figura 20. Gráfico de predicción NIR en el intervalo de concentración 0-10%

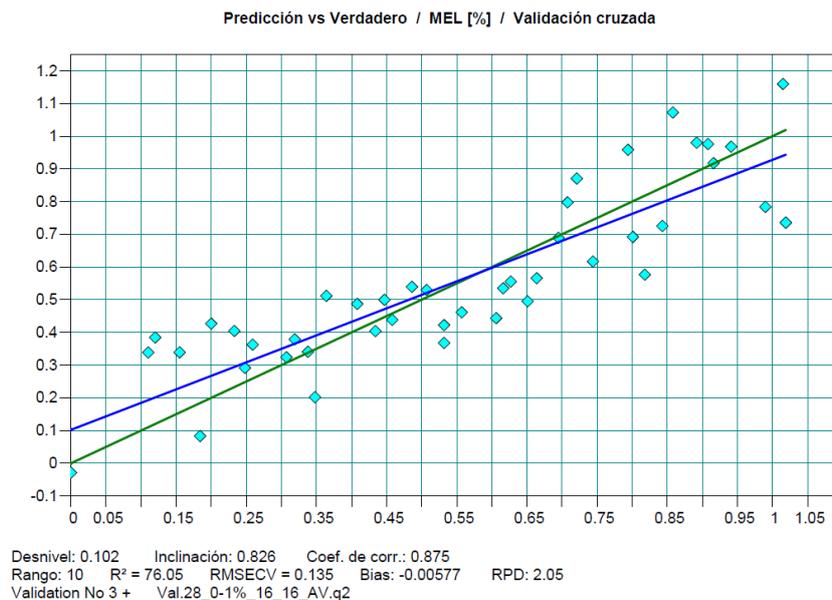


Figura 21. Gráfico de predicción NIR en el intervalo de concentración 0-1%

En los tres rangos se obtienen coeficientes de determinación altos y errores de predicción bajos respecto al intervalo de melamina en el que está construido cada modelo. Se observa que a medida que disminuye la concentración de melamina en la muestra, hay más diferencia entre los valores reales y los predichos. Por lo general, cuando se trabaja en rangos más estrechos del parámetro y con valores más cercanos a cero, se suelen obtener peores predicciones en los valores más bajos de concentración, elevando su dispersión y empeorando el ajuste. Para mejorarlo y lograr una mayor precisión y exactitud en las predicciones, habría que reforzar con más muestras el intervalo de concentraciones 0-1%. De la misma manera, también podría reforzarse el intervalo de concentraciones altas (10-50%) para aumentar la aplicabilidad del modelo y dar respuesta a un conjunto mayor de muestras.

De los modelos construidos, el que obtiene mejores ajustes y menores errores de predicción es el que cubre el intervalo de concentraciones 0-10%. Finalmente, este modelo se somete a un proceso de validación externa. Para su desarrollo, el conjunto total de muestras del intervalo de concentración 0-10% (123 muestras) se divide en dos grupos: conjunto de calibración (98 muestras) y conjunto de validación (25 muestras), este último representa el 20% del total de las muestras.

Para poder llevar a cabo la validación externa es preciso construir un nuevo modelo en el mismo rango del parámetro (0-10%), excluyendo las muestras que luego se van a emplear en su

validación externa. En la figura 22 se representa la gráfica de predicción NIR del nuevo modelo que va a ser posteriormente validado. Se puede observar que los valores de R^2 y RMSECV son muy similares al anterior.

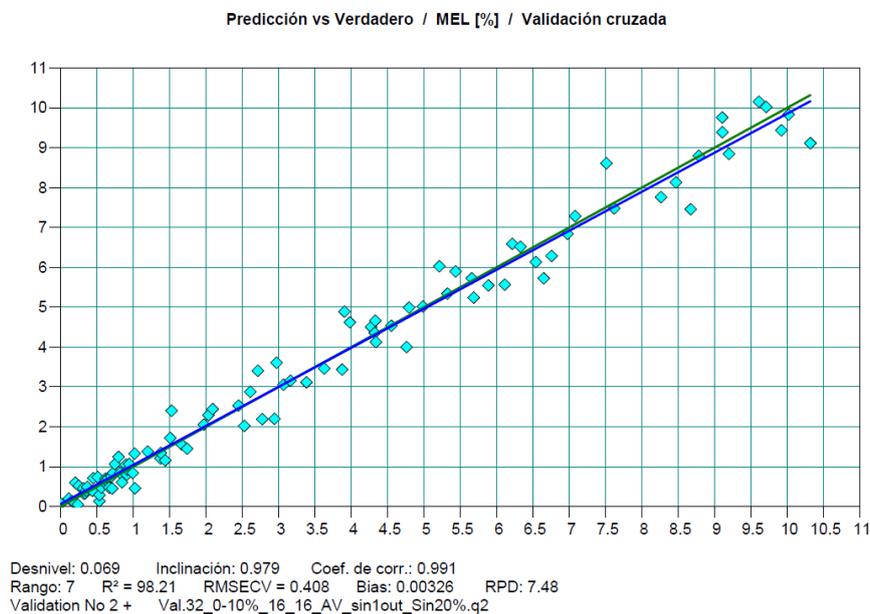


Figura 22. Gráfico de predicción NIR en el intervalo de concentración 0-10% para la validación externa

Los resultados de la validación externa se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Validación externa

VALIDACIÓN EXTERNA		
Nº de muestras	RMSEP	RPD
25	0,574	6,06

El error de predicción en validación externa (RMSEP) alcanza unos valores algo superiores a los obtenidos en calibración de 0,41%, no obstante, la capacidad predictiva (RPD) sigue siendo muy buena, con valores por encima de 3 que sugieren la aplicación del modelo a efectos de cuantificación del parámetro. Varios autores consideran que un modelo es adecuado desde el punto de vista analítico cuando la capacidad predictiva RPD es superior a 3 [44] [45].

En la siguiente tabla (Tabla 9) se recogen los valores reales y predichos por el modelo para el conjunto de validación. Se observa que el 80% de las muestras de validación presenta diferencias con respecto a su valor real inferiores a 0,5%.

Tabla 9. Valores reales y predichos por el modelo de calibración para el conjunto de validación

Valor real (%)	Valor predicho (%)	Diferencia (%)
0,11	0,23	0,12
0,26	0,32	0,06
0,41	0,63	0,22
0,46	0,22	0,24
0,49	0,92	0,43
0,79	0,34	0,45
0,86	0,50	0,36
2,21	2,21	0,00
2,45	2,19	0,26
3,51	3,68	0,17
4,10	4,14	0,04
4,50	4,04	0,46
5,77	5,26	0,51
6,55	5,31	1,24
7,19	7,24	0,05
7,41	8,82	1,41
7,84	6,94	0,90
7,94	8,38	0,44
8,05	7,45	0,60
8,26	8,68	0,42
8,37	7,99	0,38
8,89	9,05	0,16
9,31	10,61	1,30
9,50	9,81	0,31
10,12	10,25	0,13

7.6. Espectroscopía Raman

El equipo a utilizar es un espectrómetro Raman con un láser de excitación de 785 nm (Figura 23).



Figura 23. Equipo de espectrometría Raman utilizado en este trabajo

Se realiza el espectro sobre una muestra patrón de melamina (sólida). Se observan varios picos de gran intensidad sobre 400, 600, 680 y 980 cm^{-1} (Figura 24), debidos a vibraciones del anillo de triazina [46]. El pico más intenso es el de aproximadamente 680 cm^{-1} .

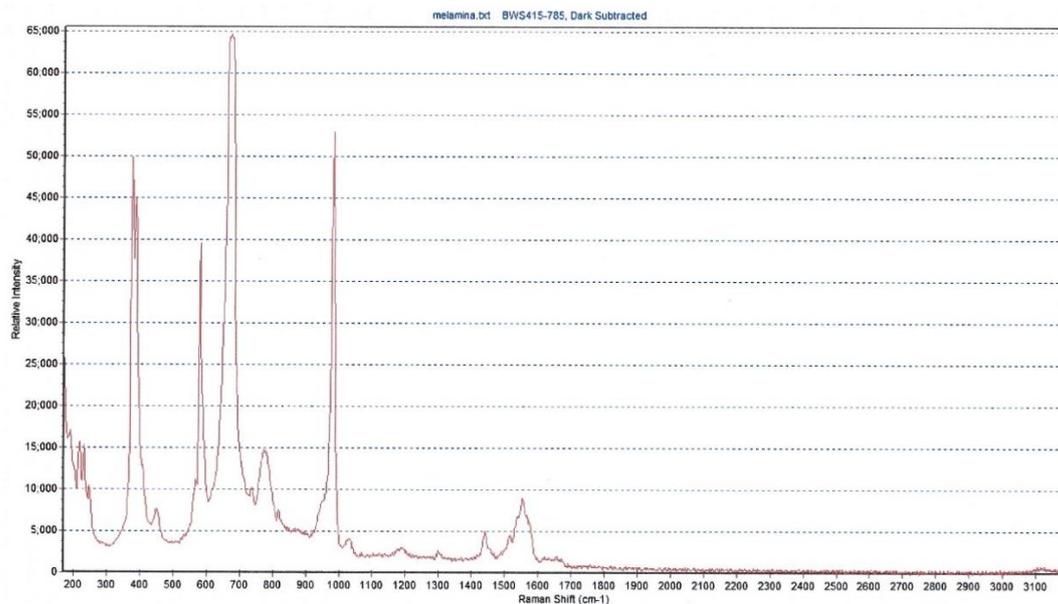


Figura 24. Espectro Raman del patrón de melamina

A continuación, se realizan los espectros de varias muestras de leche en polvo y queso contaminadas con distintas cantidades de melamina y sin contaminar (Figuras 25-30).

Se observa que las muestras contaminadas con melamina presentan los mismos picos que aparecían en el espectro del patrón de melamina sólida y a mayor concentración de melamina en la muestra, mayor intensidad de dichos picos, siendo el más intenso el que aparece en torno a 680 cm^{-1} , el cual puede utilizarse para la identificación de melamina ya que no presenta interferencias. Estos picos no se observan en los espectros de la leche en polvo y el queso sin contaminar (Figuras 26-30).

En la leche en polvo los picos de melamina empiezan a diferenciarse del ruido de fondo cuando se han adicionado 0,2004 g de melamina a 1,0006 g de muestra. Sin embargo, para el queso dichos picos empiezan a distinguirse en la adición de 0,4003 g de melamina a 1,0041 g de muestra.

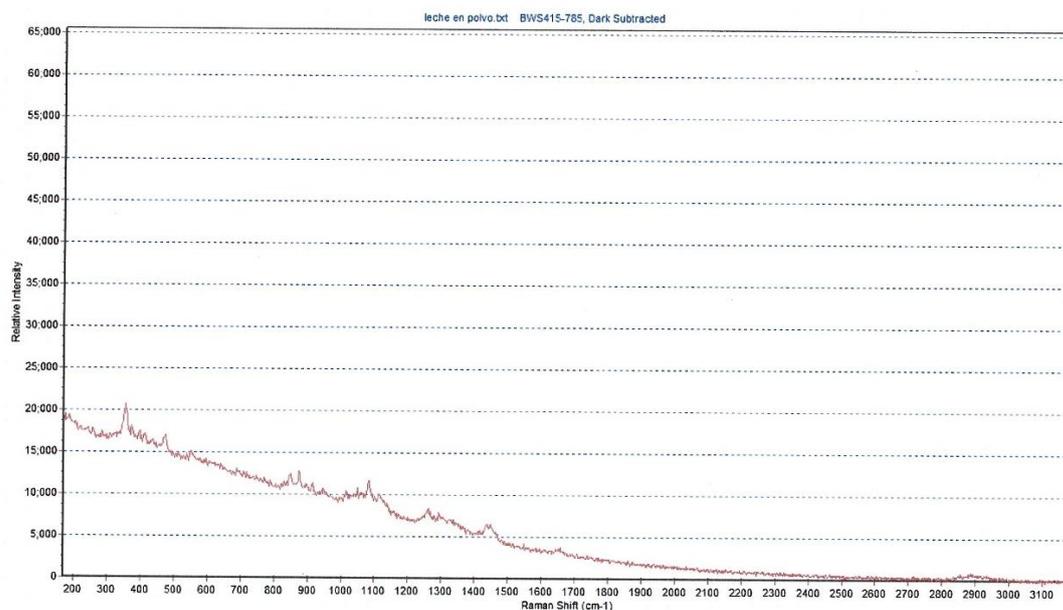


Figura 25. Espectro Raman de la leche el polvo

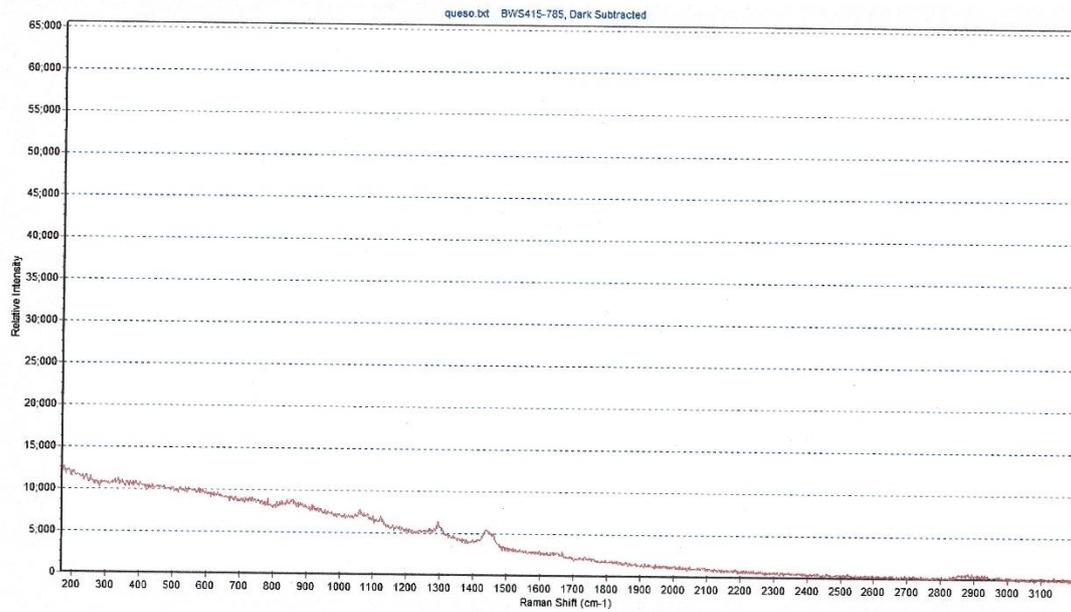


Figura 26. Espectro Raman del queso

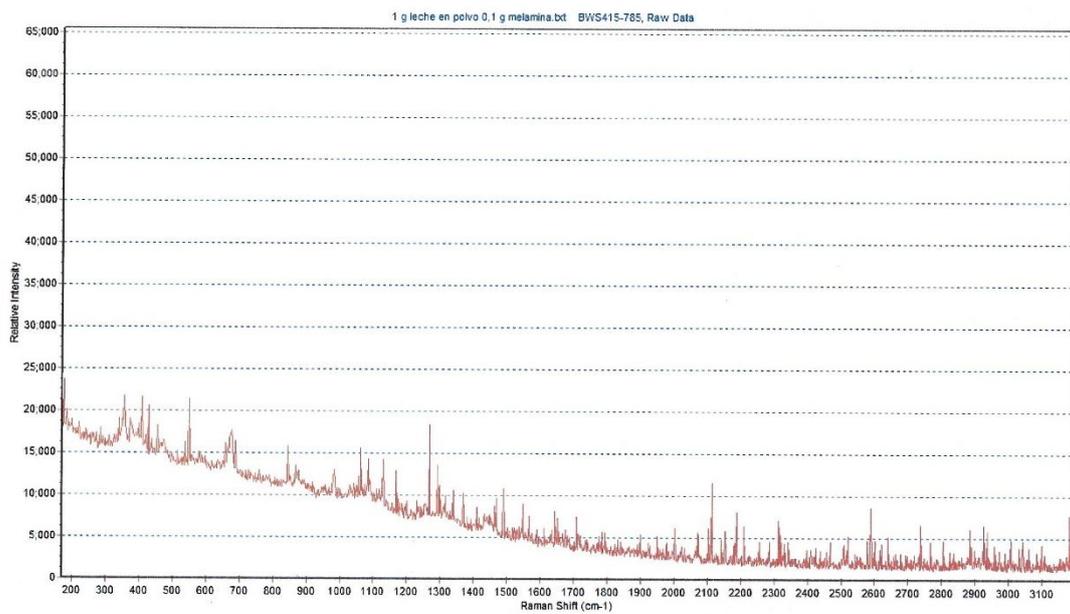


Figura 27. Espectro Raman de la adición de 0,1002 g de melamina a 1,0000 g de leche en polvo

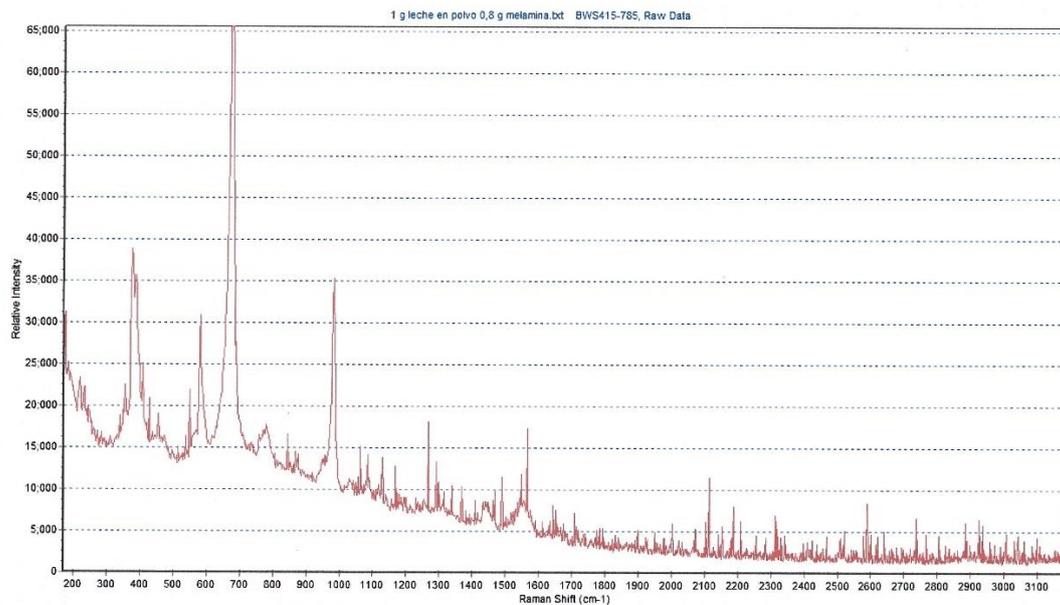


Figura 28. Espectro Raman de la adición de 0,8006 g de melamina a 1,0002 g de leche en polvo

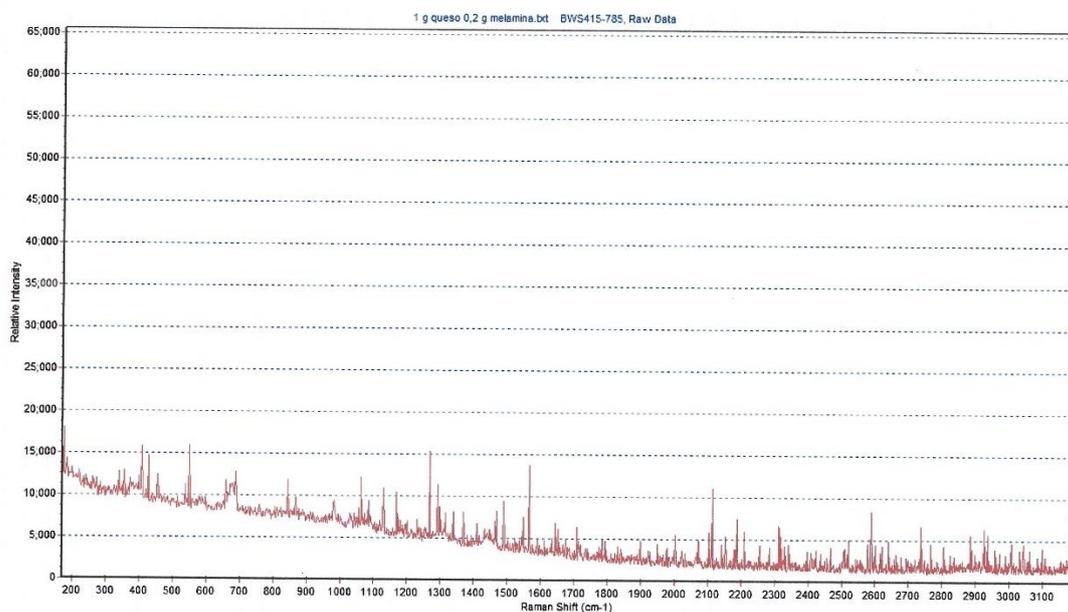


Figura 29. Espectro Raman de la adición de 0,2007 g de melamina a 1,0105 g de queso

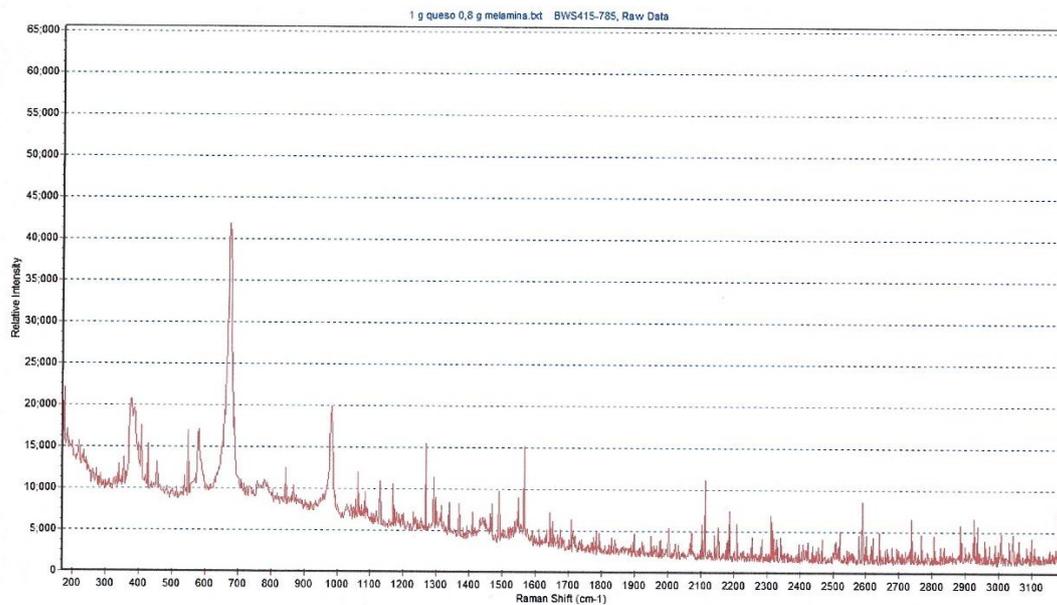


Figura 30. Espectro Raman de la adición de 0,8009 g de melamina a 1,0051 g de queso

El resto de los espectros aparecen recogidos en el anexo en el aparato de espectroscopía Raman.

8. CONCLUSIONES

- 1) Se ha puesto a punto un método para la determinación de melamina en muestras de leche en polvo y queso mediante HPLC/UV-Visible utilizando como fase móvil agua y ácido acético (1%) en proporción 90:10 y como fase estacionaria una columna de C18. Se obtiene un pico bien definido e identificable a un tiempo de retención de unos 12 minutos. El límite de detección es 1,07 ppm y el de cuantificación 3,26 ppm.
- 2) Se ha llevado a cabo una calibración mediante tecnología NIRS para la determinación de melamina en muestras de leche en polvo. Para ello, se han estudiado 123 muestras marcadas con dicho producto en un intervalo de concentración entre 0-10% sobre el total del producto lácteo, obteniéndose un coeficiente de determinación de 98,81% y un error de calibración de 0,364%. En cuanto al proceso de validación, se obtiene un coeficiente de determinación de 98,30% y un error de predicción de 0,419%.
- 3) Se ha identificado melamina en muestras leche en polvo y queso mediante espectroscopía Raman. Fundamentando las determinaciones principalmente en un pico identificativo muy intenso sobre 680 cm^{-1} . Los porcentajes mínimos de melamina en la muestra detectados son 16,68% para la leche en polvo y 28,51% para el queso.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. Manning and J. M. Soon, “Food Safety, Food Fraud, and Food Defense: A Fast Evolving Literature,” *J. Food Sci.*, vol. 81, no. 4, pp. R823–R834, Apr. 2016, doi: 10.1111/1750-3841.13256.
- [2] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, *Alimentos sanos y seguros*.
- [3] “adulterar | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE.” <https://dle.rae.es/adulterar> (accessed Jun. 15, 2022).
- [4] S. Pradana-López, A. M. Pérez-Calabuig, J. C. Cancilla, L. Otero, and J. S. Torrecilla, “Single-digit ppm quantification of melamine in powdered milk driven by computer vision,” *Food Control*, vol. 131, p. 108424, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.FOODCONT.2021.108424.
- [5] J. C. Moore, J. Spink, and M. Lipp, “Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010,” *J. Food Sci.*, vol. 77, no. 4, Apr. 2012, doi: 10.1111/J.1750-3841.2012.02657.X.
- [6] G. Qiao, T. Guo, and K. K. Klein, “Melamine in Chinese milk products and consumer confidence,” *Appetite*, vol. 55, no. 2, pp. 190–195, Oct. 2010, doi: 10.1016/J.APPET.2010.05.047.
- [7] C. Xiu and K. K. Klein, “Melamine in milk products in China: Examining the factors that led to deliberate use of the contaminant,” *Food Policy*, vol. 35, no. 5, pp. 463–470, Oct. 2010, doi: 10.1016/J.FOODPOL.2010.05.001.
- [8] Y. A. Zolotov, “The mystery of the melamine story,” *J. Anal. Chem. 2010 6510*, vol. 65, no. 10, pp. 987–987, Oct. 2010, doi: 10.1134/S1061934810100011.
- [9] “Producción y productos lácteos: Portal lácteo.” <https://www.fao.org/dairy-production-products/es/> (accessed Jun. 15, 2022).
- [10] C. F. Nascimento, P. M. Santos, E. R. Pereira-Filho, and F. R. P. Rocha, “Recent advances on determination of milk adulterants,” *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1232–1244, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2016.11.034.
- [11] H. Montgomery, S. A. Haughey, and C. T. Elliott, “Recent food safety and fraud issues within the dairy supply chain (2015–2019),” *Glob. Food Sec.*, vol. 26, p. 100447, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.GFS.2020.100447.
- [12] T. Azad and S. Ahmed, “Common milk adulteration and their detection techniques,” *Int. J. Food Contam.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2016, doi: 10.1186/S40550-016-0045-

3/TABLES/3.

- [13] A. Escobar, R. Faure, D. Sosa, P. Ponce, and S. Vega, “Melamina. Un problema potencial para la salud animal y humana como adulterante en los alimentos con énfasis en la leche,” *Rev. Salud Anim.*, vol. 32, no. 1, Mar. 2010, Accessed: May 31, 2022. [Online]. Available: <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/128>
- [14] K. Sharma and M. Paradakar, “The melamine adulteration scandal,” *Food Secur.*, vol. 2, no. 1, pp. 97–107, 2010, doi: 10.1007/S12571-009-0048-5.
- [15] V. De Lourdes Mendes Finete, M. M. Gouvêa, F. F. De Carvalho Marques, and A. D. P. Netto, “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.*, vol. 141, no. 4, pp. 3649–3655, 2013, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2013.06.046.
- [16] A. K. C. Hau, T. H. Kwan, and P. K. T. Li, “Melamine toxicity and the kidney,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 2, pp. 245–250, Feb. 2009, doi: 10.1681/ASN.2008101065.
- [17] G. Venkatasami and J. R. Sowa, “A rapid, acetonitrile-free, HPLC method for determination of melamine in infant formula,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 665, no. 2, pp. 227–230, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.ACA.2010.03.037.
- [18] W. Liang, Z. Zhu, B. Yang, X. Zhu, and W. Guo, “Detecting melamine-adulterated raw milk by using near-infrared transmission spectroscopy,” *J. Food Process Eng.*, vol. 44, no. 6, p. e13685, Jun. 2021, doi: 10.1111/JFPE.13685.
- [19] D. F. Ting, L. P. Pui, and M. I. Solihin, “Feasibility of fraud detection in milk powder using a handheld near-infrared spectroscopy,” *AIP Conf. Proc.*, vol. 2306, no. 1, p. 020017, Dec. 2020, doi: 10.1063/5.0032678.
- [20] X. Fu *et al.*, “Detection of melamine in milk powders based on NIR hyperspectral imaging and spectral similarity analyses,” *J. Food Eng.*, vol. 124, pp. 97–104, Mar. 2014, doi: 10.1016/J.JFOODENG.2013.09.023.
- [21] H. Canada and C. Ottawa, “Food and Agriculture Organization of the United Nations Toxicological and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid Report of a WHO Expert Meeting In collaboration with FAO Supported by Health Canada,” 2008.
- [22] D. R. Kimbrough and A. C. Jensen, “Using the Melamine Contamination of Foods To Enhance the Chemistry Classroom,” *J. Chem. Educ.*, vol. 87, no. 5, pp. 496–499, 2010, doi: 10.1021/ED800174H.
- [23] J. V. Sancho, M. Ibáñez, S. Grimalt, Ó. J. Pozo, and F. Hernández, “Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair

- liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 2, no. 530, pp. 237–243, Feb. 2005, doi: 10.1016/J.ACA.2004.09.038.
- [24] M. S. Filigenzi, E. R. Tor, R. H. Poppenga, L. A. Aston, and B. Puschner, “The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 21, no. 24, pp. 4027–4032, 2007, doi: 10.1002/RCM.3289.
- [25] T. Dinc *et al.*, “Determination of melamine residue in plant origin protein powders using high performance liquid chromatography diode array detection and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry,” *Chinese J. Chromatogr. (Se Pu)*, vol. 26, no. 1, pp. 6–9, Jan. 2008.
- [26] Q. Cai, Y. Ouyang, Z. Qian, and Y. Peng, “Determination of melamine residue in feeds by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry,” *Chinese J. Chromatogr. (Se Pu)*, vol. 26, no. 3, pp. 339–342, May 2008.
- [27] A. Fashi, M. R. Yaftian, and A. Zamani, “Determination of melamine in dairy products using electromembrane–LPME followed by HPLC,” *Food Chem.*, vol. 188, pp. 92–98, Dec. 2015, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.04.132.
- [28] J. Maleki, F. Nazari, J. Yousefi, R. Khosrokhavar, and M. J. Hosseini, “Determinations of Melamine Residue in Infant Formula Brands Available in Iran Market Using by HPLC Method,” *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, vol. 17, no. 2, p. 563, Mar. 2018, Accessed: Jun. 18, 2022. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC5985174/
- [29] R. Abedini *et al.*, “Determination of melamine contamination in chocolates containing powdered milk by high-performance liquid chromatography (HPLC),” *J. Environ. Heal. Sci. Eng. 2021 191*, vol. 19, no. 1, pp. 165–171, Jan. 2021, doi: 10.1007/S40201-020-00590-W.
- [30] M. C. Barreto, R. G. Braga, S. G. Lemos, and W. D. Fragoso, “Determination of melamine in milk by fluorescence spectroscopy and second-order calibration,” *Food Chem.*, vol. 364, p. 130407, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.130407.
- [31] W. Y. Mu, P. Z. Huang, Q. Y. Chen, and W. Wang, “Determination of melamine and melamine-Cu(II) complexes in milk using a DNA-Ag hydrocolloid as the sensor,” *Food Chem.*, vol. 311, May 2020, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.125889.
- [32] P. Lutter *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*, vol. 22, no. 6, pp. 903–913, Jun. 2011, doi: 10.1016/J.FOODCONT.2010.11.022.

- [33] C. Yu *et al.*, “A sensitive molecularly imprinted electrochemical aptasensor for highly specific determination of melamine,” *Food Chem.*, vol. 363, p. 130202, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.130202.
- [34] S. Ostovar pour, R. Afshari, J. Landry, C. Pillidge, H. Gill, and E. Blanch, “Spatially offset Raman spectroscopy: A convenient and rapid tool to distinguish cheese made with milks from different animal species,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 52, no. 10, pp. 1705–1711, Oct. 2021, doi: 10.1002/JRS.6179.
- [35] Z. Y. Zhang, “Rapid Discrimination of Cheese Products Based on Probabilistic Neural Network and Raman Spectroscopy,” *J. Spectrosc.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/8896535.
- [36] O. Y. Rodionova, J. A. Fernández Pierna, V. Baeten, and A. L. Pomerantsev, “Chemometric non-targeted analysis for detection of soybean meal adulteration by near infrared spectroscopy,” *Food Control*, vol. 119, p. 107459, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.FOODCONT.2020.107459.
- [37] H. Nobari Moghaddam, Z. Tamiji, M. Akbari Lakeh, M. R. Khoshayand, and M. Haji Mahmoodi, “Multivariate analysis of food fraud: A review of NIR based instruments in tandem with chemometrics,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 107, p. 104343, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.JFCA.2021.104343.
- [38] B. G. Osborne, “Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis,” *Encycl. Anal. Chem.*, Oct. 2000, doi: 10.1002/9780470027318.A1018.
- [39] M. Ferrari and V. Quaresima, “A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application,” *Neuroimage*, vol. 63, no. 2, pp. 921–935, Nov. 2012, doi: 10.1016/J.NEUROIMAGE.2012.03.049.
- [40] R. Yang, R. Liu, G. Dong, K. Xu, Y. Yang, and W. Zhang, “Two-dimensional heterospectral mid-infrared and near-infrared correlation spectroscopy for discrimination adulterated milk,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 157, pp. 50–54, Mar. 2016, doi: 10.1016/J.SAA.2015.12.017.
- [41] P. F. Scholl *et al.*, “Effects of the Adulteration Technique on the Near-Infrared Detection of Melamine in Milk Powder,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 28, pp. 5799–5809, Jul. 2017, doi: 10.1021/ACS.JAFC.7B02083/SUPPL_FILE/JF7B02083_SI_001.PDF.
- [42] R. Henn, C. G. Kirchler, M. E. Grossgut, and C. W. Huck, “Comparison of sensitivity to artificial spectral errors and multivariate LOD in NIR spectroscopy - Determining the performance of miniaturizations on melamine in milk powder,” *Talanta*, vol. 166, pp. 109–118, May 2017, doi: 10.1016/J.TALANTA.2017.01.035.

- [43] M. I. Campos Labadie, “Aplicación de la tecnología NIRS para la determinación de sodio y parámetros implicados en el proceso industrial del jamón curado,” Universidad de Valladolid, 2015. doi: 10.35376/10324/17713.
- [44] G. Sinnaeve, P. Dardenne, R. Agneessens, and R. Biston, “The Use of near Infrared Spectroscopy for the Analysis of Fresh Grass Silage:,” <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.34>, vol. 2, no. 2, pp. 79–84, Feb. 2017, doi: 10.1255/JNIRS.34.
- [45] J. P. Conzen, *Multivariate calibration a practical guide for developing methods in the quantitative analytical chemistry*. Ettlingen, Germany: BrukerOptik GmbH, 2006.
- [46] X. F. Zhang, M. Q. Zou, X. H. Qi, F. Liu, X. H. Zhu, and B. H. Zhao, “Detection of melamine in liquid milk using surface-enhanced Raman scattering spectroscopy,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 41, no. 12, pp. 1655–1660, Dec. 2010, doi: 10.1002/JRS.2629.

10. ANEXOS

10.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

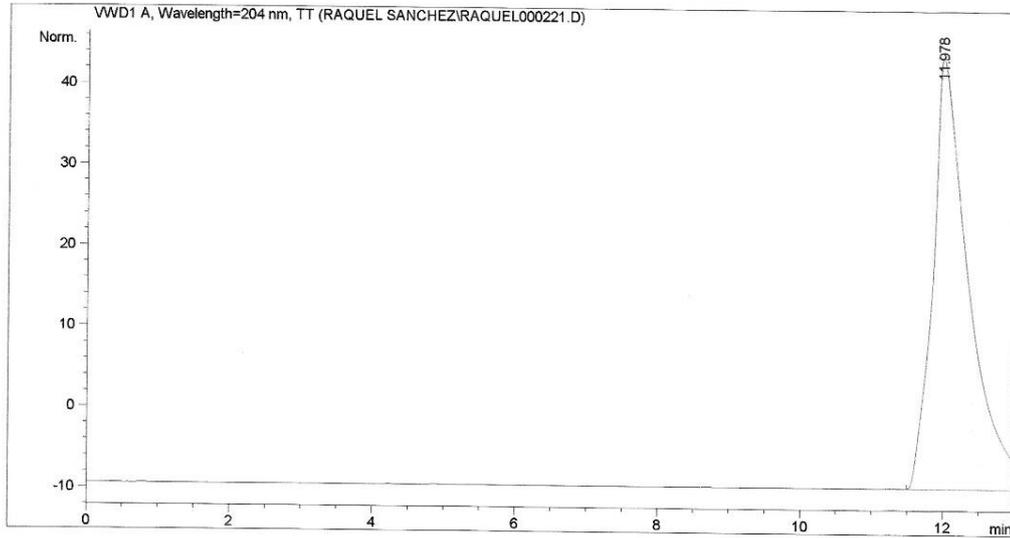


Figura 31. Cromatograma de la disolución patrón de 50 ppm de melamina

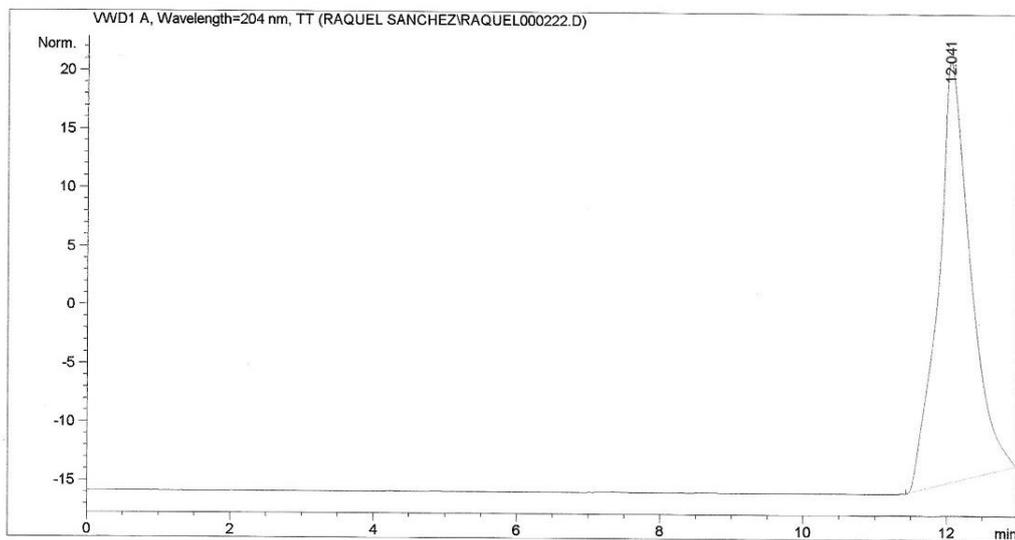


Figura 32. Cromatograma de la disolución patrón de 25 ppm de melamina

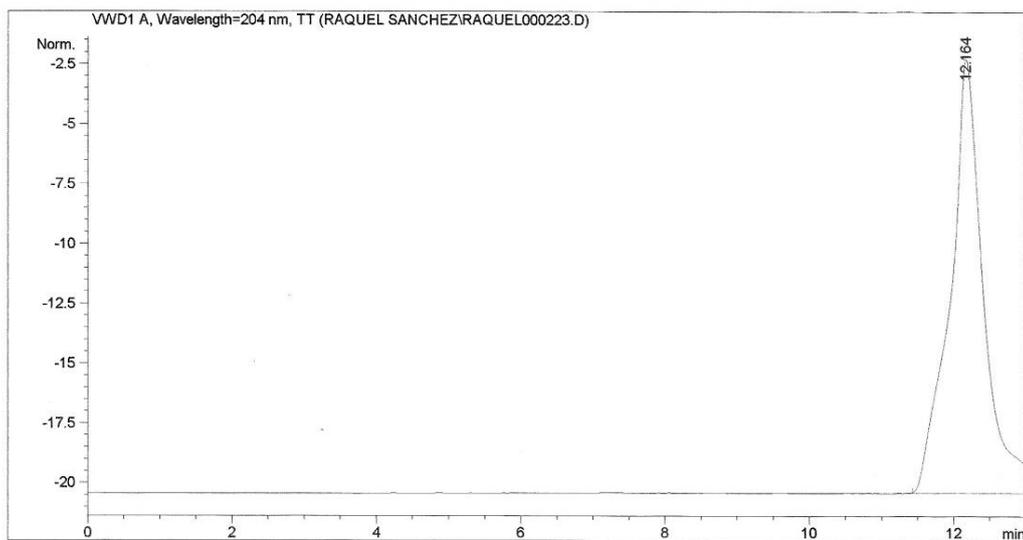


Figura 33. Cromatograma de la disolución patrón de 12,5 ppm de melamina

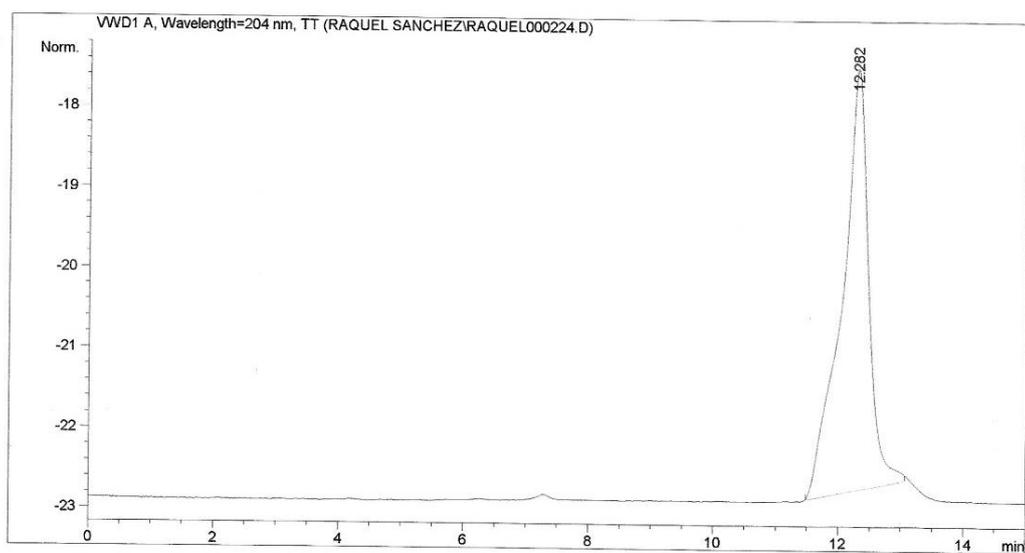


Figura 34. Cromatograma de la disolución patrón de 6,25 ppm de melamina

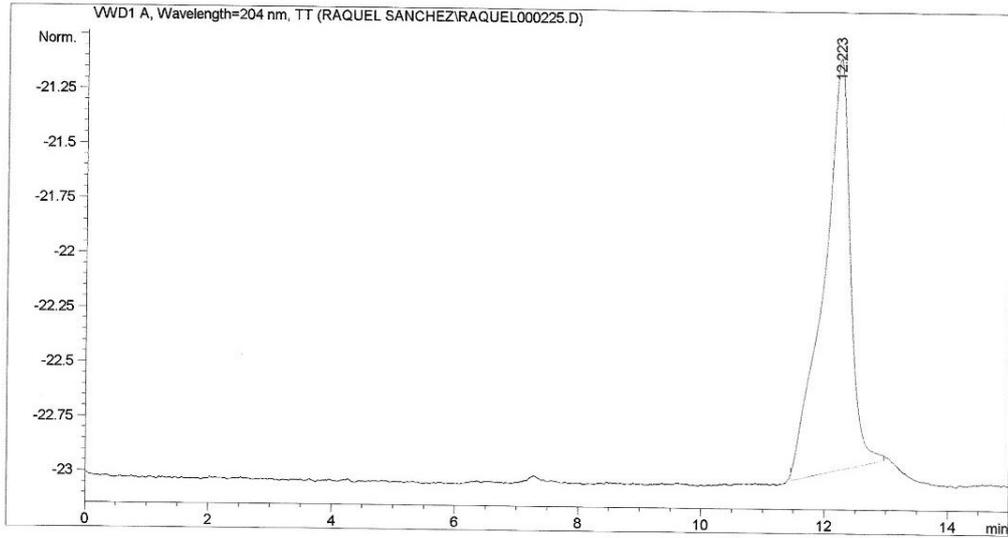


Figura 35. Cromatograma de la disolución patrón de 3,13 ppm de melamina

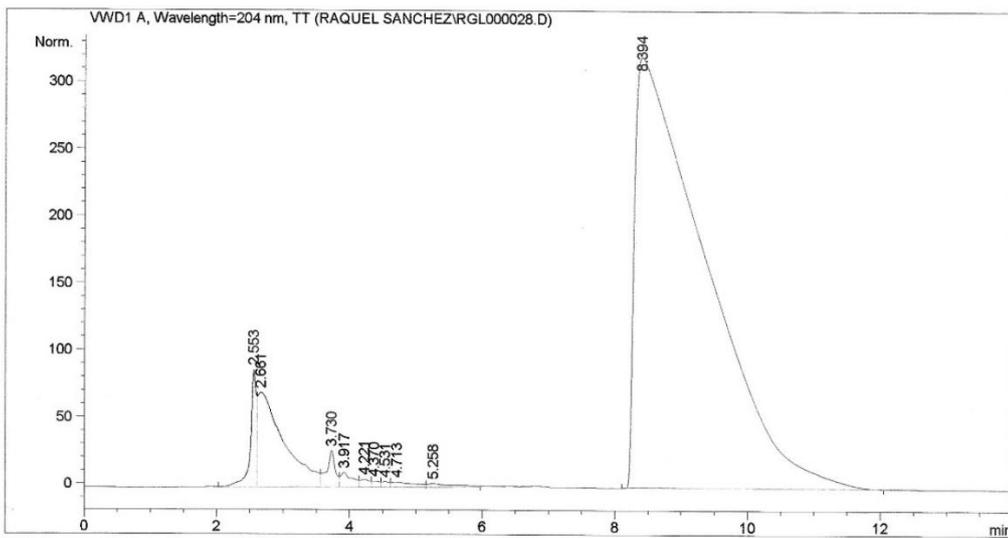


Figura 36. Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0000 g leche en polvo y 0,0100 g melamina

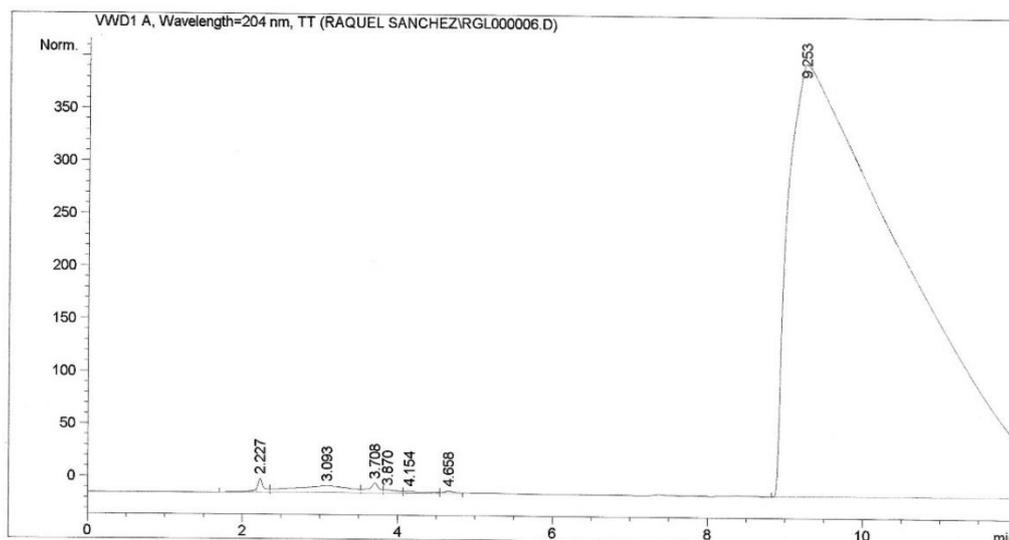


Figura 37. Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,000 g leche en polvo y 0,1002 g melamina

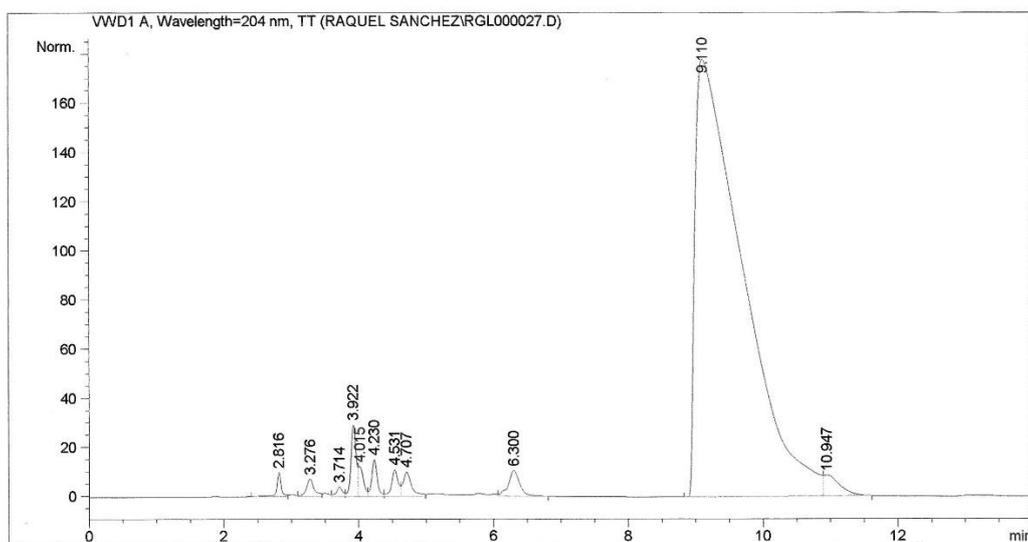


Figura 38. Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,1167 g queso y 0,0160 g melamina

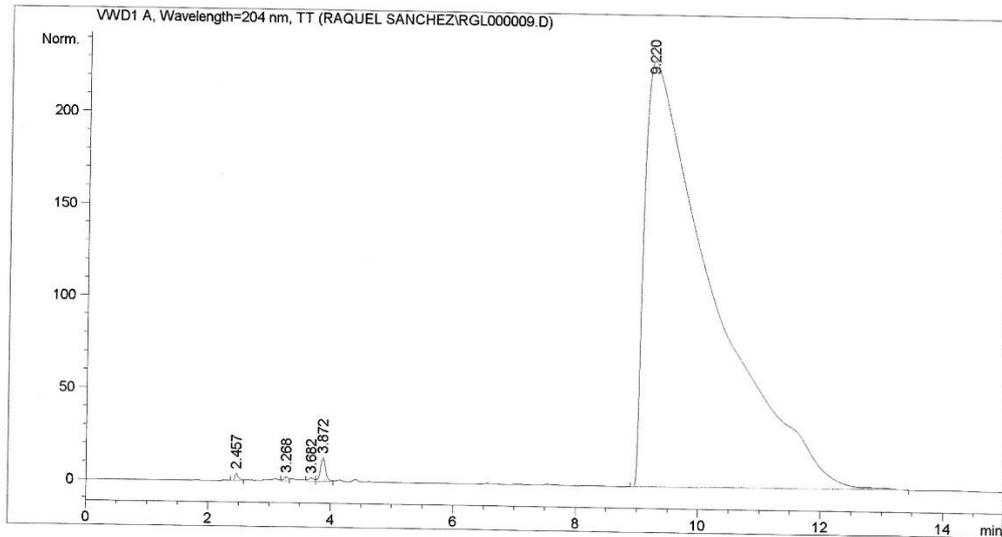


Figura 39. Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0105 g queso y 0,1003 g melamina

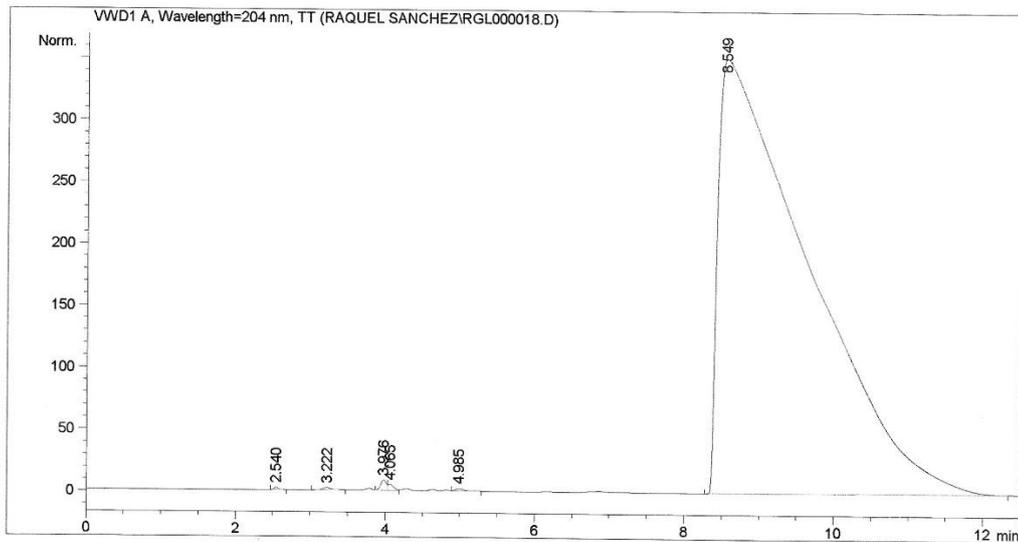


Figura 40. Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0105 g queso y 0,2007 g melamina

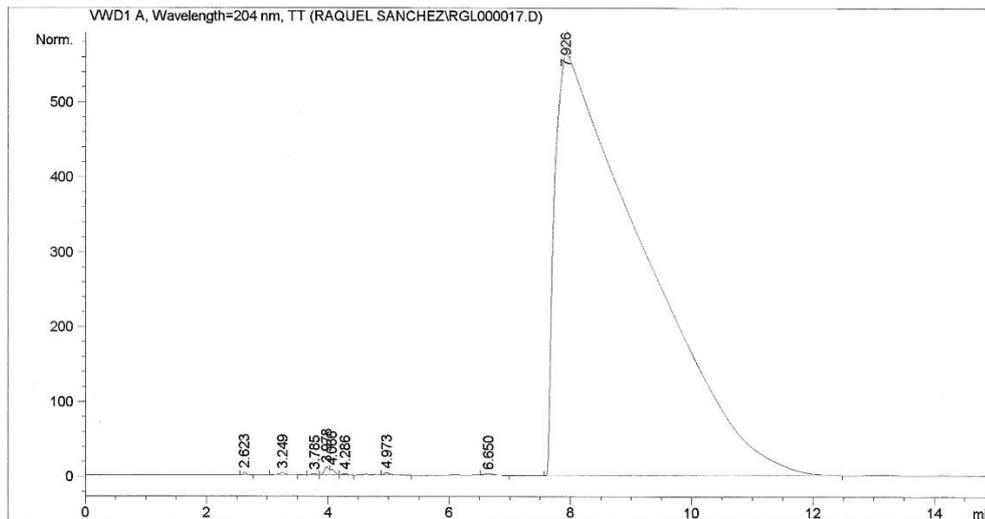


Figura 41. Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0041 g queso y 0,4003 g melamina

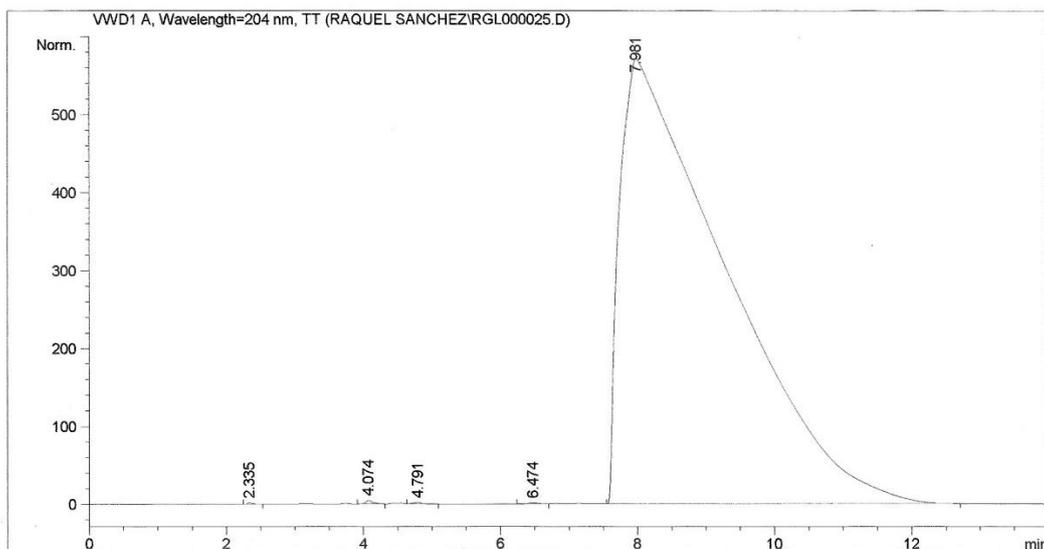


Figura 42. Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0073 g queso y 1,0005 g melamina

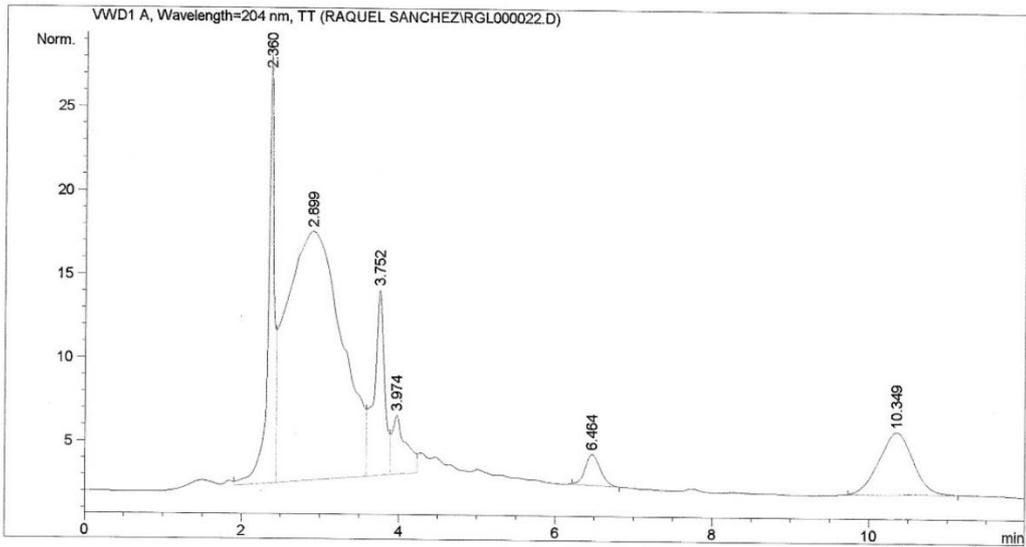


Figura 43. Cromatograma de la extracción de leche en polvo sin contaminar

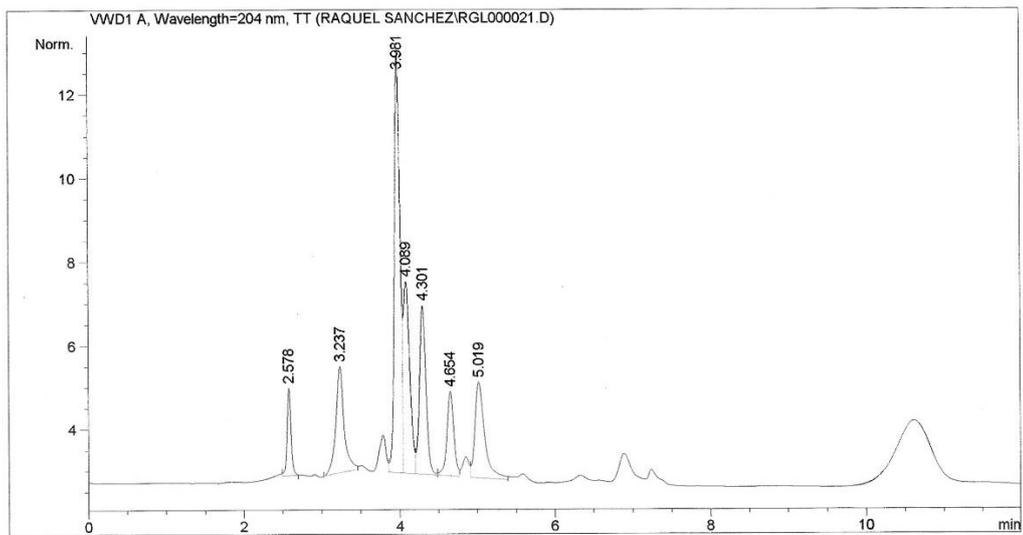


Figura 44. Cromatograma de la extracción de queso sin contaminar

10.2. Espectroscopía Raman

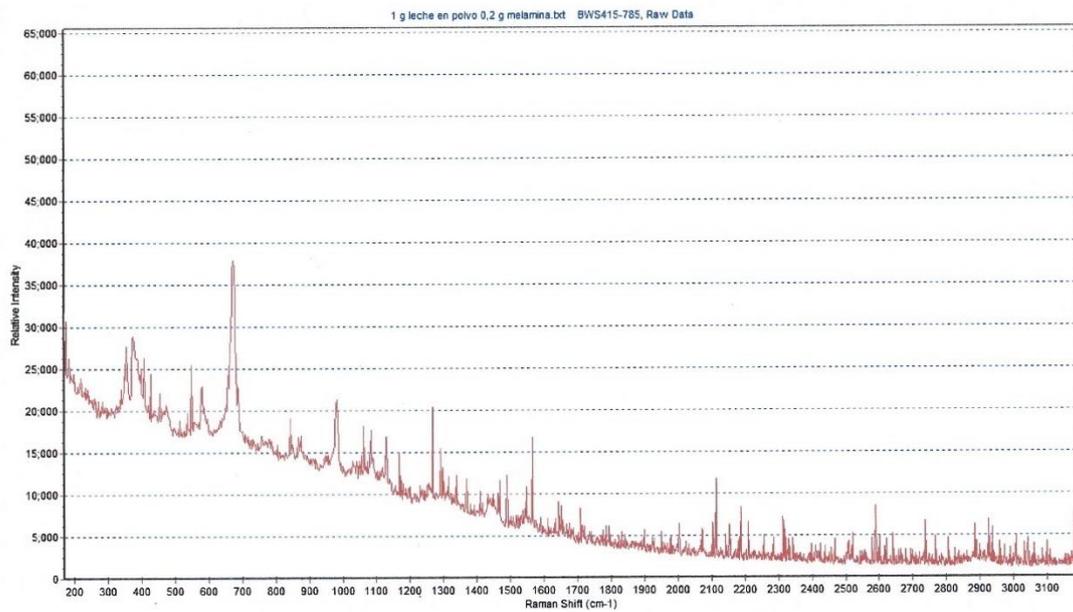


Figura 45. Espectro Raman de la adición de 0,2004 g de melamina a 1,0006 g de leche en polvo

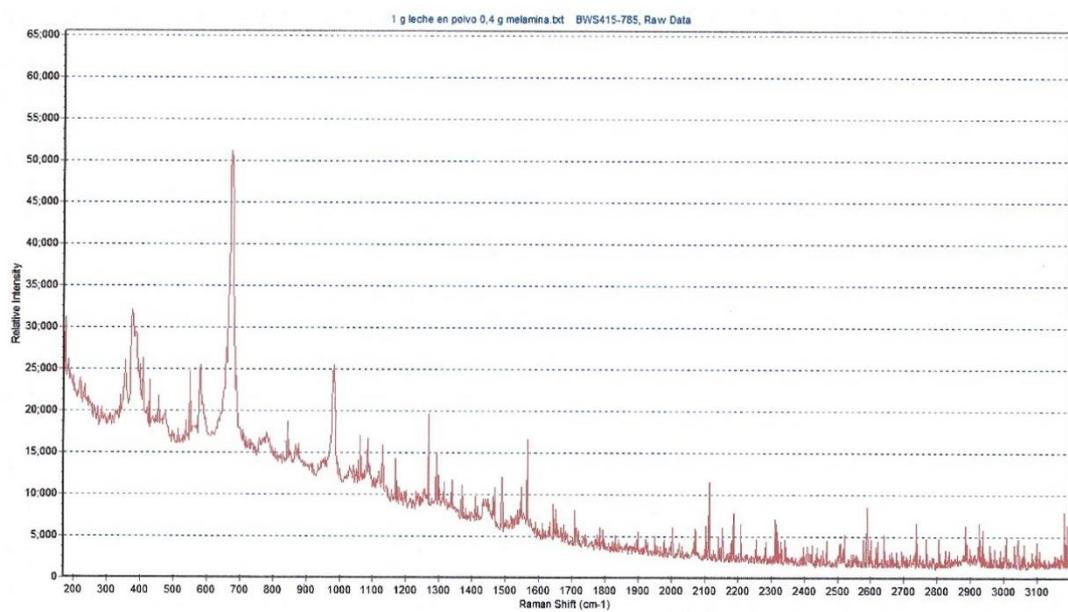


Figura 46. Espectro Raman de la adición de 0,4004 g de melamina a 1,0000 g de leche en polvo

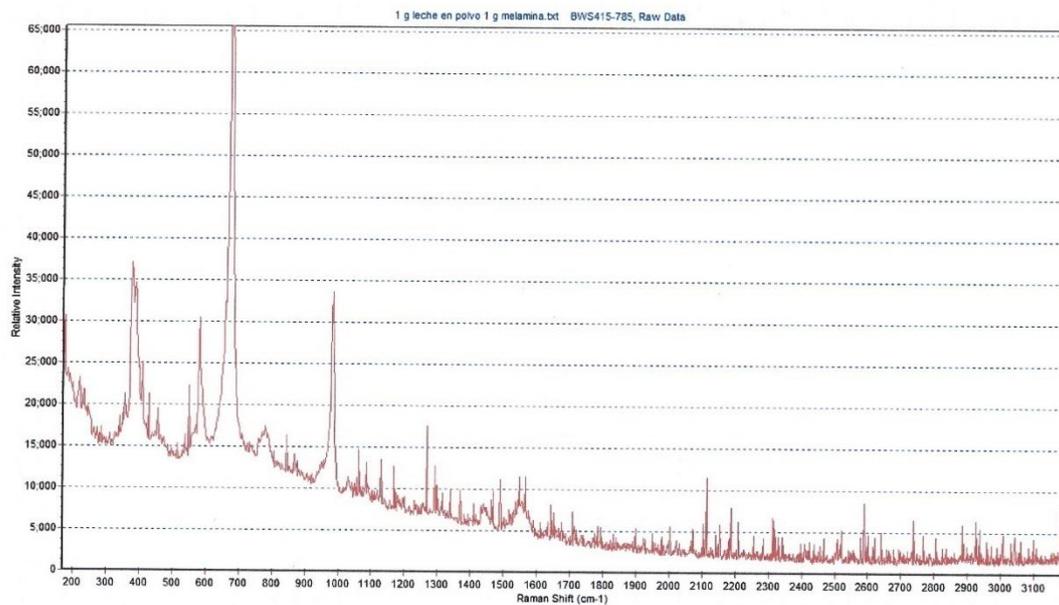


Figura 47. Espectro Raman de la adición de 1,0001 g de melamina a 1,0007 g de leche en polvo

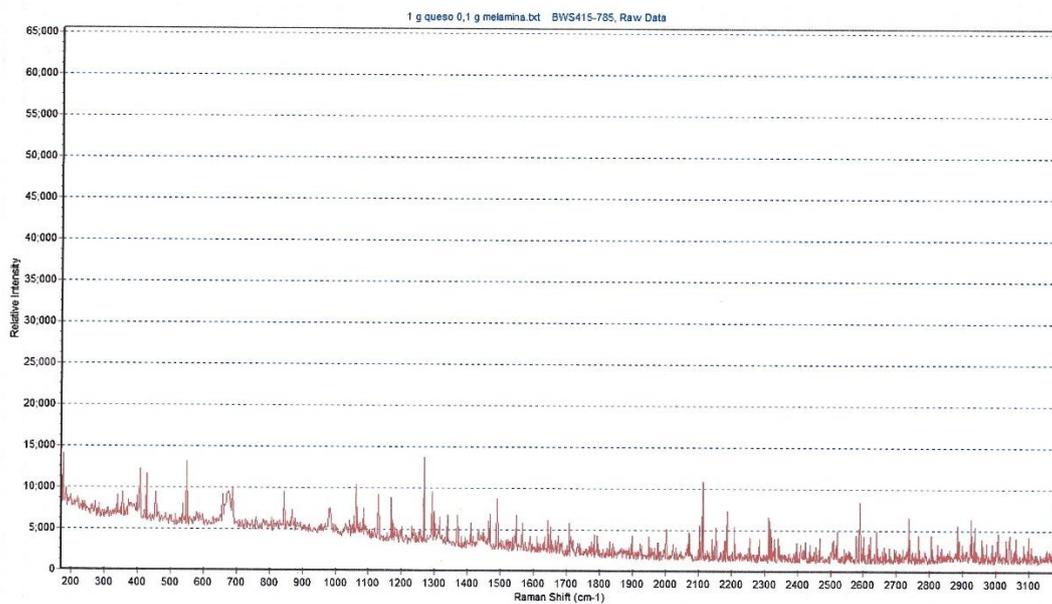


Figura 48. Espectro Raman de la adición de 0,1003 g de melamina a 1,0105 g de queso

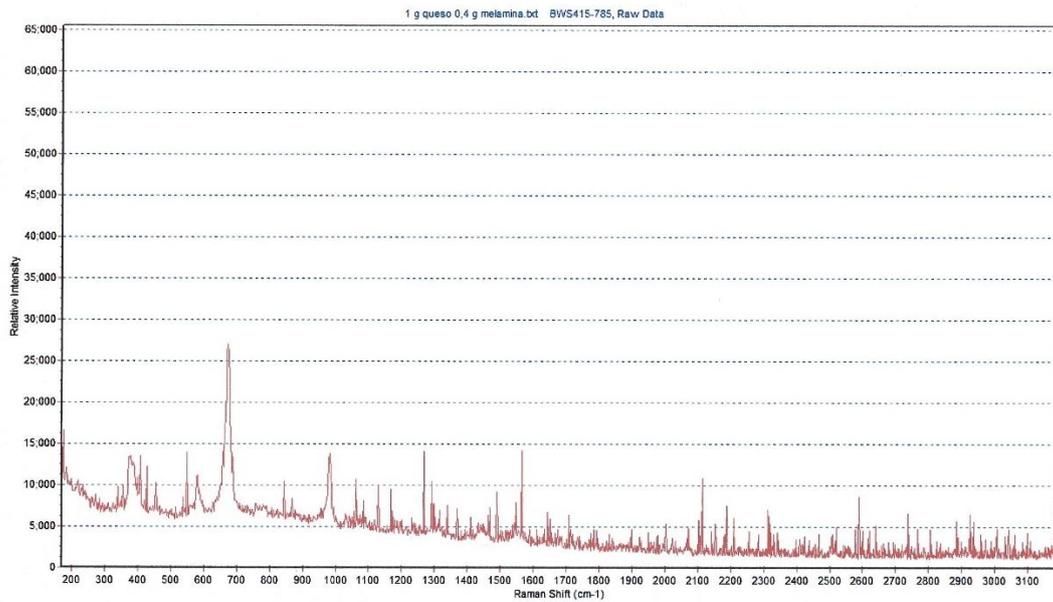


Figura 49. Espectro Raman de la adición de 0,4003 g de melamina a 1,0041 g de queso

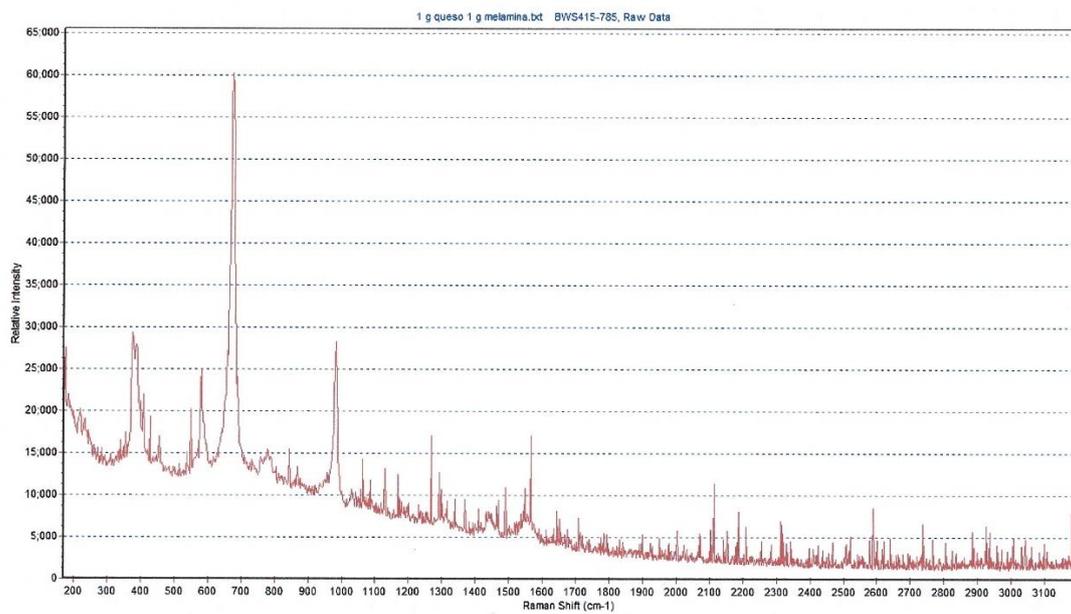


Figura 50. Espectro Raman de la adición de 1,0005 g de melamina a 1,0073 g de queso

11. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

- Figura 1** Esquema de los distintos adulterantes de la leche y las diferentes técnicas analíticas para su determinación
- Figura 2** Estructura química de la melamina
- Figura 3** Síntesis de resina de melamina-formaldehído
- Figura 4** Estructuras químicas del ácido cianúrico, amelida y amelina, respectivamente
- Figura 5** Interacción entre la melamina y el ácido cianúrico para formar cianurato de melamina
- Figura 6** Espectro electromagnético
- Figura 7** Esquema de un equipo de HPLC
- Figura 8** Espectro electromagnético, en verde aparece señalada la zona NIR
- Figura 9** Mecanismos de interacción entre la luz y la muestra en NIRS
- Figura 10** Muestras de leche en polvo contaminadas con melamina
- Figura 11** Espectros UV-Visible de las disoluciones patrón de melamina de 1, 2, 4 y 10 ppm
- Figura 12** Equipo de HPLC/UV-Visible utilizado en este trabajo
- Figura 13** Cromatograma de la disolución patrón de 100 ppm de melamina
- Figura 14** Línea de calibrado para HPLC con patrones de melamina
- Figura 15** Agitador vibrador oscilante Vibromatic P Selecta
- Figura 16** Equipo NIRS utilizado en este trabajo
- Figura 17** Sonda láser de fibra óptica del equipo NIRS
- Figura 18** Espectros NIR de las muestras de leche en polvo contaminadas con melamina
- Figura 19** Gráfico de predicción NIR en el intervalo de concentración 0-50%
- Figura 20** Gráfico de predicción NIR en el intervalo de concentración 0-10%
- Figura 21** Gráfico de predicción NIR en el intervalo de concentración 0-1%
- Figura 22** Gráfico de predicción NIR en el intervalo de concentración 0-10% para la validación externa
- Figura 23** Equipo de espectrometría Raman utilizado en este trabajo
- Figura 24** Espectro Raman del patrón de melamina
- Figura 25** Espectro Raman de la leche el polvo

- Figura 26** Espectro Raman del queso
- Figura 27** Espectro Raman de la adición de 0,1002 g de melamina a 1,0000 g de leche en polvo
- Figura 28** Espectro Raman de la adición de 0,8006 g de melamina a 1,0002 g de leche en polvo
- Figura 29** Espectro Raman de la adición de 0,2007 g de melamina a 1,0105 g de queso
- Figura 30** Espectro Raman de la adición de 0,8009 g de melamina a 1,0051 g de queso
- Figura 31** Cromatograma de la disolución patrón de 50 ppm de melamina
- Figura 32** Cromatograma de la disolución patrón de 25 ppm de melamina
- Figura 33** Cromatograma de la disolución patrón de 12,5 ppm de melamina
- Figura 34** Cromatograma de la disolución patrón de 6,25 ppm de melamina
- Figura 35** Cromatograma de la disolución patrón de 3,13 ppm de melamina
- Figura 36** Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0000 g leche en polvo y 0,0100 g melamina
- Figura 37** Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0000 g leche en polvo y 0,1002 g melamina
- Figura 38** Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,1167 g queso y 0,0160 g melamina
- Figura 39** Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0105 g queso y 0,1003 g melamina
- Figura 40** Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0105 g queso y 0,2007 g melamina
- Figura 41** Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0041 g queso y 0,4003 g melamina
- Figura 42** Cromatograma de la extracción de melamina en la muestra de 1,0073 g queso y 1,0005 g melamina
- Figura 43** Cromatograma de la extracción de leche en polvo sin contaminar
- Figura 44** Cromatograma de la extracción de queso sin contaminar
- Figura 45** Espectro Raman de la adición de 0,2004 g de melamina a 1,0006 g de leche en polvo
- Figura 46** Espectro Raman de la adición de 0,4004 g de melamina a 1,0000 g de leche en polvo

- Figura 47** Espectro Raman de la adición de 1,0001 g de melamina a 1,0007 g de leche en polvo
- Figura 48** Espectro Raman de la adición de 0,1003 g de melamina a 1,0105 g de queso
- Figura 49** Espectro Raman de la adición de 0,4003 g de melamina a 1,0041 g de queso
- Figura 50** Espectro Raman de la adición de 1,0005 g de melamina a 1,0073 g de queso

TABLAS

- Tabla 1** Cantidades de leche en polvo y melamina a mezclar para preparar las diferentes muestras contaminadas
- Tabla 2** Cantidades de queso y melamina a mezclar para preparar las diferentes muestras contaminadas
- Tabla 3** Condiciones HPLC
- Tabla 4** Áreas de los picos y sus correspondientes tiempos de retención de las diferentes disoluciones patrón de melamina medidas por HPLC/UV-Visible
- Tabla 5** Datos recogidos de los análisis por HPLC de las extracciones de melamina en leche en polvo y queso
- Tabla 6** Resultados obtenidos en la calibración y validación cruzada de melamina
- Tabla 7** Resultados obtenidos en la calibración y validación cruzada de melamina
- Tabla 8** Validación externa
- Tabla 9** Valores reales y predichos por el modelo de calibración para el conjunto de validación