

## TESTE DE TBA APLICADO A CARNES E DERIVADOS: MÉTODOS TRADICIONAIS, MODIFICADOS E ALTERNATIVOS

Cibele Cristina Osawa\*, Pedro Eduardo de Felício e Lireny Ap. Guaraldo Gonçalves

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, 13083-862 Campinas - SP

Recebido em 21/6/04; aceito em 8/11/04; publicado na web em 28/2/05

TBA TEST APPLIED TO MEATS AND THEIR PRODUCTS: TRADITIONAL, MODIFIED AND ALTERNATIVE METHODS. The TBA test is essential to quality control of fat-containing food, being the test most applied to evaluate lipid peroxidation in fishery, meat and poultry products. It estimates malonaldehyde, a secondary oxidation product, by reacting with 2-thiobarbituric acid, forming a coloured complex, measured spectrophotometrically at  $\lambda = 532$  nm. Results are expressed as mg malonaldehyde per kg sample or frequently as "TBA value". There are four ways of quantifying it: by lipid extraction, direct heating, distillation or heat-acid extraction. This review intends to point out traditional, modified and alternative TBA test methods, besides enumerating advantages and drawbacks of each one.

Keywords: TBA test; lipid oxidation; malonaldehyde.

### INTRODUÇÃO

Testes como índice de peróxidos, ácidos graxos livres, anisidina, Kreis, TBA (ácido 2-tiobarbitúrico), valor Totox (valor total de oxidação) e compostos voláteis são utilizados no controle de qualidade de óleos, gorduras e produtos que os contenham, por fornecerem informações valiosas e essenciais a respeito do estado oxidativo, na predição da rancidez do alimento analisado.

A rancidez, ou oxidação de lipídios, é a deterioração mais importante que ocorre nesse tipo de produto, definindo a vida útil, na medida em que gera produtos indesejáveis do ponto de vista sensorial e destrói vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais<sup>1-4</sup>.

Apesar de suas limitações, o método mais usual na avaliação da oxidação de lipídios em carnes e produtos cárneos é o teste de TBA, devido à sua simplicidade e rapidez<sup>1,5-9</sup>.

O teste de TBA quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo - o MDA é um dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3<sup>10</sup>. É um teste altamente empírico e foi sugerido primeiramente por Patton, Keeney e Kurtz, em 1951, para leites e produtos lácteos<sup>4,11</sup>. A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído (Figura 1), produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda (de acordo com a metodologia, esse comprimento de onda pode variar, situando-se ao redor de 500 a 550 nm). A formação do composto TBA-MDA, na proporção de 2:1, é possivelmente iniciada pelo ataque nucleofílico, envolvendo o carbono 5 do TBA e o carbono 1 do MDA, seguido de desidratação e reação similar subsequente do composto intermediário com uma segunda molécula de TBA, na proporção de 1:1<sup>6</sup>. A quantificação de malonaldeído é feita a partir de curvas de calibração construídas com concentrações conhecidas de malonaldeído. Os padrões mais frequentemente utilizados são 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) e 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) que, nas condições ácidas do teste, sofrem hidrólise, resultando na liberação do malonaldeído. Os resultados

são expressos em unidades de absorvância por unidade de massa de amostra ou em "valor de TBA" ou "número de TBA", definidos como a massa, em mg, de malonaldeído por kg de amostra<sup>10,12-14</sup>.

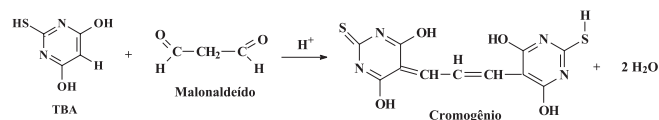


Figura 1. Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532 nm

Ao optar pelo teste de TBA, deve-se conhecer a composição em ácidos graxos do alimento em análise, uma vez que o teste mede a extensão da oxidação de lipídios com três ou mais duplas ligações. Para sistemas mais complexos, em que estão presentes misturas de constituintes, a medida de TBA tem apenas significado qualitativo e comparativo<sup>15</sup>, embora seja de grande utilidade na comparação de um único material em diferentes estágios de oxidação<sup>16</sup>.

É usado satisfatoriamente na avaliação dos estágios iniciais de rancidez de banhas, gorduras e óleos de soja, girassol e colza<sup>17</sup>. Em contrapartida, é um pobre indicador da oxidação térmica de vários óleos de fritura<sup>18</sup>. Apesar de ser reconhecido como metodologia oficial<sup>19</sup>, atualmente não se recorre à avaliação de TBA em óleos vegetais.

Particularmente para carnes, pescados e derivados, a informação do número de TBA é bastante relevante. Processos envolvidos na elaboração de produtos cárneos que incluam moagem, mistura e cozimento favorecem a formação do malonaldeído, sendo fundamental o emprego do teste na avaliação da qualidade do produto final<sup>1,2,9,20</sup>. Já para pescados e produtos à base de peixe, o teste é um dos mais adequados na predição da rancidez, apesar da reação não ser específica e estar sujeita à ação de interferentes<sup>21</sup>.

### Análise sensorial x teste de TBA

Ao ser usado como parâmetro de oxidação, os valores de TBA

\*e-mail: ciosawa@hotmail.com

obtidos correlacionam-se bem com a análise sensorial<sup>8</sup>. No entanto, em estudos de vida útil do produto, a correlação com as notas dos provadores na análise sensorial é baixa. Mesmo treinados, os provadores podem não distinguir pequenas diferenças na intensidade do sabor rancificado. O valor de TBARS, substâncias reativas ao TBA, constitui-se numa outra maneira de expressar o valor obtido no teste de TBA, sendo atualmente mais utilizado e leva em consideração outras substâncias capazes de reagir com o ácido 2-tiobarbitúrico. Em “nuggets” de frango com valores de TBARS maiores que 3,5, não houve correlação com a análise sensorial<sup>22</sup>. Em outro estudo com o mesmo tipo de produto, embora a análise sensorial fosse válida na detecção do “warmed-over-flavor” (WOF), no início do armazenamento, sua intensidade não foi discriminada, fato atribuído ao “threshold” (limite de detecção sensorial) dos provadores, que prejudicou os resultados<sup>23</sup>. O WOF é o termo adotado para definir o rápido aumento da oxidação em produtos cárneos cozidos, caracterizado pelo sabor de ranço desenvolvido durante o armazenamento sob refrigeração<sup>24</sup>.

Um outro fato constatado é que, partindo-se de diferentes matrizes, não se pode atribuir notas sensoriais a determinados valores de TBA. Isso porque o valor de TBA varia conforme o produto, na medida em que há variação na composição em ácidos graxos<sup>16</sup>.

Caso não sejam estabelecidos critérios bem definidos como matriz avaliada e metodologia de determinação de TBA utilizada, não é recomendável seguir os parâmetros de qualidade descritos na literatura. Um exemplo de parâmetros de qualidade conflitantes foi conseguido através de dois estudos realizados<sup>25,26</sup>, ao se comparar os valores de TBA, expressos em mg/kg, utilizando os devidos fatores de conversão<sup>12</sup>. No primeiro estudo, os autores consideraram peixes enlatados e peixes congelados como sendo de boa qualidade aqueles que apresentaram valores de TBA inferiores a 3; de qualidade questionável, entre 3 e 5 e rançosos, de 24 a 28. Peixes frescos com número de TBA igual a 21, apresentaram boa qualidade e de 60 a 300, estavam oxidados. Já no segundo estudo, outras faixas de TBA, muito distintas, foram apresentadas para peixes congelados: para números de TBA inferiores a 0,6, os produtos não estavam rancificados; entre 0,7-1,4, a qualidade foi aceitável, porém os produtos estavam ligeiramente rancificados e acima de 1,5, foram rejeitados pelos provadores.

### Limitações do teste

Embora seja amplamente utilizado, alguns fatores devem ser considerados no teste de TBA:

- os componentes presentes nos lipídios que geram cor no teste de TBA variam de acordo com as amostras lipídicas e a formação de malonaldeído depende do grau de insaturação do ácido graxo poliinsaturado – amostras altamente insaturadas desenvolvem mais cor que as menos insaturadas<sup>2,15</sup>;
- o teste pode não ser específico para o malonaldeído, já que outras TBARS podem reagir com o TBA e contribuir no valor de absorvância<sup>27-31</sup>;
- alguns compostos atuam como interferentes do teste<sup>21,30,32-41</sup>, o que será visto adiante;
- o aquecimento na etapa de destilação pode aumentar a quantidade de aldeídos e produzir certos produtos carbonílicos formados pelas reações entre malonaldeído e aminoácidos, pirimidinas ou proteínas. Pode, ainda, acelerar a reação, resultando em um valor mais elevado de TBA<sup>42</sup>;
- muitas das TBARS podem ser formadas durante o aquecimento sob condições ácidas<sup>43</sup> e,
- os testes baseados na medida espectrofotométrica são menos sensíveis e menos específicos que os métodos de quantificação

de malonaldeídos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou Cromatografia de Fase Gasosa (CG)<sup>7,9</sup>.

Diante de tais fatores, o teste de TBA tem sofrido modificações, com o intuito de aumentar sua sensibilidade de detecção e eliminar os interferentes presentes na amostra<sup>10</sup>.

Este trabalho teve como objetivo apontar as diversas metodologias existentes do teste de TBA, bem como suas modificações e outros métodos alternativos, aplicados a carnes e derivados, ressaltando as vantagens e desvantagens de cada uma.

### METODOLOGIAS EXISTENTES

As metodologias do teste de TBA baseadas em espectrofotometria podem ser divididas em quatro grupos de determinação<sup>8,9</sup>:

- a) diretamente na amostra, através do aquecimento direto com a solução de TBA acidificada para o máximo desenvolvimento de cor, seguido da extração do complexo colorido com solventes orgânicos, onde butanol e éter de petróleo são os mais usuais, seguida de medição espectrofotométrica<sup>12,17,19,25,44,45</sup>;
- b) no lipídio extraído da amostra: primeiramente, a porção lipídica é extraída da amostra e, em seguida, reage com o TBA para a formação do complexo colorido, com posterior medição espectrofotométrica<sup>19,46,47</sup>;
- c) no extrato ácido-aquoso da amostra: esse método visa a obtenção de extrato aquoso com o emprego de soluções de ácido tricloroacético (TCA) ou ácido perclórico, em que o malonaldeído é um dos componentes. Esse extrato reage com a solução de TBA para a formação do complexo colorido e é medido espectrofotometricamente<sup>35,36,43,48-50</sup>; e
- d) na porção do destilado da amostra: o alimento é destilado com ácido e o reagente de TBA acidificado é adicionado à porção do destilado, seguido de aquecimento para o desenvolvimento máximo de cor e medição espectrofotométrica<sup>38,39,41,48,49,51-56</sup>.

Entre os métodos citados, o da destilação, particularmente o proposto por Tarladgis *et al.*<sup>51</sup>, é o método mais comumente empregado em produtos cárneos<sup>57,58</sup>. Apesar da sua aplicação não ser universal, pois na presença de nitrito, sofre interferência<sup>38</sup>, o grande número de compostos interferentes no método de extração faz com que o método de destilação seja o preferido<sup>8,56</sup>. O método de destilação surgiu como alternativa ao método direto de determinação, cujas desvantagens são a necessidade de extração do composto malonaldeído-TBA com solventes orgânicos, a extração incompleta do malonaldeído e o tratamento mais drástico (aquecimento prolongado e contato direto com o reagente de TBA acidificado) para a liberação do malonaldeído da amostra e para o máximo desenvolvimento de cor<sup>5,51</sup>. A desvantagem do método de destilação é o tratamento térmico durante a destilação, que induz a valores mais elevados de TBA<sup>9</sup>.

Os métodos através da extração de lipídios são menos usuais e encontrados em menor número. Apresentam como desvantagem a etapa de extração que, na maioria das vezes, é difícil, incompleta e consome tempo<sup>25</sup>. O fato do malonaldeído, ligado a proteínas, estar presente na fase aquosa e não apenas junto com o lipídio extraído na fase orgânica, incorre em imprecisões nas determinações e deve ser considerado<sup>47</sup>. Aliado a isso, alguns solventes, tais como acetona, combinações de metanol com benzeno e éter etílico com éter de petróleo, não são apropriados<sup>25</sup>.

Os métodos de extração, bastante relatados na literatura, apresentam como vantagens, frente aos métodos de destilação, maior especificidade e seletividade para compostos carbonílicos, por não exigirem aquecimento, facilidade e simplicidade, sendo métodos mais adequados a laboratórios não equipados com destiladores. A

desvantagem é a menor sensibilidade perante o grande número de outros compostos interferentes<sup>8,9,43</sup>.

## MÉTODOS DE DESTILAÇÃO E DE EXTRAÇÃO MODIFICADOS

O método de destilação tradicional<sup>51</sup> ganhou novas adaptações ao longo dos anos, tanto em nível de procedimento<sup>41,49,52,53,55,59</sup> como de aparelhagem requerida<sup>56</sup>.

Com relação aos métodos de extração, a principal referência é o método proposto por Vyncke<sup>48</sup>, que surgiu como alternativa ao método de destilação<sup>51</sup>. No método de destilação, além de ocorrer a produção de aldeídos a partir de material não oxidado durante a destilação, em virtude do aquecimento, o pH da amostra (próximo de 1,5) influencia a destilação dos aldeídos. Para algumas espécies de peixes, tal procedimento é trabalhoso e foi necessário desenvolver um novo teste. Sua validação se deu com o estudo de músculos brancos de bacalhau (*Gadus morhua* L), “red fish” (*Sebastes marinus* L), arenque (*Clupea Harengus* L), linguado (*Pleuronectes platessa* L) e “spurdog” (*Squalus acanthias* L) congelados durante 6 a 24 meses, apresentando, assim, vários estágios de oxidação.

### Método da filtração

O método da filtração<sup>52</sup>, uma modificação do método de destilação tradicional<sup>51</sup>, eliminou o tratamento ácido na reação entre o destilado e o ácido 2-tiobarbitúrico, tornando-se uma opção para alimentos que geram extratos aquosos não límpidos nos métodos de extração.

Até então, acreditava-se que o tratamento ácido a quente era essencial para a liberação do malonaldeído da amostra; para a condensação do malonaldeído com o TBA e para o máximo desenvolvimento de cor.

Ao contrário, o tratamento ácido a quente não é necessário em nenhum desses casos e o teor de malonaldeído estimado é o malonaldeído livre produzido e presente no sistema até o momento do teste e não o produzido durante o ensaio<sup>52</sup>.

Em outros métodos modificados, aboliu-se satisfatoriamente o uso de ácido<sup>21,53,55,56</sup> e a principal vantagem apontada foi a ausência do pico interferente medido a 450 nm<sup>55</sup>.

### Método da filtração modificado

Siu e Draper<sup>41</sup> modificaram o método da filtração<sup>52</sup>, com a adição de ácido tricloroacético nas amostras, para prevenir o aparecimento da cor vermelha nos extratos e a eliminação da etapa de destilação, devido à turbidez dos extratos de TCA. Comparativamente ao método de destilação convencional<sup>51</sup> para amostras de carnes bovinas, a recuperação do malonaldeído foi superior para o método modificado (57 e 83%, respectivamente) e o segundo procedimento gerou valores mais elevados, sugerindo que o método de filtração<sup>52</sup> gera extração incompleta do malonaldeído originalmente presente na amostra e nas condições térmicas do método de destilação<sup>51</sup>, ocorre a liberação ou formação de malonaldeído a partir de ácidos graxos poliinsaturados (araquidônico e linolênico) presentes na amostra<sup>41</sup>.

### Emprego de antioxidantes nos métodos de filtração e de extração

Ao desenvolver o método de extração, Vyncke<sup>48</sup> já havia alertado para o uso de um antioxidante, o propil galato (PG), e um agente quelante, o sal sódico EDTA, com a finalidade de evitar a formação errônea de malonaldeído ou outras substâncias reativas ao TBA

durante a mistura e filtração da amostra. Seguindo a mesma linha de raciocínio, outros pesquisadores empregaram antioxidantes nos métodos tradicionais de destilação e de extração<sup>22,41,48,49, 53,55,59</sup>.

A adição de 0,1% de PG e a mesma quantidade de EDTA na solução de TCA no método de extração ácido-aquosa em pescados, reduziu os valores de TBA de 25 a 59%<sup>48</sup>. Constatação similar foi obtida no estudo de amostras de “catfish”, onde a oxidação lipídica foi reduzida com a solução 0,5% de PG e EDTA incorporada ao método de destilação. Vale ressaltar que o efeito combinado de PG e EDTA foi mais eficaz. O mesmo efeito no número de TBA não foi obtido para amostras de carne moída, suína e de frango<sup>53</sup>. Aliado a isso, utilizando 0,01% de TBHQ (terc-butil hidroquinona), em base lipídica, no método de destilação, não houve alteração no valor de TBA de carne bovina crua e cozida e coxa de frango cozida, ao passo que para amostras cruas ou cozidas de peixe, peito e coxa de frango, acarretou na diminuição do valor<sup>55</sup>.

Em carnes de aves, 125 µg de BHA (butil hidroxi-anisol) por mg de lipídio reduziu em 15% o valor de TBA no método de extração<sup>50</sup>.

Para amostras de peito de frango, 0,15% de BHT (butil hidroxitolueno) por massa de lipídio no método de destilação foi suficiente para controlar a autooxidação até mesmo em amostras mantidas congeladas por longos períodos. Amostras refrigeradas por 6 dias e mantidas sob congelamento durante 6 meses apresentaram valores de absorvância 1,5 e 1,8 vezes maiores, respectivamente, em relação a amostras adicionadas de BHT. Analogamente, amostras fervidas durante 1 h e incubadas durante 15 h à temperatura ambiente apresentaram diminuições médias de 13,2 e 11,8%, respectivamente, no número de TBA, com a adição de 0,10% de BHT<sup>49</sup>.

### Método de destilação modificado aplicado a pescados

O método de determinação de TBARS por destilação proposto por Ke *et al.*<sup>54</sup>, aplicado a pescados é simples, reproduzível e específico (interferência inferior a 7%), possuindo limite de detecção de 20 nmol. Além da adição de antioxidantes (1% de PG e 1% de EDTA), a amostra é submetida a tratamento com nitrogênio, antecedendo a etapa de destilação, a fim de minimizar a oxidação lipídica, e a duração da destilação é de no máximo 35 min.

Visando a validação do novo método, foram testados como possíveis interferentes: substâncias produzidas durante a deterioração de pescados no estado *post-mortem* (ácidos graxos e compostos sulfurados), metais de transição e antioxidantes nas concentrações de 1,0 a 56,8 mg para 10 g de amostra, equivalendo a 3-10 vezes o limite máximo recomendado, com exceção dos carboidratos. Não interferiram no teste os seguintes compostos nas concentrações citadas: 5,1 mg de ácido palmítico; 4,8 mg de ácido esteárico; 52,0 mg de lecitina; 52,3 mg de cistina; 5,4 mg de cisteína; 5,2 mg de tiuréia; 47,1 mg de óxido de trimetilamina; 5,2 mg de trimetilamina; 5,1 mg de dimetilamina; 4,9 mg de sorbitol; 50,8 mg de sacarose; 56,8 mg de ácido láctico; 5,0 mg de TBHQ; 4,7 mg de BHA; 4,4 mg de MnSO<sub>4</sub>; 48,3 mg de CuSO<sub>4</sub>; 4,7 mg de hemoglobina; 50,4 mg de NaCl e 1,0 mg de FeSO<sub>4</sub>.

### Método de TBA por extração ácido-aquosa utilizando cartucho de sílica C<sub>18</sub>

Utilizando Cromatografia de Fase Reversa - Cartucho C<sub>18</sub><sup>35</sup> no método de TBA por extração ácido-aquosa, foi possível aumentar o limite de detecção, a especificidade e a rapidez das análises.

O método é conhecido como Método de TBA por extração ácido-aquosa utilizando cartucho de sílica C<sub>18</sub> e é destinado a amostras que contenham outras TBARS, uma vez que há a separação do

complexo malonaldeído-TBA de outros compostos coloridos interferentes. Almôndegas e produtos cárneos similares são o principal alvo dessa metodologia e maiores detalhes, assim como sua recente modificação<sup>36</sup>, serão relatados no item referente à sacarose e outros açúcares como interferentes.

Comparado com os métodos de aquecimento direto de Uchiyama e Mihara (1978, citado na ref. 58), destilação de Tarladgis *et al.*<sup>51</sup> e extração ácido-aquosa de Salih *et al.*<sup>30</sup>, o método de extração ácido-aquosa com cartucho de sílica C<sub>18</sub> apresentou valores de recuperação superiores para almôndegas cruas (74,7% versus 52,2; 70,6 e 69,0%, respectivamente) e cozidas (76,7% versus 40,5; 68,7 e 70,0, respectivamente); menores valores de TBA que o método de extração ácido-aquosa (2,2 a 2,8 vezes inferior) – indicando uma maior especificidade do novo método – e correlações altas com as demais metodologias ( $r = 0,967-0,993$ ). Na avaliação das substâncias interferentes, o método de aquecimento direto apresentou 46,9 a 50,3% de interferentes e os métodos de destilação e extração ácido-aquosa não modificados, 6,3 a 8,4% e 21,9 a 24,0%, respectivamente, para as amostras controles. A porcentagem de interferentes formados diariamente, durante o armazenamento sob refrigeração, aumentou 2,5%, para as amostras cozidas e não variou para as amostras cruas quando o método do aquecimento direto foi utilizado, aumentou de 3,5 a 4,2% para as amostras cruas e cozidas pelo método de extração ácido-aquosa e não variou para o método de destilação. Em relação aos limites de detecção dos diversos métodos analisados, os métodos direto, destilação e extração ácido-aquosa apresentaram valores similares, de 1,33 a 2,04 nmol de malonaldeído equivalente para cada mL de extrato cárneo, correspondente ao número de TBA de 0,72 (2,04 mol/mL), o que é cerca de 20 vezes inferior ao limite de detecção do método de TBA C<sub>18</sub>, ao redor de 0,1 nmol/mL, correspondente ao número de TBA de 0,036<sup>58</sup>.

## INTERFERENTES DO TESTE DE TBA E METODOLOGIAS PARA SUA ELIMINAÇÃO

As substâncias reativas ao TBA diferem de acordo com as matrizes de diversas composições lipídicas. Antes de se estimar a reatividade ao TBA das amostras, é importante conhecer os interferentes para avaliar quais substâncias são medidas no teste de TBA<sup>30</sup>. Conhecidos os interferentes, alguns pesquisadores propuseram metodologias que visam a sua eliminação, tema este que será discutido a seguir.

### Açúcares e aldeídos

Uma grande variedade de aldeídos está presente nos lipídios oxidados e alguns deles podem contribuir com o desenvolvimento de cor do teste de TBA. Da mesma forma, os açúcares de composição ou adicionados às formulações de produtos cárneos podem ser considerados interferentes do teste.

Embora Wilbur *et al.*<sup>60</sup> não tenham detectado a influência de aldeídos de cadeias curtas e açúcares no teste de TBA realizado em tecidos biológicos, outros pesquisadores enumeraram como interferentes a sacarose e o formaldeído, individualmente, e a sacarose e/ou frutose em associação com o acetaldeído<sup>21,32-34</sup>.

Entre os demais aldeídos estudados, o ácido glioxílico, o aldeído acético, o aldol, o crotonaldeído, o aldeído pirúvico, o citral, o aldeído propiônico e o aldeído metacrílico não interferiram na reação de TBA em tecidos biológicos<sup>32,60</sup>.

Açúcares como a galactose, D-arabinose, maltose, dextrose e frutose são suficientemente diferentes nas suas reações de cor e sensibilidade, de forma a não interferirem nos testes<sup>60</sup>.

### Sacarose e frutose combinadas com o acetaldeído

A sacarose e a frutose foram reconhecidas como interferentes em sistemas biológicos, ao reagirem com o acetaldeído e o ácido 2-tiobarbitúrico. A explicação para a formação desse produto no mesmo comprimento de onda do pico produzido pelo malonaldeído no teste de TBA é a reação do acetaldeído com produtos não voláteis da pirólise da sacarose ou outras substâncias absorvendo a 225 nm, resultando no cromogênio a 532 nm na presença do ácido 2-tiobarbitúrico<sup>32</sup>.

### Sacarose e outros açúcares

Em tecidos e organelas subcelulares – coração, pulmão, fígado e músculo esquelético - de coelho, Schlafer e Shepard<sup>33</sup> aplicaram a metodologia proposta por Ohkawa *et al.*<sup>45</sup> e observaram alterações nos valores de TBA, atribuídas à sacarose. Com o aquecimento a 95 °C, concentrações tão pequenas quanto 10 mM de sacarose dobraram o valor de absorbância da solução padrão de tetrametoxipropano. A interferência da sacarose não foi relacionada à presença do cromogênio lido a 532 nm (resultado da reação entre o produto da pirólise da sacarose, o acetaldeído e o ácido 2-tiobarbitúrico), que não foi observado, mas ao produto de decomposição do TBA, que absorve a 450 nm de comprimento de onda<sup>16,50-52</sup>. Constatada a interferência da sacarose, propuseram nova adaptação à metodologia, com a adição de sacarose no tubo branco e nos padrões de TMP, seguida de extração com butanol-piridina. Os resultados não foram satisfatórios e a interferência não foi eliminada.

Nova tentativa foi realizada por Raharjo *et al.*<sup>35</sup> com almôndegas cruas e cozidas, que desenvolveram o método de extração ácido-aquosa de TBA com cartucho C<sub>18</sub>, mencionado anteriormente. Nele, o complexo malonaldeído-TBA é recuperado de outros complexos de TBARS pela eluição do cartucho de extração da fase sólida Sep-Pak C<sub>18</sub> (Waters, Milford, MA) com metanol absoluto. A absorbância do eluente de metanol é medida espectrofotometricamente a 525 nm.

Através desse método foi detectada a interferência de substâncias, possivelmente a sacarose (tal fato não foi cogitado no estudo), assim como ocorreu nos testes realizados com a metodologia não modificada de extração ácido-aquosa<sup>50</sup>. A interferência deu-se em nível de 12,7 a 16,8% e 27,3 a 29,1%, respectivamente, para a almôndega crua e a cozida e não pôde ser atribuída à retenção parcial do complexo de malonaldeído-TBA, já que quase a totalidade do complexo foi recuperada do cartucho. As vantagens em relação ao método não modificado de extração ácido-aquosa são redução do tempo de reação a 94 °C de 40 min para aproximadamente 5 min, ao utilizar 80 mM de TBA ao invés de 20 mM; maior especificidade e sensibilidade, com limite de detecção 25 vezes inferior<sup>35</sup>.

Utilizando temperaturas de incubação mais brandas e fazendo outras alterações na metodologia proposta por Raharjo *et al.*<sup>35</sup>, Wang *et al.*<sup>36</sup> concluíram que a interferência da sacarose e outros açúcares estudados (sacarose, sorbitol e maltose) praticamente era eliminada a 40 °C. Acima de 50 °C, constataram que havia a formação do composto amarelo no teste de TBA com máximo de absorbância a 450 nm, citado por outros autores<sup>33,50,51</sup> e que a cor amarela tornava-se mais intensa com o aumento da temperatura de incubação. No monitoramento do “warmed-over-flavor” de amostras de almôndega cozida adicionadas de 10% de sacarose, os resultados foram satisfatórios, com taxas de recuperação elevadas, de 92 a 102%, indicando que a interferência da sacarose foi eliminada<sup>36</sup>.



### Formaldeído

O formaldeído aparece indevidamente como resíduo de processos de conservação de alimentos - na defumação, por ex., sendo um dos constituintes da fumaça e um agente preservante - ou é formado a partir da decomposição de óxido de trimetilamina (TMAO) em algumas espécies de peixes durante o armazenamento sob temperaturas de congelamento. É apontado como interferente na reação de TBA, na medida em que propicia a formação de turbidez ou precipitado, gerando valores menores nas leituras de absorvância<sup>34</sup>.

Teores de formaldeído superiores a 25 µg/mL interferiram no número de TBA durante armazenagem sob congelamento de merluza (*Merluccius hubbsi*) e em concentrações de TBA de 20 µmol/mL, o formaldeído pode favorecer a turbidez ou a precipitação, gerando erros nas leituras da absorvância<sup>21</sup>.

Em estudo simulando a interferência do formaldeído, concluiu-se que o formaldeído compete com o malonaldeído pelo ácido 2-tiobarbitúrico e a interferência se dá pela redução do ácido 2-tiobarbitúrico disponível para reagir. Ocorre a formação de turbidez ou precipitados e, como consequência, as leituras de absorvância do teste de TBA são reduzidas. Para teores de malonaldeído de 0,02 µmol/mL, concentrações de formaldeído da ordem de 1 µmol/mL foram responsáveis pela turbidez, ao passo que para 4 µmol/mL de malonaldeído, altas concentrações de formaldeído (16 µmol/mL) impediram o desenvolvimento de cor. Já para teores de malonaldeído de 10 a 400 vezes superiores ao valor máximo da curva padrão, concentrações mais elevadas de formaldeído foram necessárias, de forma a interferir no teste. Em tais situações, para que haja o desenvolvimento completo de cor a 532 nm do teste de TBA, a razão entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído deve ser igual ou superior a 1000<sup>34</sup>.

### Alcenais e alcadienais

Nas condições do teste, os óleos e/ou gorduras oxidadas podem liberar, através de aquecimento, alcadienais e alcenais, que reagem com o TBA e formam o pigmento MDA-TBA pelo aquecimento<sup>30</sup>.

A interferência do pigmento vermelho produzido a partir de alcenais, é maior na proporção de 1:1 que na reação com TBA em excesso<sup>27</sup>, chegando a uma relação de 1/100 a 1/500 do pigmento formado a partir de malonaldeído.

Diferentemente dos alcenais, os alcadienais apresentam maior interferência quando há excesso de TBA. Sua formação se dá em teores mais elevados quando o teste é submetido a duas etapas (pré-tratamento a 5 °C durante 1 h, na presença de solução ácido-aquosa, oxigênio e outros aldeídos e hidroperóxidos, seguido de aquecimento a 100 °C por 20 min) que a uma única etapa (aquecimento a 100 °C por 20 min)<sup>28</sup>. A presença de t-butil-hidroperóxido é desejável para a formação máxima do pigmento e os aldeídos estimados são liberados a partir dos hidroperóxidos nas condições dos testes<sup>29</sup>.

O pH ótimo para a liberação de alcadienais e alcenais de gorduras e/ou óleos oxidados situa-se na faixa entre 3 e 4 ou acima de 5. Concentrações de 2 mM de t-butil-hidroperóxido e 0,2 mM de ion férrico favorecem a reação na presença de 0,01% de BHT, enquanto o EDTA exerce efeito inibitório, mesmo na presença de t-butil-hidroperóxido<sup>30</sup>. Vale lembrar que na América do Norte, os níveis máximos permitidos de antioxidantes são de 0,01%, para um único oxidante, e 0,02% para qualquer combinação de antioxidantes<sup>61</sup>.

### Nitrito

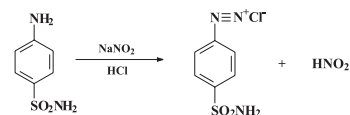
O nitrito presente em produtos curados interfere no teste de

TBA, sendo que as notas sensoriais e os números de TBA de carnes curadas não apresentam a correlação elevada encontrada para produtos cárneos cozidos não-curados<sup>37</sup>.

A interferência do nitrito ocorre na etapa de destilação e até mesmo pequenas quantidades de nitrito, da ordem de 10 mg/kg, são capazes de reduzir significativamente o número de TBA e tal redução aumenta de forma linear com o aumento da concentração de nitrito<sup>38</sup>.

O efeito do nitrito pode ser atribuído à nitrosação do malonaldeído durante a destilação. Compostos alifáticos contendo grupos carbonílicos ou outros grupos adjacentes que atraem elétrons podem gerar a nitrosação do grupo metileno, através do ácido nitroso ou nitritos orgânicos, com formação de compostos isonitrosos (oximos). Acima de 50 °C, a presença do agente de nitrosação em excesso pode converter os compostos a dicetonas ou cetoaldeídos. Dependendo da quantidade do agente de nitrosação presente, todo o malonaldeído ou porções deste podem se tornar indisponíveis para reagir com o TBA, resultando em menores valores de TBA<sup>62</sup>.

Sendo assim, Zipser e Watts<sup>38</sup> adicionaram sulfanilamida antes da etapa de destilação do método de Tarladgis *et al.*<sup>51</sup>, visando eliminar a interferência do nitrito em salsichas curadas e carnes suínas curadas e congeladas. A eliminação da interferência consiste no fato de que em pHs entre 1,5 e 1,6, o nitrito é capaz de diazotizar a sulfanilamida, formando o sal diazônio<sup>63</sup>, tornando-se, assim, indisponível para a formação de oximos (Figura 2).



**Figura 2.** Formação do sal diazônio, a partir da sulfanilamida e nitrito, para de eliminar a interferência do nitrito no teste de TBA

Os resultados obtidos foram satisfatórios, mas a sulfanilamida em excesso pode se converter em um outro interferente do teste, de modo que se recomenda o uso de 1 mL de sulfanilamida para níveis de nitrito inferiores a 100 mg/kg. Por outro lado, o efeito dos vários níveis de nitrito de sódio não foi estudado, o que foi feito por Shahidi *et al.*<sup>39</sup>. Segundo estes, a baixos níveis de nitrito de sódio (0 a 50 mg/kg), os números de TBA observados foram surpreendentemente inferiores aos obtidos nos ensaios sem a adição de sulfanilamida, ao passo que em níveis mais elevados (100 a 200 mg/kg), os números de TBA foram superiores na presença de sulfanilamida, conforme constatações de Zipser e Watts<sup>38</sup>. Os autores concluíram que a utilização da sulfanilamida antes da destilação é necessária somente na presença confirmada de nitrito residual.

### Proteínas

Utilizando amostras de carne, os teores de malonaldeído recuperado foram inferiores às quantidades recuperadas nos testes sem as amostras, para os dois métodos de TBA utilizados - de Siu e Draper<sup>41</sup> e de Tarladgis *et al.*<sup>51</sup>, respectivamente, 57 versus 70% e 83 versus 94%. Tal fato foi atribuído ao malonaldeído ligado a proteínas (MDA-proteína) cárneas, formando compostos estáveis, ou outros compostos das amostras, atuando como interferentes<sup>40,41</sup>.

A fim de avaliar a presença do complexo MDA-proteína interferente, Schmedes e Holmer<sup>47</sup> estudaram o método de TBA por extração lipídica em amostras de pescados, extraíndo a fração lipídica pelo método de Bligh e Dyer<sup>64</sup>, seguido pela reação com o ácido 2-tiobarbitúrico. Evidenciaram a presença de MDA-proteína na fase aquosa e na região interfacial do sistema metanol-água e

clorofórmio. Como o material lipídico concentra-se na fase clorofórmio, as quantidades de MDA-proteína conduziram à subestimação do valor de TBA final. No entanto, devido à presença de fibras na amostra, não foi possível detectar ou quantificar o composto MDA-proteína na fase aquosa e, dessa forma, seu nível de interferência não foi estimado.

## COMPARAÇÕES ENTRE AS DIVERSAS METODOLOGIAS

### Valores de TBA obtidos pelos métodos de extração e de destilação

Comparando os métodos de destilação com os de extração, a literatura relata valores de TBA superiores para o método de destilação, da ordem de grandeza de: 2,0<sup>43</sup>; 1,3-1,4<sup>49</sup>; 2,6<sup>50</sup> e 2,34-3,41<sup>58</sup> vezes os valores obtidos pelos métodos de extração.

Os valores mais elevados de TBA obtidos pelos métodos de destilação são atribuídos à reação da solução de TBA com uma variedade de compostos presentes em alimentos oxidados, os TBARS, conduzindo à produção de substâncias coloridas interferentes; ao aquecimento inerente à destilação que gera aumento na quantidade de aldeídos e a liberação de certos produtos carbonílicos formados pelas reações entre MDA e aminoácidos, pirimidinas ou proteínas<sup>42</sup>.

### Testes de recuperação

Em geral, os métodos de extração permitem percentuais maiores de recuperação que os demais métodos:

- 92,8 a 98,6%<sup>12</sup>; 78 e 80%<sup>35</sup>; 75,2 a 95%<sup>48</sup>; 69 a 76,7%<sup>58</sup> para os métodos de extração;
- 68,0%<sup>43,51</sup>; 68,6 a 77,2%<sup>55</sup>; 36 a 54%<sup>56</sup>; 70,6 e 68,7%<sup>58</sup> para os métodos de destilação e,
- 52,2 e 40,5%<sup>58</sup> para o método por aquecimento direto da amostra.

### Correlação

O métodos de destilação, extração, aquecimento direto e lipídio extraído apresentam elevadas correlações entre si, com valores de coeficiente de correlação de:

- 0,845<sup>43</sup>; 0,857<sup>48</sup>; 0,979<sup>49</sup>; 0,91<sup>50</sup>; 0,993 e 0,979<sup>58</sup> entre os métodos de destilação e de extração;
- 0,983<sup>49</sup>, entre o método de destilação e do lipídio extraído e
- de 0,967 a 0,993<sup>58</sup>, entre os métodos de aquecimento direto, extração aquosa ou destilação e o método de extração modificado<sup>58</sup>.

## OUTROS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE MALONALDEÍDO

A determinação de malonaldeído através do teste de TBA está sujeita à instabilidade das condições freqüentemente geradas no teste e às várias reações paralelas<sup>5</sup>.

Existem outras opções de testes que minimizam esses problemas, tais como os métodos de determinação de malonaldeído, fundamentados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência<sup>2,42,65</sup>, na Cromatografia de Fase Gasosa<sup>66</sup> e na absorção do malonaldeído no espectro ultravioleta<sup>67</sup>, além dos “kits” comerciais de análises rápidas<sup>68-70</sup>.

Os três primeiros métodos, que oferecem melhor especificidade e sensibilidade na detecção do malonaldeído<sup>7,9,42</sup>, não serão discutidos com maior profundidade, devido à maior aplicação em estu-

dos clínicos (por ex., tecidos biológicos, plasma e urina) e aos escassos relatos de aplicação em alimentos.

### Método baseado na absorção do malonaldeído no espectro ultravioleta

A determinação quantitativa do malonaldeído, através do método ultravioleta, foi proposta por Kwon e Watts<sup>67</sup> e baseia-se na absorção deste na faixa do ultravioleta, em função do pH. O malonaldeído, geralmente encontrado em soluções aquosas na forma enólica,  $\beta$ -hidroxi-acroleína (CHOH=CHCHO), dissocia-se progressivamente do hidrogênio enólico na medida em que o pH aumenta. Em pH 3 ou inferior, o composto apresenta configuração s-cis planar, com uma ligação com o hidrogênio intramolecular. Acima de pH 7, essa configuração é completamente dissociada e ocorre como o ânion planar s-trans-enolato. Como em pHs inferiores a 3 ou superiores a 7 não ocorrem mudanças no espectro, a quantificação do malonaldeído dá-se pela diferença entre as absorções a 267 nm nas condições ácidas e básicas.

Os autores propõem que o método seja utilizado para carnes frescas, cozidas e curadas na presença de antioxidantes, peixes e rações com diversos teores de gordura. Em amostras contendo BHA, é necessário ajustar o pH da solução alcalina dos destilados para valores entre 7,0 e 9,5. Aldeídos saturados, como formaldeído, acetaldeído, aldeído propiônico, aldeído butírico e hexaldeído, aldeídos  $\alpha$  ou  $\beta$  insaturados e antioxidantes fenólicos (tocoferol, BHT e PG) não interferem na reação. As vantagens dessa metodologia são a ausência de interferentes, simplicidade, rapidez e especificidade para o malonaldeído. Apesar de sua sensibilidade ser de apenas 40% do teste de TBA por destilação<sup>38,51</sup>, detecta satisfatoriamente limiares de oxidação<sup>67</sup>.

### “Kits” rápidos

Os “kits” de determinação de malonaldeído baseados na reação do malonaldeído com o n-metil-2-fenilindol são outras opções de análises que não consomem período de tempo considerável, não requerem aquecimento prolongado e têm como vantagens a especificidade para o malonaldeído<sup>68,70,71</sup>.

A temperaturas elevadas e baixos valores de pH ocorrem várias reações paralelas interferentes no teste de TBA. Entre os métodos espectrofotométricos de determinação de malonaldeído, o metilpirrol e indol são os únicos reagentes cromogênicos que não requerem aquecimento prolongado<sup>71</sup>. O n-metil-2-fenilindol é considerado o melhor reagente na determinação de malonaldeído, na medida em que reage rapidamente com o malonaldeído (Figura 3), mesmo em presença de água, gerando cromogênio de alto coeficiente de extinção molar e máxima absorção no comprimento de onda de 586 nm<sup>72</sup>.

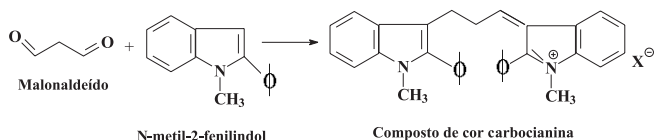


Figura 3. Reação entre o n-metil-2-fenilindol com o malonaldeído, formando o composto de cor carbocianina, medido espectrofotometricamente a 586 nm

Em meio acidificado com o ácido clorídrico, a reação é específica para o malonaldeído<sup>68,73</sup>, ao passo que com o uso do ácido metanossulfônico, o mesmo cromogênio é obtido tanto a partir do malonaldeído como a partir dos 4-hidroxiacenaís, os interferentes do teste em amostras contendo a partir de 100  $\mu$ M de Fe<sup>3+</sup>. No

entanto, a seletividade para o malonaldeído pode ser restituída na presença de probucol até a concentração final de 1 mM<sup>73</sup> ou com o emprego de acetato combinado com EDTA<sup>68</sup>. Dienais, alcenais, alcanais, acroleína e dimetil-acetal metilglioxílico, na presença de ácido metanossulfônico, não interferem no teste, assim como quantidades superiores a 2,5 mM de EDTA<sup>71,73</sup>.

Trabalhos apresentados em congressos internacionais sobre o uso de “kits” rápidos<sup>74</sup> de determinação de malonaldeído<sup>69</sup> avaliaram o emprego de procedimentos rápidos, utilizando reagentes não tóxicos e baseados em química limpa na predição de qualidade de óleos vegetais, formulações infantis, sementes, refeições, cereais, etc. Sua validação perante órgão oficial da AOAC (“American Oils Chemists’ Society”) está em andamento<sup>75</sup>, tendo em vista que os “kits” de determinações de peróxidos<sup>76</sup> e ácidos graxos livres<sup>77</sup> já foram certificados.

## VALORES DE TBA DE CARNES E DERIVADOS

Tanto a formação como a degradação de malonaldeído são afetadas pelo tempo e temperatura de cozimento, meio de transferência de calor, composição do alimento – por ex., a presença de ferro no alimento aumenta a formação de malonaldeído<sup>78</sup>, cortes de carne e tipos de produtos cárneos analisados<sup>40</sup>.

Ao se comparar amostras idênticas de frango, os valores de absorvância obtidos após 1 h de fervura foram 1,3-1,4 vezes superiores aos das amostras acondicionadas à temperatura ambiente<sup>49</sup>.

A oxidação térmica aparentemente não foi promovida em amostras de carnes que requerem tempo de cozimento relativamente curto, inferior a 30 min, ao passo que o processamento durante 3 h conduziu a aumentos significativos no teor de malonaldeído. Como tempo e temperatura estão inversamente correlacionados (quanto maior a temperatura, menor é o tempo necessário para o cozimento), a temperaturas mais elevadas, o número de TBA obtido foi menor, possivelmente pelo menor tempo de contato com o oxigênio molecular durante o cozimento e aumentos de perdas de malonaldeído, com o aumento da volatilidade ou taxa de destruição<sup>41</sup>.

Avaliando o tipo de processamento empregado, o cozimento de carne de frango resultou em aumentos nos teores de malonaldeído, em relação à amostra não processada<sup>40,78</sup>. A fritura por imersão aumentou o número de TBA da ordem de 17 a 19 vezes, enquanto que no cozimento em fornos convencionais e fornos de microondas, os aumentos foram, respectivamente, de 60 e 55 vezes e na fervura, 22 vezes. Mesmo com menor tempo de cozimento (12 min x 90 min) no processamento em fornos de microondas, as concentrações de malonaldeído no produto final foram muito próximas às do processamento em fornos convencionais. De modo similar, o cozimento de hambúrgueres em frigideira a 177-204 °C por 4 min equivaleu ao cozimento durante 3 min em microondas. Os menores níveis de malonaldeído encontrados nos frangos fritos estão relacionados a perdas de malonaldeído, quando submetidos a temperaturas mais elevadas de cocção<sup>78</sup>.

No armazenamento a 4 °C, tanto para carne bovina quanto para suína, houve um aumento gradual nos valores de TBA, as variações de TBA foram insignificantes durante o armazenamento a -20 °C<sup>43</sup>. Sob congelamento a -18 °C durante 6 meses, o número de TBA de peito de frango fresco aumentou 4,1-4,9 vezes, passando de 0,33-0,58 a 1,58-2,38<sup>49</sup>.

O descongelamento de pescados, por sua vez, propiciou um marcante aumento no número de TBA, sendo o efeito mais pronunciado com o aumento no tempo de descongelamento. O contato das amostras com o ferro dos equipamentos de processamento resultou num aumento pronunciado no número de TBA, pois o ferro catalisa a oxidação lipídica<sup>79</sup>.

Em outro estudo, as carnes curadas apresentaram menores concentrações de malonaldeído (< 1 µg/g), enquanto que as maiores concentrações foram encontradas em carnes cozidas de frango, suínas e bovinas. Entre as carnes frescas, as carnes de frango e suína continham teores menores de malonaldeído que as carnes bovina, de cordeiro e vitela. Já para os pescados analisados, as amostras frescas possuíam menores concentrações de malonaldeído que as amostras congeladas<sup>41</sup>.

Avaliando os diferentes tipos de carnes frescas adquiridas no mesmo local, as carnes bovinas apresentaram maiores níveis de malonaldeído que as carnes suínas<sup>40</sup> e de frango<sup>78</sup>. Apesar da gordura bovina ser mais saturada que os demais tipos de carne e a suína, insaturada, diferentes práticas de processamento e manipulação são adotadas, contribuindo para o maior número de TBA das carnes bovinas. A carne bovina é armazenada durante várias semanas para melhorias na textura e no sabor, tempo suficiente para a formação de malonaldeído a partir da gordura insaturada. Já as carnes suínas e de frango são manipuladas por menos tempo e vendidas frescas, a fim de evitar a formação de odores indesejáveis. Em frangos cozidos são formados maiores teores de malonaldeído que em carnes bovinas, devido à maior composição em ácidos graxos insaturados dos primeiros. Durante a cocção, ocorre fato similar: as carnes bovinas, por possuírem menores quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, exibem menores teores de malonaldeído que as carnes de frango e suína<sup>41</sup>.

Para amostras do mesmo tipo de carne ou peixe, mas de procedências distintas, as variações marcantes nos valores de TBA são conseqüências de diferentes métodos de manuseio, condições de armazenamento, idade e procedência das amostras<sup>41</sup>. Essas variações nos números de TBA podem ser atribuídas às diferenças no pH. Durante o armazenamento, existe uma relação inversa entre o valor de TBA e o pH: para cada aumento de uma unidade de pH, os valores de TBA diminuem, em média, 0,28 e 0,26 unidades, respectivamente para o método de destilação e extração no caso de carnes suínas e 0,14 unidades para o método de extração para carnes bovinas<sup>43</sup>.

Em relação a tecidos de pescados, cortes ao longo da cavidade visceral (região anterior ao tecido ventral) são mais vulneráveis à oxidação, com aumentos pronunciados na taxa de formação de malonaldeído, quando em contato com superfícies contendo ferro em sua composição<sup>79</sup>. Dentre as várias partes de pescados analisadas, ocorrem diferenças significativas nos valores de TBA. As amostras de pele (gordura subcutânea) de cavala (*Scomber scombrus*) armazenadas a -15 °C, por dois meses, apresentaram valores de TBA oito vezes maiores que os seus músculos brancos e vermelhos, submetidos às mesmas condições, sugerindo um sistema de oxidação ativo não específico presente na pele<sup>59</sup>.

## CONCLUSÕES

O teste de TBA gera informações úteis a respeito da oxidação de lipídios de produtos cárneos e pescados. Apesar da especificidade questionável do teste, frente a técnicas como CLAE e CG, têm sido feitas modificações no teste para aumentar a especificidade. O emprego de antioxidantes tende a ser uma alternativa eficaz para a minimização de TBARS formadas durante o teste, particularmente para pescados. Para carnes bovinas e suínas, sua aplicação não é válida, não havendo consenso para carnes de aves.

O conhecimento da composição do produto analisado é fundamental para apontar os possíveis interferentes no teste e para se escolher a metodologia mais adequada. Em produtos cárneos como hambúrgueres e almôndegas, crus ou cozidos, por ex., deve-se levar em consideração a sacarose presente. De forma análoga, os

produtos curados requerem atenção especial quanto à presença do nitrito. Além disso, os valores de TBA estão relacionados ao produto analisado. Pescados, em geral, apresentam maiores valores de TBA que carnes bovinas, suínas e frangos. Tal fato está associado à rica composição em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa presente nos pescados, favorecendo a formação do malonaldeído como produto secundário da oxidação de lipídios.

As diversas metodologias existentes não geram valores de TBA compatíveis e é difícil saber qual método de análise é o mais adequado, se forem levados em conta apenas os aspectos positivos. Aparentemente, todos os métodos estão altamente correlacionados entre si, mas as comparações dos números de TBA obtidos por métodos diferentes podem não ser válidas<sup>80</sup>. Os métodos de destilação superestimam os valores de TBA em aproximadamente 2 vezes, se comparados com os métodos de extração, sendo os valores dos testes de recuperação daqueles inferiores a estes. A alta correlação entre as diversas metodologias é uma constatação positiva, tornando possível o uso de fatores de correção; e, no estabelecimento de parâmetros de qualidade para determinado método e produto e permitiu o livre arbítrio na escolha do método a ser utilizado, de acordo com as instalações e os recursos disponíveis do laboratório de análises.

Tendo em vista a dependência dos parâmetros de qualidade à metodologia adotada e à matriz lipídica avaliada, é essencial divulgar o método escolhido na determinação do número de TBA para não incorrer na condenação injusta ou na permissibilidade abusiva de produtos, cuja vida útil é determinada pela oxidação de lipídios. Em alguns casos, o melhor a se fazer é treinar uma equipe de provadores para discriminar alterações no sabor de um determinado tipo de produto e aplicar a metodologia de TBA, correlacionar as notas atribuídas pela equipe com os valores de TBA e estabelecer os parâmetros de qualidade definidos pela correlação. Caso se empreguem outras metodologias, podem ser utilizados fatores de correção, baseados em estudos já realizados, para chegar aos números de TBA correspondentes. Porém, o fator de correção é específico para cada produto.

Uma alternativa promissora ao teste de TBA são os “kits” de análises rápidas disponíveis no mercado. Eles não requerem altos custos de investimento nas instalações e de equipamentos sofisticados, são métodos mais seletivos e fornecem os resultados em curto período de tempo. No entanto, ainda não há estudos conclusivos, correlacionando as concentrações de malonaldeído obtidas pelos “kits” com os números de TBA obtidos pelos métodos tradicionais.

## REFERÊNCIAS

- Gray, J. I.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1978**, *55*, 539.
- Squires, E. J.; Valdes, E. V.; Wu, J.; Leeson, S.; *Poultry Sci.* **1991**, *70*, 180.
- Barrera-Arellano, D.; *Óleos Grãos* **1993**, *13*, 10; Addis, P. B.; *Food Chem. Toxicol.* **1986**, *24*, 1021; Gómez Piñol, J. M.; De la Torre-Boronat, M. C.; *Alimentaria* **1989**, *204*, 11.
- Cecchi, H. M.; *Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos*, Ed. da Unicamp: Campinas, 1999.
- Tarladgis, B. G.; Pearson, A. M.; Dugan, L. R.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1962**, *39*, 34.
- Nair, V.; Turner, G.; *Lipids* **1984**, *19*, 804.
- Squires, E. J.; *Poultry Sci.* **1990**, *69*, 1371.
- Hoyland, D. V.; Taylor, A. J.; *Food Chem.* **1991**, *40*, 271.
- Raharjo, S.; Sofos, J. N.; *Meat Sci.* **1993**, *35*, 145.
- Angelo, A. J. St.; *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **1996**, *36*, 175.
- Mehlenbacher, V. C.; *The Analysis of Fats and Oils*, The Garrad Press: Illinois, 1960.
- Sinnhuber, R. O.; Yu, T. C.; *Food Technol.* **1958**, *9*.
- Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 94.
- Robards, K.; Kerr, A. F.; Patsalides, E.; *Analyst* **1988**, *113*, 213.
- Dahle, L. K.; Hill, E. G.; Holman, R. T.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, *98*, 253.
- Nawar, W.W. Em *Lipids*; Fennema, O. R.; ed.; Marcel Dekker: Nova Iorque, 1996, cap. 5.
- Pokorny, J.; Valentova, H.; Davidek, J.; *Die Nahrung* **1985**, *29*, 31.
- Kim, D. H.; Maeng, Y. S.; *Nonglim Nonjip* **1984**, *24*, 101 apud ref. 14.
- AOCS; *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*, AOCS: Champaign, 2004.
- Hamilton, R. J.; Rossell, J. B.; *Analysis of Oils and Fats*; Elsevier: Londres, 1986; Hougham, D.; Watts, B. M.; *Food Technol.* **1958**, 681.
- Aldomás, M. E.; Giannini, D. H.; Ciarlo, A. S.; Boeri, R. L.; *J. Sci. Food Agric.* **1986**, *37*, 54.
- Lai, S. M.; Gray, J. I.; Smith, D. M.; Booren, A. M.; Crackel, R. L.; Buckley, D. J.; *J. Food Sci.* **1991**, *53*, 616.
- Lai, S.-M.; Gray, J. A.; Booren, A. M.; Crackel, R. L.; Gill, J. L.; *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *67*, 447.
- Warmed-Over Flavor in Meat*; National Live Stock and Meat Board: Illinois, 1988; Mielche; M. M.; Bertelsen, F.; *Trends Food Sci. Technol.* **1994**, *51*, 322.
- Yu, T. C.; Sinnhuber, R. O.; *Food Technol.* **1957**, *11*, 104.
- Ke, P. J.; Linke, B. A.; Smith-Lall, B.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **1982**, *15*, 202 apud ref. 54.
- Kosugi, H.; Kato, R.; Kikugawa, K.; *Anal. Biochem.* **1987**, *165*, 456.
- Kosugi, H.; Kato, R.; Kikugawa, K.; *Lipids* **1988**, *23*, 1024.
- Kosugi, H.; Kato, R.; Kikugawa, K.; *Lipids* **1989**, *24*, 873.
- Kosugi, H.; Kojima, T.; Kikugawa, K.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, *68*, 51.
- Nielsen, S. S.; *Food Analysis*, 2a ed., Aspen Publishers: Gaithersburg, 1998.
- Baumgartner, W. A.; Baker, N.; Hill, V. A.; Wright, E. T.; *Lipids* **1975**, *10*, 309.
- Shlafer, M.; Shepard, B. M.; *Anal. Biochem.* **1984**, *137*, 269.
- Careche, M.; Tejada, M.; *J. Sci. Food Agric.* **1988**, *43*, 49.
- Raharjo, S.; Sofos, J. N.; Schmidt, G. R.; *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2182.
- Wang, B.; Pace, R. D.; Dessai, A. P.; Bovell-Benjamin, A.; Phillips, B.; *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 2833.
- Oslo, F. C.; *comunicação pessoal* 1961 apud ref. 38.
- Zipsper, M. W.; Watts, B. M.; *Food Technol.* **1962**, 102.
- Shahidi, L. J.; Rubin, L. J.; Diosady, L. L.; Wood, D. F.; *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 274.
- Shamberger, R. J.; Shamberger, B. A.; Willis, C. E.; *J. Nutr.* **1977**, *107*, 1404.
- Siu, G. M.; Draper, H. H.; *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 1147.
- Kakuda, Y.; Stanley, D. W.; Voort, F. R.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 773.
- Witte, V. C.; Krause, G. F.; Bailey, M. E.; *J. Food Sci.* **1970**, *35*, 582.
- Ke, P. J.; Woyewoda, A. D.; *Anal. Chim. Acta* **1979**, *106*, 279; Pokorny, J.; Dieffenbacher, A.; *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1165.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K.; *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351.
- Pikul, J.; Leszczynski, D. E.; Kummerow, F. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 1338.
- Schmedes, A.; Holmes, G.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1989**, *66*, 813.
- Vyncke, W.; *Fett, Seifen, Anstrichmittel* **1970**, *12*, 1084.
- Pikul, J.; Leszczynski, D. E.; Kummerow, F. A.; *J. Sci. Food Agric.* **1989**, *37*, 1309.
- Salih, A. M.; Smith, D. M.; Price, J. F.; Dawson, L. E.; *Poultry Sci.* **1987**, 1483.
- Tarladgis, B. G.; Watts, B. M.; Younathan, M. T.; Dugan Jr., L.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1960**, *37*, 44.
- Tarladgis, B. G.; Pearson, A. M.; Dugan, L. R.; *J. Sci. Food Agric.* **1964**, *15*, 602.
- Rhee, K. S.; *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 1776.
- Ke, P. J.; Cervantes, E.; Robles-Martinez, C.; *J. Sci. Food Agric.* **1984**, *35*, 1248.
- Crackel, R. L.; Gray, J. I.; Pearson, A. M.; Booren, A. M.; Buckley, D. J.; *Food Chem.* **1988**, *28*, 187.
- Hoyland, D. V.; Taylor, A. J.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **1989**, *24*, 153.
- Melton, S. L.; *Food Technol.* **1983**, 105.
- Raharjo, S.; Sofos, J. N.; Schmidt, G. R.; *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 921.
- Ke, P. J.; Ackman, R. G.; Linke, B. A.; Nash, D. M.; *J. Food Technol.* **1977**, *12*, 37.
- Wilbur, K. M.; Bernheim, F.; Shapiro, O. W.; *Arch. Biochem.* **1949**, *24*, 305.
- Belitz, H. D.; Grosch, W.; *Food Chemistry*, 2a ed., Springer: Berlim, 1999, cap. 3



62. Touster, O.; *The Nitrosation of Aliphatic Carbon Atoms*; John Wiley & Sons: Nova Iorque, 1953, cap. 6 *apud* ref. 38.
63. Barnes, H.; Rolkard, A. R.; *Analyst* **1951**, 76, 599.
64. Bligh, E. H.; Dyer, W. J.; *Can. J. Biochem. Physiol.* **1958**, 37, 911.
65. Bull, A. W.; Marnett, L. J.; *Anal. Biochem.* **1985**, 149, 284; Csallany, A. S.; Guan, M. D.; Manwaring, J. D.; Addis, P. B.; *Anal. Biochem.* **1984**, 142, 227; Draper, H. H.; Polensek, L.; Hadley, M.; Mcgirr, L. G.; *Lipids* **1984**, 19, 836; Largillière, C.; Csallany, A. S.; *Lipids* **1987**, 22, 104; Kawai, S.; Mélançon, S. B.; *Anal. Biochem.* **1988**, 170, 123; Therasse, J.; Lemonnier, F.; *J. Chromatogr.* **1987**, 413, 237; Lee, H.-S.; Kasashima, K.; Tomita, M.; *J. Chromatogr.* **1989**, 495, 235
66. Tomita, M.; Okuyama, T.; Hatta, Y.; Kawai, S.; *J. Chromatogr.* **1990**, 526, 174; Beljean-Leymarie, M.; Bruna, E.; *Anal. Biochem.* **1988**, 173, 174.
67. Kwon, R.-W.; Watts, B. M.; *J. Food Sci.* **1963**, 28, 627.
68. Inoue, T.; Ando, K.; Kikugawa, K.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, 75, 597.
69. [http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/meeting\\_2001.htm](http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/meeting_2001.htm), acessada em Julho 2003; <http://www.aocs.org/archives/am2001pp.htm>, acessada em Julho 2003; [http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper\\_11113.htm](http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11113.htm), acessada em Julho 2003.
70. Oxisresearch™; Bioxytech® MDA-586™: *Spectrophotometric Assay for Malondialdehyde*, Oxis Health Products: Portland, 2003; Oxitek; *TBARs Assay Kit*, ZeptoMetrix Corporation: Buffalo, 2001.
71. Gérard-Monnier, D.; Erdelmeier, I.; Régnard, K.; Moze-Henry, N.; Yadan, J.-C.; Chaudière, J.; *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 1176.
72. Esterbauer, H.; Zollner, H.; Schaur, R. J. Em *Aldehydes Formed by Lipid Peroxidation: Mechanisms of Formation, Occurrence, and Determination*; Vigo-Pelfrey, C. V., ed.; CRC Press: Boca Raton, 1990 *apud* ref. 71.
73. Erdelmeier, I.; Gérard-Monnier, D.; Yadan, J.-C.; Chaudière, J.; *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 1184.
74. <http://safest.com/pdf/QSC-AldeSafe010612QMM101v0022.pdf>, acessada em Janeiro 2004.
75. Gordon, V. C.; comunicação pessoal, 2004.
76. <http://www.aoac.org/testkits/certificates/030501certificate.pdf>, acessada em Janeiro 2004.
77. <http://www.aoac.org/testkits/certificates/030405certificate.pdf>, acessada em Janeiro 2004.
78. Newburg, D. S.; Concon, J. M.; *J. Food Sci.* **1980**, 45, 1681.
79. Lee, C. M.; Toledo, R. T.; *J. Food Sci.* **1977**, 42, 1646.
80. Williams, J. C.; Field, R. A.; Miller, G. J.; Welke, R. A.; *J. Food Sci.* **1983**, 48, 1776.