

Oxidação lipídica

LCA 0405 – Análise de Alimentos

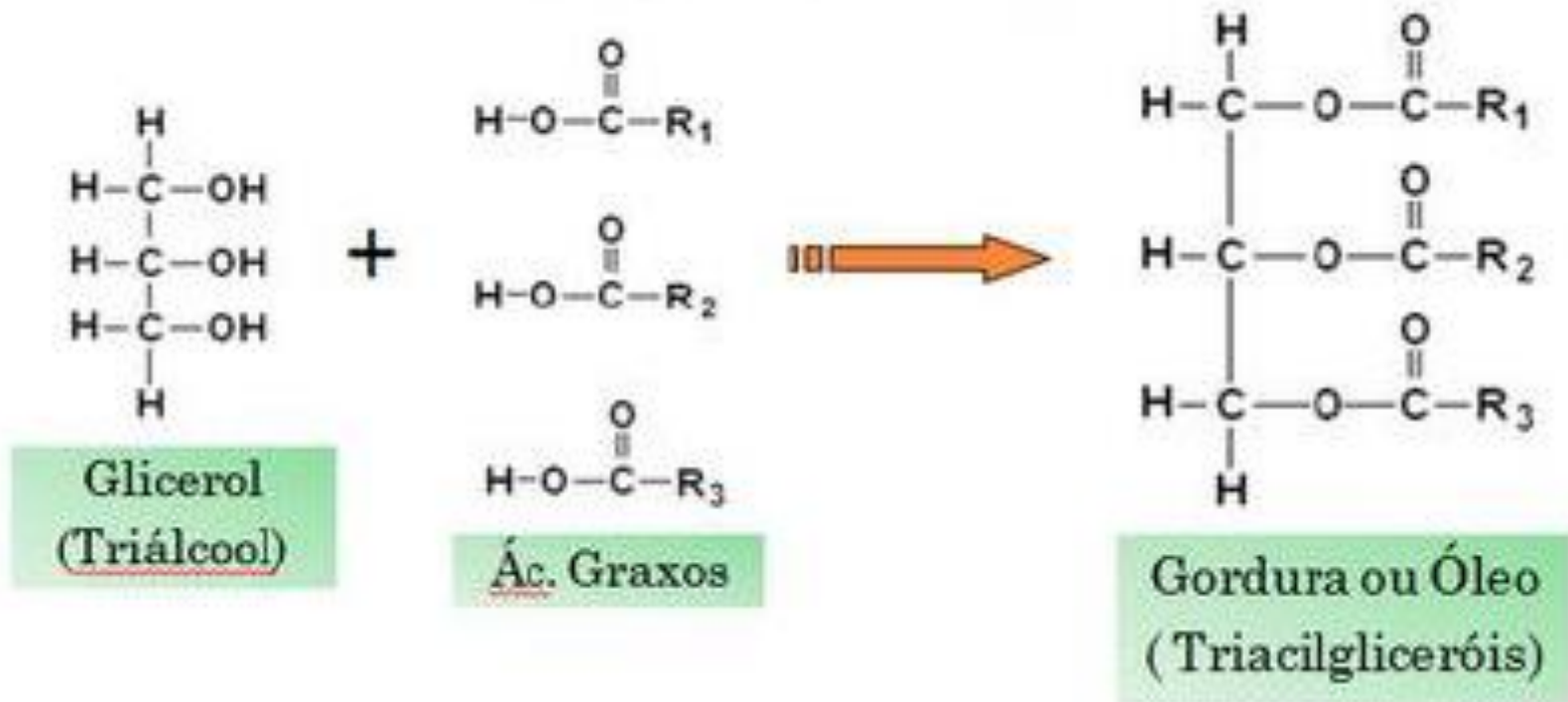
Profa. Gabriela Feltre

Roteiro da aula

- Análises de lipídios;
- Análises de Ácidos Graxos;
- Oxidação lipídica;
- Métodos de avaliação de compostos oxidados

Lipídios

Triacilgliceróis



São triésteres formados por esterificações de ácidos graxos com glicerol.

Análises de Lipídios

Análises de Lipídios

Soxhlet: muito tempo e muito solvente utilizado.

Além do método de Soxhlet, outros podem ser utilizados para a quantificação de lipídios:

- Método de Goldfish;
- Método Bligh & Dyer;
- Método de Gerber.

Método de Goldfish

- Método bastante semelhante ao Soxhlet;
- método utilizado em um sistema de refluxo contínuo com solvente a quente.

<https://www.youtube.com/watch?v=RwLcSr1ZhbM>

Bligh & Dyer

Bligh & Dyer, 1959: uso de metanol e clorofórmico para a separação dos lipídios – extração a frio.

- Trituração da amostra;
- 20 mL metanol + 10 mL clorofórmio + 8 mL água
- Agitação por 30 minutos;
- 10 mL clorofórmio + 10 mL sulfato de sódio 1,5%
- Agitação por 2 min

Bligh & Dyer

- Repouso para separação das fases;
- Separação da fase de cima;
- Filtração da parte de baixo utilizando um funil com papel filtro com 1 g de sulfato de sódio em pó;
- Retirar 5 mL da amostra filtrada, colocar em béquers tarados em deixar evaporar em capela até total evaporação do solvente;
- Pesar o béquer + amostra;

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{(m_{\text{béquer+amostra antes}} - m_{\text{béquer+amostra depois}})}{m_{\text{amostra}}} \times 4 \times 100$$

Bligh & Dyer

Observações:

- Se a umidade do produto for maior que 10%, a quantidade de água deve ser ajustada;
- Muitas vezes, para a separação de fases, é necessário esperar até o dia seguinte;
- Método bom para quando se deseja manter as propriedades dos lipídeos;
- Utilizado como extração prévia para análises oxidação.

Bligh & Dyer

- https://www.youtube.com/watch?v=6ZRepJE00_U

Método de Gerber

Butirômetro de Gerber

- Muito usado para quando os lipídeos estão ligados a outros compostos;
- Usado para leite e produtos lácteos, para hidrolisar as micelas de gordura.



Método de Gerber

Butirômetro de Gerber

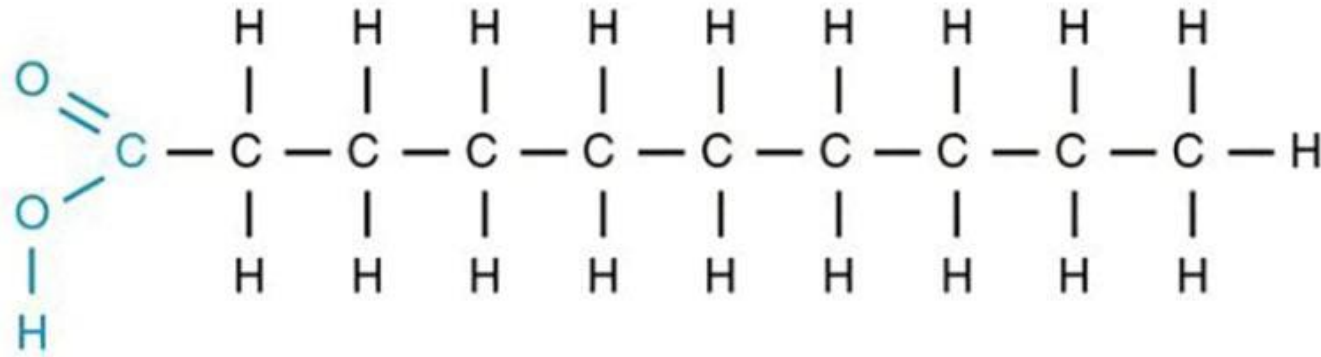
- 11 mL amostra;
- 10 mL ácido sulfúrico;
- 1 mL álcool amílico;
- Centrifugação 1200 rpm/3-5 min;
- Leitura no próprio butirômetro.



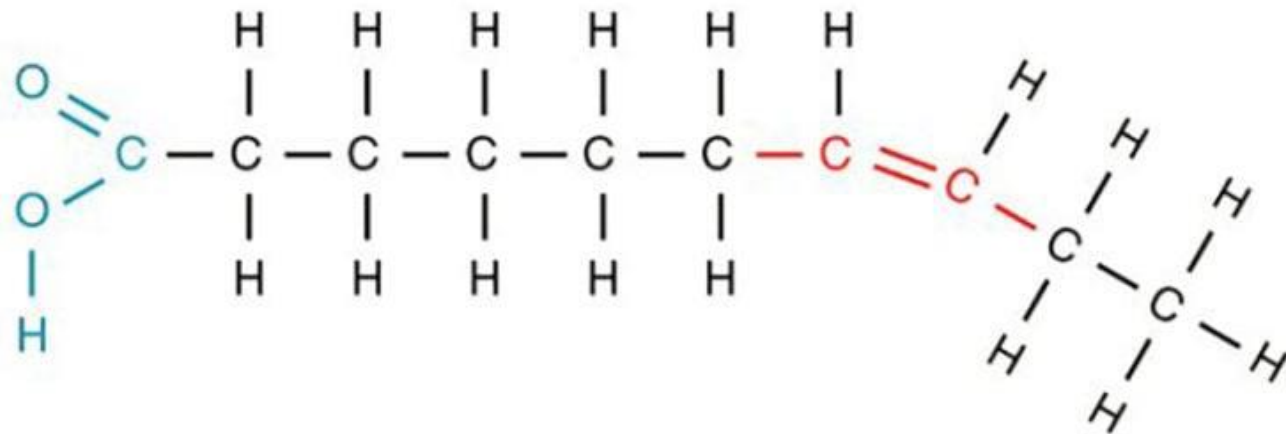
Ácidos Graxos

Ácidos graxos

Saturado



Insaturado



Análises de Ácidos Graxos

Análises de Ácidos Graxos

Análise de AG: Cromatografia Gasosa;

Preparação da amostra:

METILAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Hartman & Lago (1973), com adaptações baseadas no método AOCS Ce 1b-89

Formação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de saponificação e esterificação de amostra de óleo.

Metilação de Ácidos Graxos

Etapas:

- Amostra + Reagente de saponificação – 100°C/5 min;
- Resfriamento em água corrente;
- Adição de Reagente de esterificação - 100°C/5 min;
- Resfriamento em água corrente;
- Hexano + solução saturada de NaCl;

Metilação de Ácidos Graxos

Etapas:

- Separação de fases – coleta da fase superior;
- Fase superior num tubo limpo + água – nova separação de fases;
- Fase superior num tubo limpo + sulfato de sódio anidro;
- Recolher os ésteres metílicos e coloca-los num *vial*.

Metilação de Ácidos Graxos

Reagentes:

- Reagente de saponificação: solução metanólica de NaOH 0,5 N.
- Reagente de esterificação: Cloreto de amônio e metanol + ácido sulfúrico.

Oxidação lipídica

Oxidação lipídica

A oxidação lipídica está na origem de:

- Desenvolvimento de ranço;
- Produção de compostos responsáveis por *off flavors e off odors*
- Ocorrência de reações de polimerização e cisão.

Oxidação lipídica

As reações podem causar diversos problemas:

- Diminuição de valor nutricional;
- Diminuição de vida de prateleira;
- Geração de compostos nocivos.

Oxidação lipídica

Os fenômenos de oxidação dos lipídios dependem de mecanismos de reações muito complexos que estão relacionados a:

- Número e natureza de insaturações;
- Tipo de interface entre lipídios e oxigênio;
- Exposição a luz/calor;
- Presença de pró-oxidantes;
- Presença de antioxidantes.

Mecanismos de oxidação

A degradação oxidativa dos AG insaturados pode ocorrer de diversas formas, dependendo do meio e de agentes catalisadores:

- Fotoxidação;
- Autoxidação;
- Oxidação enzimática.

Mecanismos de oxidação

Fotoxidação

- Fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido pela radiação UV em presença de sensibilizadores
- Envolve a participação de oxigênio como intermediário reativo
- Resulta em hidroperóxidos
- Inibida por carotenos

Mecanismos de oxidação

Autoxidação

- Processo dinâmico que evolui com o tempo
- Fenômeno químico e complexo
- Depende do tipo de ação catalítica (temperatura, íons, radicais livres, pH)
- Processo dividido em 3 estágios: iniciação, propagação e terminação.

Autoxidação

- ✓ Principal responsável pela deterioração de alimentos ricos em lipídeos, pois resulta em alterações indesejáveis de cor, sabor, aroma e consistência do alimento.
- ✓ Oxidação lipídica envolve uma série complexa de reações químicas, que ocorrem entre o oxigênio atmosférico e os AGs insaturados dos lipídeos.
- ✓ 3 estágios.

Autoxidação

✓ 1º) Iniciação:

- 1 átomo de Hidrogênio é retirado do grupo metileno de um AG insaturado, levando à formação de um radical livre:
- O oxigênio adiciona-se ao radical livre e forma um radical peróxido:
- Cada peróxido pode retirar um H de um AG não oxidado.

Autoxidação

✓ 2°) Propagação:

- Uma vez formado o radical livre, este reage com o oxigênio para formar um radical peróxido (1° estágio). Esses radicais são muito reativos e podem retirar átomos de hidrogênio de outros lipídeos insaturados, propagando a reação;
- Essa etapa se caracteriza pela reação em cadeia de radicais livres, pelo alto consumo de oxigênio, alto teor de peróxidos e início de alterações de aroma e sabor.

Autoxidação

✓ 3°) Terminação:

- 2 radicais livres interagem entre si, para formar diversas substâncias, terminando assim o papel deles como propagadores da reação;
- Redução do consumo de oxigênio e redução da concentração de peróxidos;
- Peróxidos são instáveis e se decompõem, com rompimento da cadeia hidrocarbonada, gerando uma variedade de compostos indesejáveis.

Autoxidação

- ✓ 3°) Terminação:
- ✓ Aroma característico e desagradável de ranço é devido principalmente à presença de aldeídos de baixo peso molecular.
- ✓ Formação de cor é devido à formação de polímeros insaturados.

Mecanismos de oxidação

Oxidação enzimática

- Ocorre por catálise enzimática por ação da lipoxigenase.
- Essa enzima atua como catalisador à adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada.
- Resulta em formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas.

Métodos para avaliação do grau da oxidação lipídica

Métodos para avaliação do grau da oxidação lipídica

- Existem diferentes métodos para avaliar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras, mas nenhum método se correlaciona de um modo perfeito com modificações organolépticas.
- Cada método fornece informações sobre um estado particular da oxidação, em função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos.

Métodos para avaliação do grau da oxidação lipídica

- Dificuldade maior: escolher o momento mais adequado para efetuar a determinação.
- Condições padronizadas, selecionar PERÍODO DE INDUÇÃO da reação (tempo necessário para atingir ponto crítico de oxidação).

Métodos para avaliação do grau da oxidação lipídica

Para avaliar o grau de oxidação lipídica, algumas análises podem ser realizadas:

- Análise sensorial;
- Análise dos substratos da oxidação;
- Análise dos produtos primários de oxidação;
- Análise dos produtos secundários de oxidação;

Análise de substratos da oxidação

Oxigênio:

- Absorção de oxigênio – levando-se em conta que a oxidação das gorduras e óleos consomem bastante oxigênio atmosférico;
- Estudo cinético do consumo de oxigênio permite medir a duração da fase de iniciação e/ou alargamento sob o efeito de um agente antioxidante.

Análise de substratos da oxidação

Oxigênio: os métodos medem a absorção de oxigênio.

- Métodos manométricos (Teste de Sylvester) – diferença de pressão de oxigênio (amostra aquecida sob agitação). A reação do O₂ com a amostra leva à diminuição de pressão no interior do recipiente.
- Cromatográficos (cromatografia gasosa) – absorção de oxigênio medida com auxílio de um detetor termocondutimétrico.

Análise de substratos da oxidação

Oxigênio:

Método de pesagem – amostra incubada em estufa na ausência de luz – determina-se o aumento de peso da amostra pela absorção de oxigênio.

Análise de substratos da oxidação

Ácidos graxos residuais não oxidados

- Estudo da cinética de desaparecimento dos ácidos graxos presentes na matriz após extração e derivatização: cromatografia gasosa

Análise de produtos primários de oxidação

Peróxidos

- Diferença entre a formação e a decomposição dos peróxidos (Índice de peróxidos)
- Exprime-se em milimoles de oxigênio ativo por kg de matéria lipídica.
- Deve ser determinado nos primeiros estados do processo oxidativo.

Análise de produtos primários de oxidação

Índice de peróxidos

Método 1: Iodométrico de Lea:

Mede o iodo produzido a partir da decomposição do iodeto de potássio pelos peróxidos.

A análise pode ser por titulação ou colorimetria (comprimento de onda dos íons I_3^- é 350 ou 290 nm)

Análise de produtos primários de oxidação

Índice de peróxidos

Método 2: Colorimétrico

Peróxidos presentes oxidam o Fe^{2+} a Fe^{3+} , que é quantificado por colorimetria (comprimento de onda de 500 nm) sob a forma de cloreto ou tiocianato férrico

Análise de produtos primários de oxidação

Dienos conjugados

- Oxidação dos AG poli-insaturados ocorre com formação de hidroperóxidos e deslocamento das duplas ligações, com consequente formação de dienos conjugados.
- Dienos absorvem a 232 nm.

Análise de produtos primários de oxidação

Dienos conjugados

- Produtos secundários de sua oxidação absorvem a 272 nm.
- Então a relação entre $A_{272\text{nm}}/A_{232\text{nm}}$ é importante para diferenciar os estados de evolução oxidativa.
- Quanto maior o valor de $A_{232\text{nm}}$, corresponderá ao início do processo de oxidação.

Análise de produtos secundários de oxidação

Os peróxidos, quando se decompõem formam compostos de diversas naturezas (normalmente possuem odor desagradável):

- Aldeídos;
- Cetonas;
- Hidroxiácidos;
- Hidrocarbonetos;
- Polímeros

Análise de produtos secundários de oxidação

Compostos aldeídicos: a natureza e proporções relativas dos aldeídos dependem do AG oxidado e das condições de oxidação.

Métodos colorimétricos são utilizados.

Análise de produtos secundários de oxidação

Teste do ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA)

- Baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos.
- Malonaldeído reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha que absorve a 532-535 nm.
- Curva padrão: 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), que libera malonaldeído e etanol após hidrólise ácida.
- Resultado: mg de malonaldeído/kg de amostra.

Análise de produtos secundários de oxidação

Índice de p-anisidina (IpA)

- Método normalizado pela IUPAC.
- Um bom óleo deve ter IpA menor que 10 e também Totox menor que 10.
- Valor totox (Valor total de oxidação)

$$\text{Totox} = 2 (\text{IP}) + (\text{IpA})$$

Análise de produtos secundários de oxidação

Teste de Kreis ou Índice de ranço – método colorimétrico

- Epoxialdeídos ou seus acetais reagem com floroglucinol em meio ácido, formando coloração vermelha.
- Indica ocorrência de oxidação lipídica numa fase precoce de desenvolvimento do ranço.

Análise de produtos secundários de oxidação

Ácidos oxidados

- Insolubilidade dos compostos polares no n-hexano.

- Etapas:

Saponificação

Extração

Neutralização pelo ácido clorídrico

Extração de Ags pelo n-hexano

Evaporação do n-hexano

Análise de produtos secundários de oxidação

Separação dos ácidos oxidados e não oxidados:

- Separação por cromatografia gasosa ou em camada fina, após saponificação

Análise de produtos secundários de oxidação

Compostos voláteis:

- Resultam da decomposição dos produtos primários
- Aparecem numa fase bastante precoce do ciclo evolutivo e estão na origem do ranço
- Cromatografia gasosa de injeção direta ou por *headspace*

Outros métodos

Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

- Permite quantificar separadamente peróxidos e produtos secundários de oxidação.

Outros métodos

Espectrofotometria no IV:

- Bastante utilizado na avaliação do ranço.
- Reconhecimento de grupos funcionais não característicos e de compostos contendo duplas ligações com configuração trans.

Outros métodos

Fluorimetria:

- Usada para detecção de produtos resultantes da oxidação lipídica contendo grupos NH_2 livres.
- Método se baseia na emissão de radiações pela espécie a determinar após absorção de radiação eletromagnética de comprimentos de onda na zona UV/VIS.

Obrigada!