



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Evaluación de la oxidación lipídica mediante el test del TBA: extracción en medio ácido

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



1 Resumen de las ideas clave

La oxidación de las grasas es una de las principales causas del deterioro de los alimentos. La oxidación lipídica provoca cambios importantes en los alimentos, modificando su valor nutricional y atributos organolépticos. Existen diferentes métodos para determinar el grado de oxidación de un alimento, entre estos métodos, el índice de TBA es uno de los más utilizados por ser un método rápido y sencillo, ser aplicable a una amplia variedad de alimentos y correlacionarse muy bien con la evaluación sensorial. El test de TBA determina la cantidad de malonadehído (MDA), uno de los principales productos secundarios de la oxidación lipídica.

2 Introducción

Los lípidos son compuestos de gran importancia en los alimentos desde el punto de vista nutricional y organoléptico. Los lípidos contribuyen al sabor, aroma, textura y palatabilidad típica de cada alimento y condicionan su estabilidad durante el almacenamiento.

Una de las principales causas de deterioro de los alimentos es la oxidación lipídica, la cual afecta a los ácidos grasos, principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados [1]. En las condiciones que frecuentemente se almacenan los alimentos, estos ácidos grasos son altamente inestables y reaccionan fácilmente con el oxígeno, produciéndose el fenómeno conocido como autooxidación. La autooxidación lipídica confiere al producto cambios importantes en su aroma, color, sabor, textura y valor nutritivo [2].

La autooxidación se produce a través de una serie de reacciones en cadena en la que se distinguen las fases de iniciación, propagación y terminación.

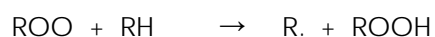
1. Iniciación

Reacciones que dan lugar a la formación de radicales libres a partir de ácidos grasos (o peróxidos lipídicos, llamados también hidroperóxidos)



2. Propagación

Reacciones que se caracterizan por una cierta acumulación de peróxidos lipídicos. Se crean tantos radicales libres como se consumen, Es la etapa de oxidación de los ácidos grasos insaturados.



3. Terminación

Los radicales libres procedentes de la descomposición de hidroperóxidos, se asocian para formar productos no radicales, como aldehídos y cetonas de bajo peso molecular, responsables del olor a rancio



Los hidroperóxidos (ROOH) son considerados los compuestos más importantes en la fase inicial de la reacción y se caracterizan por ser muy inestables. Al aumentar el tiempo de la reacción, estos productos primarios de la oxidación se descomponen generando una mezcla compleja de productos volátiles, no-volátiles y compuestos secundarios de la oxidación.

Los productos secundarios de la oxidación lipídica incluyen compuestos como aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos y ácidos orgánicos volátiles. Los métodos utilizados para evaluar la oxidación lipídica en alimentos se basan fundamentalmente en la determinación de estos compuestos, dando lugar a diferentes índices que permiten conocer su grado de oxidación.

Uno de los índices más utilizados para determinar el grado de oxidación de los alimentos es el índice del TBA.

El ensayo de TBA puede llevarse a cabo siguiendo diferentes protocolos analíticos. Estas determinaciones pueden realizarse directamente a partir de la muestra inicial, empleando un extracto acuoso o ácido de la muestra, una destilación por arrastre de vapor o realizar el ensayo a partir de un extracto lipídico de la misma. Es difícil establecer cuál es el mejor protocolo de análisis; sin embargo, entre los diferentes protocolos utilizados, la extracción ácida es el más utilizado. Este procedimiento es considerado el mejor para estimar el contenido de malonaldehído en alimentos por su rapidez, sencillez y mínimo equipamiento necesario. Además, mediante este protocolo la muestra no se expone a calentamiento alguno, que pudiera provocar una mayor autooxidación del producto y por tanto, una sobreestimación del contenido real de MDA en el alimento.

3 Objetivos

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

- Realizar la determinación analítica del índice de TBA empleando el método de extracción en medio ácido.
- Determinar la concentración equivalente de MDA de una muestra.
- Evaluar el grado de oxidación de un alimento a partir de valor del índice de TBA.



4 Desarrollo

A continuación se describe el protocolo para la determinación del índice del TBA mediante el procedimiento de extracción en medio ácido [3].

4.1 Fundamento

El procedimiento descrito incluye una etapa extracción previa de las sustancias tiobarbitúricas reactivas, mediante el tratamiento de la muestra con ácido tricloroacético. La determinación del índice del TBA se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malonaldehído (MDA) y la posterior medida de la absorbancia del cromógeno formado (figura 1). La intensidad de la coloración rosa-roja es proporcional al nivel de enranciamiento.

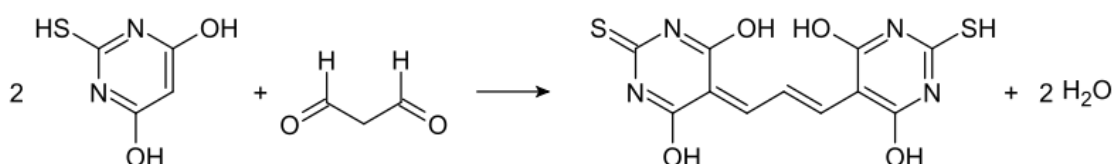


Figura 1. Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malonaldehído (MDA)

4.2 Material y reactivos

Material e instrumentación:

- Vaso de precipitados de 100 mL
- Matraz kitasatos de 250 mL
- Embudo Büchner de porcelana.
- Tubos de centrifuga
- Papel de filtro cuantitativo
- Tubos de ensayo de vidrio con tapón y gradilla de acero inoxidable
- Cubetas desechables para espectrofotómetro
- Homogenizador de alta velocidad
- Centrifuga
- Bomba de vacío.
- Espectrofotómetro

Reactivos químicos:

- **Disolución alcohólica de galato de propilo 5 % (p/v).** 5 g de galato de propilo en 100 mL de alcohol etílico.
- **Disolución A** (18,75 g de ácido tricloroacético + 0,25 g de EDTA + 5 mL de disolución alcohólica de galato de propilo, aforada con agua destilada a 250 mL).
- **Disolución de TBA** (0,14415 g de TBA en 50 mL de agua destilada).



- **Disolució 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 disolució A].
- **Disolució C** (0,1 mL de disolució B aforada a 100 mL con disolució A).

4.3 Procedimiento

1. Preparación de la muestra

- Pesar de 1 a 5 g de muestra previamente picada y homogeneizar en ultraturax durante 2 min con 30 mL de disolució A.
- Filtrar el homogeneizado a través de un filtro de papel. Si el filtrado no es completamente transparente será necesario centrifugar durante 5 min a 3000 rpm.
- Tomar una alícuota del extracto de entre 1 y 5 mL, según el contenido en malonaldehído esperado en la muestra. En caso que no se disponga de información suficiente para definir el volumen de la alícuota, se recomienda tomar diferentes volúmenes de extracto. En este caso, se procederá con 3 volúmenes de la alícuota distintos (1, 3 y 5 mL).
- Tomar las alícuotas del extracto y llevarlas a un tubo de ensayo que tenga tapón de rosca. Completar hasta 5 mL con disolució A. Añadir al tubo de ensayo 5 mL de disolució de TBA.
 - **Tubo 1:** 1 mL de filtrado + 3 mL de disolució A + 5 mL de disolució de TBA.
 - **Tubo 2:** 2 mL de filtrado + 2 mL de disolució A + 5 mL de disolució de TBA.
 - **Tubo 3:** 5 mL de filtrado + 1 mL de disolució A + 5 mL de disolució de TBA.

2. Preparación del blanco

- **Blanco:** 5 mL de disolució A + 5 mL de disolució 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 disolució C + 4,9 mL de disolució A + 5 mL de disolució de TBA (equivale a 0.0012 μmol de malonaldehído).
 - **Patrón 2:** 0,5 mL de disolució C + 4,5 mL de disolució A + 5 mL de disolució de TBA (equivale a 0.005 μmol de malonaldehído).
 - **Patrón 3:** 1 mL de disolució C + 4 mL de disolució A + 5 mL de disolució de TBA. (equivale a 0.01 μmol de malonaldehído).
 - **Patrón 4:** 2 mL de disolució C + 3 mL de disolució A + 5 mL de disolució de TBA. (equivale a 0.02 μmol de malonaldehído).
 - **Patrón 5:** 3 mL de disolució C + 2 mL de disolució A + 5 mL de disolució 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.
- Si se observa la formación de burbujas en los tubos de ensayo, se recomienda introducir los tubos en un baño de ultrasonidos durante unos minutos, hasta que se observe 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 los tubos.

5. 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 2).

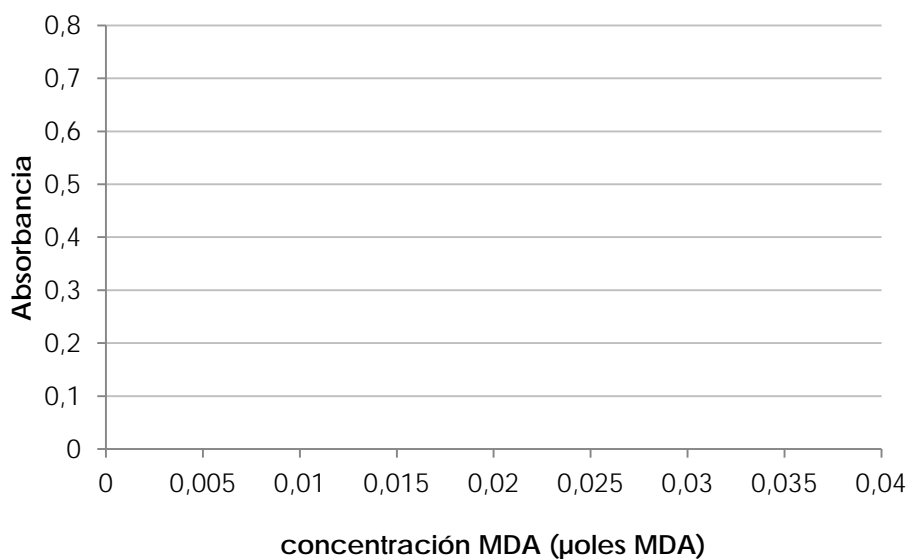


Figura 2. Representación de los valores de absorbancia (eje y) frente a la concentración de MDA para las disoluciones patrón (eje x).

4.4. Cálculos

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.



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

$$\text{Índice de TBA (mg MDA/kg)} = \frac{72 \times C \times (30 + (m \times H))}{m \times V}$$

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

m = peso en gramos de la muestra pesada

H = humedad de la muestra en tanto por uno.

V = volumen de la alícuota (mL de filtrado: 1, 2 o 5 mL)

30 = volumen de ácido tricloroacético

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

4.5. Interpretación de los resultados

El índice del TBA es uno de los parámetros más utilizados para evaluar el grado de deterioro de determinados alimentos, ya que se correlaciona muy bien con su evaluación sensorial.

Este parámetro es de especial interés en el caso de algunas especies de pescado, especialmente aquellas con un contenido graso mayor, como sardinas o arenques. Algunos estudios han observado que el pescado recién capturado presenta unos valores del índice del TBA que oscilan entre 3 y 5 mg MDA/kg de muestra, y que estos niveles van aumentando progresivamente en el tiempo hasta alcanzar los 5-8 mg MDA/kg. Estos niveles se corresponden con el límite de aceptación sensorial del pescado almacenado en hielo [4], es decir, a partir del cual su estado de oxidación puede percibirse organolépticamente

Considerando estos valores bibliográficos como referencia, se puede estimar el grado de oxidación de la muestra analizada.

5. Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto cómo llevar a cabo la determinación analítica del test del TBA en un alimento mediante el procedimiento de extracción en medio ácido. A partir de los resultados obtenidos podemos evaluar el grado de oxidación de un alimento.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

6. Bibliografia

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

[2] Fennema, O.R.; Parkin K.L.: "Lípidos" en Fennema química de los alimentos. Ed. Acribia, 2008, pág. 269-381.

[3] Vyncke, W. (1970) Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. Fette Seifen Austrichmittel, 72:1084–1087.

[4] Nunes, M. L.; Cardinal, M.; Mendes, R.; Morao Campos, R.; Bandarra, N. M.; Lourenco, H.: "Effect of season and storage on proteins and lipids of sardine (Sardine pilchardus) Mince and Surimi" en Quality assurance in the fish industry. Ed. H. H. Huss, M. Jakobsen, & J. Liston, Elsevier, 1992, pág. 73-81.