

PRUEBA DE 2,2- Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

El 2,2- Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) es un radical libre estable el cual se emplea para evaluar la actividad antioxidante de diversas sustancias como; alimentos, compuestos químicos, extractos de plantas etc (1). En este ensayo se determina si el compuesto a evaluar (AH) tiene la capacidad de donar un electrón y estabilizar al radical libre DPPH con base en la reacción de la Figura 1 (2).

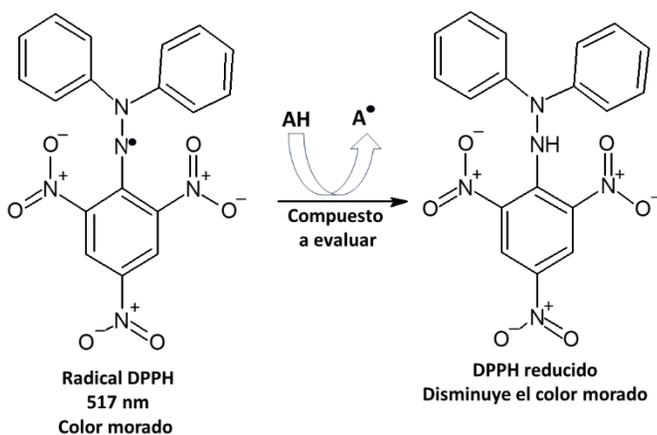


Figura 1. Reacción química entre el radical DPPH y el compuesto o extracto a evaluar en donde se reduce el DPPH.

REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE DPPH

El ensayo de DPPH contiene los reactivos de la Tabla 1 y 3 placas de 96 pozos, los cuales son suficientes para evaluar el estándar (5-ASA) y 5 compuestos (3 placas de 96 pozos).

Tabla 1. Reactivos para el ensayo de DPPH.

| Reactivo | No. de viales o tubos |
|----------------|-----------------------|
| A | 1 frasco |
| B | 2 frascos |
| DMSO | 1 |
| METANOL | Frasco DMSO (20 mL) |
| | 1 |
| | Frasco metanol (35mL) |

Nota: Para el compuesto problema determinar su concentración con base a su peso molecular (PM) como se menciona en el anexo al final de este documento. Se podrá ir preparando la cantidad de mezcla DMSO:METANOL como se requiera.



QR video ensayo DPPH

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

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE DPPH

1.- Disolver el reactivo **A**, en 12.5 mL de metanol. Verificar que se disuelva bien, se tornara de un color morado, Estabilidad por dos días en refrigeración protegido de la luz.

2.- Preparar el reactivo **B**, stock del 5-ASA disolviéndolo con 800 μL de DMSO, (preparar cada vez que se use, debido a que se oxida). Además, preparar las soluciones stock de los compuestos que se van a evaluar tomando en cuenta los cálculos del ANEXO si es necesario.

3.- Preparar las diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos a evaluar, así como el compuesto de referencia (5-ASA). Rotular 5 viales con **a, b, c, d y e** los cuales corresponden a las concentraciones de 60, 30, 15, 7.5 y 3.75 μM para cada uno de los compuestos a evaluar incluyendo el 5-ASA.

5.- Para preparar la concentración de 60 μM de 5-ASA mezcle en el **vial a** las siguientes cantidades (Tabla 2). Para determinar el volumen que se requiere para cada compuesto (**REVISAR ANEXO**).

Tabla 2. Preparación del vial **a** del 5-ASA.

| Compuesto | μL de la solución stock de 5-ASA | μL de DMSO | μL de Metanol |
|-----------|---|-----------------------|--------------------------|
| 5-ASA | 11 | 739 | 750 |

6.- Una vez preparado el **vial a** de cada serie, preparar las diluciones correspondientes a cada uno de los compuestos de la siguiente manera:

7.- Preparar la mezcla DMSO:METANOL se recomienda un volumen de 12 mL (1:1), estos serán suficientes para las diluciones de los compuestos y para el ensayo de una placa de 96 pozos (considerando que por placa es posible evaluar 2 compuestos, como se muestra en la Figura 3).

8.- Para preparar las diluciones de los viales **b, c, d, e**, adicionar a partir del **vial b** al **e**, 750 μL de la mezcla DMSO:METANOL. Posteriormente, transfiera 750 μL del **vial a** al **vial b** y mezcle. A partir del **vial b** transfiera 750 μL al **vial c** y mezcle. Posteriormente, transfiera 750 μL del **vial c** al **d** y mezcle. Transfiera 750 μL del **vial d** al **e**. (Figura 2).

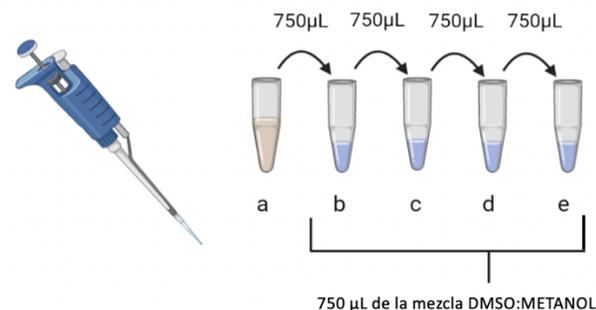


Figura 2. Preparación de los viales **b, c, d y e**.



QR video ensayo DPPH

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

PROCEDIMIENTO PARA EL ENSAYO DE DPPH

Ya preparadas las soluciones de DPPH, la mezcla DMSO:METANOL y las diferentes concentraciones de los compuestos, adicione en una placa de 96 pozos por triplicado, lo siguiente (observar figura 3):

1. A 3 pozos adicione 200 μL de la mezcla DMSO:METANOL con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a **A_D**.
2. Con el fin de descartar la interferencia de la sustancia que se va a evaluar. Adicionar 100 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 100 μL de la mezcla DMSO:METANOL. Con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a **A₂**.
3. Adicionar 100 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 100 μL de la solución de DPPH. Con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a **A₁**. Se debe considerar que en este paso la concentración de los compuestos se diluye a la mitad, por lo tanto, al graficar se emplearán las siguientes concentraciones, 30, 15, 7.5, 3.75 y 1.88 μM .
4. Finalmente, a otros 3 pozos adicione 100 μL de la solución de DPPH más 100 μL de la mezcla DMSO:METANOL con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a **A_{DPPH}**.
5. Incubar por 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

6. Determinar la absorbancia a 517 nm (3) con previa agitación de 5 segundos en un lector de placas.

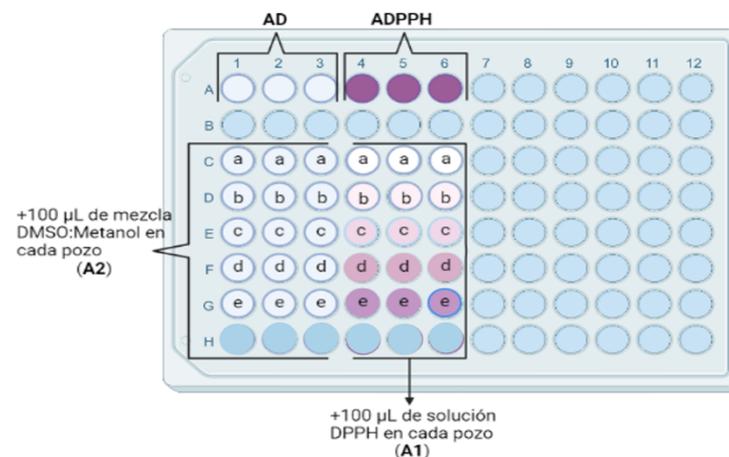


Figura 3. Ejemplo de placa de 96 pozos con un compuesto. Los pozos AD contienen 200 μL de mezcla DMSO:METANOL; Los pozos ADPPH contienen 100 μL de mezcla DMSO:METANOL más 100 μL de la solución de DPPH y los pozos marcados con cada letra corresponden a las diferentes concentraciones de compuesto preparadas de las cuales deberá añadirse 100 μL más 100 μL de la mezcla DMSO:METANOL o 100 μL de la solución de DPPH, según corresponda.



QR video ensayo DPPH

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

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para obtener el porcentaje de DPPH reducido se emplea la siguiente ecuación:

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

Donde:

A₁= Absorbancia del compuesto con DPPH

A₂=Absorbancia del compuesto con solvente

A_{DPPH}= Absorbancia del DPPH

A_D= Absorbancia del solvente.

Una vez obtenido el porcentaje de DPPH reducido se grafica vs la concentración del compuesto evaluado en este caso el 5-ASA.

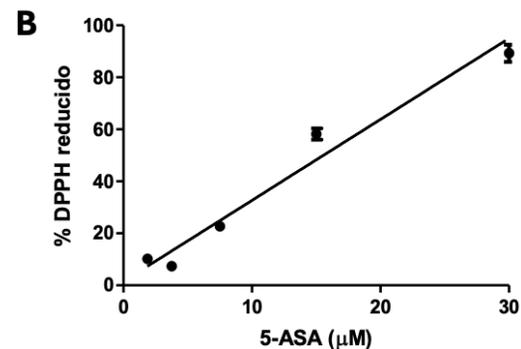
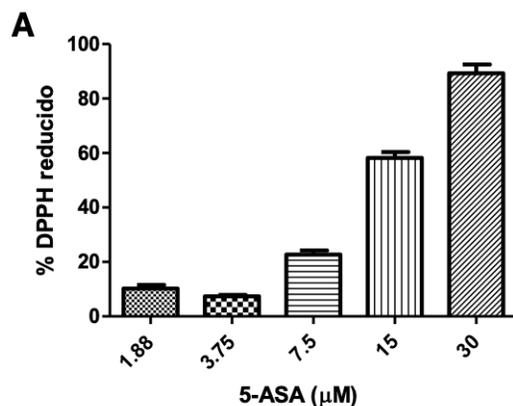


Figura 4. Porcentaje de DPPH reducido empleando 5 diferentes concentraciones de 5-ASA (A). Con la gráfica B es posible obtener la concentración de 5-ASA que reduce el 50 % de DPPH.

ANEXO

Preparación del **vial a** del 5-ASA.

El 5-ASA tiene un peso molecular de **153.135 g/mol**.

Se pesará **1 mg** de 5-ASA y se disolverá en **800 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:



QR video ensayo DPPH

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

$$M = \frac{m}{PM * V} \dots\dots (ec.1)$$

Donde:

M= molaridad (mol/L)

m=masa (g)

PM= peso molecular (g/mol)

V= volumen (L)

Sustituyendo los datos mencionados en la parte de arriba para el 5-ASA se tiene lo siguiente:

$$M = \frac{1 \times 10^{-3} \text{ g}}{153.135 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 800 \times 10^{-6}} = 0.008157 \text{ M} \approx 8.16 \text{ mM}$$

- Se determinará el volumen que se tiene que tomar de la solución stock para llegar a la concentración del **vial a** que es **60 μM o 60 x10⁻⁶M** en un volumen final de **1500 μL** DMSO:Metanol.

$$Vol \text{ stock} = \frac{Conc.del \text{ vial } a * Vol \text{ final del vial } a}{Conc.de \text{ la soln stock}} \dots\dots (ec. 2)$$

$$Vol \text{ stock} = \frac{60 \times 10^{-6} \text{ M} * 1500 \text{ uL}}{8.16 \times 10^{-3} \text{ M}} = 11.02 \mu\text{L} \approx 11 \mu\text{L}$$

- Así que el volumen del **vial a** se prepara con **11 μL** de solución stock de 5-ASA disuelto en **739 μL** de DMSO + **750 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. Por lo tanto, de los compuestos que se vayan a evaluar solo se requiere sustituir el P.M y posteriormente la concentración que se obtenga en la **ec 2**.

Además, los compuestos pueden evaluarse en diferentes concentraciones a las propuestas aquí, en caso de que a la misma concentración de 5-ASA no se observe efecto.



QR video ensayo DPPH

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

REFERENCIAS

- 1.- Rahman, M.M., Islam, M.B., Biswas, M. *et al.* In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. *BMC Res Notes* **8**, 621 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1618-6>
- 2.- Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011 Aug;48(4):412-22. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.
- 3.- Gulcin İ, Alwasel SH. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes.* 2023; 11(8):2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>

ESTABILIDAD Y ALMACENAJE DE LOS REACTIVOS

| Reactivo | Compuesto | Marca | Condiciones de almacenamiento | Ficha Técnica |
|----------|--------------------------------------|-------|--|---|
| A | 2,2- Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) | SIGMA | Mantener el frasco bien cerrado. Temperatura de almacenaje recomendada 2 - 8 °C | https://www.cansa.com/designdAGJQdT eaEM/KMEN t- QcjkM2Yava kEWgNQ/vic w?utm_content=DAGJQdT eaEM&utm_campaign=designshare&utm_medium=link&utm_source=editor |
| B | Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) | SIGMA | Temperatura de almacenaje recomendada 2 - 8 °C Sensible a la luz. | |
| | DMSO | SIGMA | Mantener bien cerrado. Almacenar en atmósfera inerte. higroscópico | |
| | METANOL | | Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente. Proteger de la luz del sol. | |



QR video ensayo DPPH

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