

Prueba de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS)

(2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonic Acid))

La prueba de ABTS consiste en la formación del cation radical de ABTS^{•+} mediante el uso de persulfato de sodio, el cual producirá un cromógeno verde/azul. La reducción del ABTS^{•+} por moléculas antioxidantes permite la decoloración del ABTS^{•+}. Lo que nos permite determinar la capacidad de nuevos compuestos de donar electrones y actuar como agentes reductores y así determinar su capacidad para estabilizar los radicales y disminuir el proceso oxidante.

Como se muestra en la Figura 1, el ABTS se reduce al catión radical ABTS y posteriormente este radical formado es estabilizado por el compuesto a evaluar a diferencia de la prueba de DPPH en donde se emplea un radical libre estable, la prueba de ABTS nos permite evaluar la capacidad de nuevos compuestos de donar un electrón a un radical que se va formando.

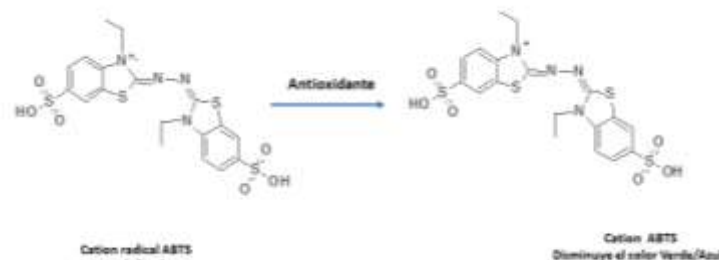


Figura 1. Principio de la prueba ABTS (modificado de Konan, et al.,2016).

Tabla 1. Reactivos para el ensayo. Esta cantidad de reactivos es suficiente para 4 placas de 96 pozos.

| Reactivo | Compuesto | Concentración | Cantidad | No. de viales o tubos |
|----------|---|---------------|---|--|
| A | ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) | 7.7 mM | 6.5 mg en 1.5 mL de H ₂ O para 3 placas, proteger de la luz y oxígeno. | 2 Vial con 6.5 mg ABTS |
| | | | | 2 Vial con 1.5 mL de agua |
| B | Persulfato de potasio (K ₂ S ₂ O ₈) | 2.4 mM | 1 mg adicionado al reactivo A. Estable por 3 días protegido de la luz. | 2 Vial con 1 mg de K ₂ S ₂ O ₈ |

| | | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|---------|--|---|
| Mezcla | Metanol y DMSO | 1:1 | 20 mL de Metanol con 20 mL de DMSO para una placa. | 1 Tubo con Metanol Tubo con DMSO |
| SOLUCIONES STOCK DE LOS COMPUESTOS | | | | |
| C (estándar) | Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) | 3.26 mM | 1 mg en 2 mL de DMSO. Preparar cada vez que se use, debido a que se oxida. | 3 Viales de 1 mg 5-ASA. |

Nota: Para el compuesto problema determinar su concentración con base a su PM.

PROCEDIMIENTO

1. Mezclar el reactivo A con el B e incubar por 16 horas a temperatura ambiente en la oscuridad o tapado en papel aluminio para formar el catión radical de ABTS de color verde/azul.
2. Una vez transcurrido el tiempo, diluir 615 µL del radical ABTS formado en 19200 µL de la mezcla DMSO: Metanol para una placa de 96 pozos completa.

3. Preparar el **vial a** del estándar o compuestos a evaluar como en la siguiente tabla:

Tabla 2. Preparación del compuesto estándar (**vial a**). Revisar Anexo para compuesto problema.

| | µL Estándar | µL DMSO | µL Metanol |
|--|-------------|---------|------------|
| 5-ASA (Vial a ; 0.32mM) | 29.4 | 120.6 | 150 |

4. Realizar las diluciones de los compuestos a evaluar para tener las siguientes concentraciones: 0.32, 0.16, 0.08, 0.04 y 0.02 mM (viales b, c, d y e) a partir del **vial a**. Adicionar a partir del **vial b** al **e**, 150 µL de la mezcla DMSO: METANOL. Posteriormente, transfiera 150 µL del **vial a** al **vial b** y mezcle. A partir del **vial b** transfiera 150 µL al **vial c** y mezcle. Posteriormente, transfiera 150 µL del **vial c** al **d**. y mezcle. Finalmente, transfiera 150 µL del **vial d** al **e** y mezcle. Ver figura 1.

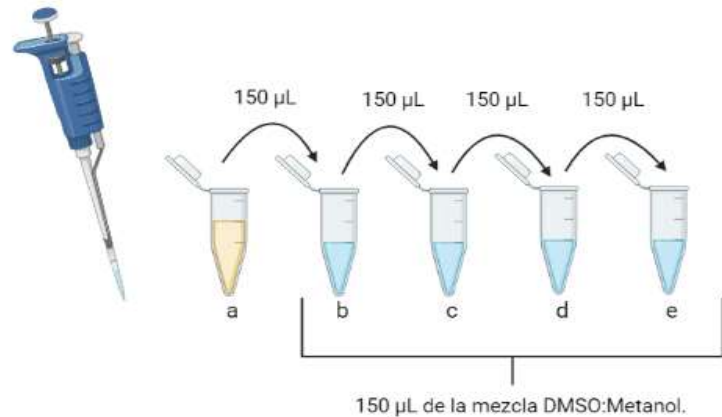


Figura 1. Preparación de los viales a, b, c, d, e y f.

5. En una placa de 96 pozos colocar 20 µL del compuesto a diferentes concentraciones en 3 pozos (a, b, c, d y e) más 200 µL de ABTS diluido, siendo un total de 15 pozos. Con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a **A_c**. (Ver figura 2).
6. Finalmente, colocar en los últimos 3 pozos 200 µL de ABTS diluido más 20 µL de la mezcla DMSO:Metanol, con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a **A_i**.

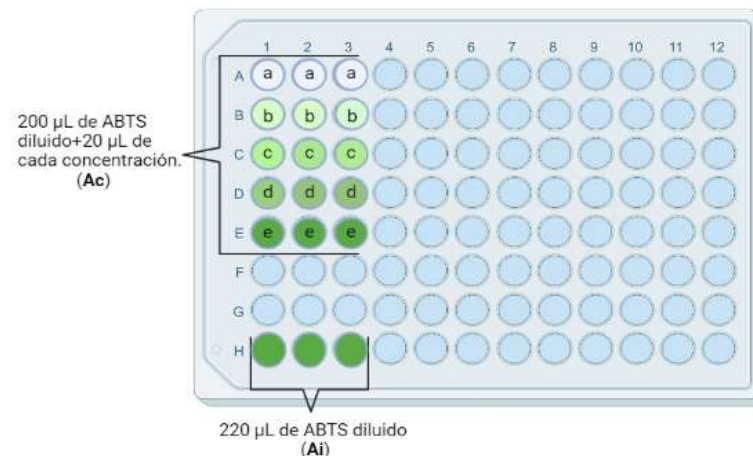


Figura 2. Ejemplo de placa de 96 pozos con un compuesto.

5. Incubar la placa por 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.
6. Determinar la absorbancia a 734 nm con 5-7 s de agitación en un lector de placas, la cual debe ser de 0.7 ± 0.010 en el **A_i**. El ensayo se realizó por triplicado. (Kotora *et al* 2016)
8. Determinar el % del radical ABTS con la siguiente ecuación.

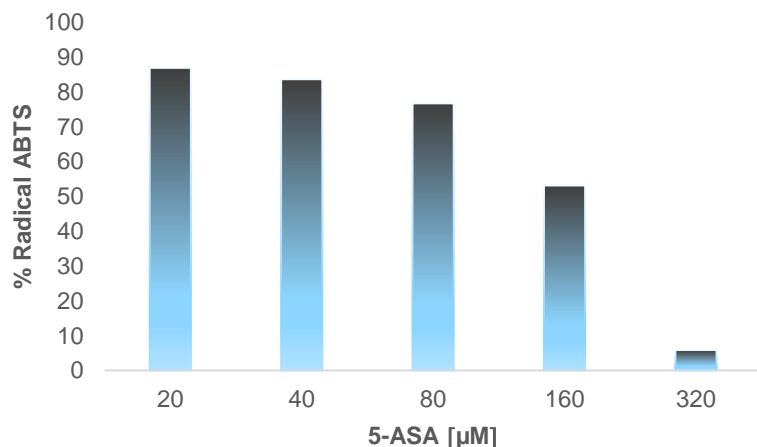
$$\% \text{ ABTS} = \frac{A_c * 100}{A_i}$$

Dónde:

A_c= Absorbancia del ABTS con el compuesto.

A_i = Absorbancia del ABTS inicial.

La gráfica obtenida después de los cálculos es la siguiente:



Anexo.

Cálculos.

Preparación del **vial a** según el 5-ASA.

Ejemplo:

El compuesto estándar tiene un peso molecular de **153.14 g/mol**.

Basándonos en el 5-ASA se pesará **1 mg** y se disolverá en **2000 μL** de DMSO. Esta será la solución stock.

1. Se tiene que obtener la concentración molar de la solución stock por lo que sustituyendo la fórmula de molaridad se tiene que:

$$M = \frac{m}{PM * V}$$

Donde:

M= molaridad (mol/L)

m=masa (g)

PM= peso molecular (g/mol)

V= volumen (L)

$$M = \frac{1 \times 10^{-3} \text{ g}}{153.14 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 2 \times 10^{-3} \text{ L}} = 3.26 \text{ mM o } 3.26 \times 10^{-3} \text{ M}$$

2. Se determinará el volumen que se tiene que tomar de la solución stock para llegar a la concentración del **vial a** que es **160 μM o $160 \times 10^{-6} \text{ M}$** en un volumen final de **300 μL** DMSO:Metanol.

$$\text{Volumen de stock} = \frac{\text{Concentración vial a} * \text{Volumen final del vial a}}{\text{Concentración de la solución stock}}$$

$$\text{Volumen de stock} = \frac{320 \times 10^{-6} \text{ M} * 300 \mu\text{L}}{3.26 \times 10^{-3} \text{ M}} = 29.4 \mu\text{L}$$

3. El volumen final es de **300 μL** DMSO:Metanol que sería **150 μL** de DMSO y **150 μL** de metanol.



4. Así que el volumen del **vial a** se prepara con **29.4 μL** de solución 5-ASA disuelto en **120.6 μL** de DMSO + **150 μL** de metanol.

Estas fórmulas se utilizan en los cálculos de la preparación del **vial a** de cualquier compuesto que se quiera evaluar según su peso molecular.

