

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).

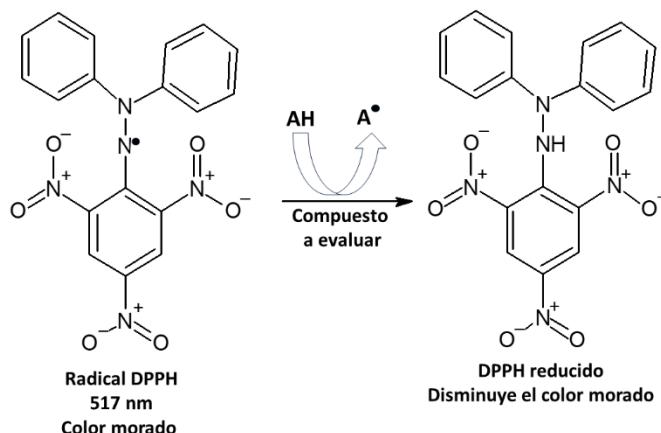


Figura 1. Reacción química entre el radical DPPH y el compuesto o extracto a evaluar en donde se reduce el DPPH.

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.

Reactivos	Compuesto	No. de viales o tubos
A	2,2- Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	1 frasco
B	Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)	2 frascos
DMSO METANOL		1 Frasco DMSO (20 mL) 1 Frasco metanol (35mL)

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, disolviendo el contenido del vial con 800 μ L de DMSO, (preparar cada vez que se use, debido a que se oxida). Además, preparar las soluciones stock de los



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, Alcaldia Tlalpan
C.P.14500

mail: pharmacologicalandbiotechnology@gmail.com

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. 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.

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	10	690	700

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**, 700 μL de la mezcla DMSO:METANOL. Posteriormente, transfiera 700 μL del **vial a** al **vial b** y mezcle. A partir del **vial b** transfiera 700 μL al **vial c** y mezcle. Posteriormente, transfiera 700 μL del **vial c** al **d** y mezcle. Transfiera 700 μL del **vial d** al **e**. (Figura 2).

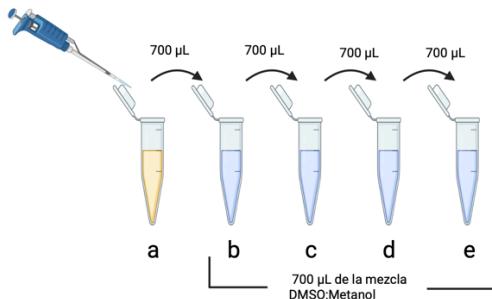


Figura 2. Preparación de los viales **b, c, d** y **e**.



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 μ L 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 μ L 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 μ L de la mezcla DMSO:METANOL. Con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a A_2 .
3. Adicionar 100 μ L 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 μ L de la solución de DPPH. Con ellos se obtendrá la absorbancia que corresponde a A_1 . 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 μ M.
4. Finalmente, a otros 3 pozos adicione 100 μ L de la solución de DPPH más 100 μ L 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.

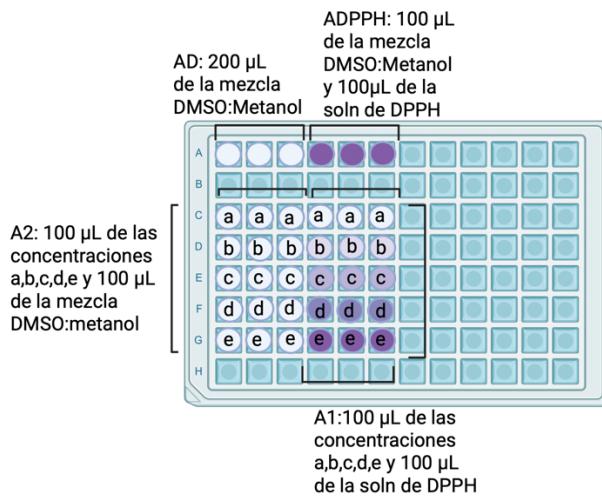


Figura 3. Ejemplo de placa de 96 pozos con un compuesto. Los pozos AD contienen 200 μ L de mezcla DMSO:METANOL; Los pozos ADPPH contienen 100 μ L de mezcla DMSO:METANOL más 100 μ L de la solución de DPPH. Cada una de las letras marcadas en cada pozo corresponden a las diferentes concentraciones de compuesto preparadas, de las cuales deberá añadirse 100 μ L más 100 μ L de la mezcla DMSO:METANOL o 100 μ L 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

ANALISIS DE RESULTADOS

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

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

Donde:

A_1 = Absorbancia del compuesto con DPPH

A_2 =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.

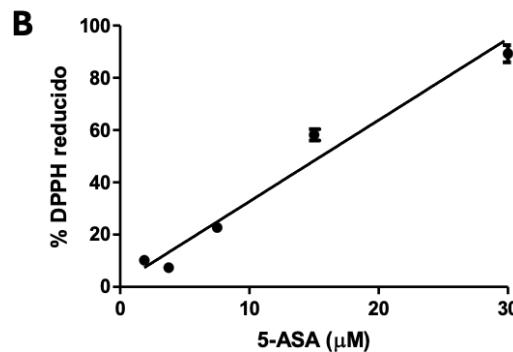
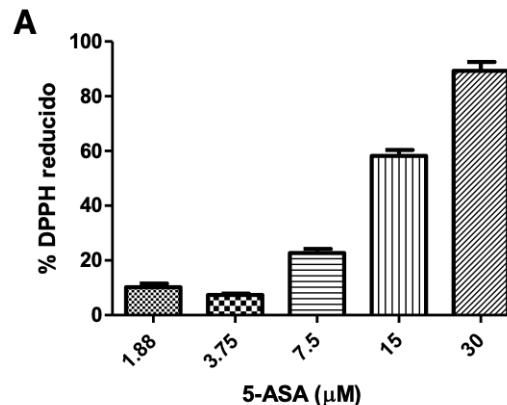


Figura 4. Porcentaje de DPPH reducido empleando 5 diferentes concentraciones de 5-ASA (A). Con la gráfica B es posible obtener la concentración de 5-ASA que reduce el 50 % de DPPH.



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, Alcaldia Tlalpan
C.P.14500

mail: pharmacologicalandbiotechnology@gmail.com

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:

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

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:



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

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

2. 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 x 10⁻⁶M** en un volumen final de **1500 µL** DMSO:Metanol.

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

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

3. 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.

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

Reactivos	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.canaiva.com/design/DAGJQdT eaEM/KMEN
B	Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)	SIGMA	Temperatura de almacenaje recomendada 2 - 8 °C Sensible a la luz.	https://www.canaiva.com/design/DAGJQdT eaEM&utm_campaign=designshare&utm_medium=link&utm_source=editor
	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.	

Última actualización: 8 de octubre del 2025.

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