



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CETEA**

**THAIS DE LIMA GONÇALVES**

**POTENCIAL DE MIGRAÇÃO DE MELAMINA E SEUS ANÁLOGOS (AMELINA,  
AMELIDA, ÁCIDO CIANÚRICO) EM UTENSÍLIOS DOMÉSTICOS A BASE DE  
MELAMINA-FORMALDEÍDO.**

**CAMPINAS**

**2022**



**THAIS DE LIMA GONÇALVES**

**POTENCIAL DE MIGRAÇÃO DE MELAMINA E SEUS ANÁLOGOS (AMELINA, AMELIDA, ÁCIDO CIANÚRICO) EM UTENSÍLIOS DOMÉSTICOS A BASE DE MELAMINA-FORMALDEÍDO.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia de Alimentos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.*

Aluno: Thais de Lima Gonçalves

Orientador: Marisa Padula

Coorientador: Mary Ângela Favaro Perez

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Thais de Lima Gonçalves e orientada pelo Prof(a). Dr(a). Marisa Padula

**CAMPINAS**

**2022**

**Agência(s):** *O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001*

**Nº do proc.:**

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507  
Biblioteca Central do ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

G635p    Gonçalves, Thais de Lima.

Potencial de migração de melamina e seus análogos (amelina, amelida, ácido cianúrico) em utensílios a base de melamina-formaldeído. Thais de Lima Gonçalves / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: Ital, 2022.

58 f.

Orientadora: Dra. Marisa Padula.

Co-orientadora: Dra. Mary Ângela Favaro Perez.

1. Melamina. 2. Amelina. 3. Amelida. 4. Ácido Cianúrico.  
5. Utensílios domésticos. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital) - Centro de Tecnologia de Embalagem (CETEA). II. Gonçalves, Thais de Lima. III. Título.

**Título em inglês:** **Migration potential of melamine and analogs (ammeline, ammelide, cyanuric acid) in kitchenware of melamine-formaldehyde.**

**Keywords:** **Melamine; Ammeline; Ammelide; Cyanuric Acid; Kitchenware;**

**Titulação:** **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Banca Examinadora:** **Marisa Padula; Mary Ângela Favaro Perez; Carla Beatriz Grepan Bottoli; Paulo Henrique Massaharu Kiyataka; Silvia Amélia Verdiani Tfuoni;**

**Data da Defesa:** **26/08/2022**

**Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

## **BANCA EXAMINADORA**

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Thais de Lima Gonçalves aprovada pela Comissão Julgadora em 26/08/2022.

---

Profa. Dra Marisa Padula  
Instituto de Tecnologia de Alimentos - Presidente

---

Profa. Dra. Mary Ângela Favaro Perez  
Instituto de Tecnologia de Alimentos - Coorientadora

---

Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli  
Instituto de Química - Unicamp

---

Dr. Paulo Henrique Massaharu Kiyataka  
Instituto de Tecnologia de Alimentos

---

Dra Silvia Amelia Verdiani Tfouni  
Instituto de Tecnologia de Alimentos - (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me dar forças para enfrentar as dificuldades e guiar pelo caminho correto.

Aos meus pais Sônia e Renato, por todo amor, incentivo, educação e confiança que proporcionam por toda minha vida, e principalmente por me incentivarem a continuar meus estudos e proporcionarem as condições para que eu me dedicasse inteiramente à vida acadêmica. Aos meus irmãos Thabata e Felipe, e todo o restante da minha família que sempre me apoiou e me incentivou.

Agradeço imensamente à minha coorientadora que se tornou uma amiga, Profa. Dra. Mary Ângela, por todo ensinamento, paciência, incentivo e acolhimento, bem como a orientadora Profa. Dra. Marisa Padula, que tornou tudo isso possível e apostou suas fichas em mim desde o início, me orientando com toda dedicação e atenção possível além de partilhar seu vasto conhecimento comigo. A todos os docentes do programa da pós-graduação, que sempre se apresentaram dispostos a compartilhar seus conhecimentos e enriqueceram ainda mais minhas experiências acadêmicas.

Não poderia deixar de agradecer à todas as meninas do laboratório de cromatografia, Beatriz, Bruna, Mayra e Joyce, que sempre me auxiliaram e orientaram em relação à todas as informações dos laboratórios e do uso dos equipamentos, além é claro, da companhia no dia a dia. E a todos os funcionários do Cetea pelo ótimo acolhimento. Agradeço também a todos os funcionários do Itai, em especial aos que são responsáveis pela pós-graduação, Sílvia Tfouni, Elenice e Gabriela.

Por fim, agradeço também às minhas amigas Bárbara e Flávia que me incentivam muito e estão sempre torcendo por mim.

Deixo aqui, o meu muito obrigada com um enorme carinho a cada um.

Thais de Lima Gonçalves

## RESUMO

A melamina é um composto orgânico nitrogenado, utilizada na produção de diversos tipos de produtos, como adesivos, finalizadores de papel, compostos de moldagem e resinas para a produção de plásticos. Devido às suas características de resistência térmica e mecânica a melamina tornou-se amplamente utilizada na produção de utensílios domésticos que entram em contato com alimentos. Segundo diversos estudos, quando ingerida em certa quantidade, a melamina pode causar danos à saúde do consumidor, e por isso vem sendo alvo de estudos para avaliar a sua migração para os alimentos. Há legislações nacionais e internacionais que determinam os limites específicos permitidos de migração em  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ . O objetivo do estudo foi avaliar, através de método desenvolvido e validado de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS), a quantidade de melamina migrada e seus análogos em diferentes utensílios domésticos a base de melamina, importados e comercializados no Brasil. Para o estudo da migração foi utilizado o simulante ácido, solução de 3% de ácido acético em água destilada e a condição de contato de  $70^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Dentre as 14 amostras avaliadas, 11 delas apresentaram a migração de melamina, estando apenas 2 destas, dentro dos limites de migração específica estabelecidos na legislação brasileira,  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ . Os compostos amelina, amelida e ácido cianúrico apresentaram migração em 9 amostras em níveis bem inferiores quando comparados à melamina. O estudo demonstrou que as condições ácidas e de temperaturas elevadas influenciam diretamente na migração dos compostos. Esse estudo é o primeiro realizado com amostras de melamina-formaldeído comercializadas no Brasil, e indicam a importância da fiscalização na importação de utensílios domésticos para evitar e reduzir os riscos à saúde da população.

### Palavras-chave:

Melamina; Amelina; Amelida; Ácido Cianúrico; Utensílios Domésticos

## **ABSTRACT**

Melamine is a nitrogenous organic compound which is used in the production of various products, such as adhesives, paper finishers, molding compounds and resins for the production of plastics. Due to its thermal and mechanical resistance characteristics, the melamine has become widely used in manufacturing of household items that come into contact with food. According to several studies, when ingested in a certain amount, melamine can cause damage to the consumer's health, so it has been the subject of studies to evaluate its migration to food. There are national and international legislation that establish the specific migration limit of  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  of food or simulant. The aim of study was to assess, through the method developed and validated of ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), the amount of migrated melamine and its analogues in different melamine-based domestic kitchenware imported and commercialized in Brazil. For the migration study the acid simulant, solution of 3% of acetic acid in distilled water and the contact condition of  $70^{\circ}\text{C}$  for 2 hours were used. Among the 14 samples evaluated, 11 of them showed melamine migration and only two of them were in compliance with the Brazilian specific migration limit,  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ . The compounds ammeline, ammelide and cyanuric acid showed migration in 9 samples at much lower levels when compared to melamine. The study demonstrated that acidic conditions and high temperatures directly influence the migration of compounds. This study was the first carried out with samples of melamine-formaldehyde commercialized in Brazil, and it indicates the importance of the importation inspection of domestic utensils to avoid and reduce the risks to the health of the population.

### **Keywords:**

Melamine; Ammeline; Ammelide; Cyanuric Acid; Kitchenware.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
Objetivo principal.....	3
Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
Estudos de Migração .....	6
Legislação.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
Material .....	13
Amostras.....	13
Reagentes .....	17
Soluções .....	17
Equipamentos.....	20
Métodos .....	21
Validação do Método .....	21
Ensaio de migração .....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
otimização e Validação do método.....	25
Linearidade .....	26
Precisão.....	27
Exatidão.....	28

análise de migração .....	31
6. CONCLUSÕES .....	40
7. REFERÊNCIAS.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEN - *European Committee for Standardization*

CONTAM - *The Panel on Contaminants in the Food Chain*

EFSA - *European Food Safety Authority*

EN - *European Standard*

FDA - *Food and Drug Administration*

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IDA - Ingestão Diária Aceitável

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *high performance liquid chromatography*.

HPLC-UV - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta, do inglês, *high performance liquid chromatography with an ultraviolet detector*

LC - cromatografia líquida, do inglês, *liquid chromatography*

LC-MS/MS - cromatografia a líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial, do inglês, *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*

LD - limite de detecção

LME - limite de migração específica

LQ - limite de quantificação

M - molar (1 mol/L)

mM - milimolar (1 mmol/L)

MERCOSUL - Mercado Comum do Sul

MS - espectrometria de massas, do inglês, *mass spectrometry*

MS/MS - espectrometria de massas sequencial, do inglês, *tandem mass spectrometry*

m/v - massa/volume

NaOH - hidróxido de sódio

RASFF- *Rapid Alert System for Food and Feed*

UV - ultravioleta, do inglês, *ultraviolet*

UHPLC - cromatografia líquida de ultra alta eficiência, do inglês, *ultra high performance liquid chromatography*

UPLC-MS/MS - cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial, do inglês, *ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry*

v/v - volume/volume

## 1. INTRODUÇÃO

A melamina é muito utilizada na produção de utensílios domésticos como pratos, colheres, copos e tigelas a base de melamina e formaldeído, que entram em contato direto com alimentos, devido à sua significativa resistência mecânica, resistência à temperatura, além de ter baixo custo e fácil produção. A resina de melamina é usada também para reticular resinas poliéster, acrílico e epóxi utilizadas em superfícies e revestimentos (BRADLEY *et al.*, 2010).

A melamina já foi objetivo de diversas pesquisas devido ao seu emprego em fraudes de produtos lácteos e, também, na alimentação animal, com o intuito de alterar a quantidade de proteína presente nestes produtos. Isso porque a molécula da melamina é composta de, aproximadamente, 66% de nitrogênio, principal determinante em análises de proteína. Essas pesquisas identificaram riscos à saúde humana e animal, tais como malefícios aos rins e outros órgãos, causando graves problemas à saúde, os quais podem acarretar o óbito (registrado com crianças na China) (ROVINA; SIDDIQUEE, 2015).

Em 2010 a EFSA - European Food Safety Authority (EFSA, 2010) a pedido da Comissão Europeia identificou as fontes potenciais de melamina e de seus análogos estruturais ácido cianúrico, amelina (2,6-diamino-1H-1,3,5-triazin-4-ona) e amelida (6-amino-1,3,5-triazina-2,4(1H,3H)-diona) em alimentos e ração animal que não estavam claramente relacionadas à incidentes de adulteração. Os materiais para contato com alimentos foram identificados e incluídos como possíveis fontes de melamina em alimentos e foi estimada a exposição alimentar dos consumidores associada a esse monômero.

Dependendo do processo de purificação, a melamina pode conter diferentes níveis de substâncias estruturalmente relacionadas, como ácido cianúrico, amelina e amelida. A melamina não apresenta toxicidade sistêmica, mas é capaz de se complexar com outras substâncias, como o ácido úrico endógeno ou substâncias relacionadas à melamina para formar cristais na urina, que causam danos aos rins.

A partir dos dados toxicológicos disponíveis o painel CONTAM (*Panel on Contaminants in the Food Chain* da EFSA) estabeleceu uma ingestão diária

aceitável (IDA) de  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal/dia para a melamina. Esta IDA é considerada apropriada para bebês, exceto para aqueles nascidos prematuramente que têm níveis mais elevados de ácido úrico urinário e maior imaturidade da função renal. No entanto, a IDA para melamina não será aplicável se houver exposição concomitante a ácido cianúrico, amelida ou amelina devido ao potencial aumento para a formação de cristais urinários (EFSA, 2010).

Em 2010, o limite de migração específica de melamina na União Europeia estava estabelecido em  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  de alimento ou simulante e frente a essa avaliação da EFSA, a Comissão Europeia reduziu esse limite para  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de alimentos ou simulante (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

A legislação brasileira possui uma Resolução RDC n. 56/12 na qual estipula o mesmo limite de migração específica (LME) para a melamina sendo a quantidade máxima de transferência permitida de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  em alimento ou simulante (Brasil, 2012). Para o ácido cianúrico, amelida e amelina a legislação de materiais para contato com alimentos não estabelece limites, tanto na União Europeia como no Brasil/MERCOSUL.

A metodologia de análise utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de massas vêm se tornando um método mais eficaz na determinação da melamina e seus análogos pois são mais sensíveis e exatos do que comparados ao método convencional de HPLC com detector UV descrito no método Europeu CEN/TS 13130-27 (COMITE EUROPEU, 2005).

Desta forma, este estudo visou realizar os testes com o método convencional europeu, mas devido aos resultados pouco reprodutíveis em relação ao tempo de retenção, realizou-se o desenvolvimento e a validação de um novo método utilizando o equipamento UPLC-MS/MS de modelo *Ultra Performance Waters Acquity*, o qual se mostrou ser mais específico e sensível na determinação de todos os compostos de interesse.

No Brasil são largamente utilizados utensílios de cozinha à base de melamina, sejam eles fabricados no país, ou importados. Porém, até hoje não se tem dados sobre o potencial de migração da melamina e seus análogos para alimentos nas diversas condições de uso. Em vista dessa ausência de dados, essa pesquisa teve o objetivo de investigar e quantificar a migração de melamina e seus análogos em diferentes tipos de utensílios comercializados no Brasil.

## **2. OBJETIVOS**

O presente estudo visou avaliar o potencial de migração de melamina e seus análogos em utensílios domésticos importados comercializados no Brasil uma vez que não foram encontrados utensílios fabricados no Brasil. O potencial foi avaliado considerando as condições de temperatura reais de uso incluindo o uso repetido. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplado ao espectrômetro de massas sequencial.

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

- Avaliar o potencial de migração da melamina e seus análogos (amelina, amelida e ácido cianúrico) em utensílios domésticos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

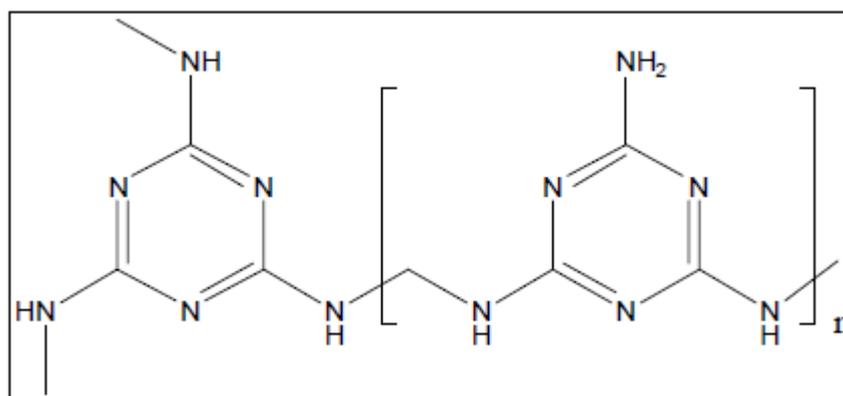
- Desenvolvimento e a validação de um método simultâneo adequado para a determinação de migração de melamina, amelina, amelida e ácido cianúrico;
- Selecionar e avaliar os utensílios domésticos disponíveis no mercado brasileiro;
- Conduzir os ensaios de migração específica, considerando uso repetido;
- Avaliar o potencial de migração de melamina, amelina, amelida e ácido cianúrico;
- Analisar os resultados baseando-se no limite de migração específica permitido pela legislação brasileira/MERCOSUL para determinar se as amostras estão dentro do limite permitido.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A melamina (2,4,6-triamina-1,3,5-triazina) é uma triamina heterocíclica que contém em sua estrutura três grupos amina. Ela foi desenvolvida na década de 1830 pelo químico alemão Liebig, através do aquecimento de tiocianato de potássio

com cloreto de amônio, porém, atualmente este composto orgânico é produzido através da uréia (QUIRÓS *et al.*, 2019).

É utilizada na síntese de resinas melamina-formaldeído produzindo um plástico termofixo denominado 'melamina' ou '*melaware*' (Figura 1). As aplicações típicas de *melaware* são para diversos fins, como a produção de finalizadores de papel, compostos de moldagem, tecidos, adesivos e, principalmente, na produção de plástico. Dentre os que entram em contato com alimentos, estão as canecas, tigelas, xícaras, pratos e outros utensílios de cozinha infantis (EFSA, 2010).



**Figura 1** – Polímero de melamina-formaldeído (Fonte - EFSA, 2010)

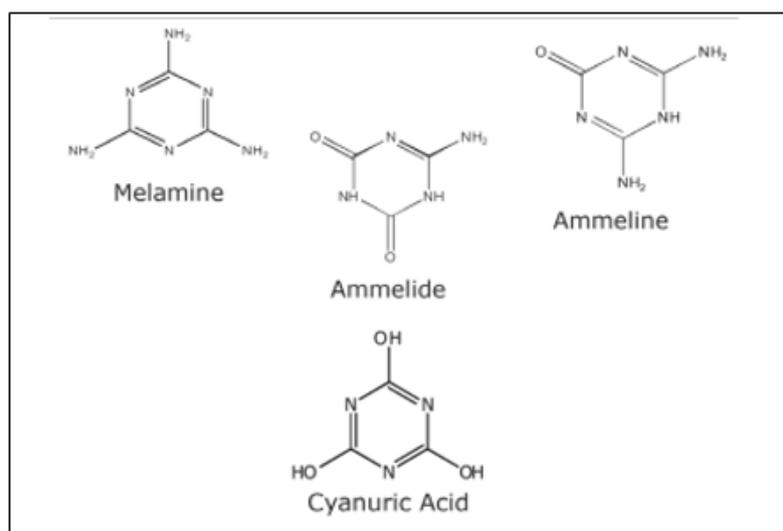
A melamina está muito presente em utensílios domésticos que entram em contato com alimentos. Essa vasta utilização se dá pelo fato de que suas propriedades se adequam às necessidades desse nicho de mercado, pois ela garante boas propriedades ao produto final, tais como resistência a altas temperaturas, fácil moldagem, oferecem grande diversidade à produção e também agregam pouco peso ao produto e conferem alta resistência mecânica.

No ano de 2008 foi descoberta na China uma enorme fraude na indústria de produtos lácteos, através da adição de melamina ao leite, com o intuito de forjar os níveis proteicos do produto, uma vez que o principal método de determinação de proteína (método de *Kjeldahl*) é baseado na quantidade de nitrogênio presente na amostra. Com a adição da melamina, molécula na qual apresenta aproximadamente 66% de nitrogênio, os resultados de proteína do leite adulterado foram significativamente altos, o que agregou valor nutricional ao produto. Porém, essa fraude trouxe consequências a saúde dos consumidores, e foi relatado que a

melamina e seus metabólitos, em níveis muito altos no organismo, geraram a produção de cristais nos rins, causando sérios danos à saúde e podendo levar ao óbito, como foi registrado com seis crianças chinesas (ROVINA; SIDDIQUEE, 2015). A partir desse episódio os estudos com melamina foram intensificados.

A melamina é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal e rapidamente excretada do corpo, com meia-vida de 4-5 horas no rato e no macaco *Rhesus*. Para o ácido cianúrico as informações disponíveis são limitadas, mas também indicam absorção e eliminação rápida através da urina com pouca ou nenhuma biotransformação. Para a amelina e a amelida ainda existem poucas informações disponíveis (EFSA, 2010).

O potencial de melamina para formar cristais é aumentada pela exposição concomitante ao ácido cianúrico. A co-exposição à melamina e ao ácido cianúrico em gado, peixes, animais de estimação e animais de laboratório mostrou maior toxicidade em comparação com melamina ou ácido cianúrico isoladamente, devido à formação de cristal renal. Há evidências limitadas de que a amelida e a amelina também podem formar cristais com a melamina (EFSA, 2010). As informações atualmente disponíveis não permitem a identificação de um fator pelo qual a toxicidade é aumentada pela co-exposição da melamina com seus análogos. A Figura 2 apresenta as estruturas moleculares da melamina, amelina, amelida e ácido cianúrico.



**Figura 2** - Estruturas moleculares de melamina, amelida, amelina e ácido cianúrico (Fonte - Benvenuti e O'Connor (2007)).

## ***Estudos de Migração***

Diversos estudos na literatura apresentam análises da migração da melamina presente em utensílios domésticos para alimentos. Estes são recipientes de vida longa, pois são duráveis e utilizados, na maioria das vezes, diariamente (principalmente os que são destinados às crianças) e entram em contato com diferentes produtos alimentícios, sob diferentes condições (tipo de alimento, temperatura, tempo de contato, uso repetido dentre outros). De acordo com Lund e Petersen (2006) os níveis de migração para alimentos aumentam quando eles estão sob condições de altas temperaturas e pH ácidos. Nesse mesmo trabalho, esses autores estudaram a migração em 10 exposições sucessivas de amostra ao simulante ácido acético 3% por 30 minutos a 95°C. Os resultados indicaram que a migração contínua de formaldeído e melamina ocorre durante a vida útil desses artigos. Isso indica que primeiro a migração de monômeros residuais é mais importante, mas no longo prazo a quebra do polímero domina e a migração continua.

Chien *et al.* (2011) estudaram a migração de melamina de diferentes utensílios domésticos em diferentes temperaturas utilizando a cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC-MS/MS). Os valores de migração variaram bastante (6,97 a 19,03  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) entre as amostras que foram expostas ao ácido acético 3% em temperatura de 90 °C. Concluíram que a quantidade migrada de melamina depende da temperatura, tempo de contato, simulante e também, do preço do utensílio, inferindo que os mais baratos seriam de qualidade inferior sob esse aspecto. Recomenda que os utensílios utilizados na vida cotidiana sejam selecionados com cuidado durante a sua aquisição no mercado de Taiwan.

Bradley *et al.* (2005) avaliaram a migração de melamina e de formaldeído em 50 amostras obtidas no comércio do Reino Unido utilizando o método descrito pela CEN EN13130-27. Dentre as amostras avaliadas, 43 apresentaram a migração de melamina, porém, segundo os autores, nenhuma delas excedeu o limite de migração específica (LME) para melamina em todas as condições de análises. Entretanto, o limite que foi baseado o artigo, foi o de 30  $\text{mg kg}^{-1}$ , o qual atualmente não é mais válido. Desta forma algumas amostras excederiam ao novo limite de 2,5  $\text{mg kg}^{-1}$ . Observou-se que houve o aumento da migração de melamina nas três

repetições com o mesmo corpo de prova na maioria das amostras testadas. Das 50 amostras, 5 excederam o LME para formaldeído segundo as legislações vigentes no país ( $15 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Com base nos resultados obtidos por este estudo a Comissão Europeia e outros Estado-membros da UE foram informados para que tomassem as medidas necessárias para a retirada dos produtos inadequados do mercado.

Ibarra *et al.* (2016) desenvolveram dois métodos rápidos por HPLC-UV para detecção de melamina e seus análogos em simulantes de alimentos após o contato com utensílios domésticos. Foram analisadas 18 amostras e em 8 delas ocorreram a migração, porém encontraram valores de melamina abaixo do limite europeu de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  após o terceiro ensaio. Observou-se que algumas amostras apresentaram rachaduras e a descoloração após os testes de migração. Amelida e amelina não foram detectadas em nenhuma das amostras.

Bradley *et al.* (2010) também estudaram a migração de melamina utilizando diversos simulantes de alimentos, sucos de frutas e bebidas ácidas (suco de maçã, suco de tomate, chá de frutas vermelhas, café, refrigerante de cola) através do método utilizando o LC-MS/MS. Encontraram que a migração em ácido acético 3% (m/v) é comparável à obtida com os sucos de frutas estudados quando aplicado as mesmas condições de tempo e temperatura. Realizaram também, testes com o uso do micro-ondas, e concluíram que, apesar de permanecerem por um menor tempo a alta temperatura, o pico do aquecimento contrabalança o tempo, e gera uma grande migração de melamina. Observaram também que durante o uso pode ocorrer a degradação dos utensílios, o que pode aumentar a migração da melamina.

A cinética da migração de melamina e formaldeído foi estudada por Arce, Sanlloriente e Ortiz (2019) onde utilizaram a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), simulante ácido e condição de contato de  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 horas. Todas as amostras se mantiveram dentro do limite de migração estabelecido, sendo o maior resultado de migração de  $1,28 \text{ mg kg}^{-1}$ . Observaram também que com o uso, a quantidade de melamina migrada pode aumentar, confirmando o já observado por Lund e Petersen (2006).

Já Haghi *et al.* (2017) realizaram a análise da migração de melamina utilizando o método CEN modificado (CEN 2005) através do HPLC-DAD. Foi

utilizado o simulante ácido acético 3% (m/v) com variação de temperatura (30 °C e 90 °C) e de tempo de contato (30 minutos e 90 minutos). O aumento de temperatura e de tempo influenciou diretamente na migração das quatro amostras avaliadas, onde a 90 °C por 90 minutos foi onde se apresentou os maiores valores de migração. De acordo com o artigo, os resultados não ultrapassaram o limite, porém ele se baseia no limite antigo de 30 mg kg<sup>-1</sup>, o qual não é mais utilizado após a atualização e redução para 2,5 mg kg<sup>-1</sup>. Levando em consideração o novo limite, as amostras excedem o limite em algumas das condições, mas principalmente nas condições mais extremas de tempo e temperatura.

Manav *et al.* (2018) avaliaram amostras de Bursa, na Turquia, utilizando o método CEN EN 13130 o qual é avaliado através do HPLC-DAD. O estudo avaliou as amostras utilizando quatro simulantes, sendo eles o ácido acético 3% (m/v), etanol 10% (v/v), etanol 50% (v/v) e óleo vegetal. Concluíram através dos resultados obtidos que, assim como demonstrado em outros estudos, a migração da melamina é diretamente influenciada pelas condições ácidas e temperaturas elevadas. As amostras que foram testadas com o ácido acético 3% (m/v) apresentaram migração em todas as três repetições, mesmo que estando dentro dos limites aceitos pela legislação.

Haghi *et al.* (2021) realizaram a análise de migração com cinco amostras utilizando-se do método oficial Europeu, modificando alguns parâmetros apenas. Em suas análises com a utilização do simulante ácido acético 3% (m/v) as amostras de 1 a 5 apresentaram os seguintes resultados respectivamente: 7,552 mg kg<sup>-1</sup>; 3,224 mg kg<sup>-1</sup>; 5,648 mg kg<sup>-1</sup>; 6,813 mg kg<sup>-1</sup>; 6,323 mg kg<sup>-1</sup>. Como observado, todas as amostras também migraram acima dos 2,5 mg kg<sup>-1</sup> permitido pela legislação.

O Instituto Federal Alemão de Avaliação de Riscos (BfR) avaliou se o uso rotineiro de utensílios de melamina-formaldeído reutilizáveis (xícaras reutilizáveis de café para viagem, xícaras ou pratos infantis) com alimentos líquidos quentes, como café, chá ou comida para bebê, envolve qualquer riscos à saúde. Eles avaliaram 111 amostras de melamina-formaldeído e 180 das chamadas '*bambooware*', o qual é designado para descrever artigos feitos de melamina-formaldeído que envolvem materiais alternativos, como fibras de bambu. Dentre as 111 amostras de melamina-formaldeído, 17 (15%) delas migraram acima do limite permitido estabelecido de 2,5 mg kg<sup>-1</sup>, sendo que o valor máximo de migração

apresentado foi de 8,37 mg kg<sup>-1</sup>. O BfR concluiu que o valor LME é adequado para garantir que os materiais em contato com alimentos não representam risco à saúde. Porém, no cenário de exposição para crianças, a liberação de melamina acima do LME levaria à superação da IDA (ingestão diária aceitável) devido à possível exposição de outras fontes que devem ser consideradas, desta forma, concluíram que isso representaria um risco potencial para a saúde de crianças de até 36 meses. (GERMAN FEDERAL INSTITUTE FOR RISK ASSESSMENT, 2020)

Muller publicou através do Conselho Dinamarquês do Consumidor Think Chemicals (2022) um estudo, onde avaliaram oito amostras de copos de melamina destinados às crianças. Dentre as oito amostras testadas, cinco apresentaram a migração de melamina acima do limite estabelecido de 2,5 mg kg<sup>-1</sup> após o terceiro ensaio de migração, o qual é exigido para produtos de uso contínuo. Os valores de migração variaram entre 2,5 a 5,4 mg kg<sup>-1</sup> e notou-se que a migração de melamina não foi estável entre os três ensaios de cada amostra. O autor recomenda que não sejam utilizados utensílios de melamina para alimentos quentes, e bebidas ácidas e jamais utilizar o utensílio em forno de micro-ondas.

### **Legislação**

Para monitorar riscos, foi criado em 1979 pela Europa, o RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) o qual é uma ferramenta que permite que as informações sejam compartilhadas de maneira eficiente entre os seus membros (autoridades nacionais de segurança alimentar dos Estados-Membros da União Europeia, Comissão, EFSA, ESA, Noruega, Liechtenstein, Islândia e Suíça) para garantir uma reação rápida quando são detectados riscos para a saúde pública na cadeia alimentar na Europa. Graças ao RASFF, muitos riscos à segurança alimentar foram evitados antes que pudessem ser prejudiciais para os consumidores europeus (RASFF 2018). Com relação à melamina e formaldeído, o total de 38 notificações foram recebidas pelo RASFF em 2020, evidenciando a necessidade do monitoramento dessas substâncias. Entre 2021 e 2022 o RASFF apresentou um total de 14 notificações.

Também para facilitar o monitoramento, foi publicado o REGULAMENTO (UE) Nº 284/2011 DA COMISSÃO de 22 de março de 2011 o qual determina requisitos específicos para a liberação da importação de utensílios para alimentos

provenientes da China, após diversas notificações de materiais importados terem registrado níveis acima do permitido pela legislação Europeia, entre eles aqueles fabricados com a resina melamina-formaldeído.

Em 2019 a Comissão Europeia publicou a Recomendação 2019/794 com o objetivo geral de estabelecer um plano de controle e conhecer a prevalência de determinadas substâncias, entre elas a melamina e o formaldeído, que migram de materiais em contato com alimentos ou a presença dessas substâncias no material. Os estados membros devem, portanto, realizar controles oficiais a fim de estabelecer a prevalência no mercado da União Europeia quanto a: 1) a migração de substâncias como aminas aromáticas primárias, melamina e formaldeído, bisfenol A, bisfenol S entre outras substâncias, 2) a presença dessas substâncias em materiais em contato com alimentos, 3) migração geral de materiais plásticos de contato com alimentos.

A CONTAM (*Panel on Contaminants in the Food Chain* da EFSA) estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) de  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal/dia para a melamina.

Já de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, a Ingestão Diária Aceitável (IDA) é de  $0,63 \text{ mg}$  de melamina/kg de peso corporal/dia para que não haja riscos e danos à saúde do consumidor, porém, recentes estudos realizados pela FDA indicaram que o aumento da toxicidade resulta da exposição combinada à melamina e ao ácido cianúrico. Isso gera um alto grau de incerteza em relação à determinação da segurança/risco. Dadas essas condições, a FDA aplicou um fator de segurança adicional de 10 vezes (além do fator de 100 vezes já aplicados anteriormente), resultando em um fator de segurança combinado de 1.000 vezes no total, para compensar as incertezas. Sendo assim,  $0,63 \text{ mg}$  de melamina e seus análogos/kg de peso corporal/dia dividido pelo fator de segurança de 10 vezes, proporciona um valor de  $0,063 \text{ mg}$  de melamina e seus análogos/kg de peso corporal/dia. De acordo com os cálculos da FDA de exposição do consumidor à essas substâncias, o valor de migração de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  deveria considerar a migração da melamina juntamente com seus análogos (FDA, 2008).

Em 2019 a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou a melamina no grupo 2B, como possivelmente carcinogênico em humanos, mas

com evidências suficientes para considerar como carcinogênico para animais, principalmente em doenças do trato urinário de roedores. A classificação dessa agência estabelece a seguinte escala: 1 – carcinogênico para humanos, 2A – provavelmente carcinogênico para humanos, 2B - possivelmente carcinogênico para humanos e 3 – não carcinogênico para humanos. Os análogos amelina, amelida e ácido cianúrico não são classificados pela IARC, ou seja, não são encontradas monografias sobre essas substâncias (IARC, 2019).

No Brasil, apesar do limite para melamina estabelecido na legislação para materiais para contato com alimentos, não se tem o conhecimento se os utensílios domésticos comercializados hoje no Brasil, atendem a essa restrição. (BRASIL, 2012)

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

O método analítico que inicialmente foi utilizado no projeto para determinação da melamina foi baseado na norma CEN/TS 13130-27 de 2005. Porém ao ser aplicado para a análise dos análogos (amelina, amelida e ácido cianúrico), não se obteve bons resultados cromatográficos que pudessem ser efetivos na determinação da migração dos compostos.

Para a realização dos testes com o método europeu para os quatro compostos utilizou-se como fase móvel a acetonitrila de grau HPLC e o tampão fosfato 5 mM pH 6,5. Inicialmente utilizou-se a porcentagem de 75% de acetonitrila (ACN) e 25% de tampão fosfato 5 mM pH 6,5, porém os picos se apresentaram sobrepostos uns sobre os outros, o que impossibilitou a quantificação correta de cada composto. Em seguida realizou-se o teste com algumas variações de gradiente para avaliar se os picos apresentariam uma melhor visualização. A seguir a tabela 1 e 2 apresentam dois testes de gradientes com as fases móveis acetonitrila (%A) e tampão fosfato 5mM pH 6,5 (%B).

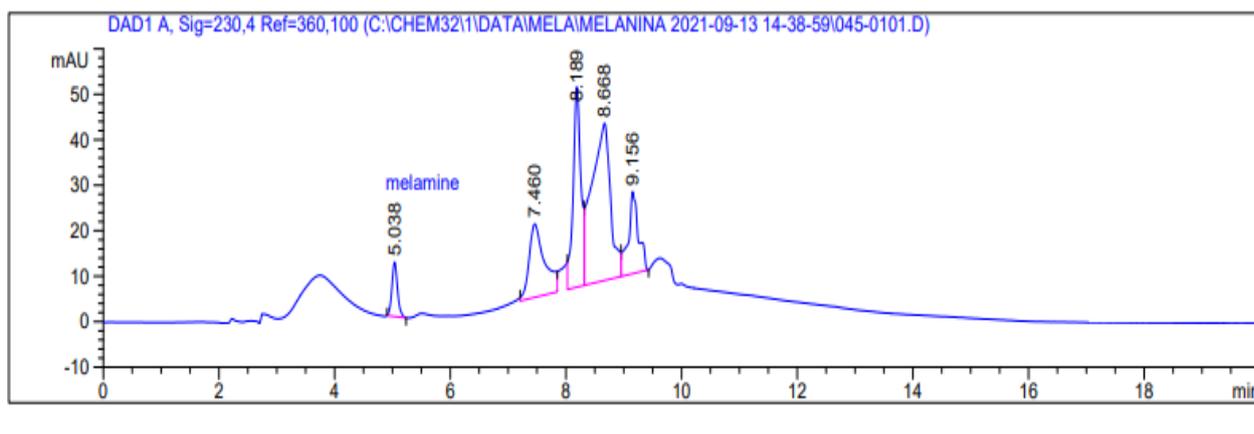
**Tabela 1- Primeiro teste de gradiente das fases móveis acetonitrila (%A) e tampão fosfato 5 mM, pH 6,5 (%B)**

<b>Tempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>%B</b>	<b>Flow (mL/min)</b>	<b>Máx. Pressão (bar)</b>
0,0	75	25	1	400
3,0	80	20	1	400
4,5	85	15	1	400
4,8	90	10	1	400
5,0	95	5	1	400
6,0	100	0	1	400
8,0	85	15	1	400
10,0	75	25	1	400

**Tabela 2- Segundo teste de gradiente das fases móveis acetonitrila (%A) e tampão fosfato 5 mM, pH 6,5 (%B)**

<b>Tempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>%B</b>	<b>Flow (mL/min)</b>	<b>Máx. Pressão (bar)</b>
0,0	75	25	1	400
3,0	70	30	1	400
4,5	65	35	1	400
4,8	60	40	1	400
5,0	55	45	1	400
6,0	50	50	1	400
8,0	60	40	1	400
10,0	70	30	1	400
12,0	75	25	1	400

Após o teste com os gradientes, observou-se uma dificuldade na separação adequadas dos picos cromatográficos para a quantificação adequada dos compostos melamina, amelina, amelida e ácido cianúrico, como é demonstrado na Figura 3 em um dos cromatogramas obtidos no HPLC, onde foi possível identificar a melamina, porém os picos dos outros compostos se sobrepuseram, impossibilitando a identificação e quantificação de cada um.



**Figura 3** – Cromatograma dos compostos melamina, amelina, amelida e ácido cianúrico obtido no HPLC e detector de arrajo de diodos (DAD).

Desta forma, o método utilizado e validado foi através da utilização do equipamento UPLC com detector MS/MS, na faixa de concentração de  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  e de  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ . Foi utilizado o simulante de alimentos ácidos, solução de ácido acético a 3% m/v, o qual esteve em contato com as amostras por 2 horas a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  em três ensaios repetidos sobre o mesmo corpo de prova. Os resultados dos níveis de migração são expressos em miligrama por quilograma ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de simulante ou alimento.

## MATERIAL

### *Amostras*

As amostras estudadas como colheres, pratos, canecas, copos e tigelas de melamina, todas importadas, foram adquiridas no comércio local de Campinas. Não foi encontrado no mercado utensílios de melamina-formaldeído fabricadas no Brasil.

Na tabela 3 as amostras são apresentadas e numeradas.

**Tabela 3 – Amostras adquiridas no mercado.**

Número da Amostra	Amostra	Composição	Origem	Número de Replicatas
1		70% Ureia 30% Melamina	China	5
2		70% Ureia 30% Melamina	China	5
3		70% Ureia 30% Melamina	China	5
4		70% Ureia 30% Melamina	China	5

5		Melamina	China	5
6		Melamina	China	5
7		Melamina	China	5
8		Resina de ureia- formaldeído e melamina	China	5

9		100% Melamina	China	5
10		Resina de ureia-formaldeído e melamina	China	5
11		Melamina	China	5
12		Melamina	China	5
13		Melamina	China	5

14		Melamina	China	5
----	---	----------	-------	---

### **Reagentes**

Foram adquiridos os padrões analíticos das substâncias da marca Sigma-Aldrich:

- Melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina), pureza de 100,8%; CAS 108-78-1
- Ácido cianúrico (1,3,5- triazina-2,4,6-triol, 2,1,6-trihydroxy-1,3,5-triazina), pureza de 100,2%; CAS 108-80-5
- Amelina (2,6-diamino-1H-1,3,5-triazin-4-ona), pureza de 95,5%; CAS 645-92-1
- Amelida (1,3,5-triazina-2,4(1H,3H)-diona, 6-amino), pureza de 98,5%. CAS 645-93-2

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- Metanol grau HPLC, marca Merck, pureza 100% (grau HPLC); CAS 67-56-1
- Água ultrapurificada no Milli-Q (qualidade para HPLC);
- Hidróxido de sódio, marca Merck, pureza 97%; CAS 1310-73-2
- Ácido acético glacial, marca Merck, pureza 100%; CAS 64-19-7

### **Soluções**

- Solução de Hidróxido de Sódio 0,05 M

Foram pesados 0,2 g de NaOH em um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água ultrapurificada até o menisco.

- Solução padrão de melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) em água (1000 mg L<sup>-1</sup>).

Pesou-se 50 mg de melamina em um frasco de 50 mL e diluiu-se com água ultrapurificada. Foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL aproximadamente 40 mL previamente diluídos. Colocou-se o balão por 15 a 30 minutos em um aparelho de ultrassom a 70 °C para dissolver a melamina. Após o esfriamento da solução para temperatura ambiente, o balão volumétrico foi completado até o menisco com água ultrapurificada. Calculou-se a concentração real em miligramas de melamina por litro de solução.

A solução foi armazenada em um recipiente bem fechado ao abrigo de luz por um período máximo de 3 meses, entre temperaturas de -20 °C a 4 °C.

A melamina é pouco solúvel em água, portanto, assegurou-se de que a dissolução foi completa. A preparação de soluções mais concentradas não é viável.

- Soluções padrão intermediária de melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) em água (100 mg L<sup>-1</sup>)

Pipetou-se 2,5 mL da solução padrão de melamina para um balão volumétrico de 25 mL e foi completado com água ultrapurificada até o menisco. Calculou-se a concentração real em miligramas de melamina por litro de solução.

- Solução padrão de amelina (2,6-diamino-1H-1,3,5-triazin-4-ona) em água (100 mg L<sup>-1</sup>).

Pesou-se 2,6 mg de amelina em um frasco de 25 mL e foi realizado a diluição com uma solução de hidróxido de sódio 0,05M conduzido por Ibarra *et al.* (2016) em suas análises para facilitar a dissolução. Transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL aproximadamente 20 mL previamente diluídos. Colocou-se o balão por 15 a 30 minutos em um aparelho de ultrassom a 70 °C para dissolver a amelina. Após esfriada a solução para temperatura ambiente, foi completado o balão volumétrico até o menisco com a solução de hidróxido de sódio 0,05M. Calculou-se a concentração real em miligramas de amelina por litro de solução.

A solução foi armazenada em um recipiente bem fechado ao abrigo de luz por um período máximo de 3 meses, entre temperaturas de -20 °C a 4 °C.

A amelina é pouco solúvel em água, por isso a utilização da solução de hidróxido de sódio 0,05M. Deve-se assegurar de que a dissolução foi completa.

- Solução padrão de amelida (1,3,5-triazina-2,4(1H,3H)-diona, 6-amino) em água (100 mg L<sup>-1</sup>).

Pesou-se 2,6 mg de amelida em um frasco de 25 mL e foi realizado a diluição com uma solução de hidróxido de sódio 0,05M conduzido por Ibarra *et al.* (2016) em suas análises para facilitar a dissolução. Transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL aproximadamente 20 mL previamente diluídos. Colocou-se o balão por 15 a 30 minutos em um aparelho de ultrassom a 70 °C para dissolver a amelida. Após esfriada a solução para a temperatura ambiente, foi completado o balão volumétrico até o menisco com a solução de hidróxido de sódio 0,05M. Calculou-se a concentração real em miligramas de amelida por litro de solução.

A solução foi armazenada em um recipiente bem fechado ao abrigo de luz por um período máximo de 3 meses, entre temperaturas de -20 °C a 4 °C.

A amelida é pouco solúvel em água, por isso a utilização da solução de hidróxido de sódio 0,05M. Deve-se assegurar de que a dissolução foi completa.

- Solução padrão de ácido cianúrico em água (1000 mg L<sup>-1</sup>).

Pesou-se 50 mg de ácido cianúrico em um frasco de 50 mL e foi diluído com água ultrapurificada. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL aproximadamente 40 mL previamente diluídos. Colocou-se o balão por 15 a 30 minutos em um aparelho de ultrassom a 70 °C para dissolver. Após esfriada a solução para a temperatura ambiente, completou-se o balão volumétrico até o menisco com água ultrapurificada. Calculou-se a concentração real em miligramas de ácido acético por litro de solução.

A solução foi armazenada em um recipiente bem fechado ao abrigo de luz por um período máximo de 3 meses, entre temperaturas de -20 °C a 4 °C.

- Soluções padrão intermediária de ácido cianúrico em água (100 mg L<sup>-1</sup>)

Pipetou-se 2,5 mL da solução padrão de ácido cianúrico em um balão volumétrico de 25 mL e completou-se com água ultrapurificada até o menisco. Calculou-se a concentração real em miligramas de ácido acético por litro de solução.

- Solução de ácido acético 3% (m/v) - simulante aquoso ácido

Foi diluído 29,0 mL de ácido acético glacial em um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se com água ultrapurificada até o menisco.

- Solução de ácido acético 0,1% (v/v)

Diluiu-se 1,0 mL de ácido acético glacial em um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se com água ultrapurificada até o menisco.

### **Equipamentos**

- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência, com um injetor automático acoplado a detector por espectrometria de massa sequencial (UPLC-MS/MS) de modelo *Waters Xevo TQD*.
- Coluna em parâmetros estabelecidos e considerados adequados. São estes:
  1. Coluna: AQUITY UPLC BEH C18 (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm)
  2. Temperatura da coluna: 40 °C
  3. Eluentes: 50% metanol grau HPLC/ 50% de ácido acético 0,1% (v/v) em água ultrapurificada.
  4. Volume de injeção: 2 µL
- Banho ultrassônico com aquecedor, modelo USC-1850-A, marca Unique
- Estufa de secagem esterilização, modelo 400/5ND, marca Nova Ética
- Estufa de esterilização e secagem, modelo 400 ND E24, marca Ethik Technology

- Micropipetas, modelo Transferpette, marca Brand
- Termômetro modelo 720, marca Testo
- Termômetro modelo 922, marca Testo
- Balança de precisão modelo PM 6100, marca Mettler
- Balança analítica, modelo MSU225S-1CE-D, marca Sartorius
- Balança analítica, modelo MSA225P-1CE-DA, marca Sartorius

## **MÉTODOS**

### ***Validação do Método***

#### **Otimização das condições de análise dos compostos no UPLC-MS/MS**

A otimização foi realizada por infusão direta de cada solução de melamina e derivados na concentração de 2 mg kg<sup>-1</sup> no detector por espectrometria de massa sequencial (MS/MS).

As condições do espectrômetro de massas do Xevo TQD, Waters encontram-se abaixo:

- Fonte de ionização: eletrospray, modo positivo e negativo
- Voltagens do capilar: 3,7 kV (modo positivo) e 2,60 kV (modo negativo)
- Temperatura de dessolvatação: 250 °C
- Fluxo do gás de dessolvatação: 550 L/Hr
- Temperatura da fonte: 150 °C

A fase móvel utilizada para a cromatografia foi 50% metanol grau HPLC/ 50% de ácido acético 0,1% (v/v) em água ultrapurificada.

### **Figuras de Mérito**

Para a validação do método foi utilizado o documento orientativo do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (orientação sobre validação de métodos analíticos) (INMETRO, 2020).

Foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação).

### **Linearidade**

Para a avaliação da linearidade, construiu-se a curva analítica com as concentrações aproximadas de 2, 4, 6, 8, e 10 mg kg<sup>-1</sup> para as amostras padrões de melamina, ácido cianúrico, amelina e amelida.

Para o preparo da curva analítica, primeiramente foram preparadas soluções padrões de melamina, ácido cianúrico, amelina e amelida como descritos no item soluções. Foram feitas as diluições das soluções intermediárias de 100 mg mL<sup>-1</sup> previamente corrigidas, em solução de ácido acético a 3% (m/v) para se obter o mix dos compostos com as concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 mg kg<sup>-1</sup>.

Cada solução foi filtrada em filtro de PTFE 0,2 µm. Cada nível da curva analítica foi injetado em triplicata.

Uma segunda curva foi preparada com concentrações menores de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 e 2 mg kg<sup>-1</sup> para a determinação dos limites de quantificação e detecção, preparadas através de soluções de 10 mg mL<sup>-1</sup> das quatro substâncias, e diluídas em ácido acético 3% (m/v).

### **Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)**

Para o limite de detecção e quantificação foram preparadas 7 soluções independentes nas concentrações de 0,05 mg kg<sup>-1</sup> do mix contendo os quatro compostos.

Foram preparadas sete replicatas independentes através da diluição das soluções intermediárias de 10 mg kg<sup>-1</sup> em solução de ácido acético a 3% (m/v) para se obter o mix dos compostos com a concentração de 0,05 mg kg<sup>-1</sup>.

Cada solução foi filtrada em filtro de PTFE 0,2 µm. Cada solução foi injetada em duplicata.

Para o cálculo do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram utilizadas as equações 1 e 2 as quais as médias do branco não foram consideradas uma vez que não há nenhuma interferência nas amostras do branco:

$$LD = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot s \quad (\text{eq. 1})$$

Sendo:

t: abcissa da distribuição de *Student*, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança.

s: desvio padrão amostral dos brancos da amostra, com adição da menor concentração aceitável do analito.

$$LQ = 10 \cdot s \quad (\text{eq. 2})$$

Sendo:

s: desvio padrão amostral dos brancos da amostra, com adição da menor concentração aceitável do analito.

## **Precisão**

Para avaliar a precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método foram utilizadas três concentrações diferentes (baixa, média e alta), cujos valores foram 2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup> de cada composto, sendo que para cada concentração foram preparadas sete soluções (replicatas) independentes.

Foram feitas sete replicatas independentes através da diluição das soluções intermediárias de 100 mg mL<sup>-1</sup> (descritas no item soluções) em solução de ácido acético a 3% (m/v) para se obter o mix dos compostos com as concentrações de 2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup>.

Cada solução foi filtrada em filtro de PTFE 0,2 µm. As sete replicatas nas três concentrações (baixa, média e alta) foram injetadas em triplicata. Os valores foram calculados com base em uma curva de calibração de 2, 4, 6, 8, 10 mg kg<sup>-1</sup> provenientes de soluções diferentes.

Para avaliar a precisão intermediária, as soluções acima foram injetadas no equipamento em três dias diferentes.

A precisão foi determinada através coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR), expresso em porcentagem (%) conforme a equação 3 abaixo:

$$CV = DPR = (DP/CMD) \times 100 \quad (eq. 3)$$

Sendo:

DP: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

CMD: concentração média determinada

### **Exatidão**

Para avaliar a exatidão (recuperação) do método foram utilizadas três concentrações diferentes (baixa, média e alta), cujos valores foram 2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup> de cada composto, sendo que para cada concentração foram preparadas sete soluções (replicatas) independentes.

Para o preparo das soluções da exatidão, foram feitas as diluições das soluções intermediárias de 100 mg mL<sup>-1</sup> (descritas no item soluções) em solução de ácido acético a 3% (m/v) para se obter o mix dos compostos com as concentrações de 2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup>. As sete replicatas nas três concentrações foram injetadas em triplicata. Os valores foram calculados com base em uma curva de calibração de 2, 4, 6, 8, 10 mg kg<sup>-1</sup> provenientes de soluções diferentes.

Para esse ensaio, as soluções de concentrações de 2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup> foram filtradas em filtro de PTFE 0,2 µm e colocadas em *vials* de 1,5 mL. Em seguida foram colocadas na estufa à temperatura de 70 °C/ 2 horas e após o término do tempo, foram injetadas no LC-MS/MS.

A exatidão foi expressa em porcentagem (%) conforme a equação 4:

$$Exatidão (\%) = (valor observado)/(valor esperado) \times 100 \quad (eq. 4)$$

## **Ensaio de migração**

De acordo com o guia técnico EUR 24815 EN (Simoneau, C. 2011), as amostras foram obtidas com no mínimo 5 corpos de prova de cada uma. Em sequência foram realizados os cálculos para a determinação da área da superfície de contato de acordo com a CEN EN 13130 que determina que a relação superfície-volume no teste é convencionalmente de 6 dm<sup>2</sup> de área de contato com alimentos para 1000 mL de simulante de alimentos. As amostras foram preenchidas com o simulante ácido aquoso (solução de ácido acético 3% m/v) em temperatura ambiente e colocadas em uma estufa na temperatura de 70 °C por 2 horas. Iniciou-se a contagem do tempo à partir do momento em que o controle atingiu a temperatura de 70°C.

Por se tratarem de utensílios domésticos de uso repetido, os ensaios de migração ocorreram por três vezes seguidas sobre o mesmo corpo de prova, como determina a legislação Resolução RDC 51/2010. (BRASIL, 2010)

Para as amostras em branco, foi adicionado o simulante em um béquer, e colocadas sob as mesmas condições de teste.

Após finalizado o tempo de contato, esperou-se a redução da temperatura do simulante até temperatura ambiente e a correção do peso de cada amostra devido à evaporação ocorrida mesmo que com todas as amostras cobertas com vidro. Em seguida as amostras foram coletadas, filtradas e transferidas para os *vials* de 1,5 mL adequados para a análise no UPLC-MS/MS.

Os resultados foram avaliados através do teste de estatística ANOVA e Teste T do Excel da *Microsoft* 365.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO**

Durante os testes iniciais para o desenvolvimento dos métodos, realizou-se o teste com os eluentes acetato de amônia 10 mM e acetonitrila, assim como fez Benvenuti e O'Connor (2007) e Li *et al.* (2019), porém avaliou-se que a intensidade

dos picos gerados com estes eluentes não havia sido tão considerável quando comparados ao uso de metanol e ácido acético 0,1% v/v.

Para a otimização das condições no UPLC-MS/MS da melamina e análogos no espectrômetro de massas, a voltagem do cone foi de 20 até 100 V. Para o monitoramento de reação selecionada (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*), a transição dos íons produtos foi monitorada e as energias de colisões foram otimizadas entre 2-80 V.

A otimização dessas voltagens foi realizada por infusão direta no espectrômetro de massas a  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  da solução individual de aproximadamente  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  para cada substância em água ultrapurificada. A Tabela 4 mostra os íons precursores e íons produtos, voltagem do cone e energias de colisão selecionadas para cada substância.

**Tabela 4: Íon precursor, íon produto, *dwell time*, voltagem do cone, energia de colisão e voltagem do cone para o espectrômetro de massas do LC.**

Compostos	Íon Precursor <i>m/z</i>	Íon Produto <i>m/z</i>	<i>Dwell time</i> (s)	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão (V)
Melamina (modo positivo)	127	85	0,070	40	25
		68	0,070	40	17
Amelida (modo positivo)	129	87	0,070	32	30
		43	0,070	32	16
Amelina (modo positivo)	128	86	0,070	37	24
		43	0,070	37	16
Ácido cianúrico (modo negativo)	128	42	0,070	25	10
		85	0,070	25	13

### **Linearidade**

Para a linearidade foi utilizado o método de padronização externa, empregando a melamina, ácido cianúrico, amelina e amelida na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Foram utilizados 5 níveis de concentração (2, 4, 6, 8 e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Os resultados obtidos através da equação da reta e o coeficiente de correlação (r) encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5: Parâmetros da curva analítica abrangendo o intervalo de 2-10 mg kg<sup>-1</sup> e coeficiente de correlação (r) para o LC-MS/MS.**

<b>Compostos</b>	<b>Curva analítica 2-10 mg kg<sup>-1</sup> r</b>
Melamina	$y = 66727,6 + 20061,7x$ $r = 0,99$
Ácido Cianúrico	$y = 376,2 + 127,3x$ $r = 0,99$
Amelina	$y = 102945 + 13941,4x$ $r = 0,99$
Amelida	$y = 66707,5 + 83204,7x$ $r = 0,99$

A Tabela 6 contempla o limite de detecção e de limite de quantificação.

**Tabela 6: Limite de detecção e limite de quantificação para o LC-MS/MS.**

<b>Compostos</b>	<b>LD<sup>(1)</sup> mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>LQ<sup>(1)</sup> mg kg<sup>-1</sup></b>
Melamina	0,002	0,010
Ácido Cianúrico	0,010	0,033
Amelina	0,003	0,010
Amelida	0,004	0,013

<sup>(1)</sup> :7 replicatas

### **Precisão**

A precisão e a precisão intermediária foram avaliadas através da repetibilidade e para isto foram utilizadas três concentrações diferentes para cada composto (2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup>), com sete soluções para cada concentração.

Para as concentrações de 2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup>, o critério de aceitação para a repetibilidade em relação ao coeficiente de variação em % é de até 11%, valor esse baseado no DOC-CGRE-008 (INMETRO, 2020).

Os resultados da precisão (repetibilidade) e precisão intermediária nas concentrações de 2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup> podem ser vistos na Tabela 7 e 8, respectivamente.

**Tabela 7: Precisão (repetibilidade) para três concentrações (2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup>) para o LC-MS/MS.**

Compostos Concentração	Repetibilidade <sup>(1)</sup> - RSD %								
	2.5 mg kg <sup>-1</sup>			5 mg kg <sup>-1</sup>			9 mg kg <sup>-1</sup>		
	Dia			Dia			Dia		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Melamina	5	4	4	6	2	4	3	3	2
Ácido Cianúrico	8	10	11	3	6	8	5	4	5
Amelina	4	4	5	2	3	2	3	3	2
Amelida	11	10	10	9	6	5	5	5	4

<sup>(1)</sup>: 7 replicatas

**Tabela 8: Precisão intermediária para três concentrações (2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup>) para o LC-MS/MS.**

Compostos Concentração	Precisão intermediária <sup>(1)</sup> - RSD %		
	2,5 mg kg <sup>-1</sup>	5 mg kg <sup>-1</sup>	9 mg kg <sup>-1</sup>
	Dia 1, 2 e 3	Dia 1, 2 e 3	Dia 1, 2 e 3
Melamina	11	7	3
Ácido Cianúrico	11	6	9
Amelina	7	4	6
Amelida	10	6	8

<sup>(1)</sup>: 7 replicatas

### **Exatidão**

A exatidão, expressa em porcentagem, nas concentrações de 2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup> ficou entre 88-105%. Os valores encontrados estavam dentro do intervalo exigido pelo INMETRO (INMETRO, 2020), que para a concentração de 2,5, 5 e 9 mg kg<sup>-1</sup> é de 80-110%. Todos os valores encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9: Exatidão (recuperação) para três concentrações (2,5, 5 e 9 mg.kg<sup>-1</sup>) para o LC-MS/MS.**

Exatidão <sup>(1)</sup> (%)			
Compostos	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )		
	2,5	5	9
Melamina	90	101	96
Ácido Cianúrico	100	105	88
Amelina	96	103	96
Amelida	89	102	94

<sup>(1)</sup>: 7 replicatas

O método desenvolvido e validado se mostrou eficiente para a determinação de melamina, amelina, amelida e ácido cianúrico.

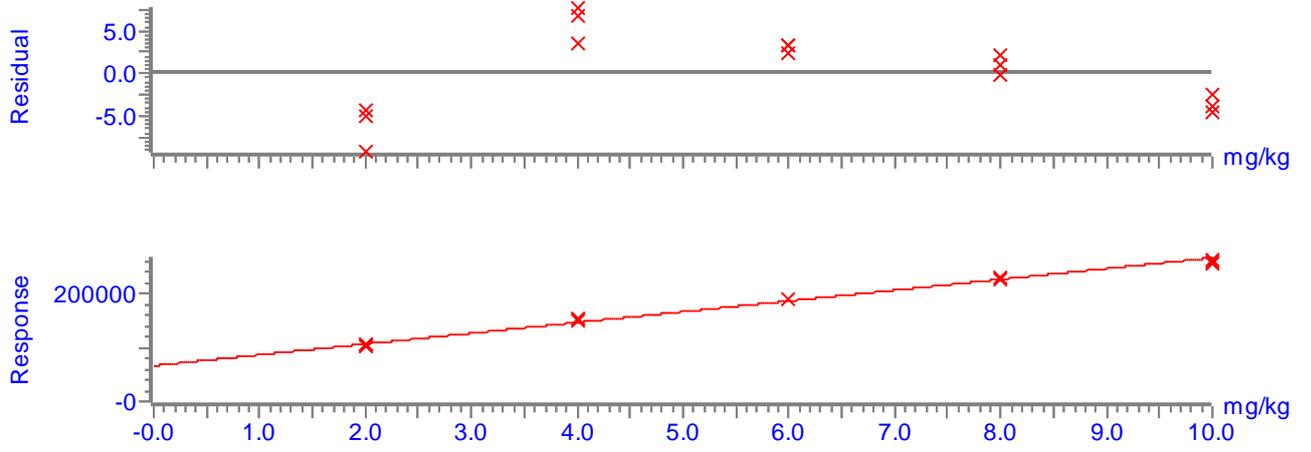
A utilização da cromatografia líquida acoplada ao detector de massas tem se tornado cada vez maior por pesquisadores. De acordo com Yuan *et al.* (2012), a espectrometria de massas fornece o mais alto grau de seletividade, seguida por MS de estágio único, detecção de arranjo de diodos (DAD) e, por último, absorção ultravioleta (UV). Este fator influenciou diretamente na escolha da utilização do UPLC-MS/MS para o desenvolvimento da análise, após o teste realizado com o método oficial (EN 13130-27) no HPLC-UV não ter se mostrado eficaz na separação dos quatro compostos de interesse uma vez que os picos estavam se juntando tornando impossível a quantificação de cada composto.

A etapa de validação demonstrou uma boa eficácia do método como pôde ser observado nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Ibarra *et al.* (2016) apresentaram valores de LD em 0,10 mg L<sup>-1</sup> para a melamina; 2,00 mg L<sup>-1</sup> para amelida; 1,00 mg L<sup>-1</sup> para amelina. Valores acima do que foi obtido no desenvolvimento deste método.

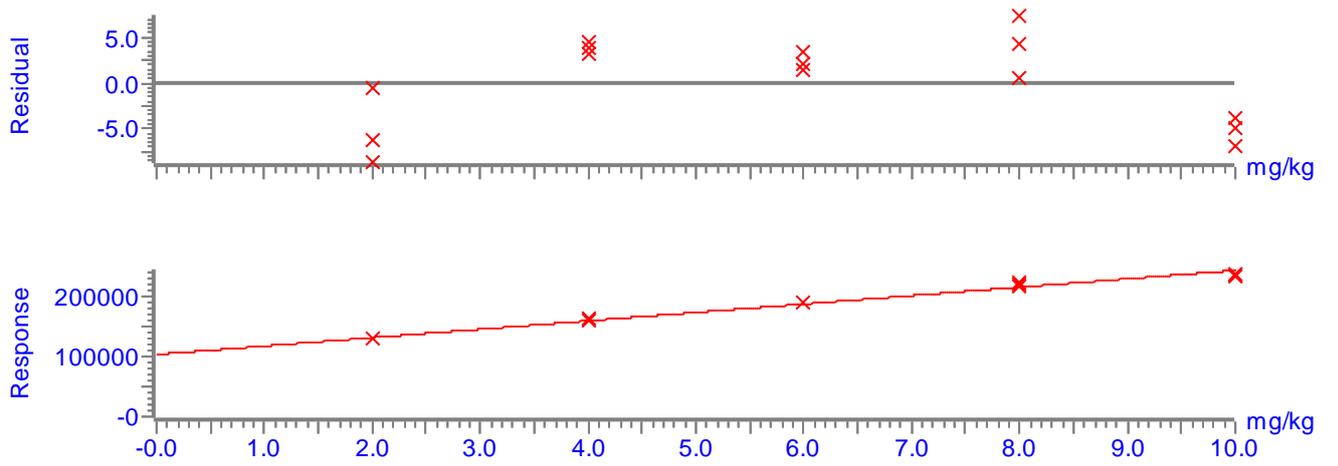
Haghi *et al.* (2017) apresentaram para a melamina valores de 0,145 mg kg<sup>-1</sup> para o LD; 0,435 mg kg<sup>-1</sup> para o LQ; 95,3% para a precisão e 94,9% de exatidão (recuperação).

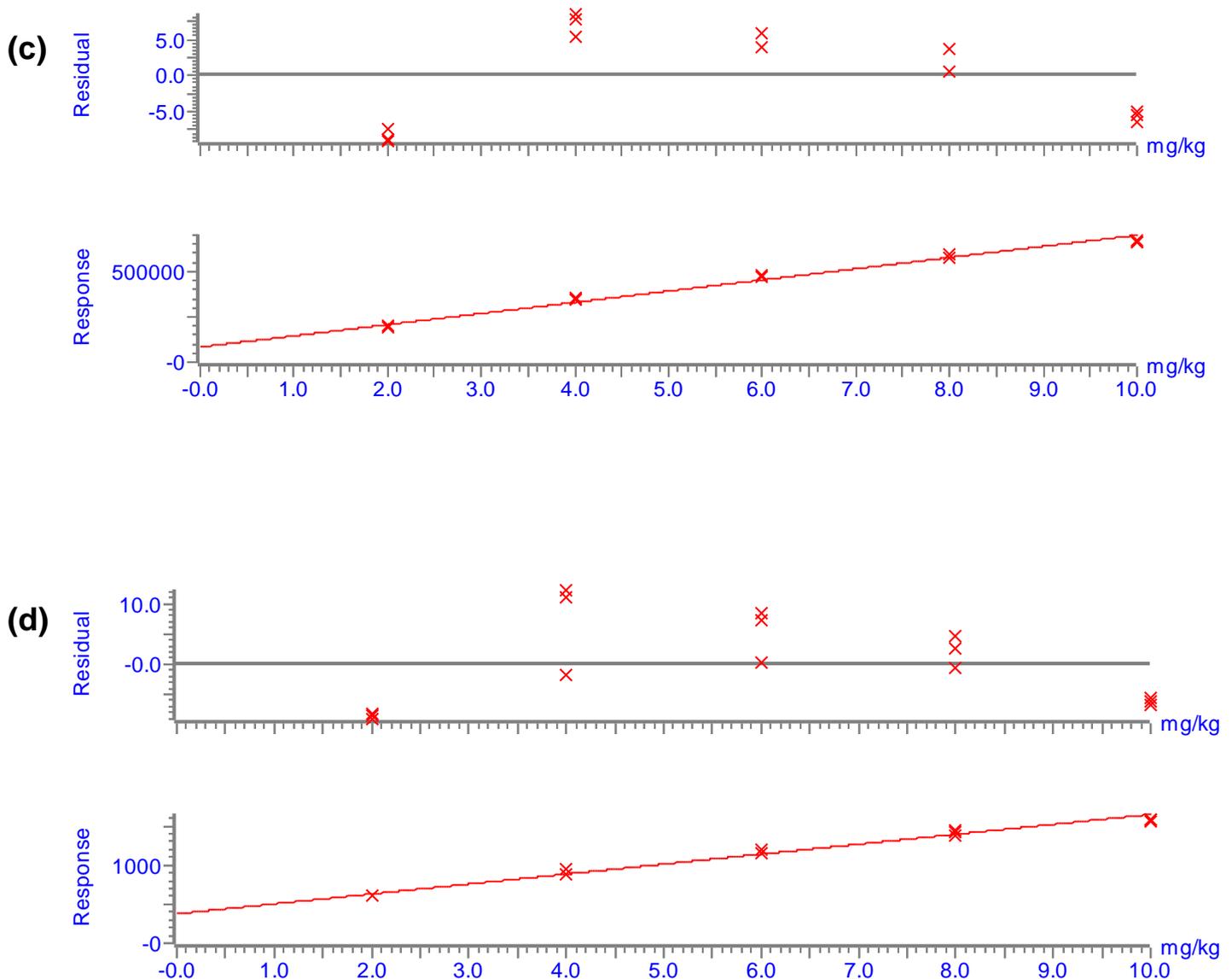
As curvas analíticas, nas concentrações de 2 mg kg<sup>-1</sup> a 10 mg kg<sup>-1</sup> da melamina, amelina, amelida e ácido cianúrico estão apresentadas na Figura 4.

(a)



(b)

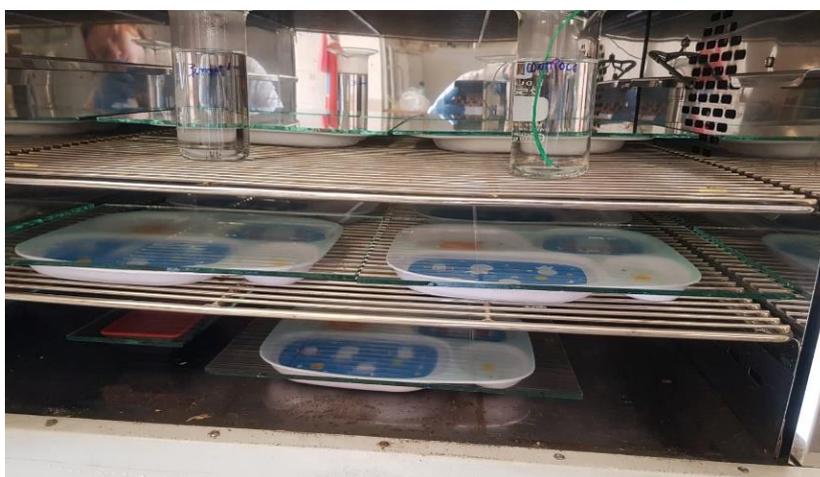




**Figura 4** - Curvas de concentração de 2 mg kg<sup>-1</sup> a 10 mg kg<sup>-1</sup> de melamina (a), amelina (b), amelida (c) e ácido cianúrico (d), respectivamente.

## ANÁLISE DE MIGRAÇÃO

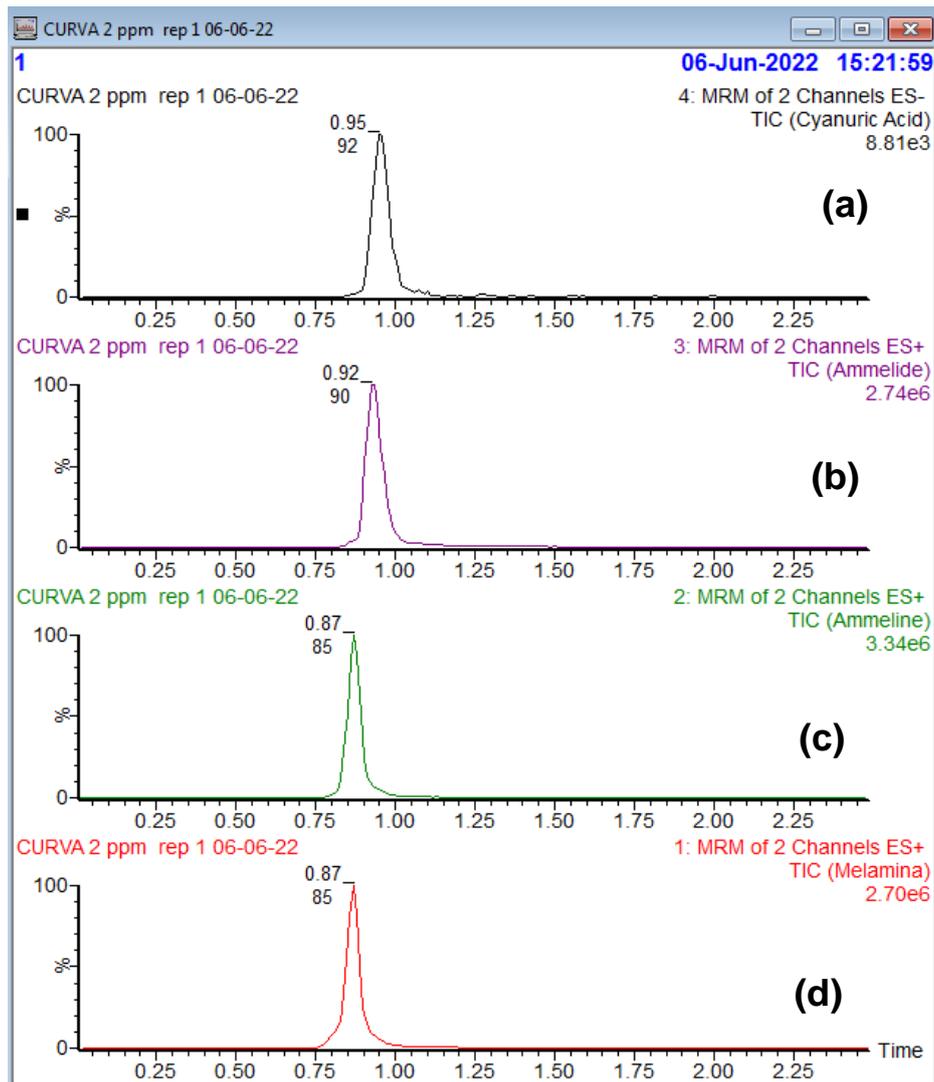
As amostras foram preenchidas com o simulante solução de ácido acético 3% m/v e inseridas nas estufas, onde permaneceram por duas horas a uma temperatura de 70 °C. A seguir, a Figura 5 ilustra as imagens de como as amostras foram dispostas na estufa, todas tampadas com vidro, para evitar a perda do simulante por evaporação.



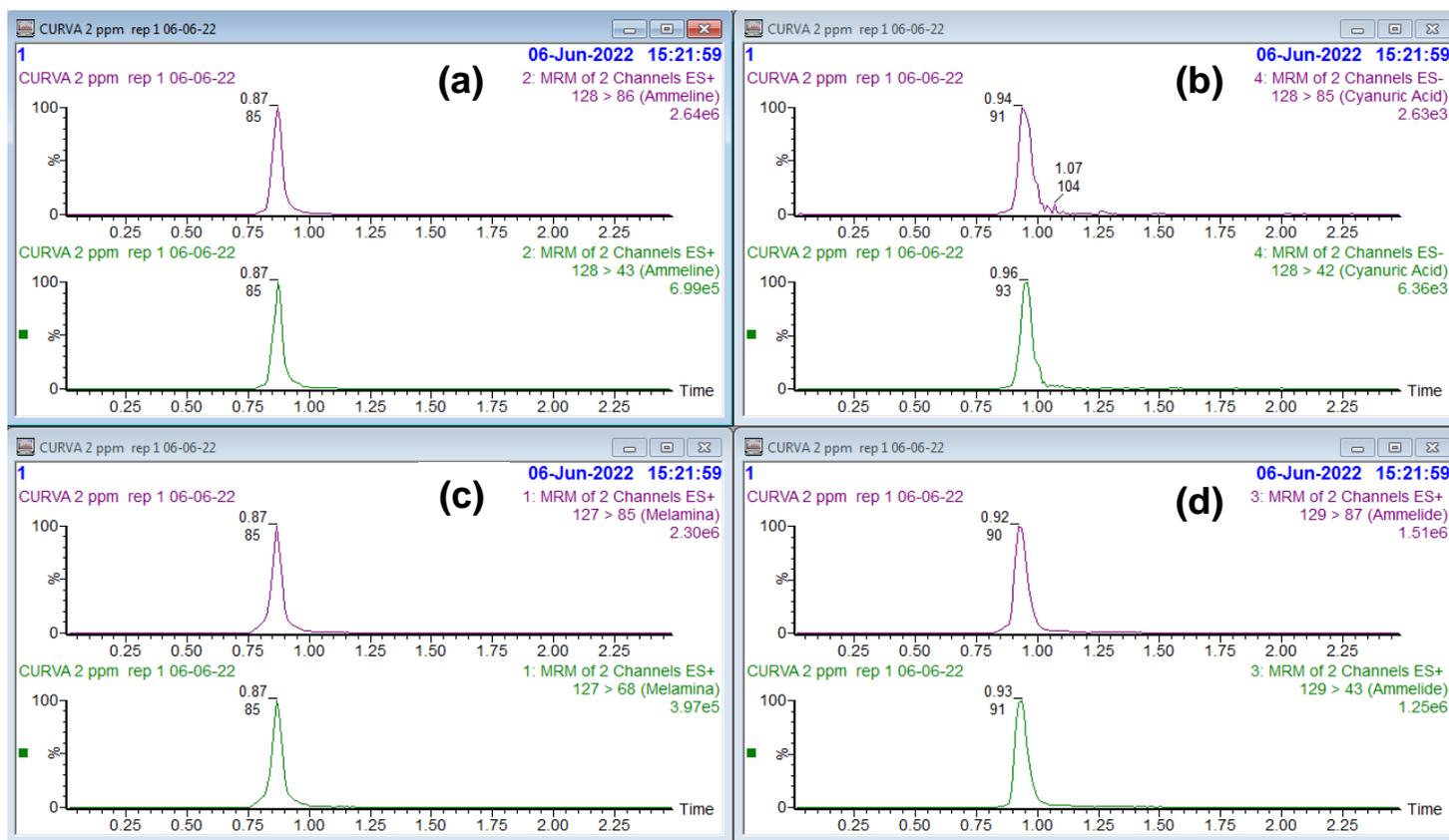
**Figura 5** - Amostras dispostas dentro das estufas.

Após o tempo de contato do simulante ácido acético 3% m/v com as amostras, elas foram coletadas e parte foi armazenada sob congelamento, parte foi filtrada em filtro PTFE 0,2  $\mu\text{m}$ , em seguida analisados no UPLC-MS/MS para avaliar os níveis de migração de cada amostra. Cada solução obtida na migração foi injetada por três vezes no equipamento para se obter uma média entre os resultados. O ensaio foi repetido três vezes no mesmo corpo de prova segundo descrito acima.

A Figura 6 apresenta os cromatogramas de íons totais (TIC) do UPLC-MS/MS dos quatro compostos analisados e a Figura 7 apresenta o SRM (*selected reaction monitoring*).



**Figura 6** - Cromatograma de íons totais (TIC) na concentração de 2 mg kg<sup>-1</sup> do ácido cianúrico (a), amelida (b), amenila (c) e melamina (d).



**Figura 7 - Selected reaction monitoring (SRM) da amelina (a), ácido cianúrico (b), melamina (c) e amelida (d).**

A Tabela 10 apresenta os resultados do teste de migração das 14 amostras analisadas.

**Tabela 10- Concentração de melamina e análogos obtidos em ácido acético 3% (m/v) para as amostras de utensílios domésticos em UPLC-MS/MS.**

<b>Amostras (n=5)*</b>							
<b>Concentração em mg.kg<sup>-1</sup> (Desvio Padrão)</b>							
<b>Número da amostra (origem)</b>	<b>Material</b>	<b>Migração</b>	<b>Melamina</b>	<b>Ácido Cianúrico</b>	<b>Amelina</b>	<b>Amelida</b>	
<b>1</b>	(China)	70% Ureia	1 <sup>a</sup>	25 (8) <sup>a</sup>	0,06 (0,01) <sup>a</sup>	0,20 (0,03) <sup>a</sup>	<LQ
		30% Melamina	2 <sup>a</sup>	9,7 (5,0) <sup>b</sup>	0,05 (0,02) <sup>b</sup>	0,16 (0,04) <sup>b</sup>	<LQ
			3 <sup>a</sup>	11 (5) <sup>b</sup>	0,05 (0,01) <sup>b</sup>	0,17 (0,04) <sup>b</sup>	<LQ
			4 <sup>a</sup>	10 (6) <sup>b</sup>	0,05 (0,02) <sup>c</sup>	0,16 (0,06) <sup>c</sup>	-
<b>2</b>	(China)	70% Ureia	1 <sup>a</sup>	<LQ	<LQ	-	-
		30% Melamina	2 <sup>a</sup>	-	<LQ	-	-
			3 <sup>a</sup>	-	<LQ	-	-
<b>3</b>	(China)	70% Ureia	1 <sup>a</sup>	0,45 (0,09) <sup>a</sup>	<LQ	<LQ	-
		30% Melamina	2 <sup>a</sup>	0,09 (0,01) <sup>b</sup>	<LQ	-	-
			3 <sup>a</sup>	0,10 (0,02) <sup>c</sup>	<LQ	-	-
<b>4</b>	(China)	70% Ureia	1 <sup>a</sup>	-	<LQ	-	-
		30% Melamina	2 <sup>a</sup>	-	<LQ	-	-
			3 <sup>a</sup>	-	<LQ	-	-
<b>5</b>	(China)	Melamina	1 <sup>a</sup>	5,1 (0,8) <sup>a</sup>	<LQ	0,09 (0,02) <sup>a</sup>	-
			2 <sup>a</sup>	8,6 (5,3) <sup>b</sup>	0,04 (0,01) <sup>a</sup>	0,12 (0,03) <sup>b</sup>	<LQ
			3 <sup>a</sup>	7,8 (3,9) <sup>a,c</sup>	0,04 (0,02) <sup>a</sup>	0,13 (0,04) <sup>b</sup>	<LQ
			4 <sup>a</sup>	6,3 (2,0) <sup>c</sup>	0,05 (0,02) <sup>b</sup>	0,16 (0,05) <sup>c</sup>	-
<b>6</b>	(China)	Melamina	1 <sup>a</sup>	53 (19) <sup>a</sup>	0,17 (0,04) <sup>a</sup>	0,39 (0,07) <sup>a</sup>	0,02 (0,00) <sup>a</sup>
			2 <sup>a</sup>	17 (13) <sup>b</sup>	0,10 (0,05) <sup>b</sup>	0,25 (0,09) <sup>b</sup>	<LQ
			3 <sup>a</sup>	45 (49) <sup>a,b</sup>	0,15 (0,08) <sup>a,b</sup>	0,35 (0,15) <sup>a</sup>	0,02 (0,00) <sup>a</sup>
			4 <sup>a</sup>	33 (24) <sup>a,c</sup>	0,06 (0,03) <sup>c</sup>	0,15 (0,06) <sup>c</sup>	-
<b>7</b>	(China)	Melamina	1 <sup>a</sup>	82(46) <sup>a</sup>	0,26 (0,08) <sup>a</sup>	0,73 (0,21) <sup>a</sup>	0,03 (0,01) <sup>a</sup>
			2 <sup>a</sup>	32 (19) <sup>b</sup>	0,13 (0,05) <sup>b</sup>	0,41 (0,14) <sup>b</sup>	<LQ
			3 <sup>a</sup>	51 (34) <sup>b</sup>	0,20 (0,10) <sup>a</sup>	0,57 (0,27) <sup>a,b</sup>	0,03 (0,01) <sup>a</sup>
			4 <sup>a</sup>	7,1 (6,4) <sup>c</sup>	0,02 (0,02) <sup>c</sup>	0,05 (0,06) <sup>c</sup>	-

<b>8</b>	(China)	Resina de ureia-formaldeído e melamina	1 <sup>a</sup>	-	<LQ	-	-
			2 <sup>a</sup>	-	<LQ	-	-
			3 <sup>a</sup>	-	<LQ	-	-
<b>9</b>	(China)	100% Melamina	1 <sup>a</sup>	21 (2) <sup>a</sup>	0,07 (0,01) <sup>a</sup>	0,06 (0,01) <sup>a</sup>	-
			2 <sup>a</sup>	3,3 (0,7) <sup>b</sup>	0,05 (0,01) <sup>b</sup>	0,02 (0,01) <sup>b</sup>	-
			3 <sup>a</sup>	7,4 (1,7) <sup>c</sup>	0,06 (0,01) <sup>c</sup>	0,03 (0,01) <sup>c</sup>	-
<b>10</b>	(China)	Resina de ureia-formaldeído e melamina	1 <sup>a</sup>	74 (42) <sup>a</sup>	0,25 (0,06) <sup>a</sup>	0,81 (0,18) <sup>a</sup>	0,04 (0,02) <sup>a</sup>
			2 <sup>a</sup>	25 (5) <sup>b</sup>	0,17 (0,03) <sup>b</sup>	0,55 (0,09) <sup>b</sup>	0,02 (0,01) <sup>b</sup>
			3 <sup>a</sup>	59 (25) <sup>a</sup>	0,24 (0,06) <sup>a</sup>	0,74 (0,14) <sup>a</sup>	0,04 (0,01) <sup>a</sup>
			4 <sup>a</sup>	130 (112) <sup>a,c</sup>	0,71 (0,36) <sup>c</sup>	1,58 (0,74) <sup>c</sup>	0,05 (0,02) <sup>a</sup>
<b>11</b>	(China)	Melamina	1 <sup>a</sup>	75 (48) <sup>a</sup>	0,23 (0,09) <sup>a</sup>	0,51 (0,16) <sup>a</sup>	0,03 (0,01) <sup>a</sup>
			2 <sup>a</sup>	22 (9) <sup>b</sup>	0,14 (0,04) <sup>b</sup>	0,36 (0,10) <sup>b</sup>	0,02 (0,01) <sup>b</sup>
			3 <sup>a</sup>	60 (43) <sup>a</sup>	0,21 (0,09) <sup>c</sup>	0,48 (0,18) <sup>a</sup>	0,02 (0,01) <sup>a</sup>
			4 <sup>a</sup>	2,8 (2,0) <sup>b</sup>	0,01 (0,01) <sup>c</sup>	0,02 (0,02) <sup>c</sup>	-
<b>12</b>	(China)	Melamina	1 <sup>a</sup>	0,01 (0,01)	<LQ	-	-
			2 <sup>a</sup>	-	<LQ	-	-
			3 <sup>a</sup>	-	0,04 (0,02)	-	-
<b>13</b>	(China)	Melamina	1 <sup>a</sup>	123 (42) <sup>a</sup>	0,35 (0,09) <sup>a</sup>	0,87 (0,20) <sup>a</sup>	0,04 (0,01) <sup>a</sup>
			2 <sup>a</sup>	53 (28) <sup>b</sup>	0,19 (0,05) <sup>b</sup>	0,47 (0,21) <sup>b</sup>	0,02 (0,01) <sup>b</sup>
			3 <sup>a</sup>	100 (130) <sup>a</sup>	0,45 (0,29) <sup>a</sup>	0,97 (0,64) <sup>a</sup>	0,06 (0,04) <sup>a</sup>
			4 <sup>a</sup>	15 (10) <sup>c</sup>	0,08 (0,04) <sup>c</sup>	0,16 (0,12) <sup>c</sup>	-
<b>14</b>	(China)	Melamina	1 <sup>a</sup>	52 (24) <sup>a</sup>	0,14 (0,03) <sup>a</sup>	0,43 (0,09) <sup>a</sup>	0,02 (0,01) <sup>a</sup>
			2 <sup>a</sup>	40 (36) <sup>a</sup>	0,17 (0,07) <sup>a</sup>	0,48 (0,16) <sup>a</sup>	0,02 (0,01) <sup>a</sup>
			3 <sup>a</sup>	110 (89) <sup>b</sup>	0,38 (0,14) <sup>b</sup>	0,90 (0,27) <sup>b</sup>	0,05 (0,02) <sup>b</sup>
			4 <sup>a</sup>	29 (24) <sup>a</sup>	0,15 (0,05) <sup>c</sup>	0,38 (0,11) <sup>c</sup>	-

\*= 5 replicatas

LQ - Limite de Quantificação

( - ) Não detectado

Diferentes letras sobrescritas indicam diferenças estatísticas entre os ensaios de migração para cada amostra considerando  $p \leq 0,05$ .

As amostras que se apresentaram acima de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  estabelecido na legislação brasileira foram submetidas a um quarto (4<sup>a</sup>) ensaio de migração.

Algumas amostras apresentaram valores de migração muito acima dos 10 mg kg<sup>-1</sup> da curva analítica, sendo assim foi realizada a diluição de grande parte dos ensaios de migração para se obter resultados mais exatos dentro dos parâmetros da curva e em seguida recalculados em cima de cada diluição realizada.

As análises foram realizadas utilizando somente o simulante solução de ácido acético 3% (m/v), pois este é o simulante mais crítico e o que mais apresenta níveis de migração em estudos de diversos outros autores.

Como demonstrado na Tabela 10, dentre as 14 amostras analisadas, muitas delas apresentaram altos níveis de migração de melamina, com valores de até 130 mg kg<sup>-1</sup>, estando apenas 5 dentro do limite de migração específica (LME) estabelecido pela Resolução RDC nº 56/12, que é de 2,5 mg kg<sup>-1</sup>. (BRASIL, 2012)

Este resultado é bem preocupante, levando em conta que a maior parte das amostras são destinadas ao uso de crianças e por se tratar de valores muito acima do permitido. Observou-se um padrão na migração de melamina, em que todas as amostras (exceto a de número 5), demonstraram uma queda no segundo ensaio, porém no terceiro os valores de migração aumentaram novamente. Isso demonstra que o processo de migração é contínuo durante sua vida útil, desta forma, as amostras que excederam os limites de 2,5 mg kg<sup>-1</sup> (com exceção da amostra número 9 que não pôde ser utilizada novamente devido aos danos físicos causados nos três ensaios iniciais) foram submetidas a um quarto ensaio de migração para a avaliação da migração contínua dos compostos. Observou-se que mesmo com a realização de um quarto ensaio de migração, algumas amostras apresentaram a queda dos valores de migração, e a amostra de número 10 apresentou um aumento significativo, porém todas elas ainda demonstraram valores acima do permitido pela legislação brasileira.

Bradley *et al.* (2010) observaram também a falta de padrão nas análises, pois algumas amostras apresentaram uma queda de migração durante os três ensaios, enquanto que outras apresentaram um aumento. Foi concluído por eles que os métodos utilizados para utensílios de uso repetido (3 repetições) não são adequados para se obter resultados precisos e confiáveis devido a variação considerável que ocorre entre as amostras.

Esse comportamento também foi observado por Haghi (2017), onde todas as amostras testadas apresentaram o aumento de migração durante os ensaios de uso repetido.

Arce, Sanllorente e Ortiz (2019) (2019) também obtiveram resultados claros de que ao decorrer dos ensaios repetidos sobre o mesmo corpo de prova, houve um aumento significativo de migração de melamina em todas as suas amostras.

Para os outros compostos, não existe um LME estabelecido pela legislação, porém, como se tratam de análogos da melamina, são compostos que podem causar danos à saúde da mesma forma que a mesma. Outro fator a ser considerado é sobre a combinação entre a melamina e seus análogos, que segundo a FDA, recentes estudos indicaram que o aumento da toxicidade resulta da exposição combinada à melamina e seus análogos. Isso gera um alto grau de incerteza em relação à determinação da segurança. Entretanto, a migração mais significativa de melamina foi de  $0,97 \text{ mg kg}^{-1}$ , já para melamida foi de  $0,06 \text{ mg kg}^{-1}$  e para o ácido cianúrico de  $0,45 \text{ mg kg}^{-1}$ . Todos esses resultados que foram os mais significativos das análises se apresentaram na mesma amostra, de número 13.

Observou-se também que as amostras que não apresentaram migração ou apresentaram esses níveis abaixo do LQ, se tratavam de copos ou canecas (amostras 2, 4, 8 e 12) que possuíam uma aparência diferente das demais. Isso foi observado por Bradley *et al.* (2010) que notaram a diferença física entre as amostras sendo algumas brilhantes e bem rígidas, já outras com aparência mate e mais macias.

Em vista disso, foi realizado um segundo teste nas amostras de número 12 e 13 através de Espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) o qual é uma metodologia analítica utilizada para a identificação de classes químicas. O resultado desta análise mostrou que a amostra de número 13 apresentou material melamínico, já a amostra de número 12 apresentou internamente o plástico de uréia-formaldeído, o que explicaria não ter migrado melamina de forma significativa nesta amostra. Provavelmente, devido apresentarem a mesma aparência, as amostras 2, 4 e 8 são também de uréia-formaldeído.

Após o ensaio de migração algumas amostras apresentaram danos físicos notáveis de degradação pelo ácido. Alguns exemplos destes danos são apresentados na Figura 8. A amostra 9 apresentou a descoloração interna a partir do primeiro ensaio e rachaduras a partir do segundo ensaio de migração. A amostra 13 apresentou a perda de brilho internamente nas laterais do bowl (parte esbranquiçada) a partir do segundo ensaio de migração. Já a amostra 3 perdeu o brilho e demonstrou um esfarelamento na parte de trás dos talheres a partir do segundo ensaio.



Amostra 9



Amostra 13



Amostra 3

**Figura 8** - Exemplos de danos nos utensílios após os ensaios de migração.

## 6. CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se:

- 1) O método desenvolvido se demonstrou efetivo para avaliar a migração de melamina, amelina, amelida e ácido cianúrico, uma vez que além de estar dentro de todos os parâmetros estabelecidos para a validação de métodos segundo o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, apresentou valores de limite de detecção e quantificação bastante baixos, na ordem de ppb, principalmente quando comparados à outros autores. A validação do método e o estudo foi de grande valia pois não existia tal avaliação com produtos comercializados no Brasil.
- 2) O método que foi desenvolvido e validado se apresentou eficiente para as análises, tornando mais viável sua utilização quando comparado ao método oficial europeu CEN 13130-27 o qual não abrange a determinação de amelina, amelida e ácido cianúrico. Além disso, o método desenvolvido utiliza menos eluente, demanda menos tempo e, baseado em outros estudos, a utilização do espectrômetro de massas, torna o método mais confiável e sensível para a determinação quantitativa da migração dos compostos.
- 3) Os resultados obtidos no ensaio de migração são preocupantes, uma vez que grande parte das amostras (9, dentre as 14) a migração foi acima do permitido pela legislação brasileira ( $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), atingindo valores de até  $122 \text{ mg kg}^{-1}$ . Isso demonstra um alto risco para a população, principalmente para as crianças que são o principal público-alvo deste tipo de utensílio.
- 4) Para utensílios a base de melamina, o método de ensaio deveria ser revisto no que se refere à repetição do ensaio no mesmo corpo de prova, pois se pôde observar que o processo de migração é contínuo e pode ser crescente após o terceiro ensaio. Esse fato levanta a questão se para esses utensílios de melamina não seria necessário estabelecer

um procedimento específico para aprovação, considerando que um dos seus usos principais é em artigos para crianças.

- 5) Observou-se também, que as amostras obtidas no mercado de Campinas-São Paulo, não são identificadas corretamente em relação à sua composição e não apresentam rastreabilidade em relação aos lotes, o que gerou desvio padrão alto dentre as mesmas amostras. A falta de identificação adequada e do controle/fiscalização dos produtos comercializados no Brasil torna-se um grande problema para os consumidores que podem vir a ter problemas de saúde devido à utilização desses utensílios domésticos que não atendem as exigências legais.
- 6) Pretende-se encaminhar esses resultados para a autoridade competente, como a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), para ser estabelecido um monitoramento na entrada no Brasil desses produtos importados para verificar o atendimento à legislação.
- 7) Esse estudo é o primeiro realizado com amostras de melamina-formaldeído comercializadas no Brasil, e indicam a importância da fiscalização na importação de utensílios domésticos para evitar e reduzir os riscos à saúde da população.

## 7. REFERÊNCIAS

ARCE, M. M.; SANLLORENTE, S.; ORTIZ, M. C. Kinetic models of migration of melamine and formaldehyde from melamine kitchenware with data of liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Spain, v. 1599, p. 115-124, abr. 2019.

BENVENUTI, M. E.; O'CONNOR, A. **Melamina, Ammeline and Cyanuric acid analysis by UPLC/MS/MS and UPLC/PDA**: application note. Waters Corporation, Milford- USA, p. 1-5, set. 2007.

BRADLEY, E. *et al.* A comparison of the migration of melamine from melamine-formaldehyde plastics ('melaware') into various food simulants and foods themselves. **Food Additives and Contaminants**, Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, p. 1-22, jul. 2010.

BRADLEY, E. *et al.* Survey of the migration of melamine and formaldehyde from melamine food contact articles available on the UK market. **Food Additives and Contaminants**, Reino Unido, v. 22, n. 6, p. 597-606, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 38, de 26 de setembro de 2008. Contaminação de fórmulas infantis, leite e derivados com melamina na China. Brasília, DF, 26 set. 2008. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p\\_p\\_id=101\\_INSTANCE\\_WvKKx2fhdjM2&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_pos=1&p\\_p\\_col\\_count=2&\\_101\\_INSTANCE\\_WvKKx2fhdjM2\\_groupId=33916&\\_101\\_INSTANCE\\_WvKKx2fhdjM2\\_urlTitle=informe-tecnico-n-38-de-26-de-setembro-de-2008&\\_101\\_INSTANCE\\_WvKKx2fhdjM2\\_struts\\_action=/asset\\_publisher/view\\_content&\\_101\\_INSTANCE\\_WvKKx2fhdjM2\\_assetEntryId=2775250&\\_101\\_INSTANCE\\_WvKKx2fhdjM2\\_type=content](http://antigo.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_groupId=33916&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_urlTitle=informe-tecnico-n-38-de-26-de-setembro-de-2008&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_struts_action=/asset_publisher/view_content&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_assetEntryId=2775250&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_type=content). Acesso em: 21 maio 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 51, de 26 de novembro de 2010. Dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 244, p. 75, 22 dez. 2010. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-51-de-26-de-novembro-de-2010-1.pdf/view>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 56, de 16 de novembro de 2012. Dispõe sobre a lista positiva de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 21 nov. 2012. p. 66- 77. Disponível em: Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/28917>. Acesso em: 21 maio 2020.

CHIEN, Chao-Yi *et al.* High melamine migration in daily-use melamine-made tableware. **Journal of Hazardous Materials**, Kaohsiung, Taiwan, v. 188, p. 350-356, fev. 2011.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento nº 284, de 22 de março de 2011, fixa as condições específicas e os procedimentos pormenorizados para a importação de objetos de matéria plástica de poliamida e melamina para cozinha originários ou provenientes da República Popular da China e da Região Administrativa Especial de Hong Kong, China. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, p. 25-29, 22 mar. 2011. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:077:0025:0029:PT:PDF>. Acesso em: 21 maio 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on melamine in food and feed. **EFSA Journal**, v. 8, n. 4, p. 1573, 2010. Disponível em: [efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1573](https://efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1573). Acesso em: 1 jun. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) No. 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, **Off. J. Eur. Union**, Brussels, L 12, Jan, 2011. 89 p.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Recommendation (EU) 2019/794 of 15 May 2019 on a coordinated control plan with a view to establishing the prevalence of certain substances migrating from materials and articles intended to come into contact with food, **Off. J. Eur. Union**, Brussels, L 19, 2019. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019H0794&from=EN>

EUROPEAN COMMISSION. **RASFF portal**. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff\\_annual\\_report\\_2018.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2018.pdf)  
Acesso em: 29 set. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. **RASFF Portal**: 2020, 2021, 2022  
<https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>. Acesso em: 02 ago. 2022.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **EN 13130-1**: materials and articles in contact with foodstuffs – plastics substances subject to limitation – Part 1: guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants. Brussels: CEN, 2004. 66 p.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **EN 13130-27**: materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics substances subject to limitation. part 27: determination of 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine in food simulants – Part 27: guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants. Brussels: CEN, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION E.U. **Interim safety and risk assessment of melamine and its analogues in food for humans**, 28 nov. 2008. Update. Disponível em:

<https://wayback.archiveit.org/7993/20170111174251/http://www.fda.gov/Food/FoodBorneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/ucm164520.htm>. Acesso em: 15 jul. 2022.

GERMAN FEDERAL INSTITUTE FOR RISK ASSESSMENT (BfR). **Fillable articles made from melamine formaldehyde resin, such as coffee-to-go cups sold as 'bambooware', may leak harmful substances into hot foods-BfR opinion No 046/2019 issued 25 November 2020**. p. 1-61, 25 nov. 2020.

HAGHI, E. *et al.* Effect of time and temperature on migration of melamine from melamine-ware products to foods. **Social Determinants of Health**, v. 3, n. 4, p. 201-207, 1 dez. 2017.

HAGHI, E. *et al.* HPLC and spectrophotometry methods for measuring melamine migration from melamine dishes to food simulants. **MethodsX**, v. 8, p. 101284, 19 fev. 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Some chemicals that cause tumours of the urinary tract in rodents**. Lyon, France: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 119, p. 115-172, 2019. ISBN 978-92-832-0186-1. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/575>. Acesso em: 25 jul. 2022.

IBARRA, V. G. *et al.* Study of melamine and formaldehyde migration from melamine tableware. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 242, p. 1187-1199, 22 jan. 2016.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **DOQ-CGCRE-008**: orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro: Inmetro, 2016. 19 p. Rev. nº 05.

LI, Mi *et al.* Tracing the melamine migration from three-piece tin cans into food simulants during coating process. **LWT - Food Science and Technology**, China, v. 101, p. 300-305, 1 mar. 2019.

LUND, K. H.; PETERSEN, J. H. Migration of formaldehyde and melamine monomers from kitchen- and tableware made of melamine plastic. **Food Additives and Contaminants**, p. 1-23, 13 out. 2005.

MANAV, H. M. *et al.* Investigation of overall and melamine migration from melamine bowls. **Acta Alimentaria**, v. 48, n. 2, p. 187-195, 1 out. 2019.

MÜLLER, S. Melamine cups: migration of unwanted chemicals. **Danish Consumer Council Think Chemicals**, Dinamarca, 19 mar. 2022. Disponível em: <https://taenk.dk/kemi/english/melamine-cups-migration-unwanted-chemicals>. Acesso em: 25 jul. 2022.

QUIRÓS, A. R. B. de *et al.* Melamine. *In*: \_\_\_\_\_. Food contamination by packaging: migration of chemicals from food contact materials. [S. l.]: De Gruyter, 2019. cap. 3, p. 27-42. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?id=NUDEDwAAQBAJ&pg=PP4&lpg=PP4&dq=Department+of+Analytical+Chemistry,+Nutrition+and+Food+Science,+Faculty+of+Pharmacy,+University+of+Santiago+de+Compostela,+15782+Santiago+de+Compostela,+Spain&source=bl&ots=wBUWH-rl\\_P&sig=ACfU3U2fMJITPEkbF3vRyMFcPk7CcUdMTg&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwi\\_uJ-D9MjpAhXfHlKGHtOIC-UQ6AEwAHoECAoQAQ#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?id=NUDEDwAAQBAJ&pg=PP4&lpg=PP4&dq=Department+of+Analytical+Chemistry,+Nutrition+and+Food+Science,+Faculty+of+Pharmacy,+University+of+Santiago+de+Compostela,+15782+Santiago+de+Compostela,+Spain&source=bl&ots=wBUWH-rl_P&sig=ACfU3U2fMJITPEkbF3vRyMFcPk7CcUdMTg&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwi_uJ-D9MjpAhXfHlKGHtOIC-UQ6AEwAHoECAoQAQ#v=onepage&q&f=false). Acesso em: 15 maio 2020.

ROVINA, K.; SIDDIQUEE, S. A review of recent advances in melamine detection techniques. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 43, p. 25-38, nov. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889157515001167>. Acesso em: 13 maio 2020.

SIMONEAU, C. (2011). Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware, (1<sup>a</sup>. ed.). Luxemburgo: European Commission. (EUR 24815 EN). doi:10.2788/19211