



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA JÉSSICA MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA POR
MALONALDEÍDO USANDO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA EM CARNE DE FRANGO E SUÍNA**

FERNANDA JÉSSICA MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA POR
MALONALDEÍDO USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA EM CARNE DE FRANGO E SUÍNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Adriana Lourenço Soares Russo.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

MENDONÇA, FERNANDA JÉSSICA.

AVALIAÇÃO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA POR MALONALDEÍDO USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM CARNE DE FRANGO E SUÍNA / FERNANDA JÉSSICA MENDONÇA. - Londrina, 2016.
76f. : il.

Orientador: ADRIANA SOARES.
dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2016.
Inclui bibliografia.

1. MDA - Teses. 2. HPLC - Teses. 3. TBARS - Teses. 4. Validação - Teses. I. SOARES, ADRIANA. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

FERNANDA JÉSSICA MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA POR MALONALDEÍDO
USANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM
CARNE DE FRANGO E SUÍNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Lourenço
Soares Russo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de março de 2016.

Aos meus pais queridos, Fernando e Isabel. Aos meus avós amados e ao meu namorado Ighor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Adriana Lourenço Soares pela constante orientação, amizade e confiança ao longo destes mais de 4 anos.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik e Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel por aceitarem o convite.

Aos membros do Laboratório de Desenvolvimento, Instrumentação e Automação Analítica (Lab DIA) – muito obrigada pela ajuda, pelo acolhimento, pelas conversas, conselhos e por se tornarem uma nova família. Um agradecimento especial a “mãe” desse grupo, a Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf por todas as contribuições e carinho.

Aos membros do Grupo de Carnes, obrigada pela ajuda, companheirismo, compreensão e bons momentos, em especial a Ju Almeida, minha amiga desde o começo do estágio.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela oportunidade de formação e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a meus pais, Fernando e Isabel por acreditarem infinitamente em mim e terem paciência em momentos tão difíceis, por serem minha base, meu apoio.

Obrigada aos meus avós por existirem e rezarem por mim.

Aos amigos que, de longe ou de perto, estiveram me apoiando sempre, principalmente a Gabi, Jéssica e Ingridh por compreenderem minha distância, muito obrigada.

Ao meu namorado Ighor, por ser companheiro, compreensível, por estar ao meu lado sempre e pela ajuda, muito obrigada.

Obrigada Deus, pelo dom da vida, pela oportunidade, pela força quando quis fraquejar, por esse trabalho e por estes que estiveram comigo nessa caminhada.

*“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado
algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida é a maior
empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões
e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz
de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre
da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios
sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...
Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um
castelo.”*

Fernando Pessoa

MENDONÇA, Fernanda Jéssica. **Avaliação de oxidação lipídica por malonaldeído usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em carne de frango e suína.** 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A oxidação lipídica é um dos principais fatores limitantes da qualidade e aceitabilidade da carne e seus derivados e o produto majoritário das reações oxidativas em lipídios é o malonaldeído (MDA). Vários são os métodos utilizados para a avaliação da oxidação lipídica em carnes, o mais empregado baseia-se na quantificação do complexo formado na reação entre o MDA e o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). O objetivo deste estudo foi validar um método rápido e específico de quantificação do complexo MDA-TBA₂ em carnes por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método foi validado de acordo com a Resolução 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e apresentou parâmetros adequados de desempenho. Os limites de detecção e de quantificação foram de $1,0 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $3,4 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A linearidade foi avaliada no intervalo de concentração de $8,5 \times 10^{-2}$ a $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o método mostrou-se robusto para variações de temperatura da coluna ($30 \text{ }^\circ\text{C}$), pH do tampão (6,5 e 7,5), proporção da fase móvel (metanol:tampão fosfato 35:65 e 25:75) e de fluxo ($0,90$ e $1,05 \text{ mL min}^{-1}$). A precisão e a exatidão encontraram-se dentro dos parâmetros da resolução. Algumas vantagens do método são a rapidez e a sensibilidade, a ampla faixa de linearidade, o que possibilita a quantificação de MDA em carnes com alto ou baixo grau de oxidação lipídica. Os filés de frango avaliados apresentaram valores médios entre $0,042$ e $0,063 \text{ mg de MDA kg}^{-1}$ de carne e os lombos suínos variaram entre $0,112$ e $0,235 \text{ mg de MDA kg}^{-1}$ de carne.

Palavras-chave: MDA. HPLC. TBARS. Validação.

MENDONÇA, Fernanda Jéssica. **Evaluation of lipid oxidation by malonaldehyde using High Performance Liquid Chromatography in chicken and pig meat.** 2016. 76 p. Dissertation (Master's degree in Science in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The lipid oxidation is one the main factors that affecting the quality and acceptability of meat and meat products and the major product of lipid oxidation reactions in meat is the malonaldehyde (MDA). Several methods are used to asses lipid oxidation in meat, the most used is based on the quantification of the complex formed in the reaction MDA and 2-thiobarbituric acid (TBA). The aim this work was validate a rapid and specific method of quantification of MDA-TBA₂ complex in meat by high performance liquid chromatography (HPLC). The method was validate according to Brazilian Resolution 899/2003 of Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) and presented adequate performance parameters. The limit of detection was $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ and the limit of quantification was $3.4 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$. Linearity was evaluated in concentration range of 8.5×10^{-2} to $1.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ and the method was robustness for variations in column temperature (30 °C), phosphate buffer pH (6.5 e 7.5), proportion of mobile phase (methanol:phosphate buffer 35:65 e 25:75) and flow (0.90 e 1.05 mL min^{-1}). The accuracy and precision were in accordance with the resolution parameters. Some advantages of method were rapidity, sensibility, the wide linear range, which allows the quantification of MDA in meats with high and low lipid oxidation degree. The evaluated chicken fillets had mean values between 0.042 and 0.063 mg of MDA kg^{-1} of meat and pork loins varied between 0.112 and 0.235 mg of MDA kg^{-1} of meat.

Key words: MDA. HPLC. TBARS. Validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Fases das principais reações de oxidação lipídica e precursores do MDA.....	19
Figura 2	– Alguns dos produtos de reação da oxidação lipídica.....	20
Figura 3	– Reação entre o malonaldeído (MDA) e moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA)	25
Figura 4	– Reação entre malonaldeído e 2,4-dinitrofenilhidrazina para formação do produto 1-(2,4-dinitrofenil)pirazol.....	26
Figura 1 (artigo)	– Curva analítica obtida para o padrão de MDA em matriz	44
Figura 2 (artigo)	– Cromatogramas (HPLC-PDA, $\lambda=532$ nm) e espectros UV-Vis obtidos para: A) Padrão MDA (0,43 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em matriz extraída de carne de frango e; B) Amostra extraída de carne de frango.....	46
Figura 3 (artigo)	– Cromatograma (HPLC-PDA, $\lambda=532$ nm) obtido para determinação de MDA-TBA2 em amostra de lombo suíno (<i>Longissimus dorsi</i>) e espectro UV-Visível	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste de TBARS utilizando diferentes quantidades de solução de TCA, com e sem EDTA, no processo de extração em filés de frango para verificar as melhores condições experimentais.....	42
Tabela 2 – Parâmetros de validação para o método de quantificação de MDA em carnes por HPLC (n=9).....	43
Tabela 3 – Variação das áreas de pico em função da variação dos parâmetros para teste de robustez.....	47
Tabela 4 – Quantidades médias de mg de MDA kg ⁻¹ de filé de frango (<i>Pectoralis major</i>) para 4 marcas comerciais avaliadas (n=9).....	48
Tabela 5 – Quantidades médias de mg de MDA kg ⁻¹ de lombo suíno (<i>Longissimus dorsi</i>) para 3 marcas comerciais avaliadas (n=6).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AGPI	Ácido Graxo Poli-Insaturado
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
CMD	Concentração média determinada
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DP	Desvio padrão
DPa	Desvio padrão do intercepto com o eixo Y
DPR	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPA	Agência de Proteção Ambiental Americana (<i>Environmental Protection Agency</i>)
ERN	Espécies reativas ao Nitrogênio
ERRO	Espécies reativas ao Oxigênio
FDA	Agência de controle de medicamentos e alimentos norte-americana (<i>Food and Drugs Administration</i>)
GPx	Glutathione peroxidase
HO•	Radical hidroxila
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC	Inclinação da curva analítica
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização (<i>International Conference on Harmonisation</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
L•	Radical alquila
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LD	Limite de detecção
LO•	Radical alcoxila
LOO•	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido

LQ	Limite de quantificação
MDA	Malonaldeído
PDA	Detector de arranjo de fotodiodos (<i>Photodiode Array</i>)
r	Coefficiente de correlação linear
r ²	Coefficiente de determinação
RP	Fase reversa (<i>Reversed Phase</i>)
SINDIAVIPAR	Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná
TBA	Ácido 2-Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (<i>2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
tR	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta resolução (<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	OXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	16
3.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÊNCIA – HPLC.....	20
3.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	22
3.4	DETERMINAÇÃO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	REGENTES E SOLUÇÕES.....	28
4.2	AMOSTRAS.....	28
4.3	MÉTODOS.....	28
4.3.1	Método de Avaliação de Oxidação Lipídica.....	28
4.3.1.1	Extração das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico	28
4.3.1.2	Determinação de TBARS por HPLC.....	29
4.3.1.2	Condições cromatográficas	29
4.3.2	Validação do Método	30
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	33
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO A – Normas para submissão de artigos da revista <i>Journal of the Brazilian Chemical Society</i>	61

1 INTRODUÇÃO

A carne é um alimento com elevada densidade e variedade de nutrientes altamente biodisponíveis por quilocaloria e é a principal fonte de vitamina B₁₂ da dieta humana. Por essas qualidades e por seu apelo sensorial, a carne e seus derivados têm grande destaque nas dietas do mundo inteiro e movimentam um grande montante em dinheiro (GUGGISBERG, RISSE, HADORN, 2012; DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

Em 2015, a indústria avícola brasileira, segundo o Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná (SINDIAVIPAR), exportou 4,3 bilhões de toneladas de carne de frango, arrecadando quase US\$ 7,1 trilhões, sendo o estado do Paraná o maior exportador do país, responsável por 34% desse total. A produção total do estado foi de 13,1 milhões de toneladas de carne de frango, segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) (SINDIAVIPAR, 2016; ABPA, 2016). Ainda segundo a ABPA, a produção brasileira de carne suína cresceu 4,95% em 2015, totalizando 3,6 milhões de toneladas e a exportação aumentou 9,7%, chegando a 555,1 mil toneladas embarcadas (ABPA, 2016).

O aumento da demanda, entretanto, faz com que se aumente também a exigência do consumidor que preza pela qualidade da carne adquirida. A qualidade da carne pode ser percebida por atributos sensoriais (cor, sabor e textura), nutricionais (quantidade de gordura, perfil de ácidos graxos, proteínas, teor de vitaminas e minerais) e sanitários (controle de microrganismos e ausência de resíduos químicos) (SOYER et al., 2010; ORDÓÑEZ, 2005).

O metabolismo animal e sua composição antes do abate são fatores que afetam diretamente a qualidade da carne e a estabilidade de sua fração lipídica. O equilíbrio entre substâncias antioxidantes, como a vitamina E e glutathione peroxidase (GPx) e substâncias pró-oxidantes, como o conteúdo de ferro livre e quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) existente no músculo antes do abate ajuda a definir a extensão dos processos oxidativos na carne *post-mortem* (PARK et al., 2012; YANG et al., 2002).

Os processos oxidativos além de comprometerem a aceitação sensorial dos produtos cárneos podem ter como produtos de reação alguns componentes tóxicos ou que possam trazer malefícios à saúde do consumidor (UTRERA, ESTÉVEZ, 2013; PARK et al., 2012). Sendo assim, a oxidação lipídica

torna-se o principal fator de perda de qualidade e aceitabilidade da carne e seus derivados, pois resulta em perda de nutrientes e reduz a vida útil do produto cárneo (YANG et al., 2002; SUN et al., 2001; MORRISSEY et al., 1998).

São produzidos durante as reações de oxidação lipídica variados compostos voláteis, como o malonaldeído (MDA), que reage com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido formando um complexo colorido amplamente quantificado em análises de avaliação da extensão da oxidação lipídica em produtos cárneos (DUAN et al., 2015; BARBOSA et al., 2008; ULU, 2004; KARATAS, KARATEPE, BAYSAR, 2002). O complexo pode ser medido em espectrofotômetro em 532 nm, mas também pode ser analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (MENDES, CARDOSO, PESTANA, 2009; MATEOS et al., 2005).

A análise de MDA por HPLC, embora seja mais complexa que a análise por espectrofotometria, é mais específica e sensível, o que aumenta a confiabilidade dos dados obtidos (OSAWA, FELÍCIO, GONÇALVES, 2005). A qualidade das medições químicas, porém, deve ser confirmada por meio de uma validação do método analítico (RIBANI et al., 2004), que “deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (BRASIL, 2003).

Diante do constante crescimento econômico do setor de carnes e da preocupação com a qualidade da carne oferecida ao consumidor, este estudo buscou validar um método rápido e específico de quantificação do complexo MDA-TBA₂ por HPLC.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um método rápido e específico para determinação do complexo MDA-TBA₂ por cromatografia líquida de alta eficiência para avaliar a extensão da oxidação lipídica em carnes de frango e suínos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o método de avaliação de oxidação lipídica por HPLC para carnes de frango e suína, de acordo com a Resolução número 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003).
- Testar o método proposto em filés de frango e lombos suínos de diferentes marcas comerciais obtidas no comércio local.
- Adaptar a extração de malonaldeído para carnes de frango e suínos para posterior determinação por cromatografia líquida de alta eficiência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A fração de gordura é uma importante parte dos componentes básicos da carne, tal como água e proteínas. A presença lipídica na carne e seus produtos é importante para fatores relacionados à aceitação do consumidor, como a suculência, sabor e aroma, mas também está intimamente ligada a processos oxidativos por ser facilmente oxidável (ORDÓÑEZ, 2005; MORRISSEY et al., 1998).

Os processos oxidativos produzem substâncias indesejáveis na carne e causam a redução da qualidade dos alimentos. Os produtos gerados além de produzirem sabores e odores desagradáveis também levam a degradação de constituintes essenciais como os ácidos graxos linoleico e linolênico (das famílias ômega 6 e ômega 3, respectivamente), ocasionando decréscimo no valor nutricional do alimento e oxidação de outros constituintes da carne, como as proteínas (YANG et al, 2002). Dentre os processos oxidativos, a oxidação lipídica é considerada a mais danosa ao alimento, sendo considerada uma das principais causas da perda de qualidade dos produtos à base de carne crus e cozidos durante o armazenamento refrigerado ou congelado (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; GRAY, MONAHAN, 1992).

A principal fração de gordura responsável pela oxidação lipídica é a fração de ácidos graxos, em especial os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), pois suas insaturações na cadeia carbônica são energeticamente mais susceptíveis a oxidação, e dessa maneira a composição de ácidos graxos de um produto cárneo pode interferir diretamente em sua vida útil, devido a possível formação de ranço, mudanças de coloração e aromas desagradáveis (RODRIGUES, CAMARGO, 2010; UCHIDA, 2003; WOOD et al., 2003).

As reações de oxidação são na maioria das vezes indesejáveis nos alimentos e muitos estudos direcionam-se na tentativa de retardar ou suprimir o processo oxidativo, seja por meio da aplicação de agentes antioxidantes, emprego de técnicas de processamento e embalagem ou adição de produtos químicos. As condições adequadas de armazenamento e embalagem conseguem ser úteis e colaboram para desacelerar ou inibir esses processos, como a refrigeração e embalagens com atmosfera modificada sem a presença de oxigênio, que preservam

por mais tempo as características desejáveis do produto cárneo (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; SOYER et al., 2010). Particularmente, a presença de ferro, cobre e outras substâncias metálicas no meio celular promove o efeito catalítico da oxidação lipídica e o controle dessas reações torna-se mais complexo (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010).

As reações de oxidação lipídica iniciam-se no sistema biológico por ação de radicais livres e ocorrem em maior proporção quando há um desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes nos tecidos animais. Quando vivos, os tecidos mantêm-se íntegros por mais tempo devido à ação dos mecanismos de defesa do organismo, entretanto quando as atividades vitais são cessadas as reações pró-oxidantes são favorecidas. Isso acontece porque a queda do pH durante a transformação do músculo em carne, além de favorecer as reações oxidativas energeticamente, desestrutura também a compartimentalização celular, liberando no meio íons metálicos, que atuam como catalisadores dessas reações, e enzimas que atuam principalmente favorecendo o sistema pró-oxidante (ESTÉVEZ, 2015; CZAUDERNA, KOWALCZYK, MAROUNEK, 2001; RAHARJO, SOFOS, 1993; GRAY, MONAHAN, 1992).

O estresse oxidativo em sistemas biológicos é caracterizado quando as reações pró-oxidantes são favorecidas no meio, e fazem com que ocorram reações oxidativas no organismo danificando principalmente os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. As membranas celulares que são constituídas de uma bicamada lipídica com proteínas dispersas também são importantes alvos das espécies reativas ao oxigênio (ERO) e espécies reativas ao nitrogênio (ERN) e, por esse motivo, o estresse oxidativo é constantemente relacionado ao desenvolvimento de doenças como o câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares e do fígado e, devido à formação de radicais livres, ao processo de envelhecimento (ESCRIBÁ, NICOLSON, 2014; VASCONCELOS et al., 2007; CZAUDERNA, KOWALCZYK, MAROUNEK, 2001; JORDÃO JÚNIOR et al., 1998; CORDIS et al., 1994).

Oxidação lipídica é um termo genérico para designar uma sequência de reações envolvendo lipídios e oxigênio e que tem como consequências alterações químicas diversas nas estruturas lipídicas. Ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídios podem ser alvos de reações oxidativas, que ocorrem em cadeia, e que levam a formação de hidroperóxidos na carne, produtos primários bastante instáveis de oxidação lipídica. A quebra destes produtos primários resulta

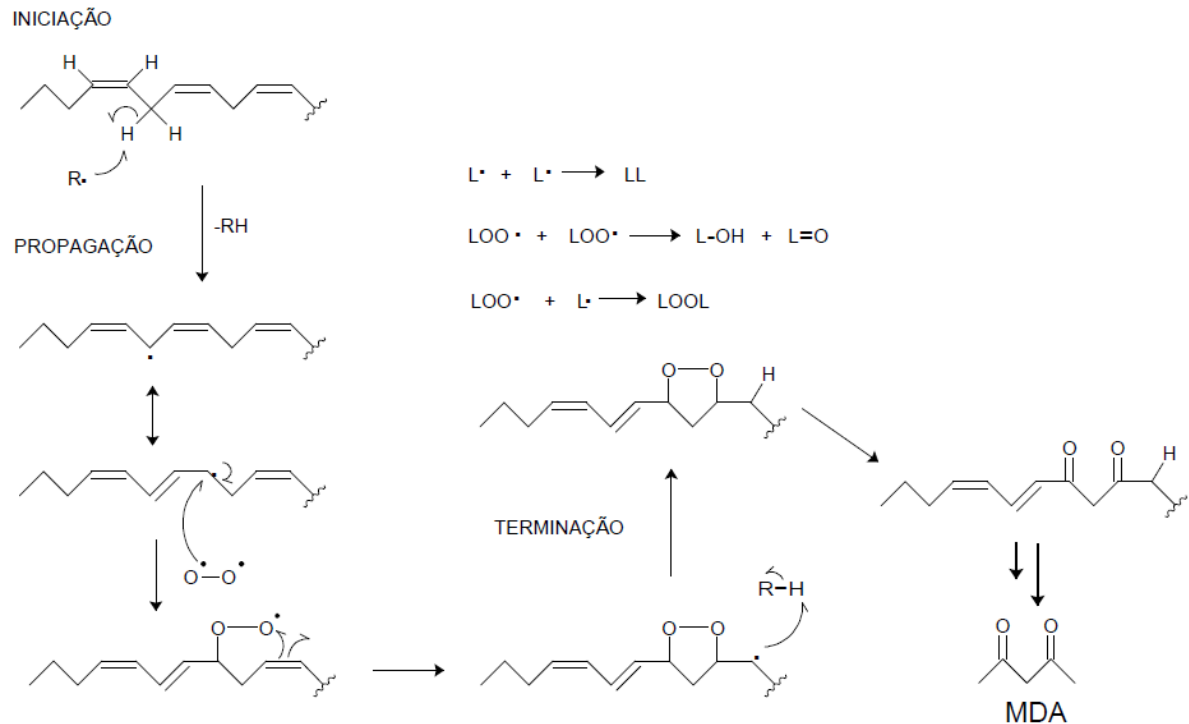
na formação de produtos secundários, moléculas pequenas e voláteis responsáveis pela formação de aromas e sabores indesejados, tais como aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos, e que em concentrações mais altas, podem desenvolver sabores e aromas de pintura, metal, papel e até de vela nos alimentos (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; MENDES, CARDOSO, PESTANA, 2009).

Os radicais livres são os principais responsáveis pelas reações de oxidação lipídica e essas espécies podem variar muito inclusive em potencialidade nociva. O radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$) é um exemplo de radical de energia muito alta e que consegue remover facilmente hidrogênio das moléculas lipídicas. As reações de oxidação lipídica ocorrem em três fases: fase de iniciação, propagação e terminação (ESTÉVEZ, 2015; VASCONCELOS et al., 2007; BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006; VANNUCCHI et al., 1998).

A Figura 1 apresenta um esquema das fases e reações da oxidação lipídica e os precursores do MDA. Na primeira fase das reações o AGPI sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; LIMA, ABDALLA, 2001). A oxidação de um AGPI, entretanto, pode também ser iniciada por sistemas enzimáticos, por meio da ação de enzimas como as peroxidases e dioxigenases (LIMA, ABDALLA, 2001).

Na etapa de propagação, em meio aeróbio, ocorre a adição de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ao radical alquila, formando radicais peroxila ($\text{LOO}\cdot$) de alta energia. Estes radicais abstraem hidrogênios de outras moléculas, principalmente AGPIs, e resultam em hidroperóxidos (LOOH) e novos radicais alquila ($\text{L}\cdot$) que continuam a fase de propagação. Íons de metais de transição, como Fe^{n+} e Cu^{n+} , podem participar do processo catalisando a formação de radicais lipídicos alcoxila ($\text{LO}\cdot$), peroxila ($\text{LOO}\cdot$) e hidroxila ($\text{HO}\cdot$) a partir dos hidroperóxidos formados. Por serem instáveis, os hidroperóxidos decompõem-se formando compostos menores como os aldeídos MDA e 4-hidroxinonenalaldeído (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; VASCONCELOS et al., 2007; LIMA, ABDALLA, 2001).

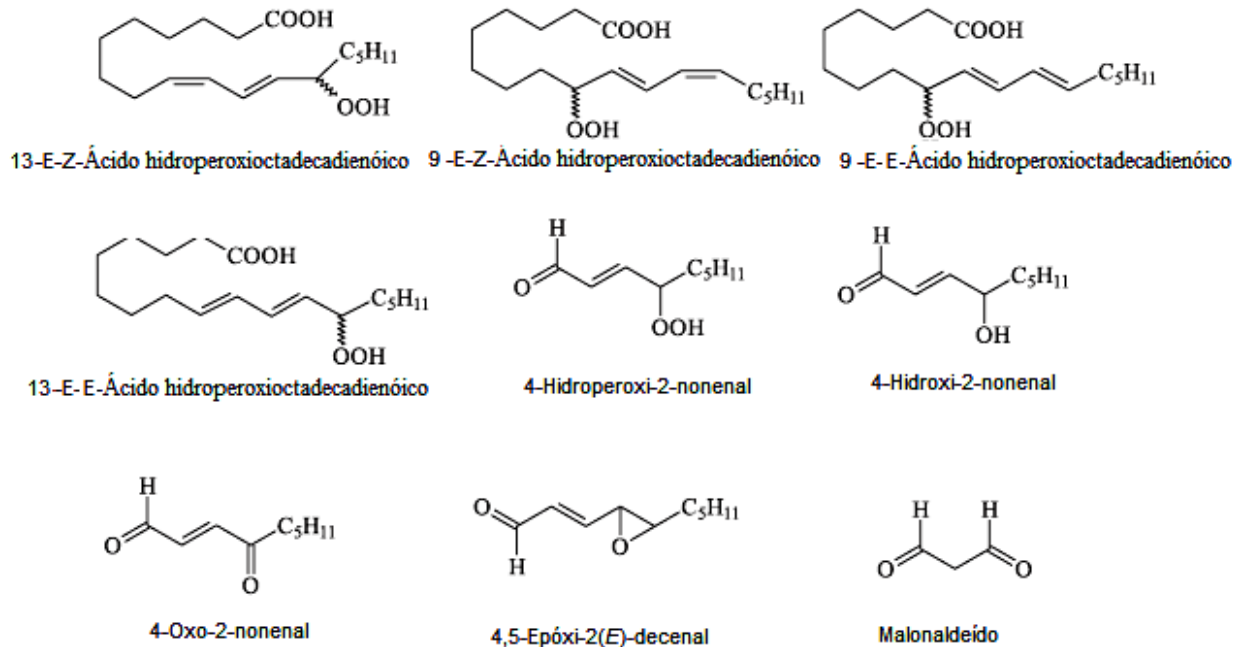
A terceira fase das reações é a de terminação, as etapas envolvidas neste momento são as de combinações de radicais para a formação de compostos não radicalares, e, portanto, menos reativos. Esta fase é limitada pelas fases de iniciação e propagação (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; VASCONCELOS et al., 2007; LIMA, ABDALLA, 2001).

Figura 1 - Fases das principais reações de oxidação lipídica e precursores do MDA

Os principais produtos da oxidação lipídica são os aldeídos, como o malonaldeído que é o produto mais abundante resultante da peroxidação lipídica, cetonas e óxidos de colesterol, alguns produtos de oxidação estão apresentados na Figura 2. Esses produtos são conhecidos por serem causadores de danos biológicos *in vivo* e conseqüentemente ocasionarem problemas de saúde. São responsáveis por alterações nas características sensoriais e nutritivas de carnes e produtos cárneos (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006).

O MDA é um dialdeído volátil de baixa massa molar, 72 g mol^{-1} , contém apenas três carbonos que formam uma cadeia curta 1,3-dicarbonil, produzido pela degradação oxidativa de AGPIs com três ou mais ligações duplas. É uma molécula altamente citotóxica capaz de alterar processos fisiológicos em animais e seres humanos. Por ser um dos principais produtos da oxidação lipídica e por sua alta reatividade, é bastante utilizado como medida indireta da extensão da oxidação lipídica e como biomarcador de estresse oxidativo em meios biológicos (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; UCHIDA, 2003; CZAUDERNA, KOWALCZYK, MAROUNEK, 2001; RAHARJO, SOFOS, 1993).

Figura 2 - Alguns dos produtos de reação da oxidação lipídica



Fonte: Adaptado de BARREIROS, DAVID, DAVID (2006).

O malonaldeído é extensamente explorado como marcador de oxidação lipídica e o teste de TBARS é a técnica mais frequentemente usada e recomendada para carnes e produtos cárneos (BARRIUSO, ASTIASARÁN, ANSORENA, 2013; ULU, 2004).

3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - HPLC

Os sistemas de HPLC atualmente são constituídos de alguns componentes básicos de operação, como a bomba de alta pressão, que elui a fase móvel ao longo do sistema cromatográfico; a válvula de injeção manual ou autoamostrador, utilizados para a introdução da amostra; a coluna analítica, considerada a peça fundamental e mais importante do sistema cromatográfico, na qual acontece a separação dos componentes da amostra; o detector, responsável por identificar a presença de componentes e emitir um sinal elétrico a ser registrado durante a corrida cromatográfica e, na saída do detector, tem-se o sistema de gerenciamento dos experimentos e aquisição de dados, responsável pelo

armazenamento dos sinais e produção de gráficos, conhecidos como cromatogramas (NAZARIO et al., 2015; VON MÜHLEN, LANÇAS, 2004; DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

As colunas analíticas mais empregadas em HPLC são feitas de aço inoxidável, de comprimento e diâmetro interno variados, e recheadas com material particulado que se mantém fixo, que é chamado de fase estacionária. O desenvolvimento dessas colunas foi um fator que proporcionou grande avanço na área da HPLC, as primeiras colunas empacotadas para essa finalidade possuíam partículas de tamanho irregular em torno de 30 μm . Por volta de 1980, foram substituídas por partículas menores e de morfologia esférica. Mas o avanço que possibilitou melhor separação dos componentes foi o surgimento de partículas com diâmetros de 5 e 3 μm . Atualmente, tem-se colunas elaboradas com partículas que variam de 1,5 - 2,0 μm , mas que são empregadas em sistemas que operam a pressões ainda mais elevadas, são os sistemas de cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*). Devido as altas pressões empregadas em sistemas com partículas micrométricas, os solventes usados devem possuir alta pureza (NOVÁKOVÁ, SOLICHOVÁ, SOLICH, 2006; SKOOG et al., 2006; SILVA et al., 2004).

A sílica é o material mais utilizado como suporte devido a suas qualidades técnicas como estabilidade mecânica e térmica, rigidez e eficiência no processo de separação. Quando a fase estacionária responsável pela separação é a sílica ou algum material de natureza altamente polar, a cromatografia se diz ocorrer em fase normal. Quando, porém, algum material de natureza apolar é quimicamente ligado ou imobilizado sobre a sílica, chama-se de cromatografia em fase reversa (RP, do inglês *Reversed Phase*), como é o exemplo das colunas do tipo C_8 e C_{18} , cujos grupos quimicamente ligados são o octil (C_8) e o octadecil (C_{18}). Segundo Skoog et al. (2006), estima-se que mais de três quartos de todas as separações feitas por HPLC são realizadas em RP (MALDANER, COLLINS, JARDIM, 2010; SKOOG et al., 2006; SILVA et al., 2004).

Os detectores mais comuns utilizados em cromatografia líquida são o de índice de refração, por possuírem seletividade universal e os espectrofotométricos na região ultravioleta-visível (UV-Vis ou PDA), sendo que o de arranjo de fotodiodos (PDA, do inglês *Photodiode Array*) possibilita a obtenção do espectro de absorção UV-Vis dos componentes da amostra. Os detectores de

fluorescência são mais sensíveis e seletivos que os detectores de UV-Vis ou de índice de refração pois são capazes de medir a intensidade de fluorescência emitida pelos analitos quando excitados por radiação UV. Devida a elevada sensibilidade, os fluorímetros são muito utilizados para análise de traços quando o tamanho da amostra é reduzido ou a concentração do analito é baixa (SKOOG et al., 2006).

Para análises de oxidação lipídica em carnes por HPLC a fase mais utilizada é a RP e os detectores são o de arranjo de fotodiodos, que identificam compostos na região ultravioleta-visível (UV-Vis), e o de fluorescência (PAPASTERGIADIS et al., 2014; CZAUDERNA, KOWALCZYK, MAROUNEK, 2001; BERGAMO et al., 1998; RAHARJO, SOFOS, 1993).

3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Para garantir a efetividade do método e confiabilidade dos dados um método analítico não pode ser desenvolvido e colocado em prática sem que sua validação seja realizada. Sendo assim, um método analítico desenvolvido ou modificado, deve passar por um processo de avaliação que ateste a sua eficiência em uso de rotina, denominado validação. Esta consiste em um processo contínuo que se inicia por um processo de estratégia e é continuado por seu desenvolvimento e modificações necessárias no decorrer das análises (ARAGÃO, VELOSO, ANDRADE, 2009; RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004).

A partir da década de 1970, a validação passou a ser importante devido a enorme variabilidade de dados obtidos em análises toxicológicas estudadas por órgãos do governo norte-americano. Por iniciativa da agência americana responsável pela fiscalização dos remédios e alimentos (FDA, do inglês *Food and Drugs Administration*) e da Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA), criou-se o sistema denominado ISO/IEC-25 (do inglês *International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission*) com a finalidade de padronizar as exigências a serem seguidas em laboratórios e tornar os resultados internacionalmente aceitos (LANÇAS, 2009).

A validação de um método analítico, embora seja trabalhosa, é necessária para garantir características importantes nas análises posteriores, como comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, exigências atuais para que se evitem decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis, causados por

resultados errôneos provenientes de análises não confiáveis. Além disso, as validações trazem por consequências maior qualidade no desenvolvimento de produtos e controle dos processos envolvidos (KHAN et al., 2013; ARAGÃO, VELOSO, ANDRADE, 2009; RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004).

Na validação de métodos analíticos, alguns parâmetros são requisitados de forma recorrente, em documentos nacionais ou internacionais, com nomes semelhantes ou um pouco divergentes. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação são: seletividade, faixa linear, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Esses termos também podem ser chamados de parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho, ou ainda de figuras analíticas de mérito. Os parâmetros, suas denominações e suas formas de serem calculados podem variar de acordo com o protocolo de validação utilizado (BRASIL, 2011; ARAGÃO, VELOSO, ANDRADE, 2009; RIBEIRO et al., 2008; ICH, 2005; LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2003).

Em análises cromatográficas, a especificidade e a seletividade avaliam a capacidade do método em medir o composto de interesse na presença de outros componentes da matriz, sem interferências no tempo de retenção do analito. A linearidade avalia a proporcionalidade direta entre os resultados obtidos e a concentração do analito na amostra, e é estudada dentro de um intervalo específico. O valor de limite de detecção expressa a menor quantidade detectável do analito presente em uma amostra, este parâmetro pode ser chamado também de sensibilidade. O limite de quantificação expressa a menor quantidade do analito que pode ser determinado em uma amostra apresentando precisão e exatidão aceitáveis. A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos quando são feitas diferentes medidas de uma mesma amostra em dias diferentes, no mesmo dia e em diferentes laboratórios. A exatidão expressa a proximidade entre os resultados obtidos pelo método e o valor verdadeiro que devem estar entre 80 a 120% do valor teórico do teste. A robustez avalia a capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, como proporção da fase móvel, temperatura da coluna, pH da fase móvel e lote ou fabricante da coluna (BRASIL, 2003).

Os protocolos para validar um método podem variar de acordo com a área que atendem, e podem ser estabelecidas por órgãos ou entidades privadas. Nos Estados Unidos, por exemplo, há a EPA que dá orientações sobre validação de

métodos na área específica de Química Ambiental, enquanto que em outras áreas, como a farmacêutica, existem protocolos de maior abrangência de utilização, que vão além da análise em fármacos e, não tem caráter apenas nacional, como o guia de validação da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH), cuja elaboração é feita por Japão, União Europeia e Estados Unidos (RIBEIRO et al., 2008; ICH, 2005). Essas organizações têm como principal objetivo aumentar a reprodutibilidade dos resultados obtidos, a fim de que sejam aceitos internacionalmente por meio de padronização de exigências (LANÇAS, 2004).

No Brasil, dois órgãos regulamentam a validação de métodos analíticos, sendo um deles uma agência reguladora, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cuja RDC número 899 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) é um guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos e a resolução mais atual, RDC número 27 de maio de 2012 (BRASIL, 2012), dispõe sobre os ensaios bioanalíticos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, e o outro o INMETRO que por meio do documento DOQ-CGCRE-008, de julho de 2011 (BRASIL, 2011), orienta sobre validação de métodos analíticos.

3.4 DETERMINAÇÃO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS

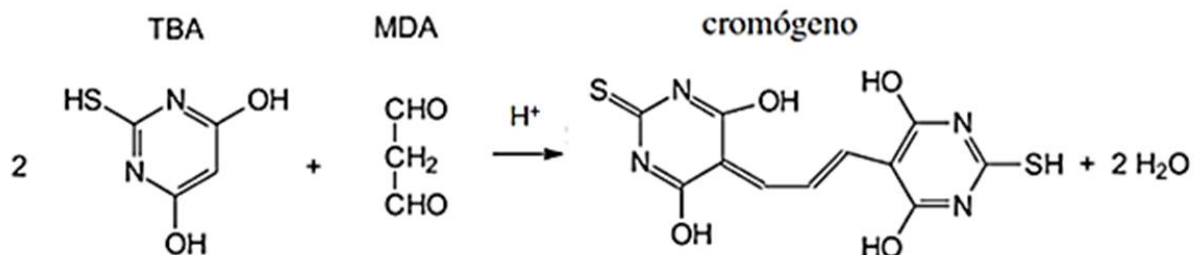
Na área de alimentos, diversos são os métodos empregados para analisar a oxidação lipídica, visto que os alimentos quando sofrem processos oxidativos têm perdas nutricionais e principalmente sensoriais que acarretam na baixa aceitação do consumidor. Os testes empregados geralmente analisam os produtos primários de oxidação, os peróxidos, ou os produtos secundários, cetonas e aldeídos principalmente. Os radicais livres também podem ser medidos por ressonância paramagnética eletrônica, entretanto o alto custo e a complexa interpretação exigida inviabilizam a expansão da técnica (BARRIUSO, ASTIASARÁN, ANSORENA, 2013).

Os métodos utilizados para identificação dos peróxidos podem ser titulação, espectrofotometria UV-Vis, cromatografia, quimiluminescência, e espectroscopia no infravermelho, sendo a titulação o método mais empregado. Para identificação dos produtos secundários de baixa massa molecular são utilizadas, a cromatografia, a espectrofotometria UV-Vis e a fluorescência, identificando principalmente os aldeídos (BARRIUSO, ASTIASARÁN, ANSORENA, 2013).

Em carnes, o método mais frequentemente empregado para avaliar a extensão da oxidação lipídica é o teste de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico, do inglês *2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), por identificação espectrofotométrica. Este método é muito criticado pela baixa sensibilidade e seletividade e, por isso, os métodos cromatográficos vêm sendo utilizados como uma alternativa mais confiável (PAPASTERGIADIS et al., 2014; RAHARJO, SOFOS, 1993; LADIKOS, LOUGOVOIS, 1990).

No teste de TBARS o MDA é derivatizado por meio de reação em meio ácido com o TBA. Duas moléculas de TBA reagem com uma molécula de MDA formando um complexo de coloração rosa/vermelha que é quantificado por HPLC-PDA ou em espectrofotômetro em 532 nm (Figura 3), por meio de uma curva analítica. Como padrão para a análise quantitativa é usado comumente o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), o qual libera MDA em solução após hidrólise ácida à quente. Neste teste, entretanto, não somente o MDA se associa ao TBA, mas sim todas as substâncias reativas ao TBA que apresentem carbonilas, como cetonas, açúcares, proteínas e aldeídos. Por esse motivo o teste de TBARS é considerado comparativo e pouco seletivo, entretanto tem alta sensibilidade e é bastante útil para a avaliação da extensão da oxidação lipídica em função do tempo (MENDES, CARDOSO, PESTANA, 2009; VASCONCELOS et al., 2007; GOMES et al., 2003; SILVA, BORGES, FERREIRA, 1999).

Figura 3 - Reação entre o malonaldeído (MDA) e duas moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)



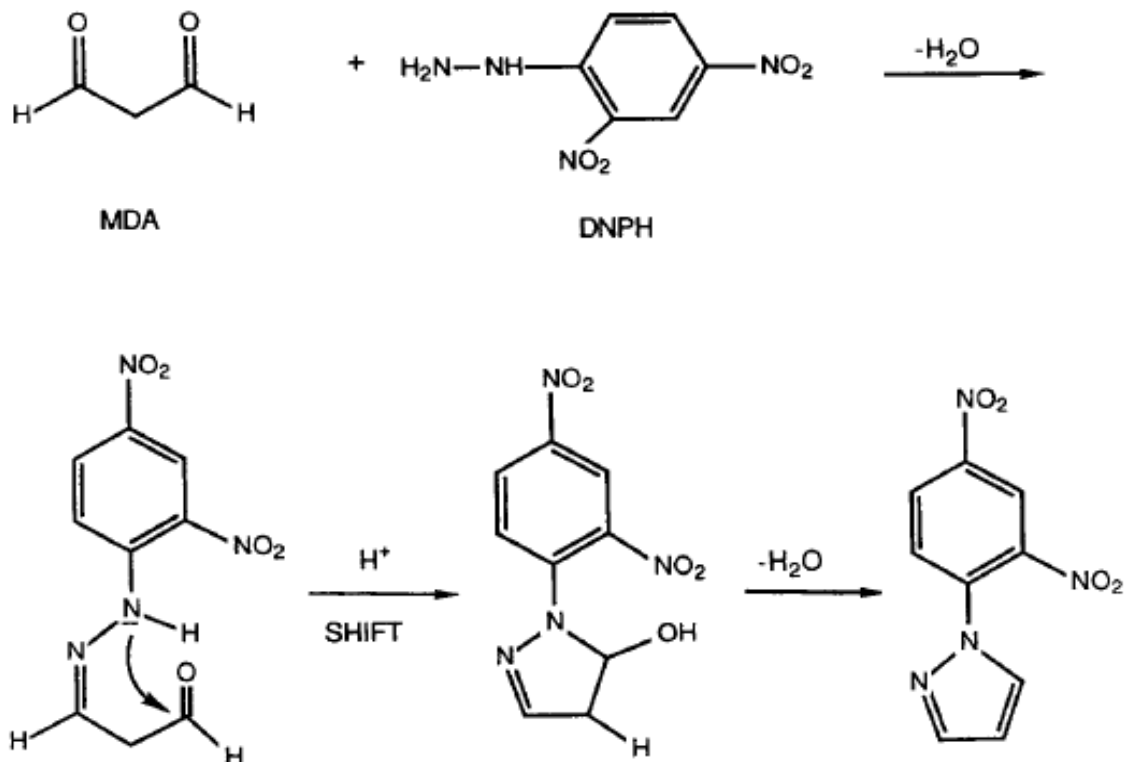
Diferentes tipos de extração da amostra podem ser realizados para análise de TBARS em alimentos, como a destilação, extração ácida e extração lipídica com solventes orgânicos. Pikul, Leszczynski e Kummerow (1989) testaram estes três métodos e recomendaram a extração ácida para carnes de frango congeladas ou refrigeradas, argumentando que esta opção é mais rápida e simples.

Após o procedimento inicial, o extrato é colocado sob aquecimento para reação com o TBA e posterior quantificação por espectrofotometria (OSAWA, FELÍCIO, GONÇALVES, 2005).

Mesmo com adaptações, o teste de TBARS espectrofotométrico é pouco específico, bastante criticado e sofre muitas interferências da matriz alimentar. Dessa maneira, estudos buscam novas maneiras de avaliação de oxidação lipídica, seja por derivatização com o TBA ou por derivatização com DNPH utilizando meios mais eficientes de separação e identificação dos produtos de oxidação lipídica por HPLC (MENDES, CARDOSO, PESTANA, 2009; CZAUDERNA, KOWALCZYK, MAROUNEK, 2001; SUN et al., 2001).

A derivatização do MDA com o reagente DNPH ocorre conforme apresentado na Figura 4 formando o produto 1-(2,4-dinitrofenil)pirazol e é medido em 360 nm. Uma vantagem desta técnica é a especificidade da reação, entretanto, o limite de detecção é mais alto que os métodos de identificação com complexo MDA-TBA₂ por espectrofotometria e por HPLC (MENDES, CARDOSO, PESTANA, 2009; EKSTRÖM et al., 1988).

Figura 4 - Reação entre malonaldeído e 2,4-dinitrofenilhidrazina para formação do produto 1-(2,4-dinitrofenil)pirazol.



Fonte: EKSTRÖM et al. (1988).

Os métodos de identificação de produtos de oxidação lipídica, como o MDA, por HPLC geralmente utilizam a RP em sua identificação, seja por derivatização com o reagente TBA ou com o reagente DNPH. A forma de detecção, entretanto, varia bastante, tanto em comprimento de onda, que é específico para cada composto, ou pelo tipo de detector, sendo os detectores de arranjo de fotodiodos e o de fluorescência, os mais usados para esse tipo de análise (AL-RIMAWI, 2015; MENDES, CARDOSO, PESTANA, 2009; AGARWAL, CHASE, 2002; KARATAS, KARATEPE, BAYSAR, 2002; EKSTRÖM et al., 1988).

Mendes, Cardoso e Pestana (2009) e Grotto et al. (2007) validaram métodos de detecção do complexo MDA-TBA₂ por HPLC em detector de arranjo de fotodiodos, com corridas cromatográficas de 8 minutos, as matrizes analisadas foram peixe e plasma, respectivamente. Os autores classificaram seus métodos como rápidos, estáveis, precisos, sensíveis e reprodutíveis. Os parâmetros analisados foram precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e exatidão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Metanol grau HPLC, foi proveniente da J. T. Baker (Ecatepec de Morelos, México). Ácido Sulfúrico e Ácido Ascórbico obtidos da Anidrol (Diadema, São Paulo, Brasil). A água ultrapura com resistividade $18,2 \mu\Omega \text{ cm}^{-1}$ foi obtida de um sistema Milli-Q[®] (Millipore, Billerica, MA, EUA). A solução tampão de fosfato de sódio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 7,00) foi preparada a partir dos sais $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac Química, Castellar del Vallés, Barcelona, Espanha), membrana de acetato de celulose $0,22 \mu\text{m}$ (Sartorius Stadies, Goettigen, Alemanha) e pHmetro Mettler Toledo (FiveEasyTMFE20, Suíça). O Ácido tricloroacético (TCA) foi obtido da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil) e os reagentes Ácido 2-Tiobarbitúrico e 1,1,3,3-tetraetoxipropano foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

4.2 AMOSTRAS

Para a realização dos testes preliminares de extração e validação do método de avaliação de oxidação lipídica, foram utilizados como matéria-prima filés de frango (*Pectoralis major*) e lombos suínos (*Longissimus dorsi*) congelados de diferentes procedências comerciais obtidos no comércio da cidade de Londrina-PR, nos meses de novembro (filés de frango) e janeiro (lombos suínos).

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Método de Avaliação de Oxidação Lipídica

4.3.1.1 Extração das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico

Testes preliminares foram feitos e a extração das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico presentes nas amostras foram readequadas a partir das condições iniciais realizadas por Mendes, Cardoso e Pestana (2009), que utilizaram amostras de peixe em seu trabalho. Porções de 10,00 g de amostra (carne

de frango ou suína) foram transferidas para tubos para (tipo Falcon de 50 mL) e adicionou-se 15,00 mL de solução de TCA, contendo TCA, 7,5% (m/v) e ácido acórbico 0,1% (m/v). Cada mistura foi homogeneizada em turrax por 1 minuto (7000 rpm), centrifugada por 10 minutos (6000 rpm, 20 °C) e filtrada em papel filtro. O extrato foi armazenado em tubos (tipo Falcon) para posterior reação com TBA.

4.3.1.2 Determinação de TBARS por HPLC

O preparo do padrão de TEP foi realizado de acordo com o descrito Bastos et al. (2012). Uma alíquota de 65,00 µL de TEP, que foi utilizado como padrão de MDA, foi adicionada em balão de 250,00 mL e seu volume completado com solução de ácido sulfúrico 1,0%. Esta solução, foi mantida ao abrigo da luz por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período uma alíquota de 1,00 mL desta solução foi transferida para um balão de 50,00 mL e o volume completado com solução de ácido sulfúrico 1,0%. A absorvância da solução obtida foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Libra S22, Biochrom Ltd, UK) a 245 nm para determinação de sua concentração pela lei de Lambert-Beer, considerando a absorvância molar do MDA de $\epsilon_{245\text{nm}}=13700 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A curva analítica foi obtida pela adição de padrão nas amostras, a concentração variou de $8,5 \times 10^{-2}$ a $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Para a reação de derivatização com TBA, seguiu-se o método proposto por Tarladgis, Pearson e Dugan (1964), em que 5,00 mL do sobrenadante extraído anteriormente, foram pipetados em tubo de rosca e 5,00 mL de solução de TBA $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram adicionados, homogeneizados vigorosamente em vórtex e colocados em banho-maria fervente por 35 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva analítica com adição de padrão.

Após o resfriamento, alíquotas das soluções obtidas foram filtradas em filtro descartável para seringa com membrana Durapore® (PVDF) hidrofílica (0,22 µm, Millex-GV) e armazenadas em *vials* para análise por HPLC.

4.3.1.3 Condições cromatográficas

As amostras foram injetadas em Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência da marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence (Quioto, Japão)

composto por bomba LC-20AT com desgaseificador DGU-20A5; autoamostrador SIL-20AC; forno para coluna CTO-20A acoplada a detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A e interface CBM-20A.

As condições de separação foram: coluna de fase reversa C₁₈ (Hypersil ODS, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Thermo Scientific, EUA) sendo a eluição em modo isocrático com fase móvel de solução de tampão fosfato 10,0 mmol L⁻¹ (pH 7,00) e metanol (70:30) e temperatura da coluna de 40 °C. O volume de injeção foi de 20,0 µL. O tempo de corrida foi de 7 minutos e os dados foram adquiridos pelo *software* LC Solution (Shimadzu, Quioto, Japão). A detecção foi feita de acordo com Bastos et al. (2012) em 532 nm. Os resultados foram expressos em mg de MDA kg⁻¹ de amostra.

4.3.2 Validação do Método

A validação do método de TBARS por HPLC foi realizada de acordo com a RDC 899/2003, da ANVISA (BRASIL, 2003). Os extratos utilizados para o ensaio de validação foram provenientes de filés de frango congelados obtidos no comércio local.

Para analisar a especificidade e seletividade foi avaliada a pureza de pico e a ausência de interferentes no tempo de retenção do complexo. Para determinar a linearidade foram utilizadas 3 curvas com 6 pontos de concentrações diferentes em triplicata e o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) obtido pelo método dos mínimos quadrados foi de 0,99. A faixa dinâmica de trabalho foi determinada pelo limite inferior da curva analítica e ponto superior da faixa linear testada.

A precisão intra-dia foi expressa como desvio padrão relativo (*DPR*) da média de 9 determinações sucessivas da amostra com concentração de MDA de aproximadamente 0,45 µmol L⁻¹ e a precisão intermediária foi obtida pela análise em 3 dias distintos, ambas foram calculadas pela Equação 1, em que *DP* é o desvio padrão e *CMD* é a concentração média determinada.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad Eq. 1$$

O limite de detecção (*LD*) foi calculado de acordo com a Equação 2, em que *DPa* é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de 3 curvas de calibração, contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação, e *IC* é a inclinação da curva analítica.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad \text{Eq.2}$$

O limite de quantificação (*LQ*) foi calculado por meio da Equação 3.

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad \text{Eq.3}$$

A exatidão foi obtida por meio de ensaio de recuperação para 3 diferentes concentrações de MDA, sendo elas de nível médio, alto e baixo. O cálculo foi feito de acordo com a Equação 4.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Eq.4}$$

A robustez do método cromatográfico foi avaliada por variações da vazão, nas condições de 0,9 a 1,05 mL min⁻¹, da temperatura da coluna, acondicionada a 30° C, do pH do tampão fosfato, em pH 6,50 e pH 7,50 e nas proporções da fase móvel, tampão fosfato/metanol (65:35) e tampão fosfato/metanol (75:25).

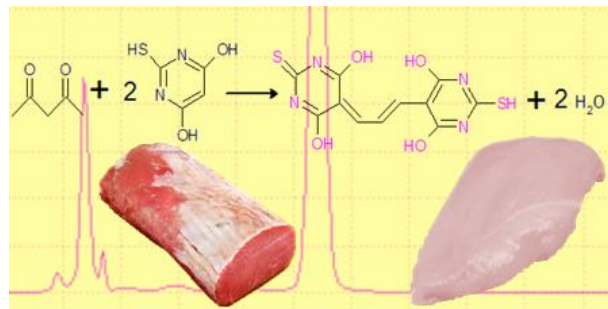
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* *STATISTICA* versão 7.0 *for Windows*. Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de médias de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os Resultados e Discussão desta Dissertação foram redigidos na forma de Artigo Científico, o qual está formatado nas normas do *Journal of the Brazilian Chemical Society* (ANEXO A) para posterior submissão. A transcrição para a língua inglesa será feita após as eventuais correções sugeridas pela banca.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO



A chromatographic method was developed and validated for lipid oxidation assessment in chicken and pork meat by determination of MDA-TBA₂ complex

Lipid oxidation assessment method validation in meat by HPLC-PDA

*Fernanda J. Mendonça^a, Tiago B. Madeira^b, Mariana B. Almeida^b, Suzana L. Nixdorf^b e
Adriana L. Soares^{a,*}*

*^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Londrina
86057-970 Londrina – PR, Brasil*

*^bDepartamento de Química. Universidade Estadual de Londrina 86057-970 Londrina – PR,
Brasil*

**e-mail: adri.soares@uel.br*

Abstract

In this study, we developed and validated a rapid and specific quantification method of MDA-TBA₂ complex by high performance liquid chromatography coupled with PDA detection (HPLC-PDA). The chromatographic run time was of 7 minutes and the complex retention time was 3.7 minutes. The method was validated according to Resolution RE 899/2003 and presented appropriate parameters of performance. The detection and quantification limits were $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ and $3.4 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The linearity ($r > 0,99$) was evaluated in the interval from 8.5×10^{-2} to $1.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ and the method was robust to temperature, phosphate buffer pH, proportion of mobile phase and flow-rate variations. The accuracy and precision were in accordance with the required parameters. The proposed method was shown to be appropriate for assays in pork and chicken meat.

Keywords: HPLC, malonaldehyde, TBARS, chicken meat.

Introdução

A carne é um alimento altamente nutritivo, principal fonte de vitamina B12 da dieta humana e tem grande impacto na economia.^{1,2} Sua qualidade pode ser percebida por atributos sensoriais (cor, sabor e textura), nutricionais (quantidade de gordura, perfil de ácidos graxos, proteínas, teor de vitaminas e minerais) e sanitários (controle de microrganismos e ausência de resíduos químicos).^{3,4}

A oxidação lipídica é um dos principais fatores de perda de qualidade e aceitabilidade da carne e seus derivados, pois resulta em perda de nutrientes e reduz a vida útil do produto cárneo. Nas reações de oxidação lipídica, variados compostos voláteis são produzidos, como aldeídos e cetonas, e um dos principais produtos de oxidação lipídica é o malonaldeído (MDA).⁵⁻⁷

O MDA reage com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido formando um complexo colorido quantificado em análises de oxidação lipídica em produtos cárneos, e é utilizado também como um biomarcador para avaliar o estresse oxidativo em biomoléculas em plasma de animais.⁸⁻¹¹

O MDA é usualmente medido em espectrofotômetro após reação com o TBA, $\lambda = 532$ nm, mas também pode ser analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seja por reação com o TBA, por derivatização com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) ou na forma livre.¹²⁻¹⁴ A análise de MDA por HPLC, embora seja mais complexa que a análise por espectrofotometria, é mais específica e sensível, o que aumenta a confiabilidade dos dados obtidos.¹⁵

Embora a cromatografia líquida de alta eficiência seja bastante versátil e confiável, a qualidade das medições químicas deve ser confirmada por meio de uma validação do método

analítico¹⁶ que “deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.¹⁷

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método rápido e específico de quantificação do complexo MDA-TBA₂ em carnes por HPLC-PDA.¹⁷

Parte experimental

Reagentes e soluções

Metanol grau HPLC, foi obtido da J. T. Baker (Ecatepec de Morelos, México). Ácido Sulfúrico e Ácido Ascórbico obtidos da Anidrol (Diadema, São Paulo, Brasil). A água ultrapura com resistividade 18,2 $\mu\Omega\text{ cm}^{-1}$ foi obtida de um sistema Milli-Q[®] (Millipore, Billerica, MA, EUA). A solução tampão de fosfato de sódio 10,0 mmol L⁻¹ (pH 7,00) foi preparada a partir dos sais NaH₂PO₄.H₂O e Na₂HPO₄.7H₂O (Panreac Química, Castellar del Vallés, Barcelona, Espanha), membrana de acetato de celulose 0,22 μm (Sartorius Stadies, Goettigen, Alemanha), pHmetro Mettler Toledo (FiveEasyTMFE20, Suíça). O Ácido tricloroacético (TCA) foi obtido da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil) e os reagentes Ácido 2-Tiobarbitúrico e 1,1,3,3-tetraetoxipropano foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Amostras

Para a realização dos testes e validação do método de avaliação de oxidação lipídica, foram utilizados como matéria-prima filés de frango (*Pectoralis major*) e lombos suínos

(*Longissimus dorsi*) congelados de diferentes procedências comerciais obtidos no comércio da cidade de Londrina-PR, nos meses de novembro (filés de frango) e janeiro (lombos suínos).

Extração das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico

Testes preliminares foram feitos e a extração das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico presentes nas amostras foram readequadas a partir das condições iniciais realizadas por Mendes, Cardoso e Pestana.¹² Porções de 10,00 g de amostra (carne de frango ou suína) foram transferidas para tubos para centrifugação (tipo Falcon de 50 mL) e adicionou-se 15,00 mL de solução TCA, contendo TCA, 7,5% (m/v) e ácido acórbico 0,1% (m/v). Cada mistura foi homogeneizada em turrax por 1 minuto (7000 rpm), centrifugada por 10 minutos (6000 rpm, 20 °C) e filtrada em papel filtro. O extrato foi armazenado em tubos do (tipo Falcon) para posterior reação com TBA.

Determinação de TBARS por HPLC

O preparo do padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) em solução de ácido sulfúrico 1,0% foi realizado de acordo com o descrito por Bastos *et al.*¹⁸ Esta solução, foi mantida ao abrigo da luz por 2 horas a temperatura ambiente e a absorbância da solução obtida foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Libra S22, Biochrom Ltd, UK) a 245 nm para determinação de sua concentração pela lei de Lambert-Beer, a partir da absorvidade molar do MDA de $\epsilon_{245\text{nm}}=13700 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A curva analítica foi obtida pela adição de padrão nas amostras, a concentração variou de $8,5 \times 10^{-2}$ a $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Para a reação de derivatização com TBA, seguiu-se o método proposto por Tarladgis, Pearson e Dugan,¹⁹ em que 5,00 mL de solução de TBA $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram adicionados a

5,00 mL do extrato obtido, homogeneizados vigorosamente em vórtex e colocados em banho-maria fervente por 35 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva analítica com adição de padrão.

Após o resfriamento, alíquotas das soluções obtidas foram filtradas em filtro descartável para seringa com membrana Durapore® (PVDF) hidrofílica (0,22 µm, Millex-GV) e armazenadas em *vials* para análise por HPLC.

Condições cromatográficas

As amostras foram injetadas em Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência da marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence (Quioto, Japão) composto por bomba LC-20AT com desgaseificador DGU-20A5; autoamostrador SIL-20AC; forno para coluna CTO-20A acoplada a detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A e interface CBM-20A.

As condições de separação foram: coluna de fase reversa C₁₈ (Hypersil ODS, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm, Thermo Scientific, EUA) sendo a eluição em modo isocrático com fase móvel de solução de tampão fosfato 10,0 mmol L⁻¹ (pH 7,00) e metanol (70:30) e temperatura da coluna de 40 °C. O volume de injeção foi de 20,0 µL. O tempo de corrida foi de 7 minutos e os dados foram adquiridos pelo *software* LC Solution (Shimadzu, Quioto, Japão). A detecção foi feita de acordo com Bastos *et al.*¹⁸ em 532 nm. Os resultados foram expressos em mg de MDA kg⁻¹ de amostra.

Validação do método

A validação do método de TBARS por HPLC foi realizada de acordo com a RDC 899/2003, da ANVISA.¹⁷ Os extratos utilizados para o ensaio de validação foram

provenientes de filés de frango congelados obtidos no comércio local.

Para analisar a especificidade e seletividade foi avaliada a pureza de pico e a ausência de interferentes no tempo de retenção do complexo. Para determinar a linearidade foram injetadas triplicatas de 6 pontos de concentrações diferentes também em triplicata e o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) foi de 0,99. A faixa dinâmica de trabalho foi determinada pelo limite inferior da curva analítica e ponto superior da faixa linear testada.

A precisão intra-dia foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) da média de 9 determinações sucessivas da amostra com concentração de MDA de $0,45 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a precisão intermediária foi obtida pela análise em 3 dias distintos, ambas foram calculadas pela Equação 1, em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

O limite de detecção (LD) foi calculado de acordo com a Equação 2, em que DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de 3 curvas analíticas, construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva analítica.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad \text{Eq. 2}$$

O limite de quantificação (LQ) foi calculado por meio da Equação 3.

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad \text{Eq. 3}$$

A exatidão foi obtida por meio de ensaio de recuperação para 3 diferentes concentrações de MDA, sendo elas de nível médio, alto e baixo. O cálculo foi feito de acordo com a Equação 4.

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Eq.4}$$

A robustez do método cromatográfico foi avaliada por variações da vazão, nas condições de 0,9 a 1,05 mL min⁻¹, da temperatura da coluna, acondicionada a 30° C, do pH do tampão fosfato, em pH 6,50 e pH 7,50 e nas proporções da fase móvel, tampão fosfato/metanol (65:35) e tampão fosfato/metanol (75:25).

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software STATISTICA* versão 7.0 for Windows. Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de médias de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Resultados e discussão

Ajuste das condições cromatográficas e de extração

Os resultados de testes preliminares do teste de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico por espectrofotometria, $\lambda = 532$ nm, utilizando filés de frango (*Pectoralis major*) demonstraram que o processo de extração utilizando uma quantidade menor de solução de TCA, e sem a adição de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), não teve diferença significativa ($p \leq 0,05$) (Tabela 1). Testou-se a extração utilizando-se 10,0g de amostra, com e sem adição de EDTA (0,1% m/v), e diferentes volumes de ácido tricloroacético, 15,0 e 20,0 mL. Assim o método foi adaptado de Mendes, Cardoso e Pestana,¹² que fizeram testes em

peixes, evitando-se a utilização desnecessária de um maior volume de reagentes e a adição de EDTA.

Tabela 1. Teste de TBARS utilizando diferentes quantidades de solução de TCA, com e sem EDTA, no processo de extração em filés de frango para verificar as melhores condições experimentais (n = 6)

Volume de TCA utilizado	20,0 mL		15,0 mL	
Quantidade de TBARS em mg kg ⁻¹ de carne	sem EDTA	com EDTA (0,1% m/v)	sem EDTA	com EDTA (0,1% m/v)
	0,198 ^a ± 0,017	0,195 ^a ± 0,022	0,204 ^a ± 0,025	0,191 ^a ± 0,026

^a Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de ANOVA a 5,0% de probabilidade (p > 0,05).

A concentração do tampão fosfato foi ajustada e passou de 50,00 para 10,00 mmol L⁻¹, contribuindo para a preservação da coluna cromatográfica. Devido a possível precipitação de sais, as fases móveis contendo tampões em altas concentrações devem ser evitadas. Além disso, pode ocorrer a cristalização na bomba, danificando o sistema.^{20,21}

Com a diminuição da concentração do tampão, o tempo de retenção (t_R) diminuiu, e isso contribuiu para uma corrida cromatográfica mais rápida. Outro fator levado em consideração foi a resolução do pico, que aumentou com a variação da proporção de fase móvel de 65:35 para 70:30 tampão fosfato:metanol.

O método tornou-se menos agressivo ao sistema cromatográfico, com eluição de picos bem resolvidos e menor tempo de análise.

Validação do método

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos na validação do método cromatográfico para análise de MDA em filés de frango.

Tabela 2. Parâmetros de validação para o método de quantificação de MDA em carnes por HPLC (n = 9)

Parâmetro avaliado	Resposta	
Faixa dinâmica de trabalho ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$8,5 \times 10^{-2}$ a 1,4	
Inclinação da curva analítica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	157396	
Intercepto da curva (área de pico, u.a.)	- 2367,18	
Coefficiente de correlação, r	0,9985	
Coefficiente de determinação, r^2	0,9969	
Soma residual dos quadrados da regressão	$8,45 \times 10^8$	
Limite de detecção, LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$1,0 \times 10^{-2}$	
Limite de quantificação, LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$3,4 \times 10^{-2}$	
Precisão intracorrída (CV%)	0,67	
Precisão intermediária (CV%)	4,30	
Exatidão (% de recuperação)	$0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$	103,51
	$0,43 \mu\text{mol L}^{-1}$	98,07
	$1,30 \mu\text{mol L}^{-1}$	99,18

n = número de observações; u.a. = unidades de absorvância; CV = coeficiente de variação.

A linearidade foi determinada calculando-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para 3 curvas analíticas obtidas em triplicata com seis concentrações diferentes crescentes de MDA, que variaram de $8,5 \times 10^{-2}$ a $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. As curvas foram obtidas em dias diferentes e os valores de coeficiente de correlação, $r = 0,9985$, e determinação, $r^2 = 0,9969$, (Tabela 2) apresentaram valores maiores que 0,99, podendo-se

dizer que são lineares na faixa dinâmica de trabalho escolhida e que os resultados obtidos se ajustam ao modelo linear proposto, além de apresentarem baixa dispersão. A análise gráfica dos resíduos demonstrou que não houve heterogeneidade de variâncias, o que é adequado ao modelo linear.

A Equação 5 descreve a curva analítica obtida para o MDA e a Figura 1 mostra sua representação gráfica.

$$y = 157396 x - 2367,18 \quad \text{Eq.5}$$

Em que y representa a área de pico e x a concentração de MDA ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

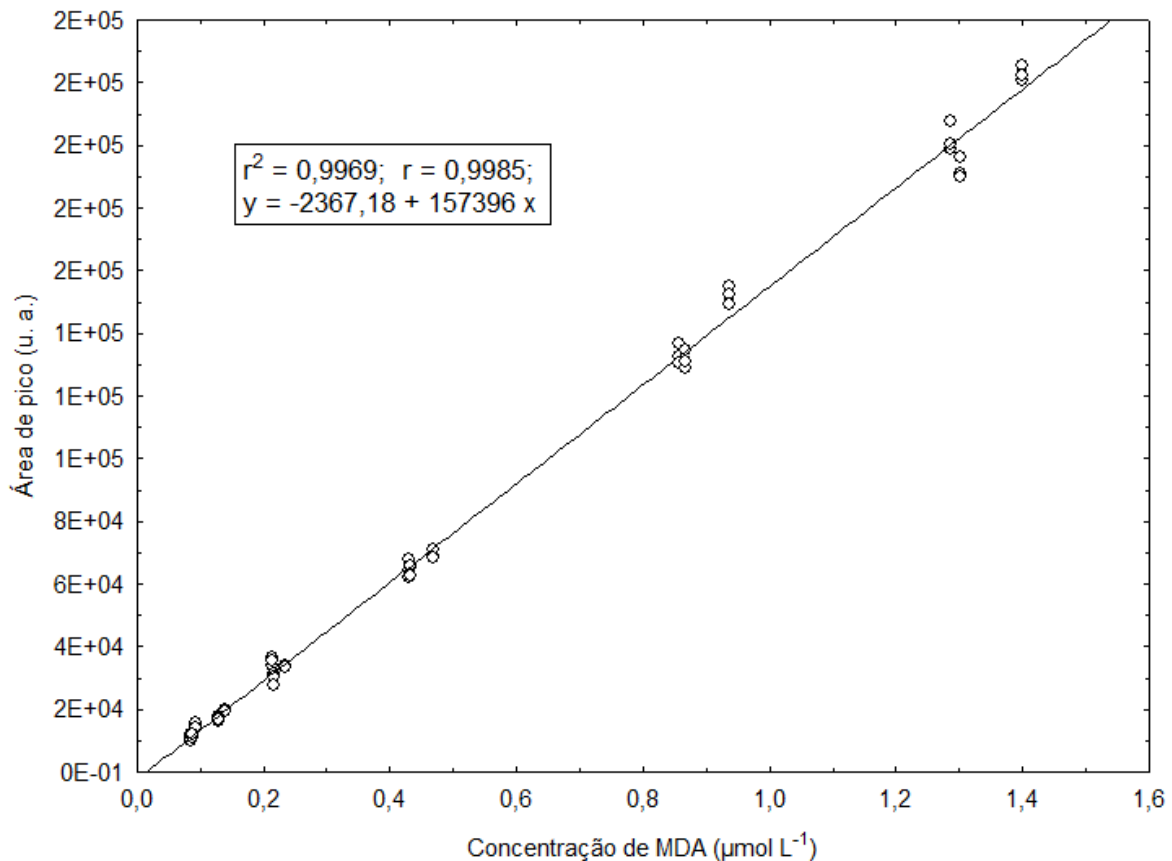


Figura 1. Curva analítica obtida para o padrão de MDA em matriz de carne de frango.

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir das curvas analíticas e os valores encontrados foram de $1,0 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ para o LD e de $3,4 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ para o LQ. Ambos os valores obtidos são inferiores ao primeiro ponto da curva, o que confirma a adequação do intervalo escolhido como faixa dinâmica de trabalho. Os valores

de LD e LQ obtidos foram mais baixos que os encontrados por Mendes, Cardoso e Pestana,¹² LD = 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LQ = 0,17 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mostrando que o método desenvolvido é mais sensível, o que é desejável para carnes pouco oxidadas.

A precisão intermediária (4,30%) foi avaliada com base nos dados obtidos em 3 dias diferentes e apresentou coeficiente de variação menor que os 5% preconizados pela norma. A precisão intracorrída (Tabela 2) confirmou a repetitividade do método, pelo baixo coeficiente de variação apresentado (0,67%) quando analisada a variação das áreas do pico referente ao complexo de MDA-TBA₂ para a mesma amostra, de acordo com o recomendado pela norma.¹⁷

A especificidade e a seletividade foram confirmadas pela pureza do pico, visto que espectros UV semelhantes foram obtidos (Figura 2) durante as análises de amostra pura e amostra com adição do padrão de MDA para o pico de interesse, e ainda pela ausência de picos interferentes no t_R do analito (Figura 2), que foi de 3,7 minutos. O tempo de corrida cromatográfica total foi de 7 minutos.

Além do complexo de interesse, outros componentes da matriz absorvem energia na em 532 nm, o que pode ser observado nos cromatogramas da Figura 2, na região inicial que varia. Essa variação na área não interfere na quantificação de MDA por cromatografia, mas provavelmente é fonte de erros na quantificação de MDA por espectrofotometria, uma vez que a absorbância total da amostra é considerada durante esta análise, podendo levar a superestimação ou subestimação dos valores reais de MDA na matriz. Esse fato justifica a maior adequação do método cromatográfico em relação ao espectrofotométrico em análises de oxidação lipídica.

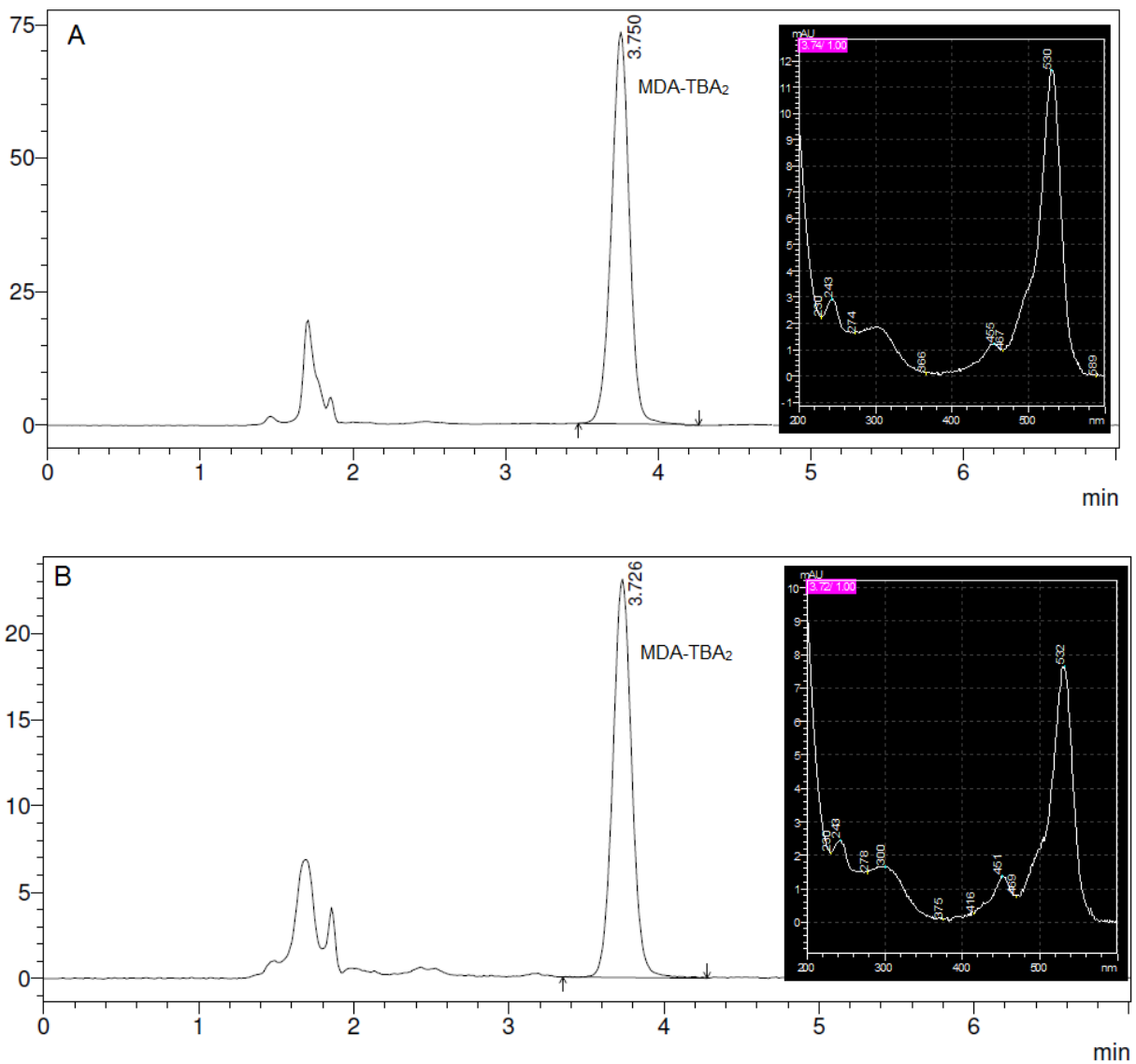


Figura 2. Cromatogramas (HPLC-PDA, $\lambda=532$ nm) e espectros UV-Vis obtidos para: **A)** Padrão MDA ($0,43 \mu\text{mol L}^{-1}$) em matriz extraída de carne de frango e; **B)** Amostra extraída de carne de frango.

A exatidão obtida foi satisfatória para os três níveis de concentração avaliados, baixo ($103,51\%$ para $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$), médio ($98,07\%$ para $0,43 \mu\text{mol L}^{-1}$) e alto ($99,18\%$ para $1,30 \mu\text{mol L}^{-1}$), ficando próximos de 100% . O método mostrou-se robusto para todas as variações testadas (Tabela 3). Mesmo com variações de temperatura da coluna em 10 unidades, a variação de área foi pequena, assim como os outros parâmetros avaliados, mostrando que o método é confiável e robusto.

O parâmetro fluxo, entretanto, só obteve variações menores que 5% nas condições de 0,90 a 1,05 mL min⁻¹, em fluxos maiores observou-se um adiantamento do pico referente ao complexo de interesse e aumento significativo de sua área. Quando os fluxos são maiores ou menores que o ideal, ocorre aumento na altura equivalente a um prato teórico, perdendo eficiência na separação, no caso do aumento de fluxo a pressão se eleva, a eluição do pico ocorre antes e no caso da análise, houve aumento da área dos picos devido à perda de resolução.^{20,22}

Tabela 3. Variação das áreas de pico em função da variação dos parâmetros para teste de robustez

Parâmetro avaliado		Varição da área de pico (%)
Temperatura da coluna (°C)	30	0,52
Proporção da fase móvel (Tampão fosfato:metanol)	65:35	1,75
	75:25	0,76
pH do tampão	6,5	0,02
	7,5	0,23
Fluxo (mL min ⁻¹)	0,90	1,33
	1,05	1,84

O método desenvolvido pode ser considerado validado por atender as exigências da RDC n°899/2003,¹⁷ além disso, mostrou-se eficiente, sensível e robusto, apresentando baixos valores de LD e LQ, o que é bastante adequado para análises de carnes com baixo teor de produtos de oxidação lipídica.

Aplicação do método

O método foi aplicado em carnes de frango e suína de diferentes procedências comerciais. Os cortes foram escolhidos em virtude do valor comercial e da homogeneidade da matriz. A carne de frango foi representada pelo filé (*Pectoralis major*) congelado, visto que filés resfriados são minoria em representação comercial. Foram avaliados 9 filés de cada uma das 4 marcas e as quantidades médias encontradas de MDA em mg kg^{-1} de amostra estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Quantidades médias de mg de MDA kg^{-1} de filé de frango (*Pectoralis major*) para 4 marcas comerciais avaliadas ($n = 9$)

Marca	mg de MDA kg^{-1} de filé de frango
A	$0,042^c \pm 0,004$
B	$0,054^b \pm 0,004$
C	$0,052^b \pm 0,008$
D	$0,063^a \pm 0,010$

^{a-c} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Das quatro marcas avaliadas três apresentaram diferenças significativas entre si, sendo que a marca D apresentou maior valor de oxidação lipídica ($0,063 \text{ mg de MDA kg}^{-1}$). Resultados de testes sensoriais descritos na literatura demonstram que seres humanos percebem sensorialmente os sabores provenientes de oxidação lipídica em carnes quando estes estão presentes em concentrações de aproximadamente $2,0 \text{ mg de MDA kg}^{-1}$ ²³, e todas as amostras apresentaram valores de concentração abaixo destes valores. Bergamo *et al.*²⁴ encontraram o valor de $0,032 \text{ mg de MDA kg}^{-1}$ para filés de frango congelados avaliados por

HPLC com detecção por fluorescência, valor comparável aos obtidos pela análise por HPLC-PDA.

As diferenças no nível de oxidação lipídica entre as marcas podem ser devido a fatores como criação, estresse pré-abate e procedimentos operacionais de abate e embalagem,^{25,26} uma vez que todas as amostras apresentavam datas de fabricação próximas (intervalo não maior que um mês), estavam mantidas sob mesma temperatura, além disso, a marca que apresentou maior oxidação lipídica (D), não foi a marca que possuía data de fabricação mais antiga (B). Assim como a marca de data de fabricação mais recente (C) não foi a que apresentou a menor média de oxidação lipídica. Para suínos o corte analisado foi o lombo (*Longissimus dorsi*) congelado de três marcas comerciais distintas. O espectro de absorção UV-Vis e um cromatograma para amostra de lombo suíno são mostrados na Figura 3. Foram avaliadas 6 amostras de cada uma das 3 marcas e as quantidades médias encontradas de MDA em mg kg^{-1} de lombo suíno estão demonstradas na Tabela 5.

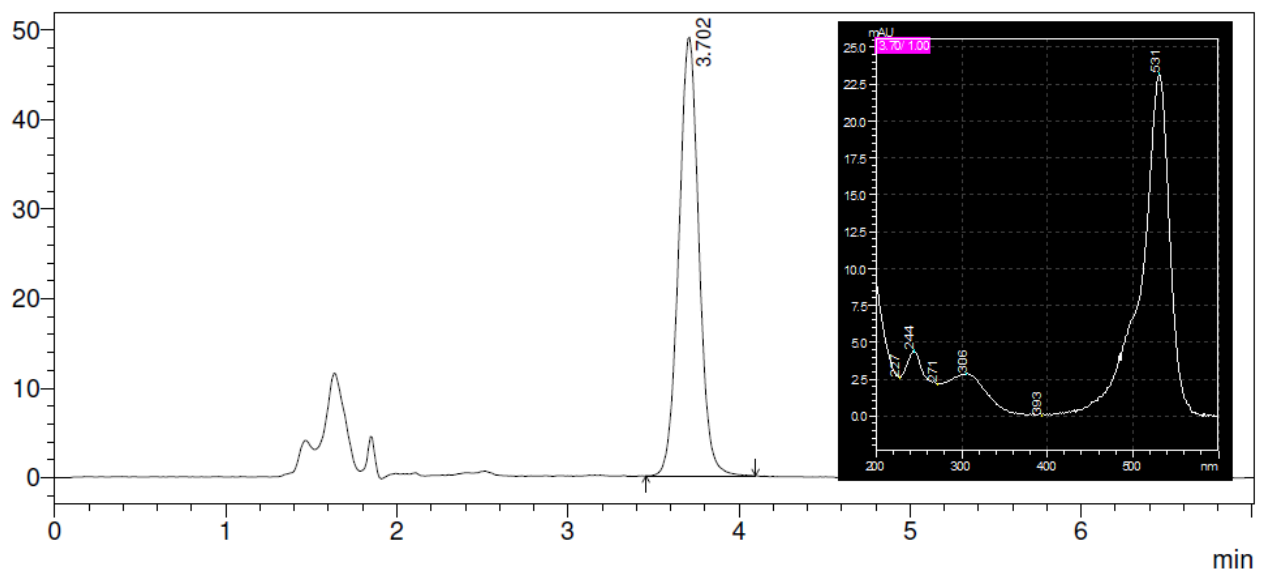


Figura 3. Cromatograma (HPLC-PDA, $\lambda=532$ nm) obtido para determinação de MDA-TBA₂ em amostra de lombo suíno (*Longissimus dorsi*) e espectro UV-Visível.

A marca C apresentou-se menos oxidada em relação às outras duas e as marcas A e B, que não diferiram entre si ($p > 0,05$). Os valores de MDA para carne suína foram todos inferiores ao limiar de detecção humana de 2,0 mg.²³ Apesar de o limiar de detecção humana não ser atingido, a ingestão dos produtos de oxidação lipídica está relacionada a implicações patológicas como a gênese de alterações ateroscleróticas.²⁷

Tabela 5. Quantidades médias de mg de MDA kg⁻¹ de lombo suíno (*Longissimus dorsi*) para 3 marcas comerciais avaliadas (n=6)

Marca	mg de MDA kg ⁻¹ de lombo suíno
A	0,235 ^a ± 0,023
B	0,204 ^a ± 0,049
C	0,112 ^b ± 0,021

^{a-b} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5,0% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Embora a composição de ácidos graxos poli-insaturados seja maior em frangos,²⁸ os cortes de lombo suíno apresentaram-se 3,4 vezes mais oxidados que os filés de frango. Isso ocorre devido a fatores como o maior teor de mioglobina da carne suína, e consequentemente ferro heme que catalisa as reações de oxidação lipídica. E ao maior teor de gordura em cortes de lombo suíno (3,02%), 1,7 vezes maior que em filés de frango (1,77%).²⁸

O método desenvolvido foi capaz de quantificar diferentes concentrações de MDA em amostras que não continham adição de padrão, o que é adequado e esperado na validação de um método.

Conclusão

O método desenvolvido foi eficiente na quantificação do complexo MDA-TBA₂ em carnes comerciais de frango e suína, atendendo todos os parâmetros necessários para validação. O método tem como vantagens maior rapidez, confiabilidade nos resultados e baixo limite de detecção e de quantificação, com faixa de trabalho que permite avaliar desde carnes com alto grau de oxidação lipídica até tecidos musculares de animais recém-abatidos com baixo grau de oxidação lipídica. Os filés de frango avaliados apresentaram valores médios entre 0,042 e 0,063 mg de MDA kg⁻¹ de carne e os lombos suínos variaram entre 0,112 e 0,235 mg de MDA kg⁻¹ de carne.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Referências

1. GUGGISBERG, D.; RISSE, M. C.; HADORN, R. *Meat Sci.*, **2012**, *90*, 279.
2. DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de alimentos de Fennema*. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
3. SOYER, A.; ÖZALP, B.; DALMIŞ, U.; BILGIN, V. *Food Chem.*, **2010**, *120*, 1025.
4. ORDÓÑEZ, I. A. *Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
5. YANG, A.; BREWSTER, M. J.; BEILKEN, S. L.; LANARI, M. C.; TAYLOR, D. G.; TUME, R. K. *J. Food Sci.*, **2002**, *7*, 3309.
6. SUN, Q.; FAUSTMAN, C.; SENEAL, A.; WILKINSON, A. L.; FURR, H. *Meat Sci.*, **2001**, *57*, 55.

7. MORRISSEY, P. A.; SHEEHY, P. J. A.; GALVIN, K.; KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. *J. Meat Sci.*, **1998**, 49, 73.
8. DUAN, Y.; ZHENG, F. CHEN, H.; HUANG, M.; XIE, J.; CHEN, F.; SUN, B. *LWT-Food Sci. Technol.*, **2015**, 60, 1235.
9. BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. *Nutrire Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.*, **2008**, 33, 111.
10. ULU, H. *Meat Sci.*, **2004**, 67, 683.
11. KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. *Anal. Biochem.*, **2002**, 311, 76.
12. MENDES, R.; CARDOSO, C.; PESTANA, C. *Food Chem.*, **2009**, 112, 1038.
13. MATEOS, R.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2005**, 827, 76.
14. CZAUDERNA, M.; KOWALCZYK, J.; MAROUNEK, M. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2001**, 879, 2251.
15. OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. *Quim. Nova*, **2005**, 28, 655.
16. RIBANI, M.; BOTTOLI, G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. *Quím. Nova*, **2004**, 27, 771.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Determina a publicação do *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, Resolução RE N°. 899, 2003.
18. BASTOS, A. S.; LOUREIRO, A. P. M.; OLIVEIRA, T. F.; CORBI, S. C. T.; CAMINAGA, R. M. S.; ROSSA JÚNIOR, C.; ORRICO, S. R. P. *Anal. Biochem.*, **2012**, 423, 141.
19. TARLADGIS, B. G.; PEARSON, A. M. ; DUGAN, L. R. Jr. *J. Sci. Food Agr.*, **1964**, 5, 602.
20. LANÇAS, F. M. *Cromatografia Líquida Moderna*. Campinas: Editora Átomo, 2009.

21. CIOLA, R. *Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC*. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.
22. GUIOCHON, G.; GRITTI, F. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 1915.
23. CAMPO, M. M.; NUTE, G. R.; HUGHES, S. I.; ENSER, M.; WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I. *Meat Sci.*, **2006**, 72, 303.
24. BERGAMO, P.; FEDELE, E.; BALESTRIERI, M.; ABRESCIA, P.; FERRARA, L. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 2171.
25. SOARES, A. L.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **2004**, 47, 57.
26. OLIVO, R.; SOARES, A. L.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. *J. Food Biochem.*, **2001**, 25, 271.
27. FERRARI, C. K. B. *Rev. Nutr.*, **1998**, 11, 3.
28. MIN, B.; NAM, K. C.; CORDRAY, J.; AHN, D. U. *J. Food Sci.*, **2008**, 73, C449.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método analítico para avaliação da oxidação lipídica em carnes, pela quantificação do complexo MDA-TBA₂ por HPLC, apresentou bons parâmetros de desempenho, como sensibilidade, precisão e exatidão assegurando sua aplicabilidade em carnes de frango e suína. Além disso, o método desenvolvido é rápido e possui baixo limite de detecção e de quantificação, o que é desejável em análises de tecidos animais recém-abatidos.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **ABPA na Mídia**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas>>. Acesso em: 02 fev. 2016.
- AGARWAL, R.; CHASE, S. D. Rapid, fluorimetric–liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. **J. Chromatogr. B**, v. 775, n. 1, p. 121-126, 2002.
- AL-RIMAWI, F. Development and Validation of a Simple Reversed-Phase HPLC-UV Method for Determination of Malondialdehyde in Olive Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 7, p. 933-937, 2015.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: assessment of biomarkers. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARRIUSO, B.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 1, p. 1-15, 2013.
- BASTOS, A. S.; LOUREIRO, A. P. M.; OLIVEIRA, T. F.; CORBI, S. C. T.; CAMINAGA, R. M. S.; ROSSA JÚNIOR, C.; ORRICO, S. R. P. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. **Analytical Biochemistry**, v. 423, n. 1, p. 141-146, 2012.
- BERGAMO, P.; FEDELE, E.; BALESTRIERI, M.; ABRESCIA, P.; FERRARA, L. Measurement of Malondialdehyde Levels in Food by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 6, p. 2171-2176, 1998.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução N° 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução N.º 27, de 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de

métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Brasília, DF, 2012.

BRASIL. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2011.

CAMPO, M. M.; NUTE, G. R.; HUGHES, S. I.; ENSER, M.; WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I. Flavour perception of oxidation in beef. **Meat Science**, v. 72, n. 2, p. 303-311, 2006.

CIOLA, R. **Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ª Ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.

CORDIS, G. A.; BAGCHI, D.; MAULIK, N.; DAS, D. K. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of malonaldehyde, acetaldehyde, formaldehyde, acetone and propionaldehyde to monitor the oxidative stress in heart. **Journal of Chromatography A**, v. 661, n. 1-2, p. 181-191, 1994.

CZAUADERNA, M.; KOWALCZYK, J.; MAROUNEK, M. The simple and sensitive measurement of malondialdehyde in selected specimens of biological origin and some feed by reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 23, p. 2251-2258, 2001.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n.7, p. 21-25, 1998.

DUAN, Y.; ZHENG, F. CHEN, H.; HUANG, M.; XIE, J.; CHEN, F.; SUN, B. Analysis of volatiles in Dezhou Braised Chicken by comprehensive two-dimensional gas chromatography/high resolution-time of flight mass spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1235-1242, 2015.

EKSTRÖM, T. et al. Recovery of malondialdehyde in urine as a 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative analyzed with high-performance liquid chromatography. **Chemico-Biological Interactions**, v. 66, n. 3-4, p. 177-187, 1988.

ESCRIBÁ, P. V.; NICOLSON, G. L. Membrane structure and function: Relevance of lipid and protein structures in cellular physiology, pathology and therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, n. 6, p. 1449-1450, 2014.

ESTÉVEZ, M. Oxidative damage to poultry: from farm to fork. **Poultry Science**, p. 1-11, 2015.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: Mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista Nutrição**, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1998.

GOMES, H. A.; SILVA, E. N.; NASCIMENTO, M. R. L.; FUKUMA, H. T. Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. **Food Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 433-437, 2003.

GRAY, J. I.; MONAHAN, F. J. Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, p. 315-319, 1992.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L. D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARÃO, M. F.; MOROA, A. M.; NASCIMENTO, P. C.; POMBLUM, V. J.; GARCIA, S. C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography–visible detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 2, p. 619-624, 2007.

GUGGISBERG, D.; RISSE, M. C.; HADORN, R. Determination of Vitamin B12 in meat products by RP-HPLC after enrichment and purification on an immunoaffinity column. **Meat Science**, v. 90, n. 2, p. 279-283, 2012.

GUIOCHON, G.; GRITTI, F. Shell particles, trials, tribulations and triumphs. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 15, p. 1915-1938, 2011.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). **International Conference on Harmonisation**, 2005.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.

KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 311, n. 1, p. 76-79, 2002.

KHAN, N.; JEONG, I. S.; HWANG, I. M.; KIM, J. S.; CHOI, S. H.; NHO, E. Y.; CHOI, J. Y.; KWAK, B. M.; AHN, J. H.; YOON, T.; KIM, K. S. Method validation for simultaneous determination of chromium, molybdenum and selenium in infant formulas by ICP-OES and ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, 3566-3570, 2013.

LADIKOS, D.; LOUGOVOIS, V. Lipid oxidation in muscle foods: A review. **Food Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 295-314, 1990.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MATEOS, R.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L.; BRAVO, L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. **Journal of Chromatography B**, v. 827, n. 1, p. 76-82, 2005.

MENDES, R.; CARDOSO, C.; PESTANA, C. Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 1038-1045, 2009.

MIN, B.; NAM, K. C.; CORDRAY, J.; AHN, D. U. Endogenous Factors Affecting Oxidative Stability of Beef Loin, Pork Loin, and Chicken Breast and Thigh Meats. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. C449-C446, 2008.

MORRISSEY, P. A.; SHEEHY, P. J. A.; GALVIN, K.; KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J. Lipid Stability in Meat and Meat Products. **Meat Science**, v. 49, p. 73-86, 1998.

NAZARIO, C. E. D.; SILVA, M. R.; FRANCO, M. S.; LANÇAS, F. M. Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview. **Journal of Chromatography A**, v. 1421, p. 18-37, 2015.

NOVÁKOVÁ, L.; SOLICHOVÁ, D.; SOLICH, P. Advantages of ultra-performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel. **J. Sep. Sci.**, v. 29, n. 16, p. 2433-2443, 2006.

OLIVO, R.; SOARES, A. L.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 271-283, 2001.

ORDÓÑEZ, I. A. (Org). **Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PAPASTERGIADIS, A.; FATOUH, A.; JACXSENS, L.; LCHAT, C.; SHRESTHA, K.; DAELMAN, J.; KOLSTEREN, P.; VAN LANGENHOVE, H.; MEULENAER, B. Exposure assessment of Malondialdehyde, 4-Hydroxy-2-(E)-Nonenal and 4-Hydroxy-

2-(E)-Hexenal through specific foods available in Belgium. **Food and Chemical Toxicology**, v. 73, p. 51-58, 2014.

PARK, E. Y.; IMAZU, H.; MATSUMURA, Y.; NAKAMURA, Y.; SATO, K. Effects of Peptide Fractions with Different Isoelectric Points from Wheat Gluten Hydrolysates on Lipid Oxidation in Pork Meat Patties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7483-7488, 2012.

PIKUL, J.; LESZCZYNSKI, D. E.; KUMMEROW, F. A. Evaluation of Three Modified TBA Methods for Measuring Lipid Oxidation in Chicken Meat. **J. Agric. Food Chem.**, v. 37, n. 5, p. 1309-1313, 1989.

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A Review. **Meat Science**, v. 35, p. 145-169, 1993.

RIBANI, M.; BOTTOLI, G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RODRIGUES, M. A. M.; CAMARGO, J. L. V. Doenças Nutricionais. In: FRANCO, M. et al., NORONHA, F. A. (Trad.). **Patologia: Processos Gerais**. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2010. Cap. 17, p. 296.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SINDIAVIPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=8&acao=detalhe&cod=164355>>. Acesso em: 02 fev. 2016.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Thomson, 2006.

SOARES, A. L.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Synergism between Dietary Vitamin E and Exogenous Phytic Acid in Prevention of Warmed-Over Flavour Development in Chicken Breast Meat, *Pectoralis major* M. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 57-62, 2004.

SOYER, A.; ÖZALP, B.; DALMIŞ, U.; BILGIN, V. Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1025-1030, 2010.

SUN, Q.; FAUSTMAN, C.; SENEAL, A.; WILKINSON, A. L.; FURR, H. Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage. **Meat Science**, v. 57, n. 1, p. 55-60, 2001.

TANG, S. Z.; KERRY, J. P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A. Dietary tea catechins and iron-induced lipid oxidation in chicken meat, liver and heart. **Meat Science**, v. 56, n. 3, p. 285-290, 2000.

TARLADGIS, B. G.; PEARSON, A. M. ; DUGAN, L. R. Jr. Chemistry of the 2-thiobarbituric test for determination of oxidative rancidity in foods ii. Formation of the tba-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. **J. Food Sci. Agric.**, v. 5, p. 602-604, 1964.

UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 4, p. 318-343, 2003.

ULU, H. Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. **Meat Science**, v. 67, n. 4, p. 683-687, 2004.

UTRERA, M.; ESTÉVEZ, M. Oxidative Damage to Poultry, Pork, and Beef during Frozen Storage through the Analysis of Novel Protein Oxidation Markers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 33, p. 7987-7993, 2013.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO JÚNIOR, A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, v. 31, p. 31-44, 1998.

VASCONCELOS, S. M. L; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VON MÜHLEN, C.; LANÇAS, F. M.; Cromatografia Unificada. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.

YANG, A.; BREWSTER, M. J.; BEILKEN, S. L.; LANARI, M. C.; TAYLOR, D. G.; TUME, R. K. Warmed-over flavor and lipid stability of beef: effects of prior nutrition. **Journal of Food Science**, v. 7, n. 9, p. 3309-3313, 2002.

WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I.; NUTE, G. R.; FISHER, A. V.; CAMPO, M. M.; KASAPIDOU, E.; SHEARD, P. R.; ENSER, M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**, v. 66, n. 1, p. 21-32, 2003.

ANEXO A

Normas para submissão de artigos da revista *Journal of the Brazilian Chemical Society*

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS - JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY



1. Introduction

The *Journal of the Brazilian Chemical Society (JBACS)* embraces all aspects of chemistry except education, philosophy and history. It is a medium for reporting selected original and significant contributions to new chemical knowledge. The Journal publishes **Articles, Communications, Short Reports, Reviews, Accounts and Letters**.

The reproduction of figures, schemes and photos already published in other publications, even if these materials have been published by the same authors, requires the copyright permission given by the editor house allowing the publication of the article in the *JBACS*.

1.1 Manuscript types

Article should be comprehensive and critical accounts of a work in a given area. Although short articles are acceptable, the Editors strongly discourage fragmentation of a substantial body of work into a number of short publications.

Communication should be restricted to reports of **unusual urgency** and **significance** or **interest**. They should be submitted with a **statement** from the authors as to **why the manuscript meets these criteria**. A manuscript will not be accepted if, in the opinion of the Editors, the principal content has previously been released or published in any other medium. The communication should not exceed 1500 words or occupy more than 3 pages of the Journal. To estimate the length of a communication, an average sized figure is counted as 100 words and separate formulae and lines of a table are counted as 8 words per line, including headings and horizontal rulings. Title, authors' names and literature references are not counted.

Short Report is meant to be a concise terminal report of studies of limited scope. Manuscripts submitted as articles or communications may, in some cases, be accepted as short reports. The standard of quality expected in short reports is the same as in articles.

Review is normally invited by the Editors. However, the Editors welcome suggestions for reviews considered suitable for the Journal. Be aware that the **topics** (items) in the **Reviews** must be **numbered** with Arabic numerals.

In order to help the Editors in the evaluation of the suitability of a proposed Review, the authors should previously submit by e-mail (office@jbcs.sbg.org.br) the following items:

- A synopsis including a brief outline of the Review content;
- At least ten sample references;

- A summary of the lead author's academic career;
- A statement explaining the relevance of the topic to be reviewed and a list of the latest reviews published on the subject, if any;
- If the text is already prepared (with the above items have been considered by the Editors), an invitation for submission will be sent for the author;
- A short Curriculum Vitae (max. 100 words) with photo for each author needs to be added in the end of the main document.

Acceptance of the synopsis does not guarantee publication of the final manuscript.

It is quite common, in Reviews, the reproduction of figures, schemes and photos already published in other works. Even if these materials have been published by the same authors, copyright permissions need to be given by the editorial office.

Account is published only by invitation from the Editorial Board. Like the Review, it may include figures, schemes, structures, etc. The **topics** in the **Account** must be **numbered** with Arabic numerals.

In order to help the Editors in the evaluation of the suitability of a proposed Account, authors should previously submit by e-mail (office@jbc.sbq.org.br) a synopsis considering the following items:

- submission of a focused and readable text, covering current areas of interest for the Chemistry community;
- it is necessary to present topics or summaries of research in an emerging area of Chemistry, covering only the most interesting/significant developments;
- in the conclusion section, the discussion is about possible future approaches of the Account subject;
- a short Curriculum Vitae (max. 100 words) with photo for each author needs to be added in the end of the main document.

In case any reproduction of figures, schemes and photos already published in other journals is included, a copyright permission given by the editorial office of the publisher must be sent to **JBCS** office.

Letter is a medium for the expression of scientific opinions and views normally concerning material published in the Journal, but not for revision/update of the authors' own work. When a **Letter** polemical in nature is accepted, a reply from the implicated parties will be requested for publication alongside the original **Letter**. Contributions in this format are intended to be published as soon as possible. No Abstract is required for letters. They should not exceed one printed page in length.

1.2 Before Beginning the Submission

Copyright License

The submission of a manuscript implies that it has not been previously published, that it is not under consideration for publication elsewhere or that it will not be simultaneously published elsewhere in the same format without the written permission of the Editors. Additionally, it implies that the submitting author has the consent of all authors. By submitting a manuscript, the authors agree that

their paper's copyright is transferred to the Brazilian Chemical Society (*Sociedade Brasileira de Química, SBQ*) if and when the manuscript is accepted for publication. Accepted manuscripts and illustrations become the property of the SBQ.

Manuscript Organization

Authors should present their materials with the utmost conciseness and clarity. The **Introduction** should clearly and briefly identify, with relevant references, both the nature of the problem under investigation and its background. Extensive reviews of the literature cannot be accepted.

In **Articles** and **Short Reports**, the **Experimental** section may precede or follow the **Results and Discussion** section, but should be separated from it. The addition of a final section at the end of the manuscript, which briefly summarizes the main **Conclusions** of the work, is recommended and needs to be just after the **Results and Discussion** section.

Descriptions of experiments should be given in sufficient details to enable other researchers to repeat them. The degree of purity of materials should be given, as well as all quantities used. Descriptions of established procedures are unnecessary. Standard techniques and methods used throughout the work should be stated at the beginning of the section in a **Materials and/or Methods** subsection, in the **Experimental** section. Apparatus should be described only if it is non-standard. Commercially available instruments should be referred to by their suppliers and models.

All **new compounds** should be fully characterized, which includes spectroscopic data and elemental analyses. High-resolution mass spectra may substitute for elemental analyses if accompanied by unequivocal proof of sample purity (melting points, copies of NMR spectra, etc.). For compounds prepared in enantiomerically pure or enantiomerically enriched form, specific optical rotation must be given. In cases where enantiomeric excess is determined by chromatographic and/or spectroscopic techniques, copies of the appropriate chromatograms and/or spectra should be included as Supplementary Information upon submission of the manuscript. Data associated with specific compounds should be listed after the name of the compound concerned, followed by the description of the preparation, or else presented in tabular form in the **Results and Discussion** section. All spectra must be included in the **Supplementary Information (SI)**, see Section 8).

Many theoretical and computational papers use a routine procedure based on a well-documented method, being it semi-empirical or *ab initio*. It is then sufficient to name the particular variant, referring to key papers, in which the method has been developed, to cite the computer program used and to indicate briefly any modification made by the author.

Complementary data meant to support the analysis of **Communications** should be included as **Supplementary Information (SI)**, see Section 8).

It is the **authors' responsibility** to obtain permission from other publishers for the reproduction of artwork from other journals in the reviews or in any other type of publication. Such specific **Copyright Permissions** should be sent to the **JBCS** Editorial Manager. Suitable acknowledgement of reproduction must be given in the captions.

2. Preparation of Manuscripts

General Overview:

Font: Times New Roman

Font Size: 12

Font Color: Black

Spacing: double spaced

Pages: numbered consecutively

Tables, Schemes, Figures and captions: placed in the text, as close as possible to the first citation.

Figures: numbered with Arabic numerals. For full manuscripts containing material previously published in

preliminary form, a copy of the previous communication is required and should be included at the end of the manuscript.

Maps: insert as **Supplementary Information**

Main sections (Introduction, Experimental, Results and Discussion, Conclusion section) of the manuscript should NOT be numbered, EXCEPT for Account and Review.

Supplementary Information (SI): needs to be included at the end of manuscript, after the **Conclusions** section.

It should contain RELEVANT and COMPLEMENTARY DATA to those presented in the manuscript. If new compounds are identified or characterized, **all spectra** should be included (see Section 8).

Graphics/Figures/Schemes: files should be uploaded in the system individually. JBCS preference is for files from original programs since editable files facilitate the correction of details out of JBCS standard. Some suggested extensions:

Structures in: *.cdx (ChemDraw);

Graphics in: *.opj/org (Origin); *.xls/xlsx (Excel);

Others in: *.cdr (CorelDraw); *.tif/jpg (Paint), etc.

If you have worked with different programs, please write to help_office@jbcbs.sbq.org.br informing which ones were used, and depending we may accept the files.

Main document (full): also keep tables/figures/schemes/equations and their legends as close as possible of their first citation.

Main document in: *.doc/docx (Word); *.tex (LaTeX, TeX).

Details:

First Page

- **Graphical Abstract (GA)** (see Section 5)

Second Page

- **Title**

- **Authors' names:** full given name, followed by the middle name initial(s) and then by the full last name.

An asterisk (*) should follow the name of the corresponding author.

- Addresses: Authors are asked to provide full addresses for correspondence. The e-mail address of the

corresponding author should be given as a footnote. If the address where the work was carried out is different from the present address of any of the authors, a footnote indicating the current position can be included. Each address should have a correspondent letter. As for instance:

*Jailson B. de Andrade,^{*a} Marta V. Andrade^b and Heloisa L. C. Pinheiro^c*

Third Page

Abstracts: maximum of 150 words for Articles, Accounts and Reviews and 50 words for Short Reports and Communications.

Keywords: a minimum of three and maximum of five. Broad-sense words such as "water" should be avoided.

The text should start from the third page of the manuscript.

Attention: all nomenclature should be consistent, clear, unambiguous and in accordance with the nomenclature rules established by the IUPAC, the International Union of Biochemistry, the Abstracts Service (see Index Guide to Chemical Abstracts, 1987 and <http://jbcs.sbq.org.br/iupac.html>), the Nomenclature Committee of the American Chemical Society or any other appropriate bodies. Units and symbols should follow IUPAC recommendations. Authors will not be denied any reasonable usage, but if non-SI units are used for critical data or for quantities measured to a high degree of accuracy, final numerical values should also be expressed in SI units.

Be sure that all abbreviations are once specified (as near as possible of their first citation).

3. Language, Style and Format

• Language

Only manuscripts written in **English** will be considered. Standard English and American English spellings are allowed but consistency should be maintained within the manuscript.

From now on, all authors are expected to send along with their manuscript a statement from a specialized company (or person), attesting that the text was submitted to **formal English review**. Otherwise, the Editor can, at any time, ask for such procedure to warrant the English precision, conciseness and understanding of the manuscript.

• Style and Format

• Main Sections: First initial with capital letter, bold, no final full stop. Should not be numbered, except for Reviews and Accounts:

- **Introduction**

- **Experimental** (or **Methodology** in case of theoretical and computational papers)

- **Results and Discussion** or **Results** then **Discussion** (alternatively, Experimental may follow Results and Discussion)

- Conclusions

- Supplementary Information (if you have): include the following text just to mention (not to add graphs and data here) the existence of the supplementary data, see the example:

Supplementary Information

Supplementary data are available free of charge at <http://jbcbs.sbq.org.br> as PDF file.

- Acknowledgments**- References**

- **Sub-Sections:** first initial with capital letter, no final full stop. Examples:

Reagents and equipments

X-ray data

- **Formulae (compounds):** should be numbered with bold Arabic numerals.
- **Structural or displayed formulae** must be accurately drawn and inserted in the text. All captions should be typed below the structural or displayed formulae, together with it, in the right position.

4. Guidelines for Illustrations**General Size**

The authors should think about the illustration size for double column (172 mm) of the journal. But, the font type size of text must be consistent with the illustration since it can be reduced during preparation of the Galley Proof.

This is important when choosing symbols for graphics, drawings, charts, photos, etc., be consistent, make your manuscript look nicer: use the same size and same font type in graphics, schemes, etc.

4.1 Graphs and Figures (also see Section 2)

Lines and Lettering: Lines should be black and of an adequate and even thickness. Solid, broke, dotted and dot-dash lines should be used in graphics. Particular care should be taken to ensure that the lines in a spectrum are of adequate thickness.

Lettering should not be smaller than 7 pt (Times New Roman) and lines not thinner than 0.5 pt. Lettering and lines should be of uniform density throughout the figures.

Labeled atoms in ORTEP (or any other) diagrams should have atom numbers in parenthesis, e.g., Fe(1), C(44).

Symbols representing physical quantities should be given in italics, e.g., J (Hz), δ (ppm), m/z , etc.

Units should be expressed in the appropriate form, e.g., g cm^{-3} or mol L^{-1} , rather than g/cm^3 or mol/L (see Section 4.5)

Graphs

- **Scales:** graphs should have only the minimum necessary scale divisions marked by numerals.
- **Axis labels** should use SI units, separated from quantities (see details in the green book)

<http://old.iupac.org/reports/1993/homann/index.html>):

For graphs, use slashes in X and Y axes to separate axes names from units. For example: 2θ / degree; Temperature / °C; time / min; Size range / mm; Wavenumber / cm^{-1} . Use parentheses only to group a set of units, e.g., Concentration / (mol L^{-1}) ; $10^3 (\text{T/K})^{-1}$, etc.

Pay close attention to the way decimal values are expressed in English. **Employ dots instead of commas.**

Figures must have a high quality in order to be well reproduced. Use at least a 900 dpi resolution. If necessary, resize to a smaller size to get higher quality.

Curves should be labeled (a), (b), (c) etc. and further information be given in the figure legend/caption.

Data Points must be shown sufficiently large to be distinguishable. Whenever possible, they should be marked

with the following symbols (use alternated full and open symbols):

●, ○, ■, □, ▲, △, ◆, ◇

Graphs/Figures should be pasted from their original files (Origin, ChemDraw, Corel etc.) and have an excellent

quality. If you have to digitalize (scan) the figures (photos, for instance), choose the following scan options: black & white (B&W), no background and minimum of 300 dpi. If you wish them to be published online in color, send both the colored and B&W versions to the Editorial Office, matching the captions of the figures to accommodate the alternatives.

For computer-generated artwork, background or shadings should be avoided.

4.2 Structural Formulae

Figures, schemes and structures should be drawn to fit single or double-column widths. They should look proportional in case they are reduced.

Structures should be numbered with bold Arabic numerals, e.g., **1**, **2**.

All chemical structures included in the manuscript should be drawn using the same letter type (Times New Roman or Arial), size of cyclic groups, size and thickness of chemical bonds, and, the most important, authors should use the same standard throughout the work, including all figures, schemes, etc.

The following organic group abbreviations may be used: Me, Et, ⁿPr, ⁿBu, ^sBu, ^tBu, Ph, CO²R, CO²H, ⁱPrOH.

One variable univalent substituent is indicated by R. When more than one independent variable general substituent is present, R¹, R², R³, etc. should be used.

A variable metal may be indicated by M and variable ligands by L¹, L², L³ or L1, L2, L3, etc.

4.3 Photographs

Photographs should be highly contrasted, positive and not mounted.

When necessary, the scale should be drawn on the photograph itself and not below.

Color prints are rarely reproduced satisfactorily in black and white. Original B&W photographs are preferred to report experimental results, such as electron micrographs or to illustrate special

equipment adaptations.

4.4 Colored Illustrations

Online Version

From 2010 onwards, the publication of colored illustrations will be totally free of charge in the ONLINE version of the Journal.

Printed Version

Black & White (B&W) illustrations are free of charge. If color figures are presented in your Manuscript (Ms), they will automatically be converted into black-and-white (except GA). Color prints rarely reproduce satisfactorily in black and white. Thus, pay attention so that no information is missed because of the conversion. If the authors want to have colored illustrations on the printed version, they will be asked to pay for their cost: the current fee is 250 USD for all figures (remember that in the online version, they are free of charge).

4.5 Tables, Data and Units

Tables

Format your table to give straightforward information to the reader. Do not use shades or bold lettering. Indicate any extra information as a footnote with letters, e.g., a, b, c, etc. For examples, see any "PDF" files in: http://jbcs.sbg.org.br/forthcoming_papers.asp.

Data

For negative numbers, ions and equations in text and tables use – (negative symbol) instead of - (hyphen). Examples: Cl^- , -0.40, $y = ax - b$.

Units

Use International System Units (SI), e.g., m, s, kg, Pa, mol L^{-1} , etc, separated from quantities with a blank space. Example: 300 K, not 300K. See: <http://old.iupac.org/reports/1993/homann/index.html>.

Note: Molar (M) is no longer a valid concentration expression for IUPAC; it is suggested mol L^{-1} or mol dm^{-3} , but be consistent throughout your manuscript.

For examples, see any "PDF" files in: http://jbcs.sbg.org.br/forthcoming_papers.asp

5. Graphical Abstract (GA) and Text for GA

Concerning the **JBCS** Table of Contents, it is expected from authors careful with their **Graphical Abstract (GA)** proposition.

This way, the figure should summarize the content of the manuscript in a concise, pictorial form, designed to capture the attention of a wide readership. The author should present a new figure, using as an idea a key structure, a reaction, an equation, a concept, a graphic, a theorem, etc. It should use colors as much as possible and have an artistic and imaginative idea. Short movies are also welcome (as supplementary information (SI)). It is not acceptable photos of commercial equipment in GA or in the text of the manuscripts.

Pay Attention: the image should have a 900 dpi resolution (*.tiff / *.jpg or any other image file that

can be edited and be 8 cm wide and 4 cm high). Along with the GA figure, insert a short explanatory⁷⁰ text about it below (three lines at the most).

Take a look at our recent publications whose Table of Contents presents Graphical Abstracts (<http://jbc.ssbq.org.br>). Therefore, be smart to advertise your manuscript: send a beautiful and appealing graphical image.

6. Equations

When writing equations, use the Word editing equation option or any other equation editor. Equation cannot be added in the main text as image format.

7. Reference Citation rules

- **Reference numbers**

Reference numbers in the **text** should be typed consecutively as superscripts after punctuation, without parentheses or brackets. Examples:

sodium salicylate,¹⁻³
Nishide *et al.*,⁴
by reduction of chromic acid.^{4-8,12}

The cited literature should be listed on a separate page (double-spaced) in the same order it appears in the text.

- **Journal Titles**

Journal title abbreviations are those defined in the Chemical Abstracts Service Source Index (see <http://www.cas.org/content/references/corejournals>). If an authoritative abbreviation for a Journal cannot be located or if the abbreviation is not obvious, the full Journal title should be cited.

- **Style Rules for Year, Volume and Page**

#. Author, A. C.; Author B.; Author C. F.; *Abbreviation of the Journal* **Year**, *Volume*, Page.

1. Author, A. C.; Author, B.; Author, C. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21, 77.

- Author initials should be separated from each other, e.g., Author, A. C.;
- Use semi-colons to separate different author's names. No "and" is necessary in any case.
- *Journal Abbreviations* should come in Italics: *J. Braz. Chem. Soc.*
- **Years** - bold font: **2010**
- *Volume* - Italic style: *21*
- Page - only the initial page, followed by dot: 77.

Examples:

2. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

In case the journal is not easily accessible, the best choice is to quote its Chemical Abstracts number, as follows

3. Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

Pay attention to the connection words in the names, as for instance: da Silva, M. A. or Silva, M. da, as follows:

4. Pinto, A. C.; de Andrade, J. B.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 448.

• Composite References

They should be used whenever possible, rather than a series of individual references, without letters (a), (b), (c), etc. Use only a semi-colon to separate them. The style for composite references is as follows:

5. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

• Patents

They should be identified in the following form. Whenever possible, Chemical Abstracts numbers should be quoted in parentheses:

6. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

7. Kadin, S. B.; *US pat.* 4,730,004 **1988** (CA 110:P23729y).

8. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI* 9.604.468-3 **1999**.

• Books

9. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed.; Wiley: New York, USA, 1988.

Chapter in a book: only the main title should be given, with the chapter author's name and the editor's name after the title (this in italic):

10. Regitz, M. In *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Germany, 1990, ch. 2.

• Software

11. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; University of Göttingen, Germany, 1993.

- **Web Pages**

12. <http://www.s bq.org.br/jbcs>, accessed in June 2013.

- **Unpublished material Reference**

For material **accepted** for publication: in this case, the DOI number should be provided by the authors.

13. Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, DOI xx.

For other reference examples, see "PDF" files in: http://jbcs.s bq.org.br/forthcoming_papers.asp

- **Dissertation/Thesis:** do not use as bibliographic reference. Include only the articles that were produced from that research work.

8. Supplementary Information (SI)

This material will be available online in the **JBCS** Page as PDF file. It should contain relevant and complementary data to those presented in the manuscript. Their format can be: tables, graphs, spectra, films and so on.

Any synthesized or identified compound must be accompanied by the spectra used for such identification. This is especially important for Natural Products, Organic and Inorganic Chemistry manuscripts in which the characterization/identification techniques are part of the work.

8.1 Manuscripts including crystallographic data

Deposition of Crystallographic Data

Prior to the submission of the typescript including crystallographic data, the author(s) should deposit, in the relevant Data Center, the data corresponding to each structure to be reported.

Data for **organometallic, organic and coordination (Werner-type) compounds** should be sent to the Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) by e-mail, in CIF format. More information and a checklist of data items to be included in the deposit can be obtained from the CCDC homepage: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/>.

Data for inorganic compounds should be sent to Fachinformationszentrum Karlsruhe (FIZ) by e-mail: crysdata@FIZ-Karlsruhe.de.

Deposition Codes

The Data Centers will provide deposition codes for each data set, which should be quoted in the typescript under a Supplementary Information heading before the Acknowledgements.

Standard text for CCDC:

Crystallographic data (excluding structure factors) for the structures in this work were deposited in the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication number CCDC XXXXXX.

Copies of the data can be obtained, free of charge, via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html or⁷³ from the Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033. E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

Preparation of Crystallographic Material

When the manuscript is submitted, the following guidelines should be observed:

The Abstract should not contain crystal data, but a concise statement of the main features of the structural results.

The following crystallographic data should be given in a paragraph of a Table, in a concise format:

8.1.1 Color, habit and size of the crystal(s) used, behavior of the compound under the data collection conditions.

8.1.2 The chemical formula should correspond to the complete chemical unit encompassing the crystallographic symmetry, the formula weight, $F(000)$, the absorption coefficient and the measured and calculated densities.

8.1.3 The unit cell parameters with esd's and the X-ray wavelength used.

8.1.4 The crystal system, space group and number of chemical units per cell.

8.1.5 Type of diffractometer used and method of data collection, total number of data collected, number of unique reflections, $R(\text{int})$ value, number of observed reflections with cut-off parameter, use or not of absorption correction, transmission factors.

8.1.6 The final results: R , wR , S and the number of parameters refined; treatment of hydrogen atoms; final peak and hole in the last difference map. Only refinements on F_2 will be accepted.

Discussion of the Structure

It must include a labeled diagram of the structure, a list of relevant geometric parameters - interatomic bond distances and angles, torsion angles, hydrogen bond parameters, etc. Data of less important parts of the structure, such as ligand sub-groups (phenyl rings, etc.) should be omitted.

8.2 Manuscripts including NMR, IR, mass spectra, etc.

Whenever a compound is synthesized or identified (new or already known), it is imperative to send all spectral data (data and spectra) as Supplementary Information (SI) along with your submission, at the end of your doc file.

A brief mention to the existence of complementary data should be included in the Supplementary Information topic before the **Acknowledgments** section. Example:

Supplementary Information

Supplementary information (Figure S1-S4, Table S1) is available free of charge at <http://jbc.org.br> as PDF file.

How to send this type of information:

Join all spectra in one SI file. Do not forget to add captions to each one of them, identifying each individual spectrum (e.g., Figure S1. ^1H NMR Spectrum of...; Figure S2. IR Spectrum of...; Figure S3. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Spectrum of...; Table S1. Data for...). If the spectra will be digitalized (scanned), choose options: black&white, without background and 300 dpi at least. Add this file to the end of your manuscript, which should then comprehend one single doc file, containing GA, text with tables and figures, and SI.

9. Procedure for Manuscript Submission

9.1 Manuscript to be Evaluated for the First Time

The **JBCS** submission offers only online submission. The submissions are made using the ScholarOne^{TR}-

JBCS system by clicking the link "Submission online (ScholarOne)" at our website (<http://mc04.manuscriptcentral.com/jbchs-scielo>).

- All the authors must have their names introduced in the platform, so fill this part and inform the correct co-authors' e-mail addresses in the system.
- In the ScholarOne-JBCS system, all files need to be uploaded individually:

(i) Main manuscript: as full.doc, not as full.pdf and

(ii) Figures/Schemes (just the ones from the main document), including GA image: as jpg, tiff, opj, xls, etc (not as individual doc files or grouped in a doc file).

Figures built using Excel/Origin programs provide pictures higher quality in the final work (proof), so upload preferentially original xls/opj files.

- In the main document (full.doc): also keep tables/figures/schemes/equations and their legends as close as possible of their first citation.

9.2 Manuscript already Evaluated (Resubmission: Reject and Reject&Resubmission)

In cases that the manuscript has already received a decision from JBCS Editor like Reject and Reject&Resubmission some specific requirements are necessary:

(1) Main document: the modifications need to be highlighted with a different color guiding Editor/Reviewers with changes made in relation to the original version (do not use the track changes mode in MS Word).

(2) Be sure that the Response Letter, in the place of the cover letter, itemizes each comment addressed, as well as any changes made, of all Referee(s) and Editor (if so). Write a very convincing text explaining the points that were introduced/removed, new experiments that were used. Add, please: "Response Letter for ID JBCHS-201x-0xxx (previous ID): ..."

(3) Replace all the files that were modified uploading with the new files.

For Reject&Resubmission decision, Authors may access the previous ID (one that received the decision) in

the Author Center at the JBCS-ScholarOne submission site

(<http://mc04.manuscriptcentral.com/jbchs-scielo> at the link "Manuscripts with Decisions") and then in "create a resubmission" to resubmit the manuscript.

With the resubmission, the manuscript will receive a new ID. The use of this link will accelerate the evaluation since the system will keep all the decisions for the previous ID linked to the new ID.

All these actions for an already evaluated manuscript will expedite the assessment.

10. Galley Proofs - GP

The **JBCS** Journal Publishing Staff will contact you in the near future regarding your manuscript page proofs (GP).

The proofs are provided for the correction of printing errors only, i.e., the proof correction should not be used for language or content improvement. If considered excessive, the change costs will be charged to the author(s).

Corrected galley proofs should be returned as soon as possible (within 72 h or in 3 business days).

Your manuscript will be published on the web only after you approve your page proofs.

11. Contacts

Address:

J. Braz. Chem. Soc.

A/C Angela Ramalho

Chemistry Institute

University of Campinas (Unicamp)

CP 6154

13083-970 Campinas-SP, Brazil

E-mails:

Angela Ramalho

Editorial Manager - **JBCS**

office@jbcs.sbq.org.br

Maria Suzana P. Francisco
Editorial Manager Assistant - **JBCS**
help_office@jbcs.sbq.org.br