



DETERMINAÇÃO SIMPLES E RÁPIDA DE MELAMINA UTILIZANDO ELETROEXTRAÇÃO COM DETECÇÃO COLORIMÉTRICA E POR SERS

Palavras-Chave: INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA, SEGURANÇA ALIMENTAR, IMPRESSÃO 3D

Autores/as:

JUAN MATIAS SANTOS [IQ - UNICAMP]

Prof. Dr. DOSIL PEREIRA DE JESUS (orientador) [IQ - UNICAMP]

Prof. Dr. JAVIER ERICK LOBATÓN VILLA (colaborador) [IQ - UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A melamina (Figura 1) é uma triazina composta de 66,6% de nitrogênio e é frequentemente adicionada de maneira ilegal em produtos alimentícios como leites e rações para animais, a fim de burlar testes de qualidade, dando um falso positivo para análises da quantidade de proteínas nesses produtos. A melamina, isoladamente, não gera danos à saúde de humanos e animais, mas quando em contato com o organismo pode causar diferentes tipos de problemas renais, como cálculo ou até insuficiência, podendo levar à óbito. Por isso, sua análise, detecção e quantificação nesses produtos se faz importante.

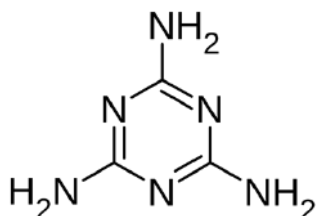


Figura 1: Estrutura molecular da melamina

Atualmente, há uma grande demanda por análises químicas que sejam práticas, simples e com custo relativamente baixo. A Extração por Eletromembrana é uma técnica nova de preparo de amostras que tem

ganhado muito espaço atualmente dentro dos laboratórios por se encaixar nas características antes citadas. Baseado nisso, o grupo de pesquisa onde esse trabalho foi desenvolvido vem pesquisando e trabalhando em métodos que unem técnicas de eletroforese capilar e de detecção colorimétrica.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo principal, desenvolver um método de eletroextração por membrana alinhado com análise colorimétrica e tratamento de dados via software de smartphone.

Este trabalho propõe aumentar ainda mais a praticidade da extração por eletromembrana e possibilitar resultados práticos e rápidos, podendo ser empregado em laboratórios menores e até mesmo em análises de campo, sem a necessidade de transportar a amostra para um laboratório.

METODOLOGIA:

O método desenvolvido para a análise do composto e posterior detecção envolve a eletroextração da melamina. O sistema montado para eletroextração, demonstrado na figura 2, consiste em uma fonte de tensão conectada a eletrodos, que por sua vez, estão fixados na tampa de um vial de 5 mL. Um

destes eletrodos, estará submerso na membrana contendo a solução aceptora e no vial será aplicada a solução doadora contendo melamina. O sistema ainda conta com um agitador magnético, um suporte universal e um multímetro para medir a corrente elétrica.

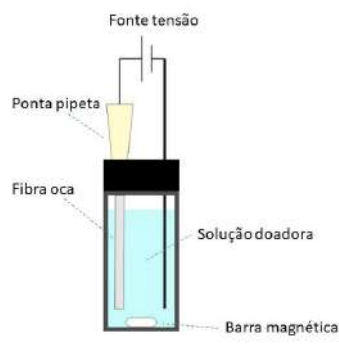


Figura 2: Esquema do sistema montado para eletroextração

Após a eletroextração, há a etapa de detecção que inicialmente seria realizada por uma técnica colorimétrica que faz o uso de nanopartículas de ouro (AuNPs). A primeira parte consiste na síntese das nanopartículas, que foi feita através da redução com citrato de sódio. Brevemente, 100 mL de uma solução de 0,01% (m/m) de HAuCl_4 é aquecida até ebulição. Após 2 minutos, adiciona-se 3,5 mL de uma solução de 1% de citrato de sódio. A solução fica sob agitação e aquecimento por 15 minutos e durante esse tempo é possível observar mudança de cor, inicialmente a solução possui uma cor amarela, muda para roxo escuro e continua mudando até atingir um tom vermelho/carmesim. Decorrido os 15 minutos, o aquecimento é interrompido e a agitação continua por mais 15 minutos. Quando a temperatura ambiente é atingida, adiciona-se 100 mL de água ultrapura (Milli-Q). A solução das nanopartículas é armazenada em geladeira a 4 °C, seguindo

este procedimento o tamanho esperado das nanopartículas é de 18 nm.

Quando as nanopartículas entram em contato com a melamina a sua cor se altera de avermelhado/vinho para azul acinzentado. Esse fato ocorre devido à agregação das nanopartículas, que acontece de acordo com o esquema demonstrado na Figura 2.

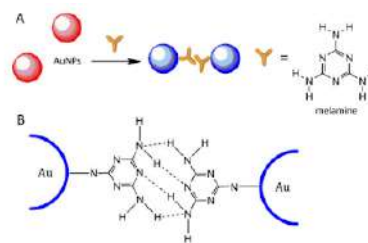


Figura 3: Esquema demonstrando o mecanismo de agregação das nanopartículas. Adaptada da referência [3].

Após os testes realizados, a detecção colorimétrica se mostrou ineficaz para quantificação de melamina nas amostras, portanto foi escolhida uma nova técnica, a Espectroscopia Raman amplificada por superfície, ou SERS. Esta detecção foi realizada na amostra depositada em um substrato de papel, contendo nanopartículas de ouro (AuNPs). A etapa de detecção SERS foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Javier Erick Lobatón Villa (IQ-UNICAMP). O substrato feito em papel com o emprego de uma impressora a cera (camada representada no ponto “A” da figura 3) formando pequenos poços ou spots, onde são imobilizadas as nanopartículas e deposita-se a amostra (representado no ponto “B” na figura 3). A cera presente em volta dos poços tem caráter hidrofóbico, importante para evitar o espalhamento das nanopartículas e da amostra quando depositadas.



Figura 3: Substrato já com nanopartículas depositadas

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

I. Análise Colorimétrica

Como pode-se observar pela figura 4, houve mudança de coloração quando as nanopartículas entraram em contato com a melamina, porém pouco tempo depois, a coloração das amostras com maior concentração se assemelhava tanto que era difícil distingui-las, o que mostrou que a técnica não é indicada para análises quantitativas de melamina, o que é nosso objetivo.



Figura 4: Imagem das soluções empregadas na análise colorimétrica da reação entre nanopartículas e melamina em diferentes concentrações. Da esquerda para a direita: 0 (branco); 1 μ M; 2 μ M; 3 μ M; 4 μ M e 5 μ M. Foto registrada 5 minutos após adição.

As observações realizadas são justificadas quando analisamos as cores com diferentes aplicativos de imagem para smartphones e computadores, como o image J. Os canais de cores RGB foram utilizados nestas análises. Plotamos os dados em gráficos usando o software Origin e os resultados não foram satisfatórios. Em alguns dos testes realizados tivemos resultados promissores, com bom coeficiente de correlação de Pearson, mas que quando

repetidos não reproduziram os mesmos resultados, o que demonstra que o método não possuía reprodutibilidade. A técnica se mostrou capaz de detectar a presença de melamina até mesmo em concentrações muito baixas, mas não se mostrou eficaz e reprodutível para quantificação.

II. Espectroscopia Raman amplificada por superfície

Diante dos resultados insatisfatórios obtidos com a detecção colorimétrica, se mostrou necessário encontrar uma nova metodologia capaz de fazer a detecção de forma mais reprodutível. Após novas pesquisas e estudos, decidiu-se testar a Espectroscopia Raman amplificada por superfície, ou SERS.

Nos testes iniciais realizados com padrões de melamina em água, preparados em diferentes concentrações, a técnica SERS se mostrou promissora para a identificação e quantificação do composto (pico característico em 710 cm^{-1}), como pode ser observado na figura 5.

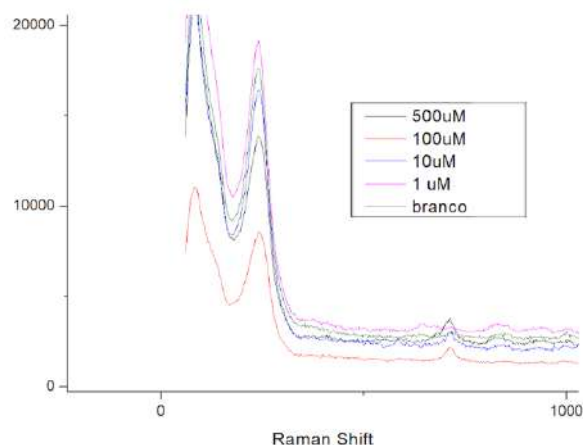


Figura 5: Espectro SERS para diferentes concentrações de melamina depositadas nos substratos modificados com AuNPs

III. Análise do Solvente da membrana líquida

Para a etapa de eletroextração, foram testados diferentes solventes para a escolha da membrana líquida imobilizada nas fibras ocas de polipropileno, dentre eles o 1-ethyl-2-nitrobenzeno (ENB). Para o teste deste solvente, a tensão aplicada foi de 300V e o mesmo procedimento foi seguido. A corrente durante a extração ficou em aproximadamente 4 μ A, as amostras extraídas foram então depositadas no substrato e então analisadas por SERS. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 6.

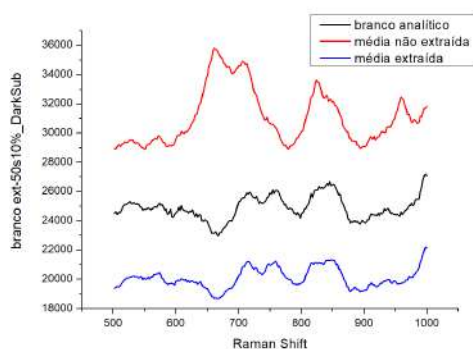


Figura 6: Espectros SERS obtidos com solução aceitadora obtidas nos testes de eletroextração empregando o solvente ENB como membrana líquida

Pode-se observar que não foi possível identificar o pico característico da melamina, por volta de 710 cm^{-1} , o que indica que esse solvente não é apropriado para este procedimento.

Além do ENB, o solvente 1-octanol também foi testado, com uma tensão de 50V sendo aplicada e o mesmo procedimento. Durante as extrações, as correntes foram bastante altas, passando de 400 μ A e os espectros obtidos (figura 7) demonstram que o solvente também não é apropriado.

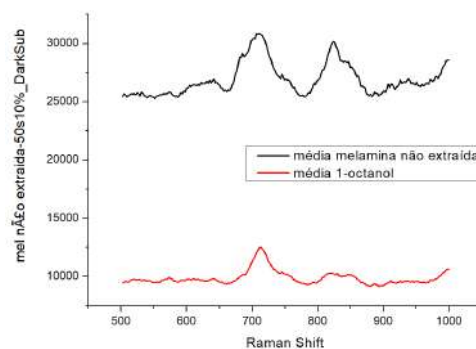


Figura 7: Espectros SERS obtidos com solução aceitadora obtidas nos testes de eletroextração empregando o solvente 1-octanol como membrana líquida.

Os melhores resultados foram obtidos com uma mistura dos compostos di-(2-ethylhexyl) phosphate (DEHP) e O-nitrophenyl octyl ether (NPOE), a foi escolhida para a continuidade do projeto

IV. Análise da concentração de DEHP no solvente da membrana

Além de testar diferentes solventes, foram testadas diferentes concentrações de DEHP na mistura NPOE como solvente. Portanto, foram testadas as concentrações de 5, 10, 15 e 20% (v/v) de DEHP, aplicando voltagem de 90V durante 15 minutos, os resultados obtidos estão demonstrados na figura 8.

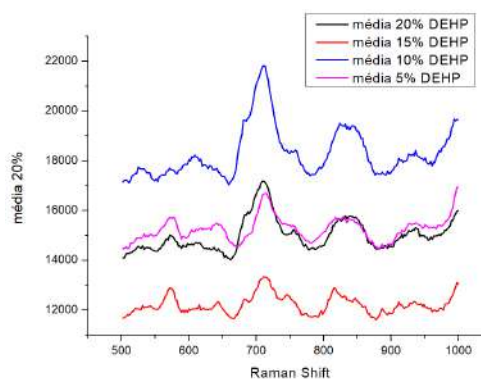


Figura 8: Espectros SERS obtidos para soluções aceitadoras obtidas com misturas de NPOE e DEHP em diferentes proporções

Portanto, com base nos espectros, o solvente escolhido para membrana foi NPOE:DEHP (9:1 v/v).

V. Análise da influência do pH da solução doadora

Um parâmetro importante a ser testado é a influência que o pH da solução doadora, que é a solução contendo a melamina. Para isso, diferentes soluções de melamina com concentração de 2 mg.L⁻¹ foram preparadas com diferentes valores de pH e testadas. As soluções foram preparadas em pH 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, além de uma solução preparada em água deionizada que apresentou pH 6,81 e os espectros estão apresentados e agrupados na figura 9.

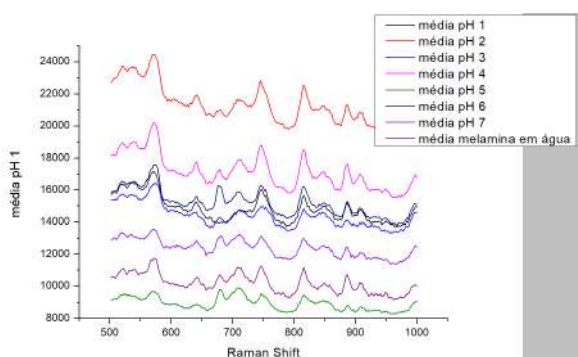


Figura 9: Comparação pH ideal para a solução doadora

Com base nos resultados, o pH ideal para a solução de melamina foi de 5. Nesse pH a intensidade do pico característico da melamina foi maior.

CONCLUSÕES:

Uma técnica capaz de extrair e pré-concentrar a melamina foi desenvolvida e segue sendo otimizada. A detecção por SERS apresentou resultados promissores para o analito, sendo capaz de identificar a melamina

em pequenas concentrações e também quantificá-la.

Diferentes parâmetros foram testados e suas influências sobre a análise foram estudadas, a fim de encontrar os que melhor se encaixam no objetivo do projeto.

Os resultados das duas técnicas utilizadas em conjunto são promissores e sua aplicação na determinação de melamina em amostras reais de leite será avaliada.

BIBLIOGRAFIA

1. HUANG, Chuixiu et al. Electromembrane extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 95, p. 47-56, 2017.
2. DROUIN, Nicolas et al. Electromembrane extraction: Overview of the last decade. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 357-363, 2019.
3. XING, Hai-bo et al. A rapid colorimetric detection of melamine in raw milk by unmodified gold nanoparticles. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 1441-1447, 2013.
4. DING, Ning et al. Colorimetric determination of melamine in dairy products by Fe₃O₄ magnetic nanoparticles- H₂O₂- ABTS detection system. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 13, p. 5897-5899, 2010.
5. XIONG, Ziyi et al. Development of nanofibrillated cellulose coated with gold nanoparticles for measurement of melamine by SERS. **Cellulose**, v. 24, p. 2801-2811, 2017.
6. GIOVANNOZZI, Andrea Mario et al. Rapid and sensitive detection of melamine in milk with gold nanoparticles by Surface Enhanced Raman Scattering. **Food chemistry**, v. 159, p. 250-256, 2014.