

BIB 5706 – Prospecção de fármacos de origem vegetal

Análise de amostras de própolis

A. Determinação do conteúdo de Fenóis totais (carbonato)

1. Preparo das soluções:

Reagente carbonato de sódio 10%: Diluir 1g de carbonato de sódio em 10 mL água ultrapura.

2. Preparo da curva padrão:

- Diluir 1 mg de ácido gálico em 1 mL de MeOH 80% (**1 mg/mL**).
- Tomar alíquotas conforme a tabela abaixo:

	Solução mãe (μL)	MeOH 80% (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade no poço (μg)
1	1	199	5	0,25
2	2	198	10	0,50
3	4	196	20	1,00
4	6	194	30	1,50
5	8	192	40	2,00
6	10	190	50	2,50
7	12	188	60	3,00
8	14	186	70	3,50
9	16	184	80	4,00

3. Preparo da microplaca para leitor ELISA:

- Todas as amostras e controles deverão ser feitos em triplicata.

<p><i>Controle negativo (metanol)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> 190 μL de água ultrapura 10 μL do reagente Folin Ciocalteu 50 μL de MeOH 80% 50 μL de carbonato de sódio 10% (homogeneizar bem) 	<p><i>Controle positivo (padrão)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> 190 μL de água ultrapura 10 μL do reagente Folin Ciocalteu 50 μL do padrão (ácido gálico) 50 μL de carbonato de sódio 10% (homogeneizar bem)
<p><i>Amostras</i></p> <ul style="list-style-type: none"> 190 μL de água ultrapura 10 μL do reagente Folin Ciocalteu 50 μL da amostra 50 μL de carbonato de sódio 10% (homogeneizar bem) 	

- Incubar durante 1 h (temperatura ambiente) e fazer a leitura da placa em 760 nm.

Referência: Furlan CM, Santos KP, Sedano-Partida MD, Motta LB, Santos DYAC, Salatino MLF, Negri G, Berry PE, van E BW, Salatino A. 2015. *Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of Croton (Euphorbiaceae)*. *Brazilian Journal of Botany* 38(4): 693-702.

A. Atividade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

1. Preparo da solução de DPPH 0,20 mM

1. Dissolver 1,97 mg de DPPH em MeOH para o volume final de 25 mL - **Sol. DPPH** (MM = 394,3) – VOLUME PARA PREPARAR UMA PLACA DE 96 POÇOS.
2. Armazenar em frasco âmbar ou coberto com papel alumínio.
3. Preparar na hora do uso.

2. Preparo das amostras:

1. Pesar 2 mg de cada extrato liofilizado e solubiliza-lo em 1 mL de Metanol (**concentração 1 mg/mL**).
2. Para cada extrato, preparar diluições da solução de 2 mg/mL para atingir as concentrações desejadas: 1 e 0,5 mg/mL.

3. Preparo das curvas padrões:

Padrão Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico MM = 250,29): 1,25 mg de trolox para 2,5 mL de MeOH. Solução 0,5 mg/mL.

Padrão Quercetina (MM = 302,24): 1,2 mg de quercetina para 2 mL de MeOH. Solução 0,6 mg/mL.

Tomar alíquotas conforme a tabela abaixo:

Solução mãe (µL)	MeOH (µL)	Concentração (µg/mL)	Quantidade no poço (µg)
2,5	97,5	12,5	0,25
5	95	25	0,50
10	90	50	1,00
15	85	75	1,50
20	80	100	2,00
25	75	125	2,50
30	70	150	3,00
40	60	200	4,00

4. Preparo da microplaca para leitor ELISA:

1. Todas as amostras e controles deverão ser feitos em triplicata.

<p><i>Controle negativo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 200 µL da solução de DPPH. • Adicionar 20 µL de metanol
<p><i>Controle positivo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 200 µL da solução de DPPH. • Adicionar 20 µL da solução do padrão.
<p><i>Amostras</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 200 µL da solução de DPPH. • Adicionar 20 µL das amostras nas diferentes concentrações.

2. Aguardar 20 minutos e fazer a leitura da placa em 515 nm.

Referência: Santos KP, Sedano-Partida MD, Motta LB, Cordeiro I, Furlan CM. 2016. Antioxidant activity of flavonoids of *Croton sphaerogynus* Baill. Brazilian Journal of Botany 39(4): 1021-1030.