

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE GRIBNER

**Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas de óleo
essencial, extratos, frações e compostos provenientes da espécie *Ocotea
paranaensis* (Lauraceae)**

Orientadora: Dr^a. Sandra Maria Warumby Zanin
Coorientadora: Dr^a. Josiane de Fátima Gaspari Dias
Coorientadora: Dr^a Deise Prehs Montrucchio

CURITIBA
2017

1. IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

1.1 SOLICITANTE

Aluna: Caroline Gribner
Telefone: (41) 98486-3607

lattes: <http://lattes.cnpq.br/0795487833228053>

1.2 ORIENTADOR

Orientadora: Professora Dr^a Sandra Maria Warumby Zanin

Temática de projeto proposto: “Estudo fitoquímico e avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais, extratos, frações e compostos provenientes de espécies vegetais com aplicabilidade na área farmacêutica, alimentícia, inseticida e veterinária”.

Departamento de Farmácia UFPR

Laboratório de Farmacotécnica

Avenida Prefeito Lothario Meissner, 632. Curitiba, PR.

Telefone: (41) 3360-4070

E-mail: sandrazanin@ufpr.br

1.3 TÍTULO DO PROJETO PROPOSTO

“Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas de óleo essencial, extratos, frações e compostos provenientes da espécie *Ocotea paranaensis* (Lauraceae)”

2. RESUMO

Com o crescente aumento no interesse em descobrir novos compostos obtidos de plantas medicinais, torna-se relevante a realização de estudos que explorem componentes fitoquímicos e atividades biológicas ainda pouco conhecidas. A espécie *Ocotea paranaensis* pertence à família Lauraceae, sendo citado recentemente a sua descoberta na Floresta Atlântica do Estado do Paraná. A ausência de estudos sobre esta espécie justifica o desenvolvimento desta pesquisa, que possui como objetivo verificar a composição química, realizar o estudo fitoquímico e avaliar as atividades biológicas de óleo essencial, extratos, frações e compostos provenientes da espécie *Ocotea paranaensis* (Lauraceae). Pretende-se a partir do extrato etanólico bruto e das suas frações preparadas com solventes de diferentes polaridades, averiguar possíveis metabólitos que possam estar presentes na espécie estudada. Além disso, os extratos brutos, frações e o óleo essencial serão avaliados em testes de triagem toxicológica *in vitro* frente à *Artemia salina*, atividade antimicrobiana e atividade hemolítica. Espera-se obter resultados que demonstrem e confirmem a capacidade promissora da espécie estudada, bem como realizar a identificação e isolamento de compostos que possam posteriormente ser testados *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Lauraceae. *Ocotea*. Morfologia vegetal. Toxicidade

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é composta por árvores e arbustos, sendo predominantemente tropical. São reconhecidos cerca de 50 gêneros, estimando-se 2.500 - 3.000 espécies. Apesar de sua importância, a família permanece pouco conhecida em relação a sua classificação, número e distribuição das espécies, o que pode estar relacionado com a dificuldade de sua identificação (VAN DER WERFF, RICHTER, 1996).

Do ponto de vista econômico a família Lauraceae apresenta grande importância. Alguns gêneros como a *Ocotea*, *Cinnamomum*, *Aniba* e *Nectandra* apresentam maior interesse por exibir diversas aplicabilidades, sendo utilizadas na fabricação de produtos culinários, papel, marcenaria e construção, além de possuírem finalidade medicinal contra diversas doenças (MARQUES, 2001). Quimicamente despertam interesse por tratar-se de uma família rica em

metabólitos, como neolignanas e lignanas, alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, flavonoides, sesquiterpenos, e pironas (GARCEZ et al., 2011).

No Brasil, ocorrem 22 gêneros desta família, dos quais um dos mais expressivos é caracterizado pelo gênero *Ocotea*, que possui cerca de 120 a 160 espécies descritas no Brasil (BAITELLO, 2001; MORAES, 2005).

3.2 GÊNERO *Ocotea*

O gênero *Ocotea* é composto por espécies que apresentam diferentes finalidades medicinais, a saber, anti-reumática, tônica, estomáquica, depurativa, rash cutâneo, entre outras (MARQUES, 2001).

Este gênero mostra-se muito promissor pela presença de metabólitos que justificam as suas propriedades medicinais, como alcaloides aporfínicos e benziltetraidroisoquinolínicos, lignanas e neolignanas, benzopiranos, monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, (ZANIN; LORDELLO, 2007; CAMARGO et al., 2013).

Devido a bioatividade destes compostos este gênero tem sido alvo de diversas patentes. Como a dicentrina, extraída da *Ocotea puberula*, responsável pela inibição da topoisomerase II e efeito antinociceptivo (WOO, SUN, 1999; JIA et al., 2000, MONTRUCCHIO, 2012; UFPR, UFSC, UFSM, 2014).

3.3 *Ocotea paranaensis* Brotto, Baitello, Cervi & E.P.Santos

O epíteto específico desta espécie traz a lembrança o Estado do Paraná, local onde foi citada pela primeira vez na Mata Atlântica, em 2010 por Brotto e colaboradores (2010).

A espécie *Ocotea paranaensis* apresenta-se como árvore dióica, com até 14 metros de altura. Possui folhas alternas; com pecíolo em torno de 4–10 mm de comprimento, subcanaliculado, tomentoso; lâmina de 4–8 × 1–2 cm, lanceolada a estreitamente elíptica, glabra, discolor, ápice acuminado, base cuneada, face adaxial com reticulação densa, inconspícua, de cor mais clara

que o limbo, nervuras impressas, face abaxial com reticulação densa, conspícua, de cor semelhante ao limbo, nervuras salientes, as secundárias 4–6 pares, ângulo de divergência da nervura principal 20°C – 60°C, padrão de nervação broquidódromo, domácias ausentes (BROTTO et al., 2010).

Ocorre em Floresta Atlântica, no leste do Estado do Paraná, em áreas montanhosas da Serra do Mar, entre 850 a 975 m de altitude. Floresce de março a junho e frutifica de julho a janeiro. Pode ser encontrada em áreas de Floresta Ombrófila Densa (domínio da Mata Atlântica), no leste do Estado (BROTTO et al., 2010).

Na literatura científica, ainda não são relatados estudos sobre o perfil químico ou biológico de *Ocotea paranaensis*. Porém com base em outros estudos do mesmo gênero, sabe-se da presença de metabólitos secundários com capacidade medicinal, o que faz despertar o interesse pela espécie.

4. QUALIFICAÇÃO OU JUSTIFICATIVA DO PROBLEMA A SER ABORDADO

No Estado do Paraná estudos revelam a grande riqueza específica do gênero *Ocotea*, sendo confirmadas 31 espécies (BROTTO et al., 2013).

Os metabólitos produzidos por este gênero apresentam grande potencial bioativo, e por este motivo tornam-se foco de estudos que buscam elucidar propriedades do gênero *Ocotea* (ZANIN; LORDELLO, 2007).

Alguns trabalhos destacam a presença de diferentes alcaloides aporfínicos (ZANIN; LORDELLO, 2007; BARRERA, 2009), como a dicentrina que por sua vez apresenta atividade antinociceptiva (MONTRUCCHIO, 2012). Outros compostos extraídos deste gênero se destacam pela ação antimalárica (BOTSARIS, 2007), depressora do sistema nervoso central (COUTINHO, 2006), atividade leishmanicida (FOURNET et al., 2007), atividade antitrombótica (BALABENNI, 2009) entre outros.

Deste modo, devido ao interesse em investigar novas substâncias naturais provindas de espécies poucos exploradas do gênero *Ocotea*, permite-se o aprofundamento de pesquisas que possibilitem a exploração de metabólitos secundários, que possam proporcionar benefícios ao ser humano de maneira sustentável.

5. OBJETIVOS E METAS A SEREM ALCANÇADOS

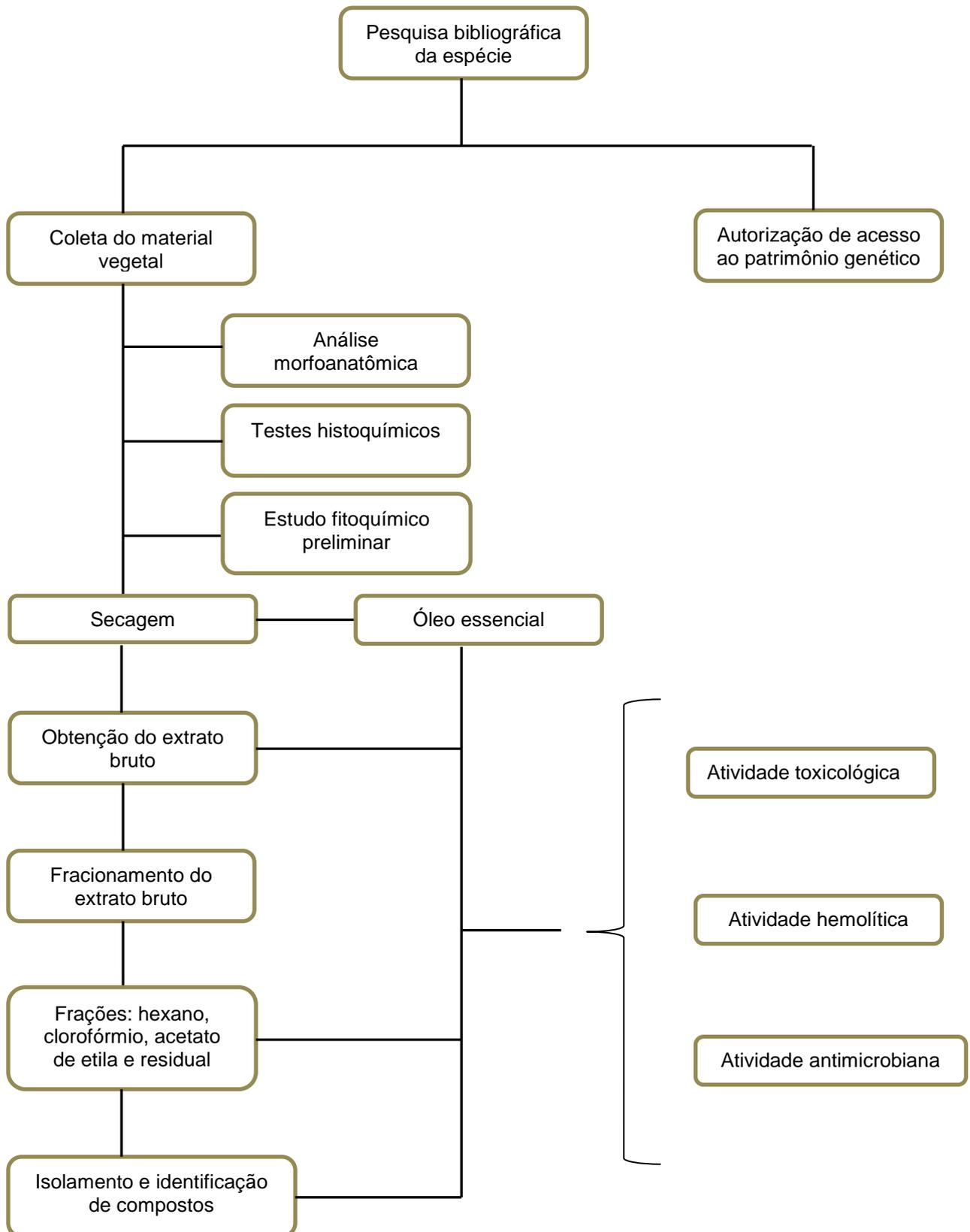
5.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas de óleo essencial, extratos, frações e compostos provenientes da espécie *Ocotea paranaensis* (Lauraceae).

5.2 Objetivos específicos

- Realizar coleta do material vegetal.
- Realizar a análise morfoanatômica do caule, folha e pecíolo.
- Realizar testes histoquímicos do caule e da folha.
- Realizar estudo fitoquímico preliminar.
- Realizar extração de óleo essencial.
- Obter o extrato etanólico bruto a partir do caule e das folhas secas.
- Realizar o fracionamento dos extratos com hexano, clorofórmio e acetato de etila.
- Realizar o isolamento e a identificação de compostos.
- Realizar perfil químico das amostras (extrato bruto, frações e óleo essencial) por CLAE/DAD.
- Avaliar toxicidade preliminar por meio de testes *in vitro* em *Artemia salina* e atividade hemolítica do extrato bruto, frações e óleo essencial.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e óleo essencial.

FIGURA 1 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



FONTE: A autora (2017).

6. METODOLOGIA EMPREGADA

6.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

A *Ocotea paranaensis* será coletada de acordo com a localização avaliada previamente pela equipe do estudo. As exsicatas obtidas serão registradas no museu Botânico de Curitiba.

Em seguida as folhas serão secas em temperatura ambiente, e posteriormente, o material seco será pesado e triturado em moinho de facas e martelo. O material obtido será reservado para ser utilizado nas etapas seguintes. Será solicitada autorização de acesso ao patrimônio genético expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

6.2 ESTUDOS MORFOANATOMICOS

6.2.1 Preparo do material vegetal

Para a análise morfoanatômica e realização dos testes histoquímicos serão utilizadas folhas adultas e os fragmentos de caule entre 5–25 cm do ápice e fixados em FAA (composto de formol, ácido acético glacial e álcool etílico a 70% (v/v), na proporção 0,5:0,5:9 (v/v); também será utilizado folhas adultas e fragmentos de caule frescos para os testes histoquímicos. O tempo de fixação será de 18 horas, sendo previamente realizado com a finalidade de bloquear de maneira instantânea o metabolismo das células, a fim de preservá-las (JOHANSEN, 1940). Após a fixação do material em FAA, o caule e as folhas deverão ser posteriormente armazenados em álcool etílico a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

6.2.2 Preparo das lâminas

6.2.2.1 Lâminas semipermanentes

Serão preparadas com o material seccionado à mão livre, nos sentidos transversal e longitudinal. Em seguida, os cortes obtidos serão submetidos à coloração com azul de astra e fucsina básica, respectivamente, para corar estruturas acidófilas e basófilas (ROESER, 1972).

A montagem das lâminas será realizada utilizando glicerina a 50%, a fim de preservar o material e fixar a lâmina com a lamínula, sendo realizado posteriormente a lutagem em esmalte incolor (BEÇAK; PAULETTE, 1976). Por fim, os cortes serão analisados e fotografados em aumento de 4x, 10x, 20x e 40x em microscópio fotônico (BX40, Olympus®).

6.2.2.2 Lâminas permanentes

As lâminas permanentes serão confeccionadas utilizando o material vegetal previamente fixado em FAA e armazenado em álcool etílico a 70%.

Inicialmente o material será desidratado em uma série etanólica, sendo que os cortes irão passar pelo álcool 80% (v/v), álcool a 95% (v/v) e em seguida, na préinfiltração com álcool 95% (v/v), sendo finalizado com a parafina.

O material deverá ficar infiltrado por quatro dias, em glicolmetacrilato (Historesin, Leica®), posteriormente o bloco obtido será submetido a cortes em micrótomo de rotação (CUT 4055, Olympus®) obtendo-se secções de 7 a 9 mm.

Para a coloração dos cortes será utilizado solução de azul de Toluidina a 5% e montados em resina sintética diluída em tolueno da marca Permout® (BEÇAK; PAULETE, 1976; KRAUS; ARDUIN, 1997). Os registros fotográficos serão realizados utilizando microscópio fotônico nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x (BX40, Olympus®).

6.2.2.3 Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos serão realizados nos caules e folhas fixados previamente em FAA e em material fresco. Serão selecionados os melhores cortes realizados por meio da secção transversal, à mão livre, para posterior pesquisa microquímica.

Serão utilizados os seguintes reagentes para identificação de grupos metabólicos: solução de floroglucina clorídrica para verificação de lignina (FOSTER, 1949), Sudan III para compostos lipofílicos (SASS, 1951), cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), lugol para amido

(BERLYN, MIKSCHE, 1976) e ácido sulfúrico para verificação dos cristais de oxalato de cálcio (OLIVEIRA, AKISUE, 1991).

6.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para a realização da análise ultraestrutural de superfície (microscopia eletrônica de varredura-MEV) será realizada metodologia segundo Souza (2007).

Inicialmente as amostras fixadas em FAA passarão por um processo de desidratação etanólica crescente (80%, 90% e 100%), sendo transferidas a cada 15 minutos. Após o processo de desidratação, para remoção completa de álcool etílico as amostras serão inseridas em uma câmara preenchida com álcool absoluto e colocadas no aparelho de ponto crítico de CO₂ (CPD-030, Balt-Tec[®]). Por fim, o material obtido será aderido com uma fita de cobre a um suporte do MEV e metalizado com ouro no aparelho SCD-030, Balzers[®], para observação e análise em microscópio eletrônico de varredura (JSM 6360LV, JEOL[®]).

6.3 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

6.3.1 Determinação do teor de umidade

O procedimento será realizado de acordo com a técnica preconizada pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010).

Em triplicata, a amostra será submetida ao método gravimétrico (dessecação). Utilizando material seco, triturado, será pesado cerca de 1 g de amostra em cadinho de porcelana previamente dessecado durante 30 minutos. Em seguida, a amostra acondicionada deverá ser colocada em estufa de circulação forçada de ar a (100-105)°C, durante cinco horas, até obter peso constante. Posteriormente, os cadinhos devem ser armazenados em dessecador para resfriamento completo, para em seguida ser realizada a pesagem deste conjunto. A perda de umidade será determinada pela diferença (em massa) da umidade do material estabilizado em relação ao material seco em estufa.

6.3.2 Determinação do teor de cinzas totais

Será pesado 3 g da amostra pulverizada, que em seguida será transferida para cadinhos previamente arrefecidos e pesados. A amostra deverá ser uniformemente distribuída no cadinho, para passar pelo processo de incineração, com aumento de temperatura até $(600 \pm 25)^{\circ}\text{C}$, e que todo o carvão seja eliminado. Após esta etapa o cadinho deverá resfriar em dessecador para posterior pesagem (BRASIL, 2010).

6.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

6.4.1 Obtenção dos extratos brutos

Para obtenção do extrato etanólico bruto será utilizado 600g de material vegetal das folhas e 600g de material vegetal do caule, previamente secos e triturados.

O processo de extração será realizado em aparelho de Soxhlet até esgotamento total utilizando etanol como líquido extrator. Os extratos obtidos serão filtrados e concentrados em rotaevaporador à temperatura de 50°C e 90 rpm até a redução a aproximadamente $1/5$ de seu volume inicial, gerando o extrato etanólico bruto. A partir da filtração os extratos obtidos serão armazenados em frascos âmbar, a temperatura ambiente, até o momento do fracionamento.

6.4.2 Determinação do teor de sólidos totais do extrato etanólico bruto

Será utilizado 10 mL do extrato etanólico bruto concentrado, que deverá ser acondicionado em uma placa de petri previamente dessecada em estufa e pesada, o ensaio será realizado em triplicata.

As amostras serão levadas a estufa a 60°C até peso constante, e secada total. Posteriormente será verificada a massa dos extratos secos remanescentes nas placas de petri para obtenção do teor de sólidos totais (g/mL) (BRASIL, 2010).

6.4.3 Obtenção das frações dos extratos brutos

A fim de auxiliar na identificação de grupos metabólicos, será realizado o fracionamento do extrato etanólico bruto com solventes extratores de polaridade crescente.

Parte do extrato etanólico bruto será submetido a partição líquido-líquido em aparelho de Soxhlet modificado, com solventes em polaridade crescente, obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e fração residual hidroalcoólica.

O Soxhlet modificado apresenta um alargamento do sifão lateral a partir da curva superior, o que impede o refluxo do solvente, permitindo a extração por gotejamento (MIGUEL et al., 2007).

6.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A realização da cromatografia em camada delgada (CCD) será realizada em triplicata com a finalidade de verificar a presença de alguns constituintes químicos como esteroides e terpenos (WAGNER, 1996), cumarinas (MIGUEL, 2003), flavonoides e taninos (WAGNER, 1996), alcaloides (VALENTE et al., 2006).

Para a realização do ensaio serão utilizadas cromatoplasmas de sílica gel, onde as amostras (5 a 10 µL) serão aplicadas com o auxílio de microseringas. Posteriormente as placas serão visualizadas sob luz ultravioleta antes e após a revelação com seus respectivos reveladores.

6.6 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

6.6.1 Extração do óleo essencial

A extração e obtenção do óleo essencial (OE) das folhas de *Ocotea paranaensis* serão determinadas pelo processo de destilação por arraste de vapor d'água, utilizando como aparelho o Clevenger modificado (BRASIL, 2010).

Para iniciar o processo de extração, as folhas secas a temperatura ambiente (600g) serão trituradas e acondicionadas em balão de fundo redondo, em seguida será adicionado água destilada em quantidade suficiente para

cobrir todo o material. Este conjunto será conectado ao equipamento e submetido a uma temperatura em torno de 100°C, por um período de 6 horas.

Terminada a operação, é realizada a leitura do volume do óleo essencial recolhido em tubo graduado para calcular o rendimento do óleo obtido. De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) o rendimento é calculado em mililitros de óleo essencial por 100 g do material vegetal (mL%).

6.6.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

Após o processo de extração do óleo essencial uma alíquota será armazenada em frasco apropriado, devidamente refrigerado e reservado para posterior análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG/EM). A ser realizado no Departamento de Química (UFPR).

Pretende-se realizar a análise cromatográfica em aparelho Shimadzu® modelo GCMS-QP 2010 Plus, com coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), equipado com injetor em modo *splitless* a 250°C, interface e fonte de íons a 300 °C. Será analisada a janela de massas em um intervalo entre m/z 40 e m/z 350, tendo o Hélio como gás de arraste.

6.7 PERFIL DAS AMOSTRAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DIODO (CLAE/DAD)

Os extratos brutos e as frações obtidas das folhas e do caule de *Ocotea paranaensis* serão diluídos em metanol (MeOH) a uma concentração de 20 mg/mL e submetidos posteriormente à análise por CLAE (Merck Hitachi – Elite Lachrom®) com detector diodo (DAD) em 300 nm, coluna (XTerra®) preparativa de fase reversa RP18 (5 µm, 4,6x250 mm), com volume de injeção de 20 µL, fluxo 1,00 mL/min.

Como fase móvel será utilizado o gradiente de concentração H₂O:H₃PO₄ a 0,1% (A) e MeOH (B) na seguinte programação: 1-45 min, iniciando com 10% de fase B e finalizando em 45 min com 100% de fase B. O metanol a ser utilizado será grau HPLC (TEDIA) e a água MilliQ.

6.8 ESTUDOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.8.1 Ensaio de toxicidade *in vitro*

São técnicas realizadas para verificar previamente a capacidade de toxicidade do material vegetal.

Os métodos para avaliar a toxicidade dos extratos brutos e frações do caule e da folha e também do óleo essencial são: toxicidade aguda sobre o microcrustáceo *Artemia salina* e atividade hemolítica *in vitro*.

6.8.1.1 Atividade tóxica em *Artemia salina*

Inicialmente será realizada a preparação da água do mar artificial, dissolvendo-se 30 g de sal marinho para 1.000 mL de água purificada. O pH deve ser ajustado para 9,0 com Na₂CO₃, o que evita o risco de morte dos náuplios sensíveis ao baixo pH, uma vez que um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia salina*, evitando ultrapassar o pH de 10,5 (LEWAN, ANDERSON e MORALEZ-GOMEZ, 1992).

Para realização do ensaio de *Artemia salina* serão utilizados os extratos brutos, suas frações e óleo essencial em diferentes concentrações (1000, 500, 100 e 10 µL/m). Os extratos e frações da folha e do caule serão diluídos com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e o óleo essencial com 0,5% de Polissorbato 80 e o volume completado com água do mar artificial até a concentração desejada (MEYER et al., 1982).

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) serão colocados para eclodir em água do mar artificial por 48 horas, sob aeração contínua e expostos à luz constante sob temperatura controlada (27 a 30)°C em pH entre 8-9 (UTYAMA, 2003). Como controle negativo (branco) será utilizado solução salina e como controle positivo sulfato de quinidina (VEIGA; VITAL, 2002).

Após a eclosão dos ovos, serão transferidos 10 náuplios de *Artemia salina* para cada tubo contendo as amostras e controles. Os tubos serão incubados novamente em temperatura de (27-30)°C por 24 horas, e após este tempo será realizada a contagem de náuplios imóveis.

Os resultados são expressos em CL₅₀ e para o seu cálculo é utilizado o programa estatístico Probitos. Todos os testes serão realizados em triplicata,

sendo consideradas amostras ativas aquelas em que a CL_{50} for menor que 1000 ppm (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (MEYER, 1982).

6.8.1.2 Atividade hemolítica *in vitro*

Para avaliar a atividade hemolítica serão utilizadas placas de Ágar-sangue (Newprov[®]), onde deverão ser colocados discos de papel estéreis impregnados com 1000 μg do extrato bruto e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Posteriormente as placas serão incubadas a 36°C por 24h. Após este período será possível verificar se houve a formação ou não de halo de hemólise. Como controle positivo será utilizada a solução de Triton 1000 μg .

Será realizada também a avaliação da hemólise por espectrometria. Para esta etapa o sangue de carneiro (Newprov[®]) deverá ser levemente homogeneizado. Em seguida deve ser transferido 5 mL do sangue para um tubo de ensaio que será centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm. Após o sobrenadante será desprezado, e o precipitado lavado com tampão fosfato-salino (PBS) gelado. Deve-se seguir para mais uma centrifugação (em torno de três vezes) até que o sobrenadante fique completamente incolor.

Em seguida a papa de eritrócitos deve ser diluída com PBS para obtenção de uma diluição a 2%. Para a realização da prova de hemólise serão utilizados extratos brutos, frações e o óleo essencial nas concentrações de 1000, 500, 200 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A diluição das amostras deverá ser feita com 10% de metanol e PBS. Como controle negativo será utilizado 200 μL de PBS em 200 μL de solução de eritrócito a 2%. Como controle positivo será utilizado 200 μL de água destilada em 200 μL de solução de eritrócito a 2%. No controle solvente são adicionados 20 μL de metanol mais 180 μL de PBS em 200 μL de solução de eritrócito a 2%.

Para a análise serão preparadas alíquotas em *eppendorfs* de 200 μL para as amostras em diferentes concentrações e controles, e 200 μL da suspensão de eritrócitos a 2%. As soluções em *eppendorfs* serão incubadas durante 3 horas em estufa a temperatura controlada de 37°C. Após a incubação as soluções serão centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos.

Para avaliação da hemólise será utilizado espectrofotometria, onde será mensurado a absorbância do sobrenadante em leitora de microplacas *Thermo Plate* ajustada em 540 nm (BANERJEE et al., 2008; CHAUDHURI et al., 2007). Para a quantificação da hemólise, o valor será calculado em porcentagem, considerando-se o valor de 100% a absorbância lida no tubo de hemólise total.

6.8.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

6.8.2.1 Micro-organismos

Ainda serão definidas as cepas para serem utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana.

6.8.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição

Será utilizada a técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). A diluição dos extratos brutos e frações será realizada com 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) completadas com etanol 10% e o óleo essencial será diluído com 5% de polisorbato 80. Os extratos brutos, frações e óleo essencial serão preparados através de diluição seriada em 100 µL de caldo Muller Hinton Broth (MHB – Merck, Darmstadt, Alemanha) em microplacas estéreis de 96 cavidades. As suspensões bacterianas serão preparadas em solução fisiológica na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, (tubo 0,5 de *McFarland*), e incubadas em um volume de 5µL nos orifícios apresentando uma concentração final de 10^4 UFC/mL. O controle negativo será realizado adicionando-se 100 µL de solução do diluente em 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. O controle de esterilidade será realizado utilizando 100 µL de MHB e 100 µL dos extratos brutos, frações e do óleo essencial. Para verificar a viabilidade bacteriana será utilizado 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos.

A incubação das microplacas será realizada em estufa bacteriológica em temperatura constante de 35°C por 16 a 20 horas. Por fim deve ser adicionada solução aquosa do revelador cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (TTC – Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,5% (20 µL) para que as microplacas sejam incubadas novamente por três horas a 35°C.

Em seguida pode-se realizar a interpretação dos resultados, onde a coloração vermelha/rósea é interpretada como ausência de atividade antimicrobiana e a ausência de coloração vermelha/rósea é considerada como presença de atividade antimicrobiana. Um antimicrobiano será escolhido para a validação da técnica e controle metodológico.

6.9 Análise estatística

Os resultados serão apresentados como média \pm desvio padrão. Comparações estatísticas serão realizadas pela ANOVA com 95% de confiança e pelo teste de Tukey (significância de $p < 0,05$).

7. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS, TECNOLÓGICAS OU DE INOVAÇÃO DO PROJETO

Este projeto tem como interesse realizar o estudo fitoquímico e a avaliação das atividades biológicas de óleo essencial, extratos, frações e compostos provenientes da espécie *Ocotea paranaensis*. Para que as características e informações obtidas de tal espécie possam ser esclarecidas e de alguma forma serem utilizadas para futuras pesquisas e possíveis tratamentos terapêuticos.

Ao desenvolver estudos que envolvem espécies ainda pouco exploradas é possível a descoberta de novas substâncias e compostos que possam ser patenteados por centros de pesquisas brasileiros. Uma vez que, o Ministério da Saúde por meio de políticas públicas como a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (BRASIL, 2006; BRASIL, 2009) incentivam a realização de estudos que explorem a fauna e flora brasileira por meio do incentivo da formação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovação em plantas medicinais e fitoterápicos.

8. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Metas	Objetivos	2017		2018		2019		2020	
		1sem	2sem	1sem	2sem	1sem	2sem	1sem	2sem
1	Desenvolvimento da tese	X	X	X	X	X	X	X	X
2	Coleta, Identificação do material vegetal	X	X						
3	Análise morfoanatômica e histoquímica		X						
4	Análise fitoquímica		X						
5	Isolamento e identificação de possíveis compostos		X	X	X	X	X	X	X
6	Obtenção e fracionamento do extrato bruto		X						
7	Toxicidade preliminar, atividade hemolítica e antimicrobiana			X					
8	Avaliação de possíveis atividades biológicas				X	X	X		
9	Divulgação dos resultados						X	X	X

9. POTENCIAL DE PUBLICAÇÃO OS RESULTADOS DO PROJETO PROPOSTO

JORNAIS CIENTÍFICOS	QUALIS FARMÁCIA (2015)
Journal of Ethnopharmacology	A2
Journal of Natural Products	A2
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences	B2
South African Journal of Botany	B2

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAITELLO, J. B. Novas espécies de Lauraceae para a flora brasileira. **Acta Bot. Bras.** São Paulo, v.15, n. 3, p. 445-450, Sept./Dec. 2001.

BALLABENI, V., et. al. Ocotea quixos Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties, **Fitoterapia**, 2009.

BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced 114 hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172. n. 2, p. 134- 139, 2008.

BARRERA, E. D. C., SUAREZ, L. E. C. Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 522–524, 2009.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, v.1, 1976.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, p. 121, 276. 1976.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.18, n.3, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Brasília-DF. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.048, de 3 de setembro de 2009. Aprova o Regulamento do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 set. de 2009.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA. 2010.

BROTTO, M. L. et al. Uma nova espécie de *Ocotea* (Lauraceae) para o Brasil. **Rodriguésia**, 61(Sup.), p. S57-S60 2010.

BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; SANTOS, E. P. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 495-525, July/Sept. 2013.

CAMARGO, M. J. et al. Sesquiterpenos de *Ocotea lancifolia* (Lauraceae). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 36, n. 7, p. 1008-1013, 2013.

CHAUDHURI, S. et al. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 42 – 48, 2007.

COUTINHO, D. F. et. al. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae-Lauroideae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.4, p.537-544, Out./Dez, 2006;

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FOURNET, A. et. al. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, n. 78, p. 382–384, 2007.

GARCEZ, F. R.; et al. Cytotoxic Aporphine Alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Médica**, v.77, n.4, p. 383-387, 2011

JIA, Q.; QIU, Z.; NISSANKA, A.; FARROW, T. M.; **US Patent Application**, Kind Code, serial nº 741215/series code 09, 2000.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book. 1940.
KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997. 198 p.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives of Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301. 1992

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e ambiente**. v. 8, n.1, p.195 - 206, jan./dez. 2001.

MEYER, B. N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MORAES, P. L. R. Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotrop**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 1-18, 2005.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIGUEL, O. G. “**Processo de obtenção de extratos hidroalcoólicos, extratos secos e derivados do agrião (Nasturtium officinale) e espécies medicinais afins, com modificações introduzidas em equipamento soxhlet para aplicações na indústria, área farmacêutica, cosmética, alimentícias e afins**”. PI 06017063-7 A2, 05 Apr. 2006, 11 Dec. 2007.

MONTRUCCHIO, D. P. et al. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Medica**, v. 78, n. 14, p. 1543-1548. 2012.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2 ed. São Paulo: Atheneu. 1991.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 33-36. 1972.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2 ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade brasileira de microscopia. 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, MIGUEL et al. **Identificação da propriedade antinociceptiva (analgésica) do alcalóide aporfínico s- (+) -dicentrina e usos do mesmo**. BR 10 2014 016339-5 A2, 01/07/2014.

UTYAMA, I. K. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica in vitro do vinagre e ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas**. Dissertação de Mestrado - Escola de enfermagem de Ribeirão Preto, 2003.

VAN DER WERFF, H. & RICHTER, H.G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Ann. Missouri Bot. Gard.** v. 83, n. 3, p. 409-418, 1996.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. **Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp.** In: I. A. Nascimento, E. C. P. M., Sousa & M. Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p.111-122, 2002.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L.. Alcalóides aporfínóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 92-98, 2007.

WOO, S. H.; SUN, N. J.; CASSADY, J. M.; SNAPKA, R. M. Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids. **Biochem Pharmacol**, n. 57, p. 1141-1145, 1999.