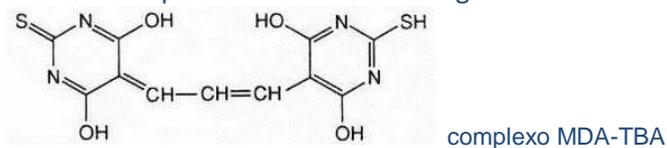


Quantificação de dialdeído malónico (método TBARS)

Adaptado de: DM Hodges, JM DeLong, CF Forney, RK Prange (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604-611

O dialdeído malónico ($\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, malondialdeído, MDA) resulta da reacção das espécies reactivas de oxigénio (ROS) com os ácidos gordos polinsaturados dos lípidos membranares. A quantificação do MDA é geralmente usada para detectar stress oxidativo nas células.

O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) gerando um composto que absorve a 532 nm. A leitura a 600nm e 440nm permite corrigir para absorção não específica de açúcares e antocianinas presentes nos tecidos vegetais.



Soluções :

Etanol 80% (v/v em H_2O)

Ácido tricloroacético (20%, p/v em H_2O)

Ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,65% p/v em ácido tricloroacético 20%)

Butylhydroxytoluene (5%, v/v em etanol)

Extracção:

Usar cerca de 0,2g de folha (cada grupo prepara uma amostra controle e uma de stress). Reduzir a pó num almofariz com azoto líquido. Transferir o pó para um microtubo contendo 1,8 mL de etanol 80%. Centrifugar a 14000g durante 5 min. Recolher o sobrenadante para um novo microtubo, sem ressuspender o pellet. Perfazer o volume a 2mL.

Nota: proceder rapidamente e conservar as amostras no gelo

Reacção:

Num tubo de vidro colocar 0,8 mL de amostra + 0,8 mL de reagente com TBA + 3,5 μL de Butylhydroxytolueno e fecgar bem. Proceder de modo semelhante usando o reagente sem TBA. Fazer os "brancos" usando etanol 80% em vez da amostra. Colocar todos os tubos num banho maria a 95 $^\circ$ C, durante 30 min. Arrefecer as amostras, transferir para um microtubo e centrifugar a 14000g durante 10 min. Recolher o sobrenadante (~ 1,2 mL) para um outro microtubo sem retirar o precipitado.

No espectrofotómetro seleccionar os comprimentos de onda de 440nm, 532nm e 600nm. Fazer a linha de base com o branco (com TBA) e ler as respectivas reacções com as amostras controle e stress. Proceder de igual modo para as reacções sem TBA. Utilizar cuvetes de vidro e lavar com etanol.

Cálculos:

$$A = [(Ab_{532} + \text{TBA}) - (Ab_{600} + \text{TBA})] - [(Ab_{532} - \text{TBA}) - (Ab_{600} - \text{TBA})]$$

$$B = [(Ab_{440} + \text{TBA}) - (Ab_{600} + \text{TBA})]0.0571$$

$$\text{MDA equivalentes (nmol mL}^{-1}\text{)} = [(A-B)10^6]/157000$$

(Exprimir em nmol MDA mL^{-1} e nmol MDA g^{-1} peso seco)