

PRUEBA de ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+})

La prueba de ABTS consiste en la formación del catión 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^{•+} (1). Por lo tanto, con la técnica de ABTS se puede medir la capacidad de moléculas de donar electrones y actuar como agentes reductores, y así determinar su capacidad para estabilizar los radicales y disminuir el proceso oxidante (2).

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 (3) 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 las moléculas de donar un electrón a un radical que se va formando.

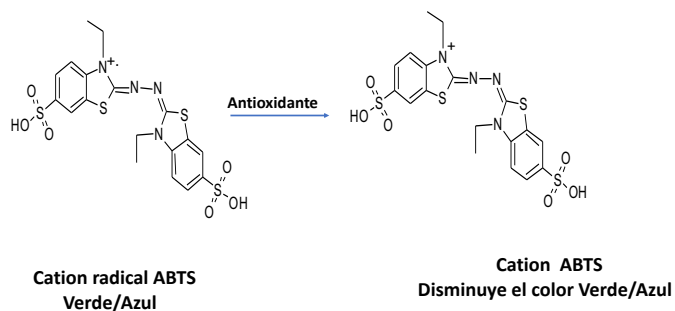


Figura 1. Reacción general entre el catión radical ABTS en presencia de una sustancia antioxidante.

REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE ABTS

El Kit contiene los reactivos presentados en la Tabla 1 y 4 placas de 96 pozos, los cuales, son suficientes para evaluar el estándar y 7 compuestos a 5 concentraciones distintas como se muestra en la Figura 3.

Tabla 1. Reactivos para el ensayo ABTS

Reactivo	No. de frascos
A	1 frasco
B	1 frasco
C	2 frascos
Metanol DMSO	1 frasco Metanol (30 mL) 1 frasco DMSO (30 mL)

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



QR video prueba ABTS

PHARMACEUTICAL AND BIOTECHNOLOGICAL INNOVATION-SERVICES
SAS de CV.
<https://www.pharbiois.com/> RFC: PBI191119GWA
Fresno Norte No 14. San Miguel Tehuisco, Alcadia
Tlalpan C.P.14500
mail: pharmacologicalandbiotechnology@gmail.com

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE ABTS

1. Disolver el reactivo **A** en 1.5 mL de H₂O destilada.
2. Transferir el reactivo **A** disuelto, al vial del reactivo **B**, mezclar e incubar por 16 h a temperatura ambiente en la oscuridad (cubierto con papel aluminio) para formar el catión radical de ABTS el cual tendrá un color verde/azul. El catión radical ABTS formado es estable por dos días.
3. Una vez transcurridas las 16 h, preparar 7500 µL de **ABTS diluido** de la siguiente forma: mezclar 241 µL del radical ABTS formado (agitar bien antes de usar) en 7259 µL de la mezcla DMSO:METANOL (1:1; para tener 15 mL). La cantidad de ABTS diluido y la mezcla DMSO:METANOL son suficientes para completar el ensayo de una placa como se muestra en la figura 3 evaluando dos compuestos por placa.
4. Preparar la solución stock del 5-ASA, disolviendo el reactivo **C** con 2 mL de DMSO esta solución tendrá una concentración de 3.26 mM (preparar cada vez que se use porque se oxida).
5. A partir de la solución stock del 5-ASA preparar las diferentes concentraciones. Rotular 5 viales con **a, b, c, d y e**, los cuales corresponden a las concentraciones de 0.32, 0.16, 0.08, 0.04 y 0.02 mM para el 5-ASA y en su caso para cada uno de los compuestos a evaluar.
6. Preparar el **vial a** (con la concentración 0.32 mM) del 5-ASA como se muestra en la tabla 2, o de los compuestos a evaluar para los cuales se deberán hacer los cálculos como se sugiere en el ANEXO. Tomando en cuenta el peso molecular, o bien si es algún extracto este podrá evaluarse en µg/mL, o alguna otra concentración.

Tabla 2. Preparación del compuesto estándar 5-ASA (**vial a**). Revisar Anexo para compuesto problema.

	µL de la solución stock del 5-ASA	µL DMSO	µL Metanol
5-ASA (Vial a; 0.32mM)	39	161	200

7. Realizar las diluciones a partir del **vial a**. Adicionar a partir del **vial b** al **e**, 200 µL de la mezcla DMSO: METANOL. Posteriormente, transfiera 200 µL del **vial a** al **vial b** y mezcle. A partir del **vial b** transfiera 200 µL al **vial c** y mezcle. Posteriormente, transfiera 200 µL del **vial c** al **d** y mezcle. Finalmente, transfiera 200 µL del **vial d** al **e** y mezcle. Ver Figura 2.

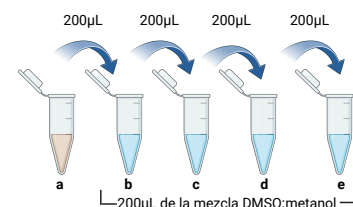


Figura 2. Preparación de los viales a, b, c, d y e.

PROCEDIMIENTO PARA EL ENSAYO DE ABTS

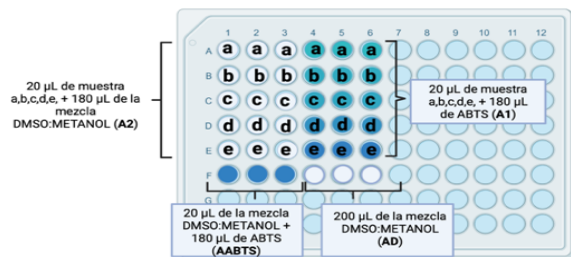


QR video prueba ABTS

PHARMACEUTICAL AND BIOTECHNOLOGICAL INNOVATION-SERVICES
SAS de CV.
<https://www.pharbiois.com/> RFC: PBI191119GWA
Fresno Norte No 14. San Miguel Tehuisco, Alcaldia
Tlalpan C.P.14500
mail: pharmacologicalandbiotechnology@gmail.com

Se recomienda realizar el ensayo por triplicado como esta indicado a continuación:

1. Con la finalidad de descartar la interferencia del propio compuesto, adicionar 20 μL de cada una de las concentraciones de cada compuesto (a, b, c, d y e) a 3 pozos, siendo en total 15 pozos. Posteriormente, adicionar a los pozos 180 μL de la mezcla DMSO:METANOL. Con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a A_2 .
2. Adicionar 20 μL de cada una de las concentraciones de cada compuesto (a, b, c, d y e) a 3 pozos, siendo en total 15 pozos. Posteriormente adicionar a todos estos pozos 180 μL de la solución de ABTS diluido. Con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a A_1 . (Ver figura 2). Considerar que el compuesto se diluye 10 veces por lo que las concentraciones para graficar serán 32, 16, 8, 4 y 2 μM .
3. Colocar en 3 pozos 180 μL de ABTS diluido más 20 μL de la mezcla DMSO:METANOL, con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a A_{ABTS} .
4. Finalmente, a 3 pozos adicione 200 μL de la mezcla DMSO:METANOL con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a A_D .



QR video prueba ABTS

PHARMACEUTICAL AND BIOTECHNOLOGICAL INNOVATION-SERVICES
 SAS de CV.

<https://www.pharbiois.com/> RFC: PBI191119GWA

Fresno Norte No 14. San Miguel Tehuisco, Alcaldía
 Tlalpan C.P.14500

mail: pharmacologicalandbiotechnology@gmail.com

Figura 3. Ejemplo de placa de 96 pozos con un compuesto.

5. Incubar la placa por 30 min a temperatura ambiente y protegido de la luz.
6. Determinar la absorbancia a 734 nm (4), con 5 segundos de agitación en un lector de placas. La absorbancia de los pozos A_{ABTS} debe ser de $\approx 0.8 \pm 0.20$.

ANALISIS DE RESULTADOS

Para determinar el % del radical ABTS reducido se emplea la siguiente ecuación.

$$\% \text{ ABTS REDUCIDO} = 100 - [(A_1 - A_2) / (A_{ABTS} - A_D) * 100]$$

Dónde:

A_1 = Absorbancia del compuesto con ABTS

A_2 =Absorbancia del compuesto con solvente

A_{ABTS} = Absorbancia del ABTS

A_D = Absorbancia del solvente.

La gráfica obtenida después de los cálculos es la siguiente:

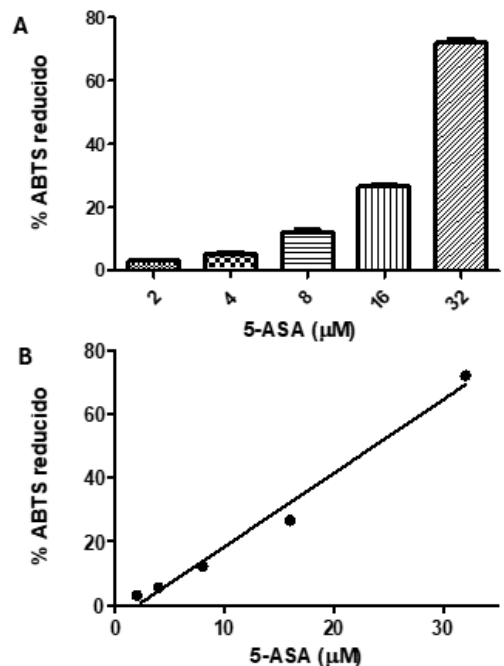


Figura 4. Porcentaje de ABTS reducido empleando 5 diferentes concentraciones de 5-ASA (A). Con la gráfica B es posible obtener la concentración de 5-ASA que reduce el 50 % de ABTS. (r^2 0.9820)

ANEXO.

Preparación del **vial a** de 5-ASA.

El 5-ASA 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)

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

2. Se determinará el volumen que se tiene que tomar de la solución stock para llegar a la concentración del **vial a** (320



QR video prueba ABTS

PHARMACEUTICAL AND BIOTECHNOLOGICAL INNOVATION-SERVICES
SAS de CV.

<https://www.pharbiois.com/> RFC: PBI191119GWA

Fresno Norte No 14. San Miguel Tehuisco, Alcaldía
Tlalpan C.P.14500

mail: pharmacologicalandbiotechnology@gmail.com

μM o $320 \times 10^{-6}M$) en un volumen final de 400 μL DMSO:METANOL.

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

$$Volumen\ de\ stock = \frac{320 \times 10^{-6}M * 400\ \mu L}{3.26 \times 10^{-3}M} = 39.26\ \mu L \approx 39\mu L$$

3. El volumen final en el tubo **a** es de 400 μL DMSO:METANOL que sería 39 μL de la solución 5-ASA que esta disuelta en DMSO mas 161 μL de DMSO y 200 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.

Nota: Puede utilizar una solución stock con diferente concentración, sin embargo, deberá calcular el volumen según la ecuación anterior.

REFERENCIAS

- 1.- Sebastian E.W. Opitz, Samo Smrke, Bernard A. Goodman, Chahan Yeretizian. (2014). Chapter 26 - Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant Assays. Editor(s): Victor Preedy, Processing and Impact on Antioxidants in Beverages, Academic Press, 2014, Pages 253-264, ISBN 9780124047389
- 2.- Rosales Hernández MC, Fragoso Morales LG, Correa Basurto J, Olvera Valdez M, García Báez EV, Román Vázquez DG, Anaya García AP, Cruz A. (2022). In Silico and In Vitro Studies of Benzothiazole-Isothioureas Derivatives as a Multitarget Compound for Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(21):12945. <https://doi.org/10.3390/ijms232112945>
- 3.- Henriquez, C., Aliaga, C. and Lissi, E. (2002), Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. *Int. J. Chem. Kinet.*, 34: 659-665. <https://doi.org/10.1002/kin.10094>
- 4.-N. J. Miller & C. A. Rice Evans. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 2:3, 161-171, DOI: 10.1080/13510002.1996.11747044



QR video prueba ABTS

PHARMACEUTICAL AND BIOTECHNOLOGICAL INNOVATION-SERVICES
SAS de CV.

<https://www.pharbiois.com/> RFC: PBI191119GWA

Fresno Norte No 14. San Miguel Tehuisco, Alcaldía
Tlalpan C.P.14500

mail: pharmacologicalandbiotechnology@gmail.com

ESTABILIDAD Y ALMACENAJE DE LOS REACTIVOS

Reactivo	Compuesto	Marca	Condiciones de almacenamiento	Ficha técnica
A	ácido 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)	sigma	Mantener el frasco bien cerrado en un lugar seco. Temperatura de almacenaje recomendada 2 - 8 °C	https://www.canva.com/design/DAGJQu0ZITw/B2c-XjFFEFZ2clxOUml9KA/view?utm_content=DAGJQu0ZITw&utm_campaign=designshare&utm_medium=link&utm_source=editor
B	Persulfato de potasio (K ₂ S ₂ O ₈)	sigma	Mantener el frasco bien cerrado en un lugar seco. Sensible a la humedad.	
C	Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)	sigma	Temperatura de almacenaje recomendada 2 - 8 °C Sensible a la luz.	
	Metanol	chroma solv for hplc	Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco.	
	DMSO	sigma	Mantener el frasco bien cerrado en un lugar seco. Almacenar en atmósfera inerte. higroscópico	



QR video prueba ABTS

PHARMACEUTICAL AND BIOTECHNOLOGICAL INNOVATION-SERVICES
 SAS de CV.

<https://www.pharbiois.com/> RFC: PBI191119GWA

Fresno Norte No 14. San Miguel Tehuisco, Alcaldía
 Tlalpan C.P.14500

mail: pharmacologicalandbiotechnology@gmail.com