



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Evaluación de la oxidación lipídica mediante el test del TBA: Método de destilación

Apellidos, nombre	Fuentes López, Ana (anfuelo@upv.es) García Martínez, Eva (evamargar@tal.upv.es) Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es)
Departamento	Tecnología de Alimentos
Centro	Universidad Politécnica de Valencia



1 Resumen de las ideas clave

El índice del TBA es uno de los índices más utilizados para estimar el grado de oxidación de los alimentos. En algunas ocasiones, especialmente en alimentos ricos en proteínas hidrosolubles, pigmentos y/o aminoácidos, se precisa del método de destilación como protocolo de análisis. Mediante este procedimiento se consigue un destilado que contiene el malonaldehído que va a reaccionar con el TBA formando el complejo cromógeno, cuya intensidad de color nos permite estimar el grado de oxidación de la muestra.

2 Introducción

Los lípidos son compuestos de gran importancia en los alimentos desde el punto de vista nutricional y organoléptico. La importancia de los lípidos para la fisiología de la nutrición radica en su elevado valor energético y en la presencia de ácidos grasos esenciales y vitaminas (liposolubles). Además, los lípidos tienen ciertas propiedades indispensables para la preparación y obtención de alimentos, por su comportamiento a la fusión, sabor agradable, capacidad disolvente para ciertas sustancias sápidas y numerosas sustancias aromáticas [1].

Durante el procesado y/o almacenamiento, los alimentos están sujetos a una serie de alteraciones que afectan a la calidad de los mismos. Entre estas alteraciones, la oxidación lipídica es la que tiene una mayor importancia por los cambios que produce en los alimentos, modificando su aroma, sabor, textura, consistencia y apariencia, así como su valor nutritivo y también su seguridad, debido a la formación de sustancias potencialmente nocivas [2].

Algunos métodos utilizados para evaluar la oxidación lipídica en alimentos se basan en la determinación de los compuestos secundarios de la oxidación, dando lugar a diferentes índices que permiten conocer su grado de oxidación. El índice del TBA es uno de los más utilizados. Mediante esta determinación se miden los compuestos secundarios de la oxidación de las grasas, fundamentalmente compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas), siendo el malonaldehído el componente mayoritario.

El ensayo del TBA puede llevarse a cabo siguiendo diferentes protocolos analíticos. Esta determinación se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malonaldehído y la posterior medida de la absorbancia del cromógeno formado. El protocolo de análisis más comúnmente utilizado es la extracción ácida por ser un procedimiento rápido y sencillo. Para que el ensayo se desarrolle correctamente, el extracto de la muestra debe ser un líquido claro y debe contener la cantidad adecuada para formar el complejo cromóforo MDA-TBA. Sin embargo, en algunas ocasiones, cuando se utiliza este protocolo de extracción en medio ácido, ciertas sustancias interferentes pueden ser extraídas. En estos casos, la presencia de proteínas hidrosolubles, péptidos, pigmentos, aminoácidos, y gotas de grasa en el extracto hace necesario incorporar una etapa de filtración, que en muchos casos es tediosa y no llega a ser completamente efectiva. La turbidez del medio que contiene el complejo MDA-TBA provocaría un incremento en las lecturas de absorbancia y por tanto, los valores del índice de TBA se verán sobreestimados. Para resolver estos inconvenientes se emplea la técnica de destilación.

La técnica de destilación evita el problema de las interferencias en el extracto, sin embargo, presenta el inconveniente del calentamiento de la muestra. Durante la



destilación la muestra se somete a un calentamiento en medio ácido que favorece la degradación de los hidroperóxidos como precursores del malonaldehído, y que genera además un mayor número de radicales reactivos y productos de escisión que pueden reaccionar con el TBA [3]. Estos inconvenientes consiguen evitarse incorporando agentes antioxidantes, antes del calentamiento como el galato de propilo, butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ), hidroxibutilanisol (BHA), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

3 Objetivos

Mediante el presente artículo se pretende que el alumno sea capaz de:

- Realizar la determinación analítica del índice de TBA empleado la destilación por arrastre de vapor.
- Determinar la concentración equivalente de MDA de una muestra.

4 Desarrollo

La determinación del índice del TBA mediante el procedimiento de destilación de la muestra acidificada que se describe a continuación se basa en el método descrito inicialmente por Tarladgis y col. [4], tal y como se recoge en los protocolos químicos de la química analítica de los alimentos [5].

4.1 Fundamento

La destilación por arrastre de vapor de una muestra acidifica permite obtener extracto que contiene MDA. Este extracto se hará reaccionar con un exceso de ácido tiobarbitúrico (TBA). La posterior medida de la absorbancia del cromógeno formado en esta reacción, nos permitirá calcular el nivel de enranciamiento.

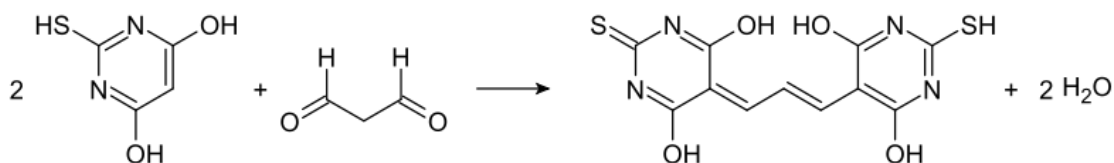


Figura 1. Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malonaldehído (MDA)



4.2 Material y reactivos

Material e instrumentación:

- Tubos de ensayo de vidrio con tapón y gradilla de acero inoxidable.
- Cubetas desechables para espectrofotómetro
- Tubo de destilación
- Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 50 mL
- Sistema de destilación automática por arrastre de vapor (figura 1).
- Homogeizador de alta velocidad (Ultraturrax).
- Espectrofotómetro

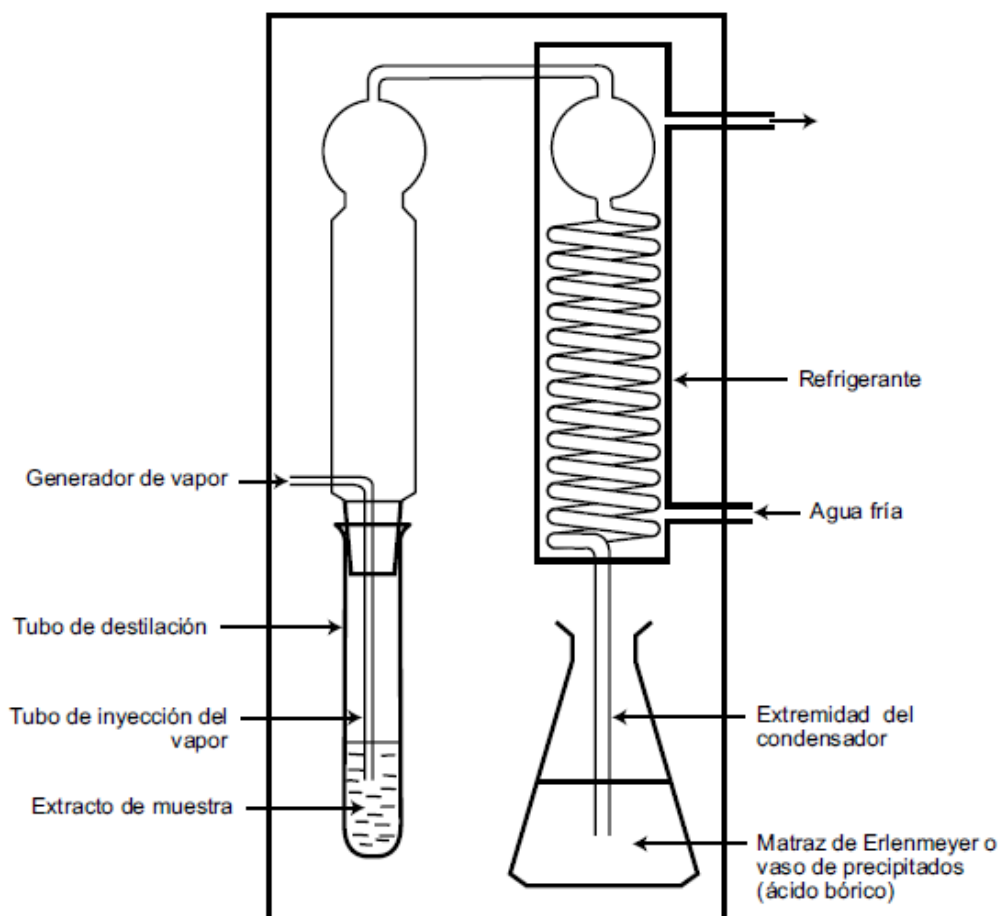


Figura 2. Esquema del sistema de destilación por arrastre de vapor.



Reactivos químicos:

- Disolución antioxidante: disolver 0,5 g de galato de propilo y 0,5 g de EDTA con una mezcla etanol/agua 1:1 (v/v) y enrasar a 100 mL.
- Disolución HCl 4 N
- Disolución de TBA (0,14415 g de TBA en 50 mL de agua destilada).
- Disolución B [0,110155 g de TEP (1,1,3,3-tetraetoxipropano o malonaldehído; densidad=0,917) = 0,12 mL de TEP aforado a 50 mL con disolución A].
- Disolución C (0,1 mL de disolución B aforada a 100 mL con disolución A).

4.3 Procedimiento

1. Preparación de la muestra

- Pesar 10 g de muestra previamente picada y pasarla a un tubo de destilación tipo Kjeldahl.
- Añadir al tubo:
 - 95 mL de agua destilada
 - 2,5 mL de disolución antioxidante
 - 2,5 mL de disolución HCl 4N
 - 3-5 perlas de vidrio para regular la ebullición
- Los tubos se llevan a la unidad de destilación, donde se destilan hasta recoger un volumen de destilado de aproximadamente 50 mL (tomar el valor exacto del volumen del destilado, V_d).
- Tomar dos tubos de ensayo que tenga tapón de rosca. En uno de los tubos introducir 2 mL extracto recogido y en el otro tubo 4 mL. Completar con disolución A hasta un volumen final de 5 mL.
- Finalmente, añadir al tubo de ensayo 5 mL de disolución de TBA.

2. Preparación del blanco

- Blanco: 5 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA.

3. Preparación de la recta de calibrado

- Se procederá a la preparación de una recta de calibrado con diferentes concentraciones del patrón (malonaldehído)
 - **Patrón 1:** 0,1 mL de disolución C + 4,9 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA (equivale a 0.0012 μmol de malonaldehído).
 - **Patrón 2:** 0,5 mL de disolución C + 4,5 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA (equivale a 0.005 μmol de malonaldehído).
 - **Patrón 3:** 1 mL de disolución C + 4 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA. (equivale a 0.01 μmol de malonaldehído).
 - **Patrón 4:** 2 mL de disolución C + 3 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA. (equivale a 0.02 μmol de malonaldehído).
 - **Patrón 5:** 3 mL de disolución C + 2 mL de disolución A + 5 mL de disolución de TBA. (equivale a 0.03 μmol de malonaldehído).



4. Desarrollo de la reacción y medida de la absorbancia

- Tapar todos los tubos e introducirlos en un baño con ebullición suave durante 40 min.
- Una vez finalizado el tiempo de reacción, se enfriarán los tubos en corriente de agua y agitando ligeramente.
- En caso que se observe la formación de burbujas en los tubos de ensayo, éstos se llevarán a un baño de ultrasonidos durante unos minutos, hasta que todo el aire incluido en la disolución se haya liberado.
- Finalmente, medir en un espectrofotómetro la absorbancia a 530 nm de cada una de las disoluciones contenidas en os tubos.

4.4 Cálculos

Representar los valores de absorbancia obtenidos en las medidas espectrofotométricas frente a la concentración equivalente de malonaldehído (MDA) correspondiente (absorbancia vs μ moles de malonaldehído)(figura 3).

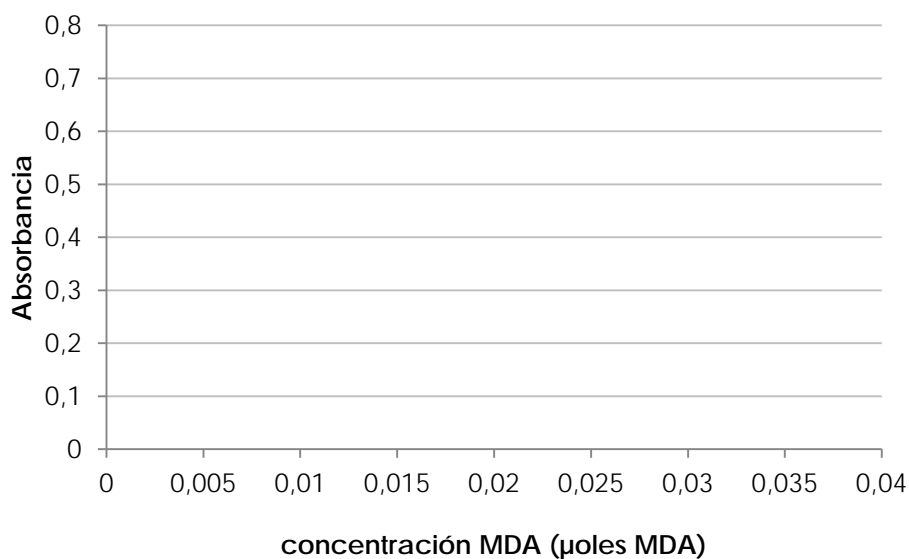


Figura 3. Representación de los valores de absorbancia (eje y) frente a la concentración de MDA para las disoluciones patrón (eje x).

A partir de esta representación, se obtiene la ecuación de la recta de ajuste para los patrones medidos. Esta ecuación se empleará como recta de calibrado para determinar la concentración de malonaldehído (μ moles de MDA) en las muestras a partir de sus lecturas de absorbancia. Se considerarán únicamente aquellos tubos cuyas lecturas de absorbancia hayan caído dentro de los valores registrados para los patrones con los que hemos calculado la recta de calibrado.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

El valor de concentración de MDA en el tubo de muestra se sustituirá ecuación 1, para obtener el valor del índice de TBA, expresado en mg de malonaldehído/1000 g de muestra:

$$\text{Índice de TBA (mg MDA/kg)} = \frac{72 \times C \times V_d \times 10}{m \times V}$$

Ecuación 1. Ecuación para el cálculo del índice del TBA

Donde:

72 = Peso molecular del malonaldehído

C = μ moles de malonaldehído obtenidos a partir de la recta de calibrado

V_d = volumen del destilado recogido (L)

m = peso en gramos de la muestra pesada

V = volumen de la alícuota (mL de filtrado: 2 o 4 mL)

Índice de TBA = _____ mg de malonaldehído/1000 g muestra

5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto cómo llevar a cabo la determinación analítica del índice de TBA en un alimento empleando el método de destilación. Este índice nos permite establecer el grado de oxidación de un alimento.

6 Bibliografía

[1] Belitz, H. D.; Grosh, W.: "Lípidos" en Química de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, 1998, pág. 175-267.

[2] Zamora, R.; Hidalgo, F.J.; Alalaz, M. (1991). Alteraciones bioquímicas de los lípidos en los alimentos vegetales. Grasas y aceites, 42(2): 155-162.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

[3] Raharjo, S.; Sofos, J.N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. *Meat Science*, 35: 145-169.

[4] Tarladgis, B.G.; Watts, B.M.; Younathan, M.T.; Dugan, L.R.Jr. (1960). A distillation method for quantitative determination of malonaldehyde in rancid food. *Journal American Oil Chemistry Society*, 37:44-48.

[5] Pegg, R.B. (2001). Spectrophotometric Measurement of Secondary Lipid Oxidation Products en *Current rotocols in Food Analytical Chemistry*. Ed. John Wiley and Sons., Inc., 2001. pág. D2.4.1-D2.4.18