

Prueba del poder antioxidante reductor del ion férrico (FRAP)

El ensayo poder antioxidante reductor del ion férrico (FRAP) se basa en la reducción del complejo incoloro Fe^{3+} -TPTZ al complejo Fe^{2+} -TPTZ de color azul, en medio ácido (figura 1) (1). Por lo tanto, las moléculas evaluadas serán capaces de reducir al ion férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+})(2).

El incremento en la absorbancia a 593 nm se debe a un mayor poder reductor de la molécula evaluada (3).

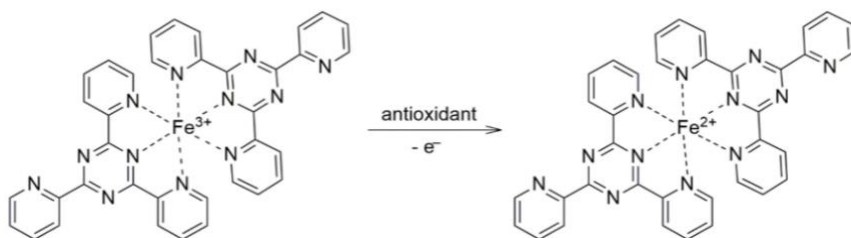


Figura 1. Reducción del complejo Fe^{3+} -TPTZ (Incoloro) a Fe^{2+} -TPTZ (azul)

REACTIVOS PARA EL ENSAYO DE FRAP

El kit contiene los reactivos que se muestran en la Tabla 1, los cuales son suficientes para evaluar 10 compuestos y el estándar de sulfato ferroso, así como el 5-asa, en placas de 96 pozos (3 placas).

Tabla 1. Reactivos para el ensayo de FRAP.

Reactivos	Compuesto	Cant. de tubos o viales
Buffer de acetatos	Acetato de sodio Ác. Acético	2 Frascos con 50 mL
A	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ)	2 Frascos
		1 Frasco con HCl+H ₂ O
B	Cloruro férrico	2 Frascos
C	Sulfato Ferroso	2 Frascos
D	Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)	2 Frascos
DMSO		1 Frasco con 15 mL (DMSO)
Metanol		1 Frasco con 10 mL (metanol)



QR video prueba FRAP

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

1. Preparar el reactivo **A**, en 2 mL de HCl:H₂O, proteger de la luz, el reactivo es estable por tres días.
2. Preparar el reactivo **B**, mezclando en 2 mL de agua destilada, proteger de la luz.
3. Preparar el reactivo **C**, disolviendolo en 1mL de agua destilada.
4. Preparar el reactivo **D**, disolviendolo en 2 mL de DMSO. Preparar cada vez que se use, debido a que se oxida.
5. Preparar la solución FRAP en una proporción 10:1:1 mezclando 10 mL de buffer de acetatos, 1000 µL del reactivo **A** con 1000 µL del reactivo **B**, suficiente para una placa de 96 pozos como se muestra en la Figura 3, en donde se podrán evaluar 4 compuestos, sin considerar la curva estandar de FeSO₄ que no lleva solución FRAP.
6. Preparar las diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos a evaluar.
 - a) Rotular 5 viales con **a, b, c, d, y e** los cuales corresponden a las concentraciones de 5, 2.5, 1.25, 0.63 y 0.31 mM para la curva estándar de FeSO₄. Para preparar el **vial a** agregar las siguientes cantidades:

Tabla 2. Preparación del vial **a** de FeSO₄.

Compuesto	µL de la solución stock FeSO ₄	µL de agua destilada
Reactivo C (FeSO ₄).	80	120

- b) Rotular otros 5 viales con **a, b, c, d y e** los cuales corresponden a las concentraciones de 250, 122.5, 61.2, 30.6, 15.3 µM para la solución problema 5-ASA. Para preparar la concentración de 245 µM de 5-ASA o de los compuestos a evaluar (revisar anexo) mezcle en el **vial a**.

Tabla 3. Preparación de la solución **a** de 5-ASA

Compuesto	µL del reactivo D 5-ASA	µL de DMSO	µL de metanol
Reactivo D (5 ASA)	15	85	100

7.- Una vez preparado el **vial a** de cada serie (5-ASA, FeSO₄ y compuestos a evaluar), preparar las diluciones correspondientes a cada uno de los compuestos de la siguiente manera: adicionar a partir del **vial b** al **e**, 100 µL de la mezcla DMSO: METANOL (1:1) (o agua destilada en caso del FeSO₄). Posteriormente, transfiera 100 µL del **vial a** al **vial b** y mezcle. A partir del **vial b** transfiera 100 µL al **vial c** y mezcle. Posteriormente, transfiera 100 µL del **vial c** al **d** y mezcle. Finalmente, transfiera 100 µL del **vial d** al **e** (Figura 2).



QR video prueba FRAP

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

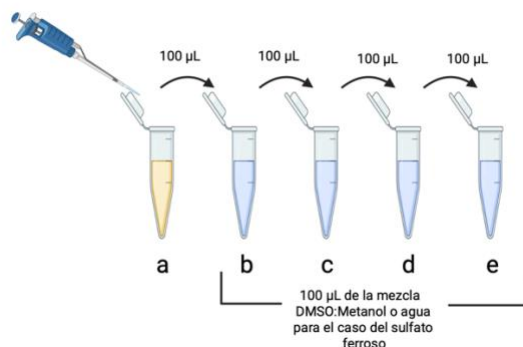


Figura 2. Preparación de los viales b, c, d y e.

PROCEDIMIENTO PARA EL ENSAYO DE FRAP

Se recomienda realizar el ensayo por triplicado.

1. En una placa de 96 pozos, colocar 150 µL de buffer de acetatos, 15 µL del reactivo **A** más 10 µL de diferentes concentraciones de FeSO_4 en 3 pozos (a, b, c, d y e), siendo un total de 15 pozos. Con el **vial a** se obtendrá la absorbancia que corresponde **A_b**, los demás viales corresponderán a **A_e**. Considerar, que la concentración de FeSO_4 se diluye 17 veces, por lo tanto, la concentración en los pozos sería 310, 155, 77.6, 38.8 y 19.4 µM.
2. Posteriormente colocar 150 µL de FRAP más 25 µL de diferentes concentraciones de 5-ASA (a, b, c, d y e) o cualquier compuesto a evaluar en 3 pozos, siendo un total de 15 pozos. Con ellos se obtendrá la absorbancia que

corresponden a **A_e** de cada concentración. Considerar que la concentración de 5-ASA se diluye 7 veces, por lo tanto, la concentración en los pozos será 35, 18, 9, 4.5 y 2.2 µM Ver figura 3.

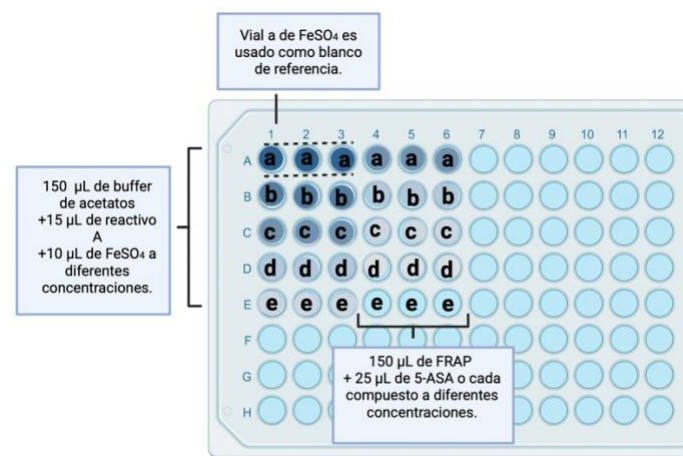


Figura 3. Ejemplo de placa de 96 pozos con un compuesto, 5-ASA. En una placa será posible evaluar 4 compuestos.

3. Incubar por 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz.
4. Finalmente determinar la absorbancia a **593 nm** con agitación de 5-10 segundos en un lector de placas.

ANALISIS DE RESULTADOS

Para obtener la curva estándar de FeSO_4 se utiliza la siguiente ecuación:



QR video prueba FRAP

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

$$\% \text{ Poder de reducción } FeSO_4 = \frac{A_e}{A_b} * 100$$

Donde:

A_e = Es la absorbancia de cada vial de la curva estándar

A_b = Absorbancia del blanco de referencia (Vial "a").

La gráfica obtenida después del tratamiento de los datos obtenidos es la siguiente:

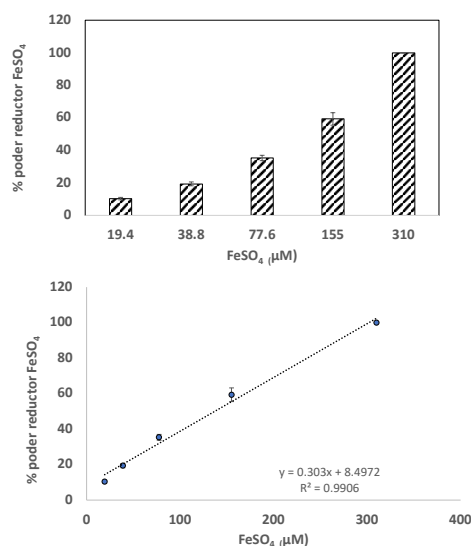


Figura 4. Porcentaje del poder reductor del FeSO₄ (R²=0.9906)

Para obtener el porcentaje de poder de reducción de cada compuesto se emplea la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Poder de reducción } 5ASA = \frac{A_c}{A_b} * 100$$

Donde:

A_c = Absorbancia del compuesto

A_b = Absorbancia del blanco de referencia (Vial "a" de la curva de FeSO₄).

La gráfica obtenida después del tratamiento de los datos obtenidos es la siguiente:

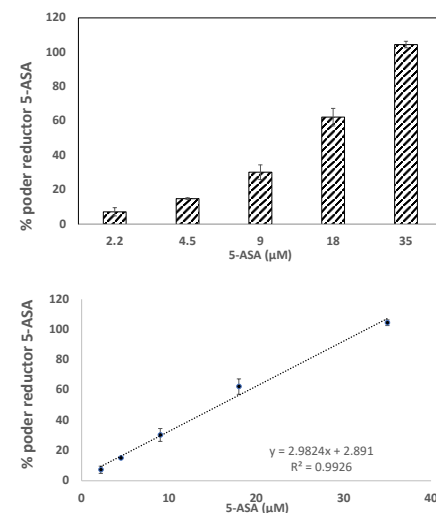


Figura 5. Porcentaje del poder reductor del 5-ASA. Con la gráfica lineal es posible obtener la concentración de 5-ASA que reduce el 50 % de del ion ferrico del complejo TPTZ-Fe³⁺. (R²=0.9964).



QR video prueba FRAP

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

Cálculos.

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

Ejemplo: El compuesto referencia 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** que es 0.245 mM o 250 µM en un volumen final de 200 µL DMSO: Metanol.

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

$$Volumen \text{ de stock} = \frac{0.250 \times 10^{-3} M * 200 \mu L}{3.26 \times 10^{-3} M} = 15.03 \mu L \approx 15 \mu L$$



QR video prueba FRAP

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

4.- Así que el volumen del **vial a** se prepara con **15 µL** de solución 5-ASA disuelto en **85 µL** de DMSO + **100 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.

REFERENCIAS

1.- Iris F.F. Benzie, Malegaddi Devaki, Book Editor(s):Resat Apak, Esra Capanoglu, Fereidoon Shahidi. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. (2017) <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch5>

2.- Vázquez Ovando A, Mejía Reyes J.D., García Cabrera K.E., Velázquez-Ovalle G. Antioxidant capacity: concepts, quantification methods and use for tropical fruits and derived products characterization Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales. (2022) <https://doi.org/10.23850/24220582.4023>

3.- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. (1996) 15;239(1):70-6. doi: 10.1006/abio.1996.0292.

ESTABILIDAD Y ALMACENAJE DE LOS REACTIVOS

Reactivo	Compuesto	Marca	Condiciones de almacenamiento	Ficha tecnica
	Buffer de acetatos		Estabilidad en almacén Temperatura de almacenaje recomendada 2 - 8 °C	https://www.canva.com/design/DAGJSJM2gHk/UXTySOPo6LzjdgLIg_QtVA/vi?utm_content=DAGJSJM2gHk&utm_campaign=designshare&utm_medium=link&utm_source=editor
A	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	SIGMA	Mantener bien cerrado y en un ambiente seco.	
B	FeCl ₃	SIGMA	Mantener bien cerrado, no usar recipientes metálicos.	
C	FeSO ₄	SIGMA	Mantener bien cerrado. Seco. Sensible al aire y a la humedad.	
D	Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)		Temperatura de almacenaje recomendada 2 - 8 °C Sensible a la luz.	
	Metanol		Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco.	
	DMSO	SIGMA	Almacenar en atmósfera inerte. higroscópico	

Actualizado 8 de Octubre 2025



QR video prueba FRAP

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