

Trabajo práctico para medir producción de radicales hidroxilos por el método de TBARS

Preparación de soluciones

- **Buffer fosfato pH = 7.4, 0.1 M**

Pesar 1.09 g de Na_2HPO_4 (PF: 137.99 g) y llevar a volumen con agua destilada en matraz aforado de 100 mL. Control del pH obtenido con pH-metro.

- **Solución stock 0.0125 M de MDA**

Toma de 106.6 μL de MDA (MDA Merck: 97%, $d_{20^\circ\text{C}} = 0.992 \text{ g/mL}$, PF = 164.20 g) con micropipeta (P200), llevar a 50 mL con agua destilada en matraz aforado.

- **Solución de 2-deoxy-D-ribosa 0.0125 M**

Llevar 0.042 g de 2-deoxy-D-ribosa (PF = 134.13 g) a 25 mL con agua destilada en matraz aforado.

- **H₂O₂ 20 mM**

Tomar 0.5 mL de una solución 100 vol (30 %m/m, $d = 1.11 \text{ g/mL}$) y llevar a 250 mL con agua destilada. Se obtiene de esta manera una solución aproximadamente 0.01958 M.

- **TBA 1 %m/v**

Llevar 0.5 g de TBA a 50 mL con agua destilada mediante agitación continua y temperatura (80 °C - 100°C).

Curva de calibración

1. Partiendo de la solución stock de MDA 0.0125 M se hacen las soluciones de trabajo realizando las siguientes tomas las cuales son llevadas a **250 mL** con agua destilada en matraz aforado:

Toma de solución stock (μL)	Concentración de MDA (μM) en la solución de trabajo
0	0.0
20	1.0
40	2.0
60	3.0
80	4.0
100	5.0

2. Se agregan en 6 tubos limpios y secos (con micropipeta P1000):
 - 500 μL de buffer fosfato pH = 7.4, 0.1 M
 - 500 μL de solución de trabajo de MDA
 - 1 mL TBA 1 %m/vObteniendo así 6 puntos en el rango de 0 a 2.5 μM .
3. Incubar los tubos en un baño de agua a 90 °C durante 15 a 20 minutos. Retirar del baño y dejar enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente.
4. Medir la absorbancia de cada tubo a 532 nm (habiendo verificado al menos con un tubo que el máximo de absorbancia es 532 nm).
5. Realizar curva de calibración graficando absorbancia de cada tubo a 532 nm vs. concentración de MDA.

Mediciones con complejos

Preparación de soluciones de complejo

Cu(Ala)₂

- Solución stock 0.005 M: 6 mg de Cu(Ala)₂ llevados a 5 mL de agua destilada en matraz aforado.
- Soluciones de trabajo (agregados con pipeta automática considerando volúmenes aditivos):

Toma de solución stock (μL)	Agua destilada (μL)	Concentración de Cu(Ala) ₂ (μM) en la solución de trabajo
0	5000	0.0
200	4800	0.2
400	4600	0.4
600	4400	0.6
800	4200	0.8
1000	4000	1.0

Procedimiento

1. En 6 tubos limpios y secos se agregan:
 - 500 μL de buffer fosfato pH = 7.4, 0.1 M
 - 200 μL de ribosa 0.0125 M
 - 200 μL de solución de trabajo del complejo
 - 100 μL de H₂O₂ 0.030 M (por ultimo)

Las concentraciones finales obtenidas son: 50 mM de buffer, 2.50 mM de ribosa, 1.0-3.0 mM de peróxido y 50-300 μM de complejo (dependiendo del tubo).

2. Luego de agitarlos, los tubos se colocan en un baño de agua a 37 °C durante 40 minutos.
3. Retirar del baño y agregar 1 mL de TBA 1%, agitar, colocar en baño de agua a 90 °C durante 15 minutos.

4. Retirar del baño y dejar enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos.
5. Medir la absorbancia de cada tubo a 532 nm.
6. Realizar curvas de absorbancia vs. concentración de complejo y equivalentes de MDA (los equivalentes de MDA se calculan a partir de la curva de calibración).