

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA CARDOSO OSHIRO

ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE *Citronella gongonha* (Mart.)

R.A. Howard (CARDIOPTERIDACEAE).

CURITIBA

2018

MARIANA CARDOSO OSHIRO

ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE *Citronella gongonha* (Mart.)

R.A. Howard (CARDIOPTERIDACEAE).

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Paraná

Orientador: Profº Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientadora: Profª. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2018

Oshiro, Mariana Cardoso

Estudo fitoquímico, morfoanatômico, atividades biológicas e propriedades antioxidantes da espécie
Citronella gongonha (Mart.) R.A. Howard (Cardiopteridaceae) / Mariana Cardoso Oshiro – Curitiba, 2018.
100 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Cardiopteridaceae. 2. Ácido clorogênico. 3. Toxicidade. 4. Hemólise. I. Miguel, Obdulio Gomes.
II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.271

Maria da Conceição Kury da Silva – CRB – 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
<http://www.farmacuticas.ufpr.br>



TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANA CARDOSO OSHIRO

Título: "ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard Cardiopteridaceae"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

Prof. Dr. OBDULIO GOMES MIGUEL
Orientador

Dra. ANA FLÁVIA SCHVABE DUARTE
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. VITOR ALBERTO KERBER –
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 28 de fevereiro de 2018.

Ao Paulo, Toninha e Glorinha.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR.

À Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR.

Aos amigos que compartilharam durante o mestrado experiências de vida e a bancada do Laboratório de Fitoquímica.

Ao orientador Prof. Obdulio Gomes Miguel, que me ofereceu conhecimento e liberdade.

“Eu sei que você não o crê. Mas eu também não o acreditava, julgando o q. tenho feito até hoje. É que eu não sou senão um estado potencial, sentindo que há em mim água fresca, mas sem descobrir onde é a sua fonte.”

(Clarice Lispector, carta a Lúcio Cardoso, 13 jul. 1941)

RESUMO

A fabricação de medicamentos a partir de moléculas provenientes do metabolismo secundário das plantas é uma interessante maneira para encontrar a cura ou amenizar os desconfortos de uma enfermidade. Apesar do estudo de plantas com finalidades medicinais ser desenvolvido no mundo todo, muitas espécies ainda não possuem estudos fitoquímicos e biológicos. Este trabalho descreve o estudo morfoanatômico, fitoquímico, propriedades antioxidantes e atividades biológicas de *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard, uma angiosperma presente em áreas úmidas de Floresta Atlântica e regiões pan-tropicais pertencente à família Cardiopteridaceae. Foi realizada morfoanatomia comparativa entre a espécie *Citronella paniculata* notando-se uma diferença de formato da nervura central e pecíolo entre as espécies. Além disso, observou-se maior quantidade de lignina envolvendo o feixe vascular da espécie *Citronella gongonha*. O extrato bruto etanólico de folhas e caule foi obtido em Soxhlet e particionado com os solventes: hexano, clorofórmio e acetato de etila. O screening fitoquímico revelou a presença de terpenos, flavonoides, compostos fenólicos, cumarinas, saponinas e taninos. Derivados do ácido cinâmico, ácido clorogênico e catequinas foram identificados por espectrometria de massas e a presença do ácido diclorogênico foi sugerida por CLAE e RMN ^1H e ^{13}C como composto majoritário desta espécie. Propriedade antioxidante foi observada para fração acetato de etila e os resultados da atividade antioxidante (%) de *Citronella gongonha* foram comparados com a espécie *Ilex paraguariensis*. A fitotoxicidade da espécie foi avaliada por meio dos ensaios de germinação e crescimento de *Lactuca sativa*. Atividade hemolítica foi observada para a fração hexano e toxicidade em *Artemia salina* foi observada para fração acetato de etila. A espécie *Citronella gongonha* oferece potencial para aplicações farmacêuticas e pode ser considerada fonte dietética de compostos fenólicos.

Palavras-chave: Cardiopteridaceae. Ácido clorogênico. Toxicidade. Hemólise.

ABSTRACT

The manufacture of drugs from molecules derived from the secondary metabolism of plants is an interesting way to find a cure or ease the discomforts of a disease. Although the study of plants with medicinal purposes is developed worldwide, many species not have yet got their phytochemical study carried out. This work describes the phytochemical, morpho-anatomic study so as biological activities and antioxidant properties of *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard, an angiosperm that belongs to the Cardiopteridaceae family and present in moist areas of the Atlantic Forest and pan-tropical regions. A comparative morpho-anatomy between the specie *Citronella paniculata* was performed. There was a difference in the shape of the central nerve and petiole between the species. In addition, a greater amount of lignin was observed involving the vascular bundle of *Citronella gongonha*. The crude ethanolic extract of leaves and branch was obtained in Soxhlet and partitioned with solvents: hexane, chloroform and ethyl acetate. Phytochemical screening was positive for presence of terpenes, flavonoids, phenolic compounds, coumarins, saponins and tannins. Derivatives of cinnamic acid, chlorogenic acid and catechins were identified by mass spectrometry. The presence of dichlorogenic acid was suggested by HPLC and NMR (¹H and ¹³C) as the major compound of this species. The antioxidant property was observed for ethyl acetate fraction and the results of the antioxidant activity (%) of *Citronella gongonha* were compared with an *Ilex paraguariensis* species. *Citronella gongonha* was evaluated for phytotoxicity by germination and growth assays in *Lactuca sativa*. Hemolytic activity was observed for hexane fraction and toxicity in *Artemia saline* was observed for ethyl acetate fraction. *Citronella gongonha* offers a potential for pharmaceutical applications and may be considered a dietary source for phenolic compounds.

Key-words: Cardiopteridaceae. Chlorogenic acid. Toxicity. Hemolysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DE <i>Citronella gongonha</i> e <i>Citronella paniculata</i> NO BRASIL	23
FIGURA 2 – FLORES E FOLHAS DE <i>Citronella gongonha</i>	23
FIGURA 3 – ÁCIDOS FENÓLICOS	26
FIGURA 4 – FRAGMENTO DA ROTA METABÓLICA PARA FORMAÇÃO DOS DERIVADOS DE ÁCIDO CINÂMICO	27
FIGURA 5 – ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	28
FIGURA 6 – VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DE <i>Citronella gongonha</i> E <i>Citronella paniculata</i>	45
FIGURA 7 – VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS ESPÉCIES <i>Citronella gongonha</i> E <i>Citronella paniculata</i>	46
FIGURA 8 – SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL E MESOFILO DAS ESPÉCIES <i>Citronella gongonha</i> E <i>Citronella paniculata</i>	47
FIGURA 9 – TESTES HISTOQUÍMICOS DA REGIÃO FOLIAR DAS ESPÉCIES <i>Citronella gongonha</i> E <i>Citronella paniculata</i>	48
FIGURA 10 – SECÇÃO TRANSVERSAL DE PECÍOLO DAS ESPÉCIES <i>Citronella gongonha</i> E <i>Citronella paniculata</i>	49
FIGURA 11 – TESTES HISTOQUÍMICOS DO PECÍOLO DAS ESPÉCIES <i>Citronella gongonha</i> E <i>Citronella paniculata</i>	50
FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA FLA 1 PURIFICADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Citronella gongonha</i>	56
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DA CO-INJEÇÃO DAS AMOSTRA FLA 1 E PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	57
FIGURA 14 – PERFIL UV PARA OS PICOS Nº 1 E Nº 2 DA AMOSTRA FLA 1	58
FIGURA 15 – ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA FLA1	59
FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN ^1H (200 MHz) PARA AMOSTRA FLA1.....	60
FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (50,32 MHZ) PARA AMOSTRA FLA 1.....	61
FIGURA 18 – ESTRUTURA SUGERIDA ATRAVÉS DOS DADOS OBTIDOS COM OS ESPECTROS DE RMN ^1H E ^{13}C	62
FIGURA 19 – FORMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO DICAFEOLQUÍNICO	63

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA PARA EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Citronella gongonha</i> COMPARADA AOS PADRÕES BHT, RUTINA E VITAMINA C.....	64
GRÁFICO 2 – CI ₅₀ PARA EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>Citronella gongonha</i> COMPARADA AOS PADRÕES BHT, RUTINA E VITAMINA C.....	66
GRÁFICO 3 – CRESCIMENTO RADÍCULA E HIPOCÓTILO PARA SEMENTE DE ALFACE TRATADOS COM EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE <i>Citronella. gongonha</i>	71
GRÁFICO 4 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i>	74

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – GÊNEROS PERTENCENTES À FAMÍLIA CARDIOPTERIDACEAE .	20
QUADRO 2 – ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO <i>Citronella</i>	22
QUADRO 3 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Citronella gongonha</i>	24
QUADRO 4 – CLASSIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	25
QUADRO 5 – IDENTIFICAÇÃO POR COMPARAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Citronella</i>	29
QUADRO 6 – FASE MÓVEL E REVELADORES UTILIZADOS PARA SCREENING FITOQUÍMICO EM CCD	34
QUADRO 7 – LISTA DE COMPOSTOS FENÓLICOS PESQUISADO PARA O EXTRATO BRUTO DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i>	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS PARA AMOSTRA DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i>	44
TABELA 2 – RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS PARA <i>Citronella gongonha</i> E <i>Citronella paniculata</i>	50
TABELA 3 – RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i>	52
TABELA 4 – PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i>	53
TABELA 5 – ÍONS MOLECULARES E FRAGMENTOS ENCONTRADOS PARA AS FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i> EM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.	
.....	54
TABELA 6 – DESLOCAMENTOS E ACOPLAMENTOS PARA O ESPECTRO DE ^1H E ^{13}C PARA A ESTRUTURA DO ÁCIDO CAFÉICO	62
TABELA 7 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR FORMAÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA AOS PADRÕES BHT, RUTINA E VITAMINA C DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i>	65
TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% DO RADICAL DPPH E CONTEÚDO DE FENÓIS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i>	67
TABELA 9 – EQUAÇÃO DA RETA PARA OS PADRÕES, EXTRATOS E FRAÇÕES DE CAULE E FOLHA DE <i>Citronella gongonha</i> PARA O ENSAIO DE DPPH·	68
TABELA 10 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH· DE <i>Citronella gongonha</i> COMPARADA A ESPÉCIE <i>Ilex paraguariensis</i>	69
TABELA 11 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE <i>Citronella gongonha</i>	75
TABELA 12 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE CAULE DE <i>Citronella gongonha</i>	75
TABELA 13 – CL ₅₀ PARA EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i> FRENTE A <i>Artemia salina</i>	77
TABELA 14 – ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE <i>Citronella gongonha</i> – AVALIAÇÃO DO IVG PARA <i>Lactuca sativa</i>	93

TABELA 15 – ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>Citronella gongonha</i> – AVALIAÇÃO DO IVG PARA <i>Lactuca sativa</i>	93
TABELA 16 – ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE CITRONELLA GONGONHA – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i>	94
TABELA 17 – ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE CITRONELLA GONGONHA – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i>	94
TABELA 18 – ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE CITRONELLA GONGONHA – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i>	95
TABELA 19 – ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE CAULE DE CITRONELLA GONGONHA – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i>	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	FAMÍLIA CARDIOPTERIDACEAE.....	20
3.1.1	Gênero <i>Citronella</i>	21
3.2	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	25
3.2.1	Ácidos fenólicos.....	26
3.2.2	Derivados do ácido cinâmico (C ₆ – C ₃)	26
3.2.3	Ácidos clorogênicos.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	MATERIAL BOTÂNICO	29
4.1.1	Controle de qualidade da matéria-prima vegetal	29
4.2	MORFOANATOMIA COMPARATIVA ENTRE AS ESPÉCIES <i>CITRONELLA GONGONHA</i> E <i>CITRONELLA PANICULATA</i>	30
4.2.1	Preparo das lâminas.....	31
4.2.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	32
4.3	ANÁLISE QUÍMICA	32
4.3.1	Extração	32
4.3.2	Particionamento.....	32
4.3.3	Determinação do teor de sólido	33
4.3.4	Screening fitoquímico	33
4.3.5	Cromatografia em coluna	35
4.3.6	Cromatografia líquida de alta eficiência	36
4.3.7	Espectrometria de massas	36
4.3.8	Ressonância magnética nuclear (RMN)	37
4.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	37
4.4.1	Formação do complexo fosfomolibdênio	37
4.4.2	Redução do radical 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH).....	38
4.4.3	Fenóis totais	39
4.5	ATIVIDADE FITOTÓXICA	40

4.5.1	Teste de germinação	40
4.5.2	Teste de crescimento	41
4.6	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	41
4.7	TOXICIDADE: <i>ARTEMIA SALINA</i>	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	MATERIAL BOTÂNICO	44
5.1.1	Controle de qualidade da matéria prima vegetal	44
5.2	MORFOANATOMIA COMPARATIVA ENTRE AS ESPÉCIES <i>CITRONELLA GONGONHA</i> E <i>CITRONELLA PANICULATA</i>	44
5.3	ANÁLISE QUÍMICA	52
5.3.1	Teor de sólidos e rendimento das frações	52
5.3.2	<i>Screening</i> fitoquímico	52
5.3.3	Identificação de compostos por espectrometria de massas	54
5.3.4	Identificação de compostos por cromatografia líquida de alta-eficiência.....	56
5.3.5	Identificação de composto por ressonância magnética nuclear	59
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	63
5.4.1	Formação do complexo fosfomolibdênio	64
5.4.2	Redução do radical DPPH e fenóis totais	66
5.5	ATIVIDADE FITOTÓXICA	70
5.6	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	73
5.7	TOXICIDADE: <i>ARTEMIA SALINA</i>	76
6	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICE 1 – ESPECTRO DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i> – ÍONS MOLECULARES 179 (ÁCIDO CAFÉICO) E 191 (ÁCIDO QUÍNICO)	88
	APÊNDICE 2 – ESPECTRO DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i> – ÍONS MOLECULARES 289 (EPICATEQUINA) E 341 (CAFEOL GLICOSE)	89
	APÊNDICE 3 – ESPECTRO DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i> – ÍONS MOLECULARES 353 (CAFEOLQUÍNICO) E 367 (FERULOIQUÍNICO)	90

APÊNDICE 4 – ESPECTRO DE FOLHAS E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i> – ÍONS MOLECULARES 515 (DICAFEOILQUÍNICO) E 441 (EPICATEQUINA GALATO)	91
APÊNDICE 5 – ESPECTRO DE CAULE DE <i>Citronella gongonha</i> – ÍONS MOLECULARES 455 (METIL EPICATEQUINA GALATO) E 471 (EPIGALOCATEQUINA GALATO)	92
APÊNDICE 6 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) PARA O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE <i>Citronella gongonha</i>	93
APÊNDICE 7 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE <i>Citronella gongonha</i> ...	94
APÊNDICE 8 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>Citronella gongonha</i> ...	95
ANEXO 1 – DECLARAÇÃO POR COMPARAÇÃO DA ESPÉCIE <i>Citronela gongonha</i> (MART.) R.A. HOWARD	96
ANEXO 2 – EXSICATA MBM 387516 DA ESPÉCIE <i>Citronela gongonha</i> (MART.) R.A HOWARD	97
ANEXO 3 – DECLARAÇÃO POR COMPARAÇÃO DA ESPÉCIE <i>Citronela paniculata</i> (MART.) R.A. HOWARD	98
ANEXO 4 – EXSICATA MBM 297713 DA ESPÉCIE <i>Citronela paniculata</i> (MART.) R.A. HOWARD	99
ANEXO 5 – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO CGEN - IBAMA.....	100

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários como os alcalóides, terpenos, quinonas e compostos fenólicos, produzidos por plantas são substâncias de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos, pois servem como modelo molecular para a síntese e aperfeiçoamento de novas drogas. São muitos os exemplos de moléculas com ação farmacológica provenientes de plantas e microrganismos, como no caso da morfina (*Papaver somniferum*) e penicilina (*Penicillium chrysogenum*). Para que novas moléculas sejam descobertas e seu potencial desenvolvido pela indústria farmacêutica, a pesquisa fitoquímica de plantas deve ser estimulada. No Brasil, há 32 mil espécies nativas de Angiosperma catalogadas (BFG, 2015), no entanto ainda há pouco conhecimento associado a marcadores moleculares e compostos majoritários para algumas famílias, devido à alta complexidade destas matrizes e ausência de estudos.

Na literatura publicada recentemente, estudos realizados com extratos de plantas ou princípio ativo isolado são comumente encontrados. Suveren et al. (2017) forneceu evidências experimentais de cardioproteção, em estudo realizado com coração de ratos, com extrato de folhas de *Viscum album* L.(Loranthaceae) utilizado na medicina popular turca. Na plataforma digital ClinicalTrials.gov, iniciativa da U.S National Institute of Health (NIH) estão contidas informações sobre estudos médicos em voluntários humanos de 203 países. Nesta base de dados, estudo clínico de fase 3 realizados com a substância canabidiol, encontrado em plantas da família da Cannabaceae estão sendo conduzidos, como a publicação de Thiele et al. (2018) que avaliou a ação do canabidiol em pacientes com epilepsia que não respondem ao tratamento medicamentoso disponíveis. O estudo de plantas medicinais e seus derivados é área da ciência que nunca cessa, pois são muitos os estudos a serem realizados a fim de comprovar a eficácia e segurança das plantas medicinais.

O presente trabalho tem como objetivo a contribuição ao estudo fitoquímico e morfoanatômico, além de avaliar as propriedades antioxidantes, fitotóxica, hemolítica e toxica do extrato bruto e frações das folhas e caule da espécie *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard, pertencente à família Cardiopteridaceae.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização fitoquímica, morfoanatômica e avaliação das propriedades antioxidantes, atividade fitotóxica, tóxica e hemolítica das folhas e caule da espécie *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Coletar e identificar as espécies *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard e *Citronella paniculata* (Mart.) R.A. Howard;

Notificar a pesquisa científica no SisGen;

Realizar análise do teor de umidade e cinzas totais das folhas e caule secos;

Realizar estudo morfoanatômico e testes histoquímicos de comparação entre as espécies *Citronella gongonha* e *Citronella paniculata*;

Realizar extração por Soxhlet e o particionamento do extrato bruto com os solventes: hexano, clorofórmio e acetato de etila;

Realizar o teor de sólidos do extrato bruto de folhas e caule e o cálculo de rendimento das frações;

Realizar análise fitoquímica por cromatografia de camada delgada (CCD) identificando as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos brutos e frações;

Identificar os metabólitos secundários presentes nas folhas e caule de *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard;

Verificar a propriedade antioxidante dos extratos brutos e frações de folhas e caule por redução do complexo fosfomolibdênio, redução do radical DPPH[·] e conteúdo de fenóis totais;

Verificar os efeitos fitotóxicos dos extratos brutos e frações de folhas e caule em sementes de *Lactuca sativa* por meio de ensaios de germinação e crescimento;

Verificar a atividade hemolítica dos extratos brutos e frações de folhas e caule;

Verificar a atividade tóxica dos extratos brutos e frações de folha e caule em náupilos de *Artemia salina*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA CARDIOPTERIDACEAE

A família Cardiopteridaceae foi descrita pela primeira vez por Carl Ludwig Blume no ano de 1847, enquanto exercia a função de inspetor de vacinas para a Companhia das Índias Orientais Holandesas. Por meio do contato com a população local da ilha de Java, coletou numerosas espécies tropicais e informações a respeito do uso tradicionais de algumas delas. Distinguiu oito novas famílias entre elas a família Cardiopteridaceae (FLORA MALESIANA, 2018).

Atualmente, a família possui 15 gêneros descritos que se apresentam morfologicamente com as seguintes características: arbustos, árvores perenes ou liana possuem folhas simples, alternadas, inteiras, dentadas ou palmadas, apresentam inflorescências axilares, espigas, fascículos ou panículas, flores bissexuais ou unissexuais, cálice persistente, 4-5 sépalas, 4-5 pétalas, frutas na forma de drupas ou sâmara com apêndice terminal acentuado (SCHORI, 2016). No QUADRO 1 estão presentes os gêneros que compõe a família Cardiopteridaceae:

QUADRO 1 - GÊNEROS PERTENCENTES À FAMÍLIA CARDIOPTERIDACEAE

<i>Acrocoelium</i> Baill.	<i>Citronella</i> D. Don	<i>Pleuropetalon</i> Blume
<i>Briquetina</i> J.F. Macbr.	<i>Gonocaryum</i> Miq.	<i>Pseudobotrys</i> Moeser
<i>Cardiopteris</i> Wall. ex Royle	<i>Leptaulus</i> Benth.	<i>Sarcanthidion</i> Baill.
<i>Cardiopteryx</i> Engl.	<i>Peripterygium</i> Hassk.	<i>Villaresia</i> Ruiz & Pav.
<i>Chariessa</i> Miq.	<i>Phlebocalymna</i> Griff. ex Benth.	<i>Villaresiopsis</i> Sleumer

FONTE: Adaptado TRÓPICOS (2018)

A família Cardiopteridaceae possui escassos estudos sobre o perfil fitoquímico e atividades biológicas, carecendo de mais estudos, a fim de detectar o perfil metabólico das espécies que compõem a família.

Su et al. (2016) isolou da espécie *Leptaulus citroides* coletada na floresta de Madagascar três novas saponinas triterpênicas denominadas etil-leptaulosídeo A, B e C e o sesquiterpeno cinamosmolídeo. Este último é caracterizado como composto volátil encontrado em plantas da família Canellaceae, possuindo atividade antifúngica e inibidora da alfa-glicosidase (TORRES et al. 2010; AMIGUET, 2006). Neste mesmo estudo, Su et al. (2016) verificou citotoxicidade para os compostos

isolados em células de câncer de ovário humano A2780 e registrou atividade moderada para estes compostos.

Kaneko et al. (1994) isolou sete flavonóides derivados da apigenina, sendo eles: apigenina 7-O- β -apiofuranosil (1 → 6)- β -d-glucopiranosideo, apigenina, apigenina-5,7-dimetil éter, apigenina trimetil eter, apigenina 7-O-glucosideo, apigenina 7-O-neohesperidoside e vitexina. A apegenina é um metabólito que possui publicações sobre seu efeito antioxidante, anti-inflamatório e propriedades anti-tumorais (MADUNIĆ et al., 2018). Da mesma forma, a vitexina substância encontrada em plantas empregadas na medicina chinesa, possui estudos sobre seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-hiperalgésica, anti-tumoral e efeitos neuroprotetores (HE et al., 2016; MANOLESCU et al., 2009). Estes metabólitos foram isolados de folhas de *Gonocaryum calleryanum*, espécie utilizada na medicina tradicional Filipina para o tratamento de doenças estomacais. Estudo realizado por Chan et al. (1998) isolou da espécie *Gonocaryum calleryanum* secoridóides denominados gonocarosídeo. A substância isolada demonstrou atividade anti-microbiana contra o agente *Tricomonas vaginalis*, causador de infecção sexual transmitida por agente não viral (BALA; CHHONKER, 2018).

3.1.1 Gênero *Citronella*

O gênero *Citronella* foi classificado inicialmente na família Icacinaceae, porém evidências moleculares registradas por meio de estudos de sequenciamento de DNA (ndhF, rbcL, atpB e 18SrDNA) e análises morfológicas entre os membros da família Icacinaceae serviram como embasamento científico para mudança de família (KAREHED, 2001). Estudos genéticos adicionais envolvendo DNA cloroplástico e partes de DNA não codificados, apresentados por Bremer et al. (2002) corroboram com a classificação do gênero *Citronella* na família Cardiopteridaceae pertencente à ordem Aquifoliales (APG, 2016; BYNG et al. 2014). O gênero *Citronella* possui 32 espécies espalhadas pelo mundo em regiões de clima tropical (TROPICOS, 2018). O QUADRO 2 resume as espécies pertencentes ao gênero *Citronella*.

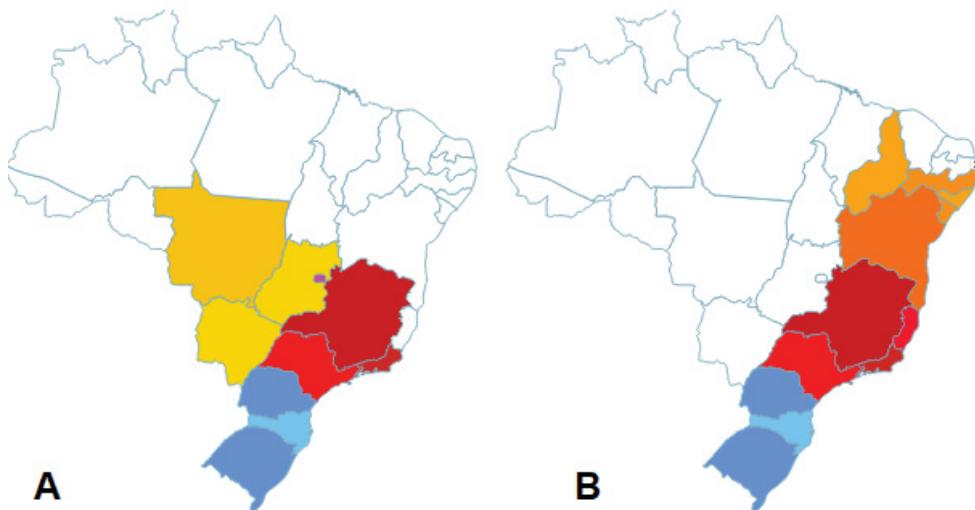
QUADRO 2- ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO *Citronella*

<i>Citronella apogon</i> (Griseb.) R.A. Howard	<i>Citronella lucidula</i> R.A. Howard	<i>Citronella ramiflora</i> (Miers) R.A. Howard
<i>Citronella brassii</i> R.A. Howard	<i>Citronella macrocarpa</i> Hürl. Hurlmann	<i>Citronella samoensis</i> (A. Gray) R.A. Howard
<i>Citronella chilensis</i> (Molina) R.A. Howard ex Muñoz	<i>Citronella macrocarpa</i> Hurlmann	<i>Citronella sarmentosa</i> (Baill.) R.A. Howard
<i>Citronella colombiana</i> Cuatrec.	<i>Citronella megaphylla</i> (Miers) R.A. Howard	<i>Citronella silvatica</i> Cuatrec.
<i>Citronella costaricensis</i> (Donn. Sm.) R.A. Howard	<i>Citronella melliodora</i> (Sleumer) R.A. Howard	<i>Citronella smythii</i> (F. Muell.) R.A. Howard
<i>Citronella engleriana</i> (Loes.) R.A. Howard	<i>Citronella moorei</i> (F. Muell. ex Benth.) R.A. Howard	<i>Citronella suaveolens</i> (Blume) R.A. Howard
<i>Citronella gongonha</i> (Mart.) R.A. Howard	<i>Citronella mucronata</i> (Ruiz & Pav.) D. Don	<i>Citronella sucumbiensis</i> Cuatrec.
<i>Citronella hirsuta</i> Munzinger	<i>Citronella paniculata</i> (Mart.) R.A. Howard	<i>Citronella toledo</i> Hashim.
<i>Citronella ilicifolia</i> (Sleumer) R.A. Howard	<i>Citronella paraguariensis</i> (Hassl.) R.A. Howard	<i>Citronella virescens</i> (Miers) R.A. Howard
<i>Citronella incarum</i> (J.F. Macbr.) R.A. Howard	<i>Citronella peruviana</i> R.A. Howard	<i>Citronella vitiensis</i> R.A. Howard
<i>Citronella latifolia</i> (Merr.) R.A. Howard	<i>Citronella philippinensis</i> (Merr.) R.A. Howard	

FONTE: Adaptado TRÓPICOS (2018)

No Brasil, apenas duas espécies do gênero *Citronella* tiveram sua ocorrência registrada: *Citronella gongonha* e *Citronella paniculata* (MEDRI, 2002; VIANI; VIEIRA, 2007). A *Citronella gongonha* ocorre nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do país, podendo habitar áreas de Cerrado e Floresta Atlântica. A espécie *Citronella paniculata*, conhecida popularmente como carne de vaga ou perobossu ocorre nas regiões sul e sudeste do país e diferentemente da outra espécie habita também o nordeste do país. Além disso, tem sua ocorrência registrada para os domínios fitogeográficos: Caatinga, Cerrado e Floresta Atlântica (REFLORA, 2018). Não há publicação científica do estudo fitoquímico e farmacológico para esta espécie, igualmente não há registros de qualquer estudo científico para as outras espécies do gênero *Citronella* que ocorrem nas outras regiões do mundo. A FIGURA 1 ilustra a ocorrência das duas espécies do gênero *Citronella* no Brasil.

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE *Citronella gongonha* e *Citronella paniculata* NO BRASIL



FONTE: Adaptada de REFLORA (2018).

LEGENDA: A: distribuição de *Citronella gongonha* nos estados DF, GO, MS, MT, MG, RJ, SP, PR, SC e RS; B: distribuição de *Citronella paniculata* nos estados AL, BA, PE, PI, SE, ES, RJ, SP, MG, PR, SC e RS.

3.1.1.1 *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard

A espécie *Citronella gongonha* se caracteriza morfologicamente por apresentar ápice mucronado, margem da folha dentada, frequentemente acuelada e ovário glabro (HOWARD, 1942; VIANI; VIEIRA, 2007), como representada na FIGURA 2.

FIGURA 2 - FLORES E FOLHAS DE *Citronella gongonha*



FONTE: FLORA SBS (2018).

Em estudo etnobotânico realizado por Carvalho; Rodrigues (2008) nas doze áreas remanescentes de floresta estacional semidecidual, no sul do estado de Minas Gerais, foi registrado para espécie *Citronella gongonha* a utilização medicinal para o trato urinário com frequência de 25% entre os entrevistados. Alguns autores também descrevem a utilização das folhas desta espécie na forma de chá como bebida

substituta da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (KAREHED, 2001; MAZINE; SOUZA; RODRIGUES, 2005). Ainda, a espécie *Citronella gongonha* apresenta os seguintes sinônimos: *Cassine gongonha* Mart, *Myginda gongonha* (Mart.) DC, *Villaresia gongonha* (Mart.) Miers, *Ilex gongonha* (Mart.) D. Don, *Villaresia cuspidate* Miers e *Villaresia gongonha* var. *pungens* (Miers) Engl (REFLORA, 2018). No QUADRO 3 estão descritos os níveis de organização taxonômica para espécie:

QUADRO 3 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Citronella gongonha*

HIERARQUIA	TAXONOMIA
Reino	Plantae
Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novákex Takht.
Superordem	Asteranae Takht
Ordem	Aquifoliales Senft
Família	Cardiopteridaceae Blume
Gênero	<i>Citronella</i> D.Don
Espécie	<i>Citronella gongonha</i> (Mart.) R.A. Howard

FONTE: TROPICOS (2018).

Damtoft et al. (1993) isolou a partir do extrato aquoso de *Citronella gongonha* seis secoridóides glicosídeos (ácido kingisídico, ácido 8-epi-kingisídico, ácido kingisídeo, 8-epi kingisídeo, swerosídeo e secoxyloganina), que são comumente encontrados em plantas da família Oleaceae como a espécie *Syringa velutina* e nos frutos da espécie *Fructus Corni*, utilizada na medicina tradicional chinesa promissora no tratamento da osteoporose (FENG et al., 2009; DINDA et al., 2011).

3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos possuem uma grande diversidade de estrutura molecular, contendo um ou mais anéis aromáticos, no qual pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2001; ANGELO; JORGE, 2007). Dessa forma, podem ser classificados segundo seu esqueleto principal, conforme o QUADRO 4:

QUADRO 4- CLASSIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

CLASSE	ESTRUTURA
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ – C ₁
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C ₆ – C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C ₆ – C ₃
Naftoquinonas	C ₆ – C ₄
Xantonas	C ₆ – C ₁ – C ₆
Estilbenos, antoquinonas	C ₆ – C ₂ – C ₆
Flavonóides, isoflavonóides	C ₆ – C ₃ – C ₆
Lignanas, neolignanas	(C ₆ – C ₃) ₂
Biflavonóides	(C ₆ – C ₃ – C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ – C ₃) _n
Taninos condensados	(C ₆ – C ₃ – C ₆) _n

FONTE: ANGELO; JORGE, 2007

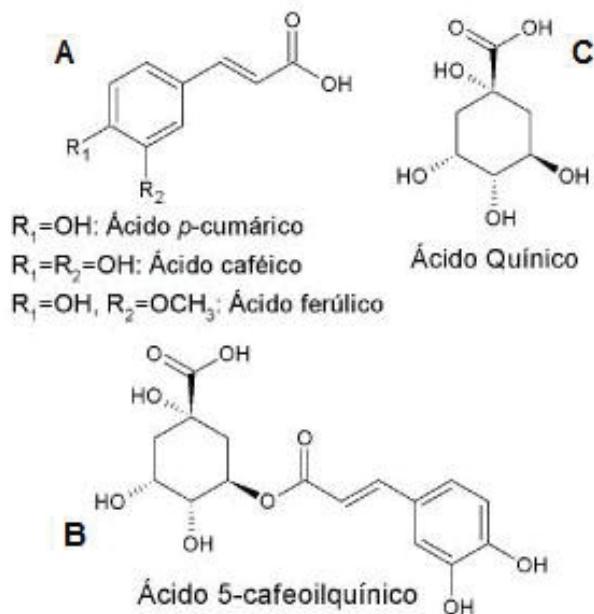
Os compostos fenólicos também podem ser classificados de acordo com a sua ocorrência no reino vegetal (RIBÉREAU-GAYON; PEYNAUD, 1968; SOARES, 2002). A quantidade de compostos fenólicos em uma espécie de plantas pode variar de acordo com a temperatura, condições do solo, luz, condições de crescimento, predação, entre outros fatores uma vez que os compostos fenólicos são metabólitos secundários dos vegetais e são produzidos de acordo com as necessidades para o desenvolvimento e estão associados ao mecanismo de defesa dos vegetais (KING; YOUNG, 1999; HECK et al., 2008).

Inúmeras são as fontes de polifenóis na dieta entre frutas, legumes, cereais e chás, podemos ressaltar a importância das catequinas comumente encontradas nos chás, as isoflavonas nas preparações com soja, os flavonóides como o resveratrol presente em frutas e os ácidos fenólicos encontrados em cerca de um terço dos alimentos (YANG, 2001).

3.2.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em duas classes: os ácidos hidroxibenzoicos e os hidroxicinâmicos. Os ácidos fenólicos são componentes das estruturas dos taninos que se apresentam na forma de polímeros. Os taninos, por exemplo, conferem ao alimento a sensação de adstringência e são classificados em taninos hidrolisáveis e condensados. Comumente encontrado nas uvas (SOARES, 2002). Os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal, como o café, erva mate, maçã, ameixa, crucíferas, cereais, entre outros (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

FIGURA 3 - ÁCIDOS FENÓLICOS



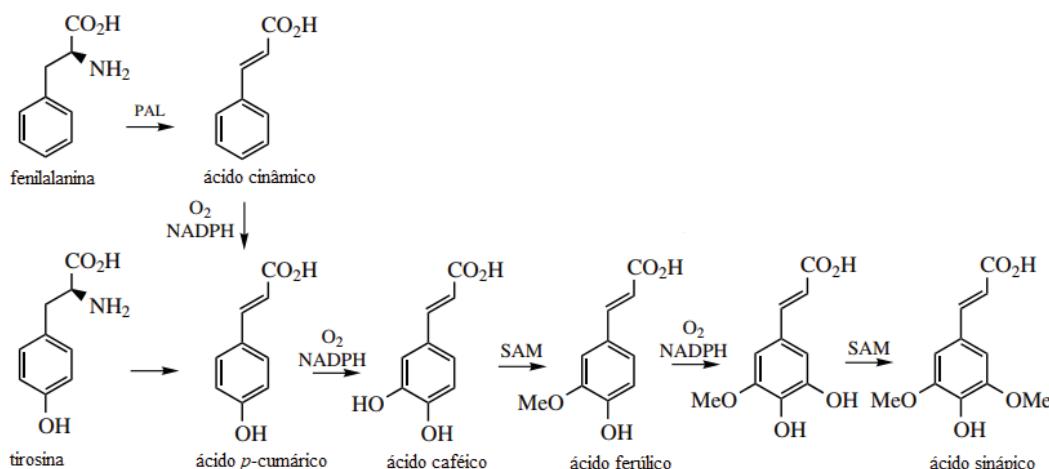
FONTE: Adaptado OLIVEIRA; BASTOS, 2011.
LEGENDA: A: ácido hidroxicinâmico; B: éster de ácido hidroxicinâmico; C: ácido hidroxibenzoico.

3.2.2 Derivados do ácido cinâmico ($C_6 - C_3$)

Os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico são derivados do ácido cinâmico e estão amplamente distribuídos nos vegetais. Estas substâncias são formadas pela via do chiquimato, na qual o ácido chiquímico é intermediário central desta rota metabólica. A este intermediário é atribuído uma cadeia de três carbonos para formação do ácido corísmico, que por meio de reações de transaminação

formará os aminoácidos fenilalanina e tirosina. A eliminação do nitrogênio da cadeia lateral destes aminoácidos e uma sequência de reações de metilação e hidroxilação que leva a formação dos derivados do ácido cinâmico (DEWICK, 2002). A FIGURA 3 ilustra parte da rota metabólica dos derivados do ácido cinâmico.

FIGURA 4 - FRAGMENTO DA ROTA METABÓLICA PARA FORMAÇÃO DOS DERIVADOS DE ÁCIDO CINÂMICO



FONTE: Adaptado Dewick (2002).

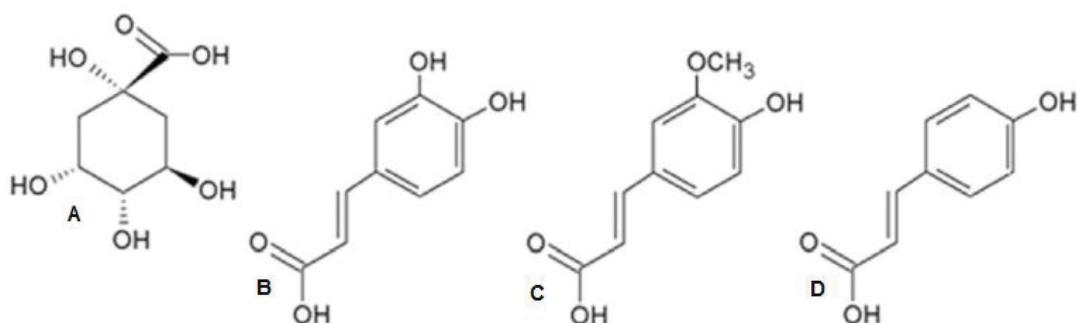
Para cada substância formada pode ocorrer reações de esterificação e glicosilação dando origem a ésteres e heterosídeos do ácido cinâmico, substâncias como o ácido clorogênico, ácido chicórico, ácido rosmariníco, entre outros são classificadas neste grupo de compostos. Há também a possibilidade de polimerização dos derivados do ácido cinâmico dando origem a compostos denominados ligninas. As ligninas constituem a parede celular de tecidos vegetais de folhas e caules de plantas vasculares (DEWICK, 2002). A presença de ligninas em tecido vegetal está intimamente relacionada com a presença de ácidos fenólicos. Por exemplo os musgos (briófitas) não possuem tecidos lignificados, da mesma forma que as algas, também não produzem ácidos fenólicos (SIMÕES, 2001).

3.2.3 Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos (CGAs) são formados pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos trans-cinâmicos: o ácido cafeíco, o ferúlico, sinápico ou o p-cumárico. Podem ser classificados de acordo com o tipo, número e posição dos resíduos acila (OLIVEIRA; BASTOS, 2011; CLIFFORD, 2000):

- mono ésteres (ácidos cafeiolquínicos, cumaroilquínicos e feruloilquínicos);
- ésteres mistos dos ácidos cafeico e ferúlico (ácidos cafeiol-feruloilquínicos).

FIGURA 5 - ÁCIDO CLOROGÊNICO



FONTE: Adaptado Kremr (2016).

LEGENDA: Formulas estruturais. A: ácido quínico; B: ácido caféico; C: ácido ferúlico; D: ácido p-cumárico.

Entre as atividades biológicas reconhecidas para o ácido clorogênico estão atividade antioxidante, potencial anti-carcinogênica, anti-inflamatória, antibactericida, e propriedades anti-obesidade (NAVEED, 2018; KERMR, 2016). Estudos demonstram propriedades antidiabéticas e anti-obesidade evidenciando a ação do ácido clorogênico no metabolismo da glicose, diminuindo sua disponibilidade na circulação sanguínea (YUKAWA, 2004). Ação antioxidante e antiinflamatória inibindo a interleucina 8 (IL-8) e a expressão de RNA mensageiro (SHIN, et al., 2017). Ainda, estudo em modelo experimental animal evidenciou a alteração de níveis de óxido nítrico alterando a vasodilatação (TOM, et al 2016). Ação antibactericida foi comprovada para cepas de *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Stenotrophomonas maltophilia*, entre outras (FARZAEI, 2015; AYSELI, 2016; KARUNANIDHI, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As espécies *Citronella gongonha* e *Citronella paniculata* foram coletadas no Capão do Cifloma, Curitiba-PR no Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná em março de 2016. O material coletado foi submetido à lavagem com água corrente e seco à sombra. Após secagem do material, o mesmo foi triturado em moinho de facas e martelos e armazenado em local seco e ausente de luz. O material botânico fresco destinado ao estudo morfoanatômico foi submerso em solução de FAA (JOHANSEN, 1940) e estocado em etanol a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHÉ, 1976). O material botânico foi identificado pelo engenheiro florestal Marcelo Leandro Brotto do Museu Botânico de Curitiba (ANEXO 1 - 4), conforme QUADRO 5:

QUADRO 5 - IDENTIFICAÇÃO POR COMPARAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Citronella*

ESPÉCIE	Nº TOMBO EXSICATA
<i>Citronella gongonha</i> (Mart.) R.A. Howard	MBM 387516
<i>Citronella paniculata</i> (Mart.) R.A Howard	MBM 297713

FONTE: A autora (2018).

A notificação para acesso ao patrimônio genético no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado realizado pelo Ministério do Meio Ambiente (IBAMA) está vinculada ao número de processo 02001.001165/2013-47 (ANEXO 5).

4.1.1 Controle de qualidade da matéria-prima vegetal

4.1.1.1 Determinação de umidade

A determinação de umidade para as amostras de folha e caule de *Citronella gongonha* foi realizado de acordo com o método gravimétrico da Farmacopeia Brasileira (2010). Em um cadinho de porcelana, previamente dessecado e tarado, foi pesado aproximadamente 1 g do material vegetal (folhas ou caule) seco e triturado.

As amostras foram levadas a estufa 100°C por um período de 2 a 3 horas, e pesadas a cada 30 minutos até obtenção de peso constante. O teste foi realizado em triplicata e o cálculo para determinação do teor de umidade seguiu a equação 1 (Eq. 1):

$$\frac{\% \text{ umidade} = (\underline{P_a} - \underline{P_s}) \times 100}{P_a} \quad (\text{Eq. 1})$$

Considerar:

P_a = Peso do cadinho + peso da amostra

P_s = Peso do cadinho + peso da amostra seca

4.1.1.2 Determinação de cinzas

A determinação de cinzas para as amostras de folha e caule de *Citronella gongonha* foi realizada de acordo com o método descrito pela Farmacopeia Brasileira (2010). Os cadinhos e as amostras utilizadas no teste de umidade (4.1.1.1) foram levados a mufla e incinerados a 600°C por aproximadamente 6 horas. Os cadinhos foram retirados da mufla e colocados em dessecador para resfriar, as amostras foram pesadas e o teor de cinzas calculado conforme a equação 2 (Eq. 2):

$$\frac{\% \text{ de cinzas} = \underline{P_a} - \underline{P_i} \times 100}{P_a} \quad (\text{Eq. 2})$$

Considerar:

P_a = Peso do cadinho + peso da amostra

P_i = Peso do cadinho + peso da amostra incinerada

4.2 MORFOANATOMIA COMPARATIVA ENTRE AS ESPÉCIES *CITRONELLA GONGONHA* E *CITRONELLA PANICULATA*

O material botânico das espécies *Citronella gongonha* e *Citronella paniculata* foi conservado em solução FAA (JOHANSEN, 1940) durante 7 dias e armazenado em etanol 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

Para a observação e comparação das estruturas morfoanatômicas das espécies do gênero *Citronella* foram preparadas lâminas semipermanentes e permanentes de cortes transversais e paradérmicos coradas com azul de astra e fuccina básica das folhas e pecíolo de cada espécie (O'BRIEN, FEDER, McCULLY, 1964). Adicionalmente, foram realizados testes histoquímicos com os reativos: cloreto férrico para presença de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), Sudam III para presença de lipídios (SASS, 1951), floroglucina clorídrica para presença de lignina (FOSTER, 1949) e lugol para presença de amido (BERLYN; MIKSCHÉ, 1976). Além da utilização de ácido sulfúrico (1%) para reação com cristais de oxalato de cálcio (OLIVEIRA; AKISSUE, 1997). As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Para análise estrutural da superfície das folhas de *Citronella gongonha* e *Citronella paniculata* foi realizado microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises foram realizadas com o microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6360 LV) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

4.2.1 Preparo das lâminas

As lâminas semipermanentes foram confeccionadas com glicerina a 50% (BERLYN; MIKSCHÉ, 1976). Cortes transversais e paradérmicos de folhas e pecíolo das duas espécies foram realizados à mão livre com auxílio de uma lâmina de aço inox. Os cortes foram corados com azul de astra e fuccina básica ou reativos para testes histoquímicos (Cloreto férrico, Sudam III, Floroglucina clorídrica e Lugol). Logo após, adicionou-se glicerina 50% em uma lâmina e realizou-se a inclusão dos cortes, separadamente, na glicerina líquida cobrindo com a lamínula e após secagem das lâminas realizou a vedação das mesmas com esmalte incolor.

As lâminas permanentes foram confeccionadas com parafina (CAPUTO; GINTINARA; MANSO, 2011). Pequenos fragmentos de folha e pecíolo das duas espécies foram colocados em contato com a parafina líquida com auxílio de uma pinça aquecida, evitando-se a formação de bolhas de ar em torno dos mesmos. A parafina foi resfriada, formando-se pequenos blocos contendo os fragmentos. Estes blocos foram seccionados no plano transversal em micrótomo rotatório Spencer 820, em secções de 6-9 µm. Os cortes foram hidratados e distendidos em lâminas para

coloração e visualização em microscópio óptico. Os resultados foram registrados por fotografias através de uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio óptico.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de folha e pecíolo das espécies do gênero *Citronella* foram submetidas a um pré-preparo antes da análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pequenos pedaços com cerca de 1 cm de folha e pecíolo de cada espécie foram desidratados em uma série etanólica crescente (80% até grau analítico) e levados para equipamento de ponto crítico (Balzers CPD 030) para desidratação das estruturas (SOUZA, 1998). Os cortes foram colados com auxílio de fita de carbono dupla face em um suporte circular para metalização em ouro (Balzers Sputtering SDC 030). Foram registradas imagens da face abaxial e adaxial da folha e cortes transversais do pecíolo das espécies *Citronella gongonha* e *Citronella paniculata*.

4.3 ANÁLISE QUÍMICA

4.3.1 Extração

Foi realizada extração sólido-líquido em aparelho de Soxhlet modificado (PI 0601703-7) de folhas e caule de *Citronella gongonha*. Uma amostra de 516,1 g de folhas secas e trituradas foi colocada no cone do Soxhlet e a extração realizada com 3,5 L de álcool etílico P.A. por cerca de 7 dias. Amostra de 580,3 g de caule secos e triturados foi extraída em aparelho de Soxhlet com 3L de álcool etílico P.A. durante 5 dias.

4.3.2 Particionamento

A partir do extrato bruto etanóico de folhas e caule de *Citronella gongonha* obtido por extração sólido-líquido foi realizado um particionamento líquido-líquido em aparelho de Soxhlet modificado (PI 0601703-7). Foi utilizado três diferentes solventes em grau analítico (hexano, clorofórmio e acetato de etila) em ordem crescente de polaridade.

4.3.3 Determinação do teor de sólido

A determinação do teor de sólidos dos extratos brutos de folha e caule de *Citronella gongonha* foi realizado de acordo com o método descrito por Miguel (2003). Em placas de Petri, previamente dessecadas e taradas, foram pipetados 10 mL do extrato bruto de folha e caule obtidos na extração realizada por Soxhlet. As placas foram mantidas em estufa a 100°C até peso constante e o teor de sólidos calculado conforme equações 3 (Eq. 3) e 4 (Eq. 4):

$$\text{Peso} = \frac{\text{Peso seco (g)} \times 10 \text{ mL}}{\text{Volume do extrato bruto (mL)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Considerar:

Peso seco (g) = peso da folha (516,1 g) e caule (580,3 g) utilizado para extração em Soxhlet.

Volume do extrato bruto (mL) = quantidade de extrato bruto obtido após extração em Soxhlet. Volume do extrato de folha (2,8 L) e Volume do extrato de caule (1,4L).

$$\% \text{ Teor de Sólido} = \frac{\text{Ts} \times 100}{\text{Peso seco}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Considerar:

Ts= Peso placa Petri + amostra seca

Peso seco= valor obtido na equação (Eq. 3).

4.3.4 Screening fitoquímico

Foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica de 4 x 5 cm como ensaio sistemático de análise fitoquímica preliminar, para identificação dos principais grupos do metabolismo secundário das folhas e caule de *Citronella gongonha*. Para realização do screening fitoquímico foi utilizado fases móveis e reveladores, de acordo com o QUADRO 6:

QUADRO 6 – FASE MÓVEL E REVELADORES UTILIZADOS PARA SCREENING FITOQUÍMICO EM CCD

ELUENTES	REVELADORES
Hexano: clorofórmio (7:3)	Vanilina sulfúrica
Hexano: clorofórmio (3:7)	
Hexano: acetato de etila (8:2)	
Clorofórmio: acetato de etila (7:3)	Vanilina sulfúrica / Dragendorff
Clorofórmio: acetato de etila (3:7)	Vanilina sulfúrica
Clorofórmio: metanol (9:1)	Vanilina sulfúrica / Dragendorff
Clorofórmio: metanol (7:3)	Dragendorff / NEU / Cloreto férrego
Butanol: ácido acético: H ₂ O (4:1: 1)	NEU / Cloreto férrego
Acetato de etila: ácido fórmico: H ₂ O (100:10: 5)	

FONTE: Adaptado Wagner; Bladt (1996).

4.3.4.1 Pesquisa de heterosídeos saponínicos e taninos

Utilizando a fitoquímica clássica para complementar o screening fitoquímico de folhas e caule de *Citronella gongonha*, foi realizada pesquisa de heterosídeos saponínicos e taninos de acordo com metodologia descrita por Miguel (2003).

Para a realização destes dois ensaios foi preparado extrato aquoso com 40 g do vegetal seco e fragmentado (folhas ou caule) em 200 mL de água e deixado em banho-maria a 70°C durante 1 hora.

Para a pesquisa de heterosídeos saponínicos foram utilizados 3 tubos de ensaio e adicionado em cada tubo o volume de 5 mL do extrato aquoso (folhas ou caule). Os tubos foram agitados energicamente por 5 min medindo-se em seguida o anel de espuma formado. Após repouso de 30 min, a presença de heterosídeos saponínicos é confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1 cm.

Para pesquisa de taninos foram utilizados 3 tubos de ensaio e adicionado em cada tubo o volume de 5 mL do extrato aquoso (folhas ou caule) e 5 gotas de cloreto férrego 1%. Após formação de precipitado escuro, 5 mL da solução foram

transferidos para um balão de fundo chato, adicionados 5 gotas de formaldeído a 37% e 4 mL de ácido clorídrico. A mistura foi levada para o refluxo por 1 h. A solução foi filtrada e o material retido lavado com água destilada e álcool. Ao material retido no filtro foi acrescido gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. A formação de coloração indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado será adicionado excesso de acetato de sódio e 4 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

Em complemento a pesquisa de taninos, foi realizada ensaio de precipitação com solução de gelatina a 2,5 % em cloreto de sódio a 0,9%: O extrato aquoso foi transferido para 3 tubos de ensaio nos volumes de 0,5 mL, 1 mL e 2 mL. A cada tubo foram adicionados 2 mL da solução de gelatina (2,5 %). A formação de precipitado nesta fase indica a presença de taninos.

4.3.5 Cromatografia em coluna

A partir de 6 g da fração acetato de etila da folha de *Citronella gongonha* foi realizada cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel 60 Merck (0,063 – 0,200 mm) e 100 mL dos eluentes hexano, acetato de etila e metanol em gradientes de concentração variando de 5 mL em 5 mL. A amostra foi empacotada com 14 g de sílica e suspensa com hexano P.A. e papel de filtro do mesmo diâmetro da coluna utilizada. Iniciou-se a cromatografia com hexano - acetato de etila nas concentrações de 30: 70 mL de acetato de etila até volume final de 100 mL de acetato de etila. E novamente, foi eluído acetato de etila - metanol nas concentrações iniciais de 95: 5 mL de metanol até concentração isocrática dos dois solventes em 50: 50 mL e finalizando com 200 mL de metanol P.A. Inicialmente, foi coletado cerca de 200 mL de hexano, correspondente ao volume morto da coluna e logo em seguida, recolheu-se a amostra em frascos de aproximadamente 7 mL, numerados crescentemente. O solvente contido nos frascos foi evaporado para observação da cristalização de substâncias purificadas.

4.3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência

Análise cromatográfica do isolado FLA 1 foi realizada utilizando cromatógrafo à líquido de alta eficiência (CLAE-UV) modelo Pro Star (Varian®), equipado com detector UV/VIS, coluna C18. Água destilada acidificada com ácido fórmico (0,2%) foi utilizada como eluente A e Acetonitrila/metanol grau CLAE (60:40 v/v) foi utilizada como eluente B. O programa de gradiente seguiu a sequência: 20–30% B (6 min), 30–40% B (10 min), 40–50% B (8 min), 50–90% B (8 min), 90–90% B (3 min), 90–20% B (3 min), 20–20% B (2 min) em um fluxo constante de 0,8 mL/min.

4.3.7 Espectrometria de massas

Análise do extrato bruto de folhas e caule para pesquisa de compostos fenólicos foi realizada em espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo XEVO TQD (Waters®), fonte ESI, voltagem do capilar e cone foram ajustadas para - 3000 V e – 40 V, respectivamente. A temperatura de desovação foi de 100°C e a energia de colisão variou de 15 a 50 V. A amostra foi dissolvida em metanol grau CLAE (70%) e água destilada (50%). A análise foi feita por injeção direta em modo negativo utilizando a metodologia adaptada de Bastos (2007). As análises foram realizadas na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. A identificação de compostos fenólicos foi realizada por comparação com dados publicados em literatura, conforme QUADRO 7 (BASTOS, 2007; AMMAR et al. 2018).

QUADRO 7- LISTA DE COMPOSTOS FENÓLICOS PESQUISADO PARA O EXTRATO BRUTO DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha*

COMPONENTES	Íon desprotonado [M-H] ⁻ m/z	MS/MS íon m/z
Ácido caféico	179	135, 179
Ácido quínico	191	85, 93, 111, 127, 173
Ácido cafeoilchiquímico	335	135, 161, 179
Ácido dicafeoilchiquímico	497	161, 179, 335
Ácido dicafeoilquínico	515	173, 179, 191, 353

Ácido cafeoilquínico	353	135, 173, 179, 191
Ácido feruloiquílico	367	173, 191, 193
Epicatequina galato	441	135, 169, 289
Metil Epicatequina galato	455	375, 407
Epigalocatequina galato	457	69, 305, 331
3-metil Epigalocatequina galato	471	407, 441
Catequina /epicatequina	289	109, 125, 179, 203, 205, 245
Rutina	609	301

FONTE: Adaptado de BASTOS, 2007; AMMAR, 2018.

4.3.8 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizados em espectrômetro Bruker modelo DPX 200, operando na frequência de 200 MHz para ^1H e 50,32 MHz para ^{13}C , tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram apresentados em ppm e o solvente utilizado foi o dimetilsulfoxido deuterado (DMSO). As análises foram realizadas na Central de RMN no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

O teste de formação do complexo fosfomolibdênio foi realizado segundo método de Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Foi avaliada a capacidade antioxidante para o extrato bruto e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha* na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi utilizado como padrões positivos hidroxitolueno butilado (BHT), rutina e Vitamina C na mesma concentração de teste e como controle branco foi utilizado metanol. O teste foi realizado em triplicata.

Em tubo de ensaio com tampa, foi adicionado 300 µL de amostra (extrato, frações ou padrões), 1 mL de solução reagente de fosfomolibdênio e 1,5 mL de água destilada. Os tubos foram incubados por 90 minutos em banho-maria à 95°C, foi realizado leitura em espectrofotômetro de microplaca (Thermo Scientific®) a 540 nm em um volume de 200 µL. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) em relação aos padrões BHT, rutina e vitamina C, de acordo com a equação 5 (Eq. 5):

$$\text{AAR\%} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (padrão)} - \text{Abs (branco)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

As diferenças entre os valores foram tratadas estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e os resultados foram comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5% pelo programa estatístico SISVAR 5.6.

4.4.2 Redução do radical 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH)

O teste de redução do radical DPPH foi realizado com o extrato bruto e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha*, de acordo com a metodologia de Mensor et al. (2001). O ensaio consiste em avaliar a capacidade dos extratos e frações em sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) de coloração púrpura, que quando reduzido transforma-se em difenil-picril-hidrazina de coloração amarela. Foram utilizadas as concentrações de 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450; 500; 550 e 600 µg/mL para a fração hexano das folhas, as concentrações de 150; 250; 300; 350; 400; 450 e 500 µg/mL para a fração hexano do caule, as concentrações de 55; 65; 70; 75; 80; 85; 90; 95 e 150 µg/mL para a fração clorofórmio das folhas, as concentrações 50, 55, 60, 65, 85, 90, 100 e 150 µg/mL para a fração clorofórmio do caule, as concentrações 6, 8, 12, 13, 14, 15 e 20 µg/mL para a concentração acetato de etila da folha, as concentrações 6, 8, 11, 12, 14 e 15 µg/mL para a fração acetato de etila do caule, as concentrações 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55 µg/mL para o extrato bruto de folhas e as concentrações 14, 25, 30, 35, 50, 55, 60 e 65 µg/mL para o extrato bruto do caule. Como controle branco foi utilizado metanol e como controle positivo foi utilizado vitamina C (4, 5, 6, 7, 8

$\mu\text{g/mL}$), BHT (5, 6, 8, 9, 10 $\mu\text{g/mL}$) e rutina (5, 6, 8, 9, 10 $\mu\text{g/mL}$). O teste foi realizado em triplicata.

Com auxílio de uma pipeta automática, foram adicionados em microplaca de 98 poços 142 μL de amostra ou controle branco ou controles positivos, adicionou-se 58 μL de solução de DPPH (0,03 mmol/mL) recém-preparado em metanol. A microplaca foi mantida ao abrigo de luz por 30 minutos e após período de incubação foi realizada leitura em espectrofotômetro de placa (Thermo Scientific[®]) no cumprimento de onde de 540nm. O cálculo da atividade antioxidante relativa (AAR%) foi realizado conforme equação 6 (Eq. 6):

$$\text{AAR\% em relação ao padrão} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (padrão)} - \text{Abs (branco)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da concentração dos extratos e frações que inibem 50% do radical DPPH (IC_{50}) por meio de uma curva analítica para cada amostra. As diferenças entre os valores foram tratadas estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e os resultados foram comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5% pelo programa estatístico SISVAR 5.6.

4.4.3 Fenóis totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada com o extrato bruto e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha*, de acordo com Singleton et al. (1974). Em um tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL do extrato bruto ou frações de *Citronella gongonha* na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, 3,4 mL de água destilada e 0,2 mL de reagente Folin-Ciocalteu. Foi adicionado à reação 0,4 mL Na_2CO_3 (10%) e a mistura foi incubada por 30 minutos ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Após período de incubação foi realizada leitura em espectrofotômetro no cumprimento de onde de 760nm. O conteúdo de fenóis totais foi expresso em equivalente de ácido gálico (EAG) $\mu\text{g/mL}$, de acordo com curva de calibração para o ácido gálico realizado com a seguinte equação da reta: $y=0,0392x - 0,0583$. Os resultados numéricos foram tratados estatisticamente utilizando análise de variância

(ANOVA) e os resultados foram comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5% pelo programa estatístico SISVAR 5.6.

4.5 ATIVIDADE FITOTÓXICA

A avaliação da atividade fitotóxica foi realizada com o extrato bruto e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha* em sementes de alface (*Lactuca sativa*) da marca Feltrin®, com 98% de germinação. Nos ensaios de germinação e crescimento foram utilizadas para folhas e caule as seguintes concentrações: 50; 100; 200; 500; 1000 µg/mL. Foram utilizados como controle negativo água e metanol. O teste foi realizado em quadruplicata. Os ensaios ocorreram em estufa (BOD) com temperatura controlada (20°C ± 0,5°C).

4.5.1 Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado com o extrato bruto e frações de caule e folha de *Citronella gongonha*, de acordo com a metodologia de Maguire (1962).

Em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo 2 papéis Whatman® nº6 previamente esterilizados, foram colocados 5,0 mL das soluções de cada extrato bruto e frações nas concentrações do teste e para os controles negativos foram utilizados água e metanol. As placas de Petri foram deixadas a temperatura ambiente em fluxo laminar para evaporação das soluções. Após 24 horas, as placas foram divididas em 4 quadrantes, recebendo em cada quadrante 5 sementes de alface, totalizando 20 sementes (diáspora) por placa. Foi adicionado 5,0 mL de água destilada em cada placa e levadas agrupadas em cinco, para armazenamento dentro de saco plástico, evitando a perda de umidade dentro da placa.

Durante 7 dias consecutivos foi realizada contagem do número de sementes germinadas, utilizando como critério o aparecimento da protusão radicular de cerca de 3 mm no tegumento. As sementes germinadas foram retiradas das placas. A germinação foi avaliada por meio do Índice de velocidade de germinação (IVG) (Labouriau, 1983). Seguindo a equação 7 (Eq. 7):

$$\frac{\text{Nº de sementes germinadas} + \dots + \text{Nº de sementes germinadas}}{\text{Primeiro dia de contagem} + \dots + \text{Último dia de contagem}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Primeiro dia de contagem

Último dia de contagem

As diferenças entre os valores foram tratadas estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e os resultados foram comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5% pelo programa estatístico SISVAR 5.6.

4.5.2 Teste de crescimento

O teste de crescimento foi realizado com o extrato bruto e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha*, de acordo com a metodologia de Macías, Castellano e Molinillo, (2000).

Foram utilizadas caixas de germinação medindo 11,0 x 11,0 cm² contendo 2 papéis Whatman® nº6 previamente auto clavados. Em cada caixa foram adicionados 6,0 mL das soluções-teste de folha e caule nas concentrações de 1000, 500, 200, 100 e 50 µg/mL. Foram utilizados água e metanol para os controles negativos. As caixas de germinação foram mantidas a temperatura ambiente em fluxo laminar para evaporação dos solventes. Após 24 horas, as caixas foram divididas em 4 quadrantes, recebendo em cada quadrante 5 sementes de alface, totalizando 20 sementes (diáspora) por caixa. Em cada caixa foram adicionadas 6,0 mL de água destilada e armazenadas dentro de saco plástico, evitando a perda de umidade. Durante o período de teste as caixas de germinação foram hidratadas com água destilada.

Durante 7 dias consecutivos foi realizada contagem do crescimento da radícula e hipocótilo para cada concentração e controle negativo utilizando uma régua e papel milimetrado. Ao final do período de teste as plântulas foram refrigeradas para interrupção do crescimento. O crescimento (cm) da radícula e hipocótilo foram calculados e expressos nas médias e desvio padrão para cada concentração testada e controles negativos água e metanol.

As diferenças entre os valores foram tratadas estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e os resultados foram comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5% pelo programa estatístico SISVAR 5.6.

4.6 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O teste para atividade hemolítica foi realizado segundo adaptação do método de Banerjee et al. (2008). Foi avaliada ação hemolítica para o extrato bruto e

frações de caule e folha de *Citronella gongonha* em sangue de carneiro. As concentrações utilizadas para folhas e caule foram 100; 200; 500 e 1000 µg/mL. Foi utilizado como controle negativo solução de PBS e como controle positivo água.

Em eppendorfs (1,5 mL) foram adicionados, em sextuplicata, o volume de 200 µL de cada concentração de folhas e caule ou controles positivo ou negativo. Em seguida foi adicionada a cada tubo, 200 µL de sangue de carneiro 2%, previamente lavado com solução tampão (PBS). Os tubos foram incubados por 3 horas a uma temperatura de 37°C. Logo após tempo de incubação, os eppendorfs foram centrifugados (3000 rpm por 5 minutos) e foi realizado leitura de um volume de 200 µL do sobrenadante em microplaca de 96 poços em um espectrofotômetro de microplaca (Thermo Scientific®) a 540 nm.

Considerou-se como porcentagem de hemólise a proporção da leitura da absorbância para o extrato bruto e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha* sendo calculada conforme equação 8 (Eq. 8):

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{Abs (final)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (positivo)} - \text{Abs (negativo)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

As diferenças entre os valores foram tratadas estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e os resultados foram comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5% pelo programa estatístico SISVAR 5.6.

4.7 TOXICIDADE: *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade em *Artemia salina* foi realizado segundo método descrito por Meyer et al. (1982). As concentrações utilizadas para o teste foram 1000; 750; 500; 250 µg/mL de extrato e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha*. Foi utilizado como controle negativo solução de salina e DMSO (1%) e como controle positivo dodecilsulfato de sódio (SDS) nas concentrações 30; 20; 10 e 5 mg/mL.

A solução salina foi preparada com água destilada e sal marinho (30 g/L). Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/L) foram incubados durante 48 h em solução de salina, previamente aerados e solução com pH 7-8. Nas primeiras 24 horas foram removidos da solução de salina os ovos não eclodidos. Após 48 horas, 10 náupilos

foram transferidos para eppendorfs (1,5 mL) contendo os extratos e frações nas concentrações citadas acima. As concentrações de extrato e frações e controles foram realizados em quadruplicata. Após o período de 24 horas de exposição, foram contabilizados para cada concentração de extrato, fração e controles o número de náupilos imóveis/mortos. Foram utilizados como critérios para validação do teste: a imobilização de até 10% da população de náupilos para o controle negativo; 100% dos náupilos devem ser imobilizados na maior concentração testada e a CE₅₀ para o controle negativo deve estar entre as concentrações de 13 e 30 mg/mL (Petrobras, 2006).

Os dados foram tratados pelo método Probit com o objetivo de estimar a concentração efetiva que imobiliza 50% dos indivíduos (CE₅₀) com 95% de confiabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATERIAL BOTÂNICO

5.1.1 Controle de qualidade da matéria prima vegetal

5.1.1.1 Determinação do teor de umidade e cinzas

O controle de qualidade da matéria-prima vegetal é realizado com a determinação de parâmetros físico-químico do vegetal, tais como granulometria, densidade aparente, umidade, pH e cinzas totais. A determinação destes parâmetros auxilia na identificação correta do material vegetal e atua como sinalizador para contaminantes, indicando a presença de material estranho ou outras espécies de plantas (OMS, 1998). De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), o percentual máximo de umidade aceitável para as drogas vegetais é de 15% e o teor de cinzas totais variando entre 2 a 20%. Os resultados para determinação de umidade e cinzas de folhas e caule de *Citronella gongonha* estão apresentados na TABELA 1:

TABELA 1- DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS PARA AMOSTRA DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha*.

AMOSTRA	UMIDADE	CINZA
FOLHA	8,40 ± 0,32%	9,11 ± 0,04%
CAULE	9,98 ± 0,77%	5,42 ± 0,22%

FONTE: A autora (2018).

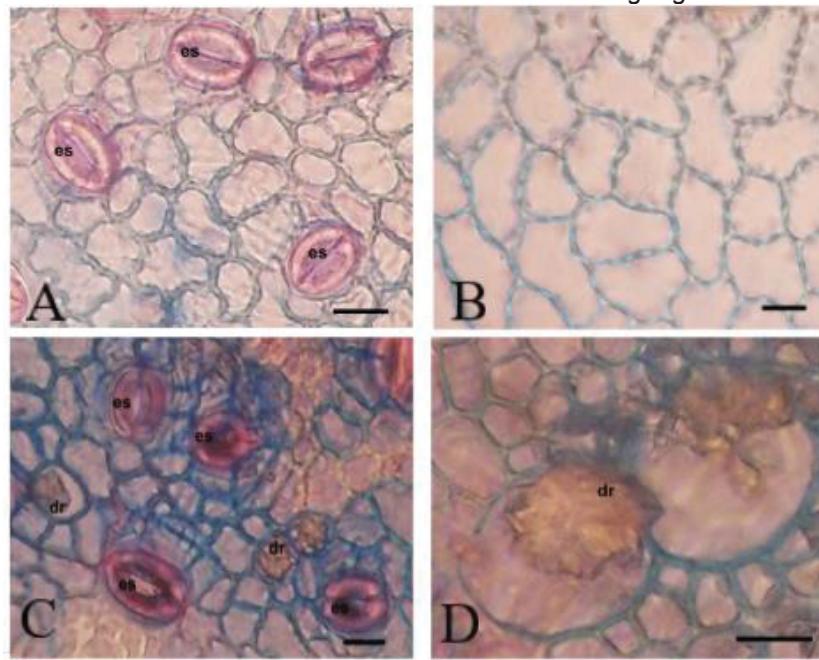
5.2 MORFOANATOMIA COMPARATIVA ENTRE AS ESPÉCIES *CITRONELLA GONGONHA* E *CITRONELLA PANICULATA*

A caracterização morfoanatomica de uma espécie vegetal é um dos aspectos considerados para identificação da mesma. O gênero *Citronella* possui cerca de 32 espécies catalogadas (TROPICOS, 2018), no entanto nenhuma espécie possui estudos morfoanatomicos publicados. No Brasil, em áreas úmidas de Floresta Atlântica é comum a presença de duas espécies deste gênero: *Citronella gongonha* e *Citronella paniculata*.

As folhas de *Citronella gongonha*, medem aproximadamente 5,6 - 9,5 cm de comprimento e 5,6 de largura e o pecíolo com 1,5 cm de comprimento. As folhas são elípticas, ápice aculeado, margem denteada com cerca de 6 a 8 dentes, base atenuada e glabra. A espécie *Citronella paniculata* apresentou folhas maiores com cerca de 18 cm de comprimento e 7,1 cm de largura e o pecíolo com 1,0 cm, ovais, ápice acuminado, margem inteira, base atenuada e glabra. Essas características são condizentes às descritas por Mazine; Souza & Rodrigues (2005).

Em cortes paradermicos das folhas de *Citronella gongonha* observou-se células epidérmicas com paredes espessas e levemente onduladas em ambas as faces, com campos de pontuação primários visíveis (FIGURA 6 - imagens A e B). As células epidérmicas de *Citronella paniculata* também apresentou paredes espessas em ambas as faces, no entanto se diferenciam pelo formato reto na face adaxial e levemente ondulado na face abaxial (FIGURA 6 – imagem C). Ainda, observou-se para *Citronella paniculata* a presença de numerosas drusas nas células epidérmicas em vista frontal (FIGURA 6 – imagens D).

FIGURA 6- VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DE *Citronella gongonha* E *Citronella paniculata*



FONTE: A autora (2018).

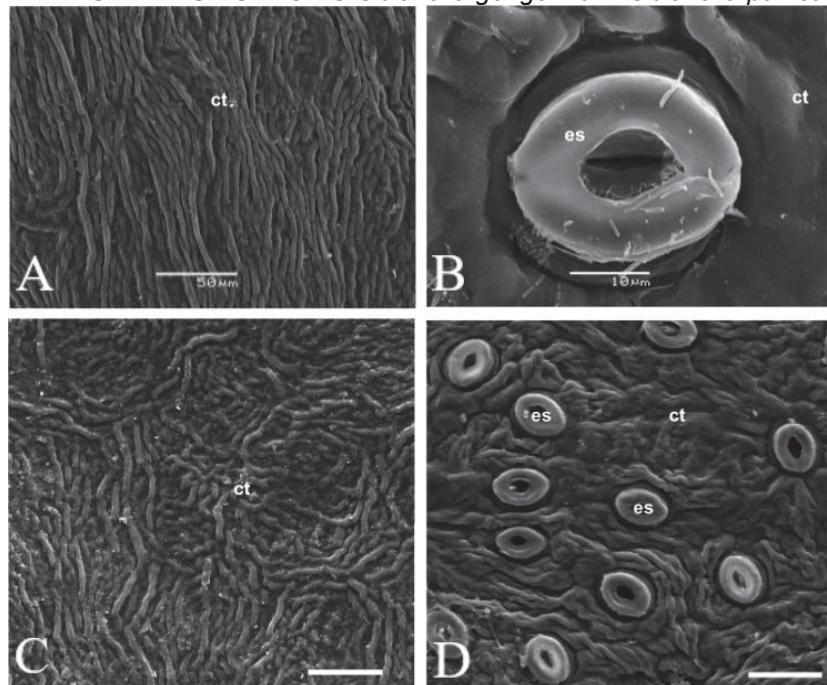
LEGENDA: A, B: *Citronella gongonha*; C, D: *Citronella paniculata*; A: Face abaxial; B: Face adaxial; C: face abaxial; D: face adaxial evidenciando drusas; es: estômato; dr: drusa.

NOTA: Barra= 50 µm.

A epiderme foliar analisada por microscopia eletrônica de varredura possibilitou a observação da cutícula estriada em ambas as faces de *Citronella*

gongonha (FIGURA 7 - imagem A). A mesma ornamentação cuticular foi observada em *Citronella paniculata* (FIGURA 7 – imagem C). As folhas das duas espécies são hipoestomáticas e os estômatos são classificados como anomocíticos (FIGURA 7 - imagens B e D).

FIGURA 7 - VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS ESPÉCIES *Citronella gongonha* E *Citronella paniculata*



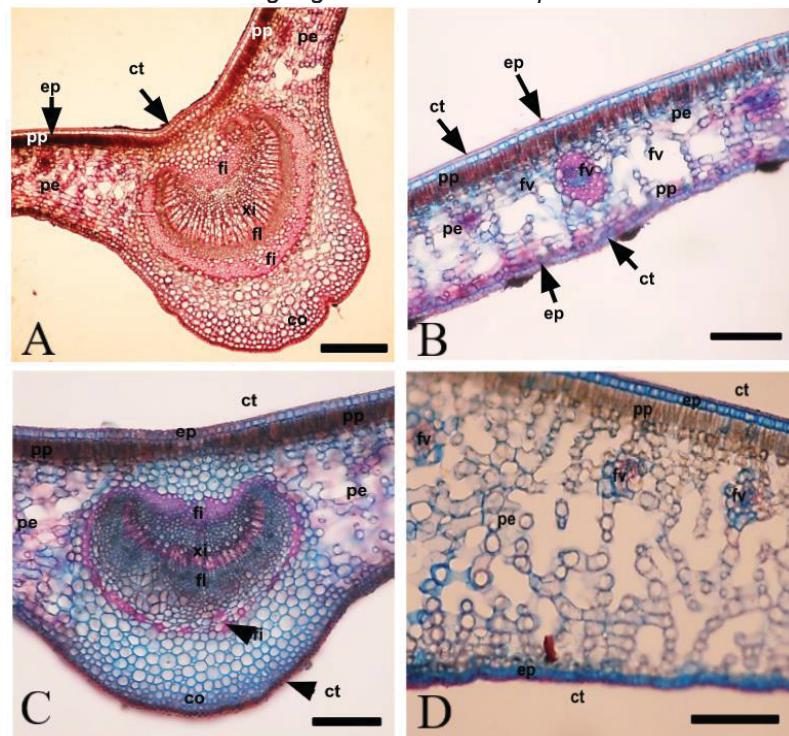
FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: A, B: *Citronella gongonha*; C, D: *Citronella paniculata*; A: Face adaxial; B: Face abaxial; C: Face adaxial; D: face abaxial; ct: Cutícula; es: estômato.

NOTA: Barra= 50 µm (A, C e D) 10µm (B).

Em secção transversal, a epiderme de *Citronella gongonha* mostrou-se uniestratificada com células isodiamétricas em ambas as faces as quais são recobertas por cutícula que reagiram positivamente à reação com Sudam III para presença de compostos lipídicos (FIGURAS 8 – imagens A e B). Em *Citronella paniculata* a epiderme também se mostrou uniestratificada, no entanto apresenta células isodiamétricas mais achadas na face abaxial e retangulares na face adaxial (FIGURAS 8 – imagens C e D). Para as duas espécies foram observados subjacente à epiderme a ocorrência de 3-4 camadas de colênquima angular. As duas espécies apresentam mesofilo dorsiventral sendo formado por uma camada de parênquima paliçádico. Para a espécie *Citronella gongonha* foi observado de 8-10 estratos que compõe o parênquima esponjoso e para *Citronella paniculata* foi observado 10-15 estratos na composição do parênquima esponjoso.

FIGURA 8 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL E MESOFILO DAS ESPÉCIES *Citronella gongonha* E *Citronella paniculata*



FONTE: A autora (2018).

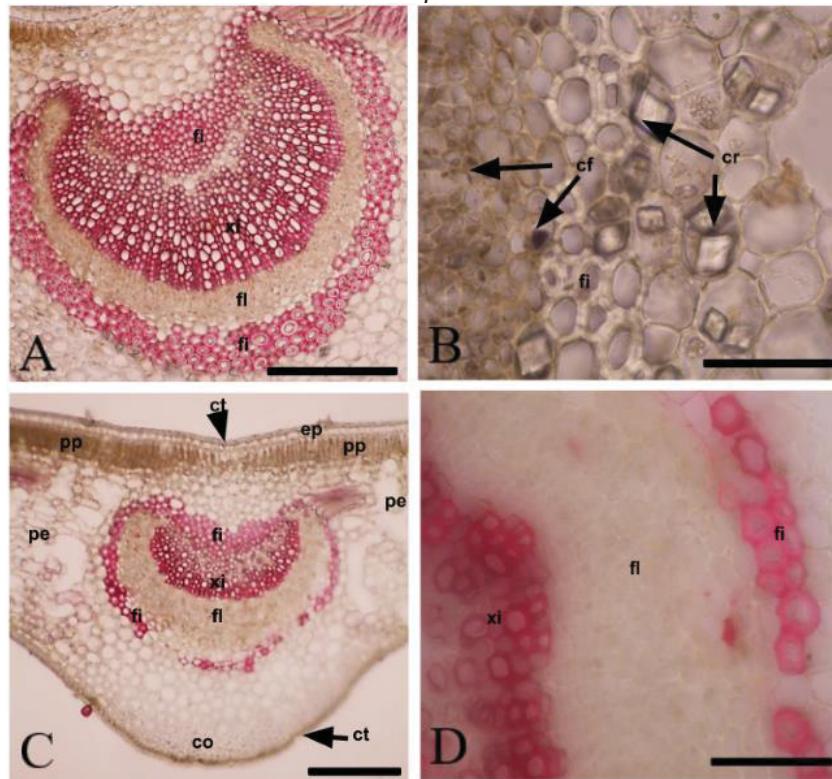
LEGENDA: A, B: *Citronella gongonha*. C, D: *Citronella paniculata*. A: Nervura central; B: Detalhes do mesofilo; C: Detalhes do feixe vascular; D: Detalhes do colênquima; co: colênquima; ct: cutícula; ep: epiderme; fi: fibras; fl: floema; fv: feixe vascular; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema.

NOTA: Barra = 100 µm (A, B e C) 200 µm (D).

A nervura central da espécie *Citronella gongonha* possui formato côncavo convexo, apresentando no parênquima esponjoso feixes vasculares colaterais de pequeno porte. Ainda, foram observadas bainhas de fibras envolvendo todo o feixe vascular que reagiram com floroglucina clorídrica indicando a presença de lignina (FIGURA 9 – imagem A). Foi observado próximo à bainha de fibras reação positiva para cloreto férreo indicando a presença de compostos fenólicos, além da presença de cristais prismáticos e drusas de oxalato de cálcio (FIGURA 9 – imagem B).

A nervura central da espécie *Citronella paniculata* possui formato plano-convexo. A reação com floroglucina clorídrica também foi positiva para esta espécie, no entanto apresentou menor quantidade de fibras envolvendo o feixe vascular, principalmente na face abaxial. A espécie não apresentou cristais ou drusas de oxalato de cálcio próximos ao feixe vascular (FIGURA 9 – imagem C e D).

FIGURA 9- TESTES HISTOQUÍMICOS DA REGIÃO FOLIAR DAS ESPÉCIES *Citronella gongonha* E *Citronella paniculata*



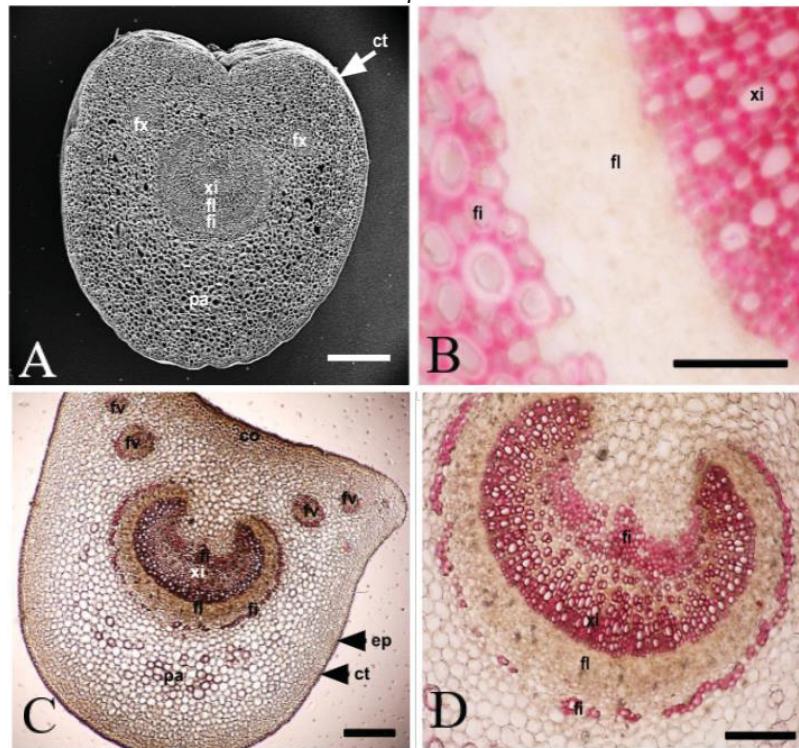
FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: A e B: *Citronella gongonha*; C e D: *Citronella paniculata*; A: detalhe do feixe vascular evidenciado com floroglucina clorídrica; B: discretas substâncias fenólicas evidenciadas por cloreto férreo e cristais de oxalato de cálcio; C: feixe vascular evidenciado com floroglucina clorídrica; D: detalhe do feixe vascular mostrando menor quantidade de fibras; cf: compostos fenólicos; ct: cutícula; ep: epiderme; fi: fibras; fl: floema; pe: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; xi: xilema.

NOTA: Barra = 100µm (C), 200 µm (A, B e D).

No corte transversal do pecíolo das duas espécies se observou o mesmo padrão no formato levemente côncavo na face adaxial e convexo na abaxial para *Citronella gongonha* e formato plano-convexo para *Citronella paniculata* (FIGURA 9 - imagens A e C). As epidermes dos pecíolos de ambas as espécies são uniestratificadas e apresentam uma cutícula espessa que reagiu positivamente à pesquisa de compostos lipofílicos com o reativo Sudam III da mesma forma que a folha (FIGURA 10 – imagem A e C).

FIGURA 10- SECÇÃO TRANSVERSAL DE PECÍOLO DAS ESPÉCIES *Citronella gongonha* E *Citronella paniculata*



FONTE: A autora (2018).

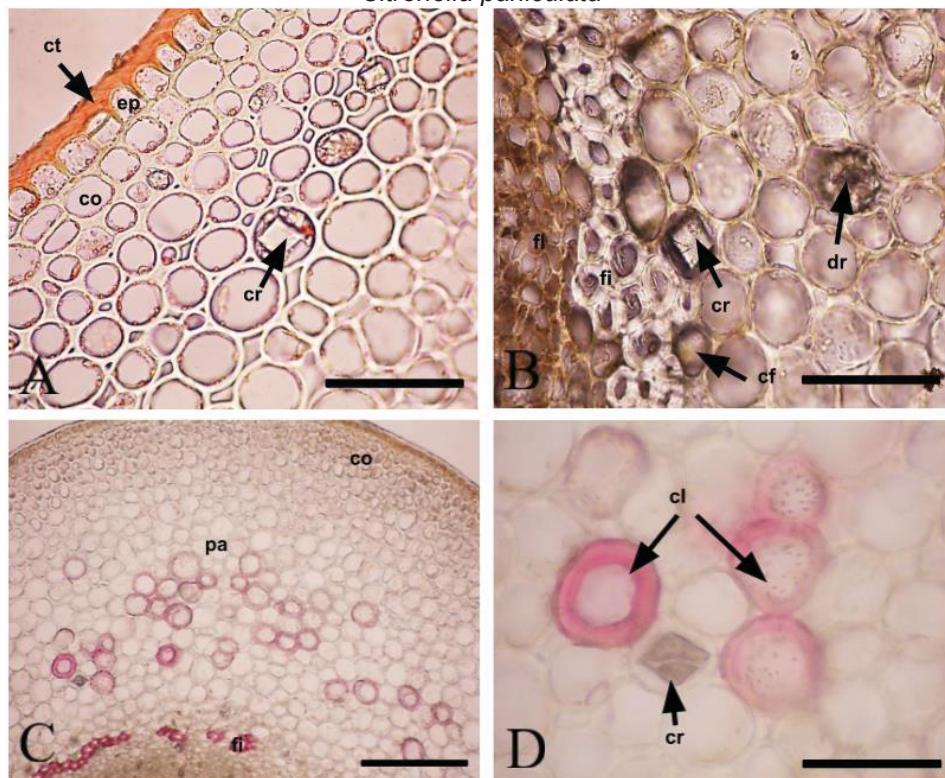
LEGENDA: A e B: *Citronella gongonha*; C e D: *Citronella paniculata*; A: visão geral do pecíolo em microscopia eletrônica de varredura (MEV); B: visão geral do pecíolo em microscopia óptica; C: feixe vascular evidenciado com floroglucina clorídrica; D: detalhes do feixe vascular; ep: epiderme; fi: fibras; fl: floema; pa: parênquima; xi: xilema.

NOTA: Barra = 500 µm (A), 100 µm (B) 200 µm C e D.

O sistema vascular do pecíolo em *Citronella gongonha* é composto por um feixe único envolvido por bainha de fibra que reage positivamente à floroglucina clorídrica. Para a espécie *Citronella paniculata* foi observado uma menor quantidade de fibras, assim como foi descrito para nervura central, no entanto, algumas células lignificadas foram evidenciadas dispersas no parênquima (FIGURA 10 – imagens C e D).

Próximo à bainha de fibras em *Citronella gongonha* ocorrem drusas e cristais prismáticos de oxalato de cálcio os quais tiveram sua confirmação de composição com a reação com ácido sulfúrico (FIGURA 11 - imagem B). Em *Citronella paniculata*, escassos cristais de oxalato são observados e drusas são ausentes. Discretos idioblatos fenólicos foram evidenciados junto ao feixe vascular pela reação com cloreto férlico em ambas as espécies.

FIGURA 11 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO PECÍOLO DAS ESPÉCIES *Citronella gongonha* E *Citronella paniculata*



FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: A e B: *Citronella gongonha*; C e D: *Citronella paniculata*. A: detalhe da cutícula evidenciada com Sudam III; B: cristais e drusas de oxalato de cálcio e escassos compostos fenólicos próximos ao feixe vascular; C: parênquima e visão geral das células lignificadas; D: detalhe para as células lignificadas e cristal prismático; cf: composto fenólico; cl: célula lignificada; co: colênquima; cr: cristal; ct: cutícula; dr: drusa; ep: epiderme; fi: fibras; fl: floema; pa: parênquima.

NOTA: Barra = 200µm.

Na TABELA 2 estão resumidas as principais características observadas em microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura para as folhas e pecíolo das duas espécies do gênero *Citronella*.

TABELA 2 - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS PARA *Citronella gongonha* E *Citronella paniculata*

ESTRUTURAS	<i>Citronella gongonha</i>	<i>Citronella paniculata</i>
CÉLULAS	ondulada	Reta / presença de drusas de oxalato de cálcio
EPIDÉRMICAS		
CUTÍCULA	estriada em ambas as faces	
ESTÔMATO	anomocíticos hipoestomático	
EPIDERME	uniestratificada com células isodiamétricas	uniestratificada com células isodiamétricas retangulares (adaxial) achatadas (abaxial)
COLENQUIMA		3-4 camadas

ANGULAR		
PARENQUIMA		
ESPONJOSO	8 – 10 estratos	10 – 15 estratos
NERVURA CENTRAL	côncavo-convexo	plano-convexo
BAINHA DE FIBRAS	abundante / presença de cristais e drusas de oxalato de cálcio / compostos fenólicos	escasso
PECÍOLO	côncavo-convexo	plano-convexo
BAINHA DE FIBRAS	abundante / presença de cristais e drusas de oxalato de cálcio / compostos fenólicos	escasso / presença de células lignificadas dispersas / cristais de oxalato de cálcio / compostos fenólicos

FONTE: A autora (2018).

Analisando o perfil morfoanatômico entre as duas espécies do gênero *Citronella* é possível observar diferenças no formato das células epidérmicas, no número de estratos do parênquima esponjoso, no formato da nervura central e pecíolo e quantidade de lignina que compõe a bainha de fibras que envolvem os feixes vasculares. A principal diferença observada entre as espécies se dá pelo formato da nervura central e pecíolo que se apresenta no formato côncavo-convexo para *Citronella gongonha*, enquanto se apresenta no formato plano-convexo para *Citronella paniculata*. Além disso, vale destacar uma maior quantidade de células lignificadas que compõem a bainha de fibras observada para *Citronella gongonha*, quando comparada a *Citronella paniculata*. Simões et al., (2001) correlaciona a presença de ligninas com as propriedades antioxidantes dos vegetais, dessa forma, é possível sugerir uma maior propriedade antioxidante para *Citronella gongonha* quando comparada a *Citronella paniculata*, pois a primeira espécie apresenta uma quantidade maior deste metabólito em sua morfoanatomia.

Os achados apresentados para as duas espécies são descritos pela primeira vez em literatura para o gênero *Citronella*, sendo um importante parâmetro para identificação entre as espécies e caracterização da família Cardiopteridaceae.

5.3 ANÁLISE QUÍMICA

5.3.1 Teor de sólidos e rendimento das frações

Os resultados referentes a porcentagem do teor de sólidos dos extratos brutos, assim como o cálculo do rendimento das frações obtidas no particionamento do extrato bruto com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila de folhas e caule de *Citronella gongonha* estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 - RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha*.

AMOSTRAS	EXTRATO BRUTO	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA
FOLHA	18,91% ^a	2,30% (11,9 g) ^b	1,34% (6,9 g) ^b	1,36% (7,0 g) ^b
CAULE	9,44% ^a	0,48% (2,8 g) ^b	0,52% (3,0 g) ^b	0,48% (2,8 g) ^b

FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: ^a Calculo de rendimento do extrato bruto baseado no teor de sólidos; ^b Valor do peso seco das frações obtidas após o particionamento do extrato bruto com os diferentes solventes.

5.3.2 Screening fitoquímico

A cromatografia em camada delgada é uma técnica versátil, de baixo custo e grande repetitividade. A separação de compostos está fundamentada no fenômeno físico relacionado a adsorção/desadsorção, na qual a sílica (SiO_2) é o adsorvente mais utilizado nesta técnica. A seleção da fase móvel tem papel fundamental no sucesso da separação dos componentes da mistura, considerando a polaridade da fase móvel e a natureza química das substâncias a serem separadas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia em camada delgada realizada com o extrato bruto e frações de folha e caule de *Citronella gongonha* foram avaliadas de acordo com Wagner e Bladt (1996) evidenciando a presença de esteróides e triterpenos para a fração hexano (Vanilina sulfúrica), presença de compostos fenólicos (Cloreto férlico) e flavonóides (NEU) para a fração acetato de etila. Ainda nesta mesma fração, foi observada presença de bandas azul fluorescente sugerindo a presença de cumarinas (NEU). Não foi observada reação com o revelador Dragendorff. Os extratos aquosos

de folha e caule foram testados para presença de saponinas e taninos pelo método clássico e apresentaram reação positiva para estes grupos de metabólitos. Os testes realizados para folhas e caule apresentaram os mesmos resultados, sugerindo que estes tecidos vegetais apresentam o mesmo perfil metabólico. A TABELA 4 resume os resultados obtidos para o *screening* fitoquímico desta espécie.

TABELA 4- PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonga*

Amostras	Esteróides /Triterpenos	Flavonóides	Compostos Fenólicos	Cumarinas	Alcalóides	Saponinas	Taninos
Extrato bruto	+	+	+	+	-	-	-
Fração hexano	+	-	-	-	-	-	-
Fração clorofórmio	-	-	-	-	-	-	-
Fração acetato de etila	-	+	+	+	-	-	-
Extrato aquoso	-	-	-	-	-	+	+

FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: + presença do metabólito secundário; - ausência/não detecção do metabólito secundário.

NOTA: O extrato aquoso foi testado apenas para presença de saponinas e taninos.

Os resultados obtidos estão de acordo com as reações positivas obtidas na morfoanatômia para os reativos Sudam III e cloreto férrico, confirmando a presença de compostos terpênicos e fenólicos, respectivamente. O *screening* fitoquímico também corrobora com o perfil de metabólitos secundários presente na família Cardiopteridaceae, descritos por Kaneko et al (1994), Damtoft et al. (1993) e Su et al. (2016), que evidenciaram a presença de flavonóides (apeginina 7-O-β-apiofuranosil (1→6)-β-d-glucopiranosídeo, apigenina, apigenina-5,7-dimetil eter, apigenina trimetil eter, apigenina 7-O-glucosídeo, apigenina 7-O-neoesperidosídeo e vitexina), saponinas (etyl-leptaulosídeo A, B e C e sesquiterpeno cinamosmolídeo) e terpenóides (gonocarosídeos, ácido kingisídico, ácido 8-epi-kingisídico, 8-epi kingisídeo, swerosídeo e secoxiloganina).

5.3.3 Identificação de compostos por espectrometria de massas

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray (IES-EM) é uma técnica amplamente difundida para determinação do peso molecular, quantificação de substâncias e estudos de determinação estrutural. A formação dos íons observados no espectro de massas está relacionada com as propriedades químicas das substâncias em análise. Os compostos fenólicos e ácidos carboxílicos por apresentarem características ácidas são analisados no modo negativo, preferencialmente. A formação de moléculas desprotonadas (íons moleculares $[M-H]^-$) produzidas por reações ácido/base no processo de ionização permite a identificação dos compostos fenólicos no espectro gerado. Além da análise em modo negativo parâmetros como o pH e a escolha do solvente são importantes para geração de moléculas desprotonadas (CROTTI et al. 2006).

Foi aplicada a metodologia de Bastos (2007) com adaptações para a análise do extrato bruto etanólico de folhas e caule de *Citronella gongonha* a fim de identificar os compostos fenólicos observados no screening fitoquímico (5.3.1). Na TABELA 5 estão os compostos identificados por espectrometria de massas dos extratos brutos de *Citronella gongonha*.

TABELA 5- ÍONS MOLECULARES E FRAGMENTOS ENCONTRADOS PARA AS FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha* EM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.

COMPOSTOS	FOLHA Íon molecular $[M-H]^-$ (fragmento m/z)	CAULE Íon molecular $[M-H]^-$ (fragmento m/z)
Ácido cafético	179 (135)	179 (135)
Ácido quínico	191 (85, 111)	191 (85, 93, 111)
Epicatequina (EP)	289 (245)	289 (109, 205)
Cafeoila glicose	341 (179)	341 (119)
Ácido cafeoilquínico	353 (191, 179)	353 (135, 191)
Ácido feruloilquínico	367 (191, 193)	367 (191, 173)
Epicatequina galato (ECG)	441 (135)	---
Metil epicatequina galato	---	455 (407, 375)

Metil epigalocatequinana galato (EGCG)	---	471 (441)
Ácido dicafeoilquínico	515 (353)	515 (353)

FONTE: A autora (2018).

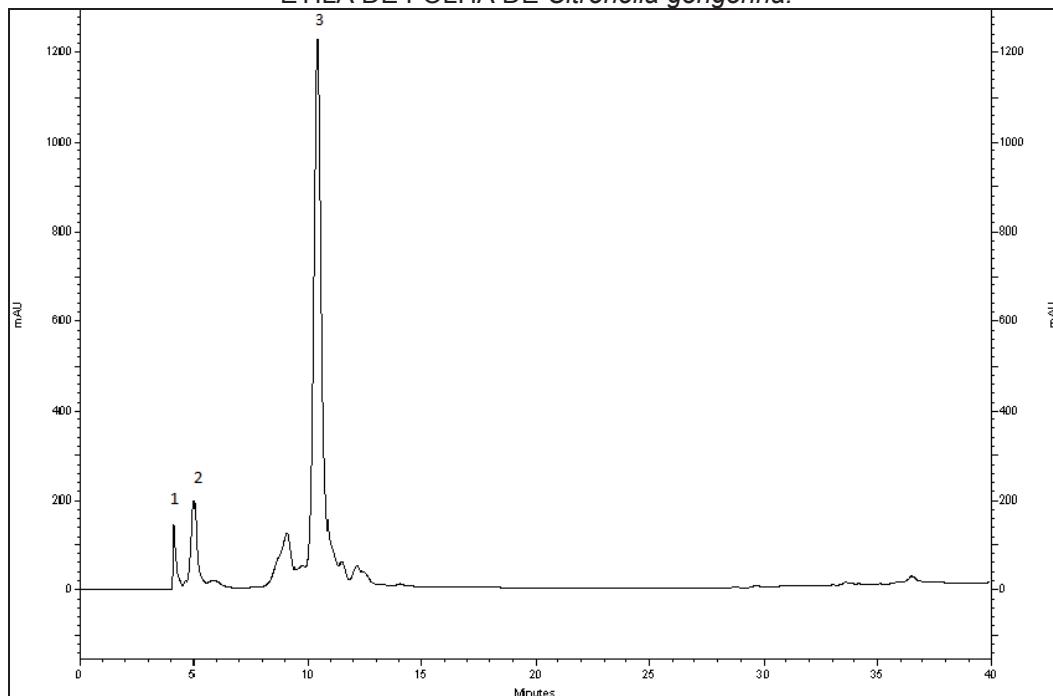
A partir das massas e fragmentos obtidos foi possível identificar os ácidos clorogênicos (ácido cafeoilquínico, ácido feruloiquínico, ácido dicafeoilquínico) as catequinas (epicatequina, epicatequina galato, metil epicatequina galato, metil epigalocatequinana galato) e os derivados do ácido cinâmico (ácido caféico, ácido quínico e cafeoil glicose). Foram identificados oito compostos fenólicos para o extrato bruto das folhas e nove compostos fenólicos para o extrato bruto do caule (APÊNDICE 1-5). A presença destes compostos sugere propriedades antioxidantes para o extrato bruto de folhas e caule de *Citronella gongonha*.

No geral, os compostos fenólicos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes devido a presença de anel aromático e grupamentos hidroxilos doadores de hidrogênio, que atuam na redução dos radicais livres. A publicação de estudos sobre estas substâncias é extensa e demonstra uma série de atividades biológicas. Hao et al. (2012) observou atividade hepatoprotetora para o ácido isoclorogênico. Assim como, Wen et al. (2003) demonstrou que os ácidos fenólicos se mostraram ativos contra as cepas de *Listeria monocytogenes*, além da atividade anti HIV apresentada no trabalho publicado por Prinsloo et al. (2018). Kulkarni et al. (2015), isolou glicosídeos cefeoila da espécie *Nandina domestica* e registrou seu potencial terapêutico para o tratamento de inflamações vasculares. Os derivados do ácido cefeoila e cumaroila isolados da espécie *Acacia cochliacantha* demonstraram promissoras atividades anti-helmínticas (CASTILLO-MITRE et al. 2017), assim como atividade antifúngica contra cepas de *Aspergillus* (SUÁREZ-QUIROZ et al. 2013). Em publicações de Chen et al. (2014) foi possível observar a redução de tumores em 37% de seu peso quando administrado em linhagem de células cancerígenas os derivados de ácidos cafeoila e feruoila. E por fim, de acordo com revisão de literatura realizada por Lamarão; Fialho (2009) catequinas se mostraram muito eficazes no tratamento de obesidade induzindo a apoptose de células de gordura em diversos estudos realizados com extrato de chá verde (*Camellia sinensis*).

5.3.4 Identificação de compostos por cromatografia líquida de alta-eficiência

Aplicando-se a técnica de cromatografia em coluna para fração acetato de etila das folhas de *Citronella gongonha* obteve-se cerca de 0,5 g de um pó amarelo denominado FLA 1. A fim de identificar o composto obtido da fração acetato de etila foi utilizada cromatografia de alta eficiência segundo metodologia publicada por Ferracane et al. (2010). O cromatograma da FIGURA 12 revela o perfil cromatográfico da amostra FLA 1.

FIGURA 12- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA FLA 1 PURIFICADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Citronella gongonha*.



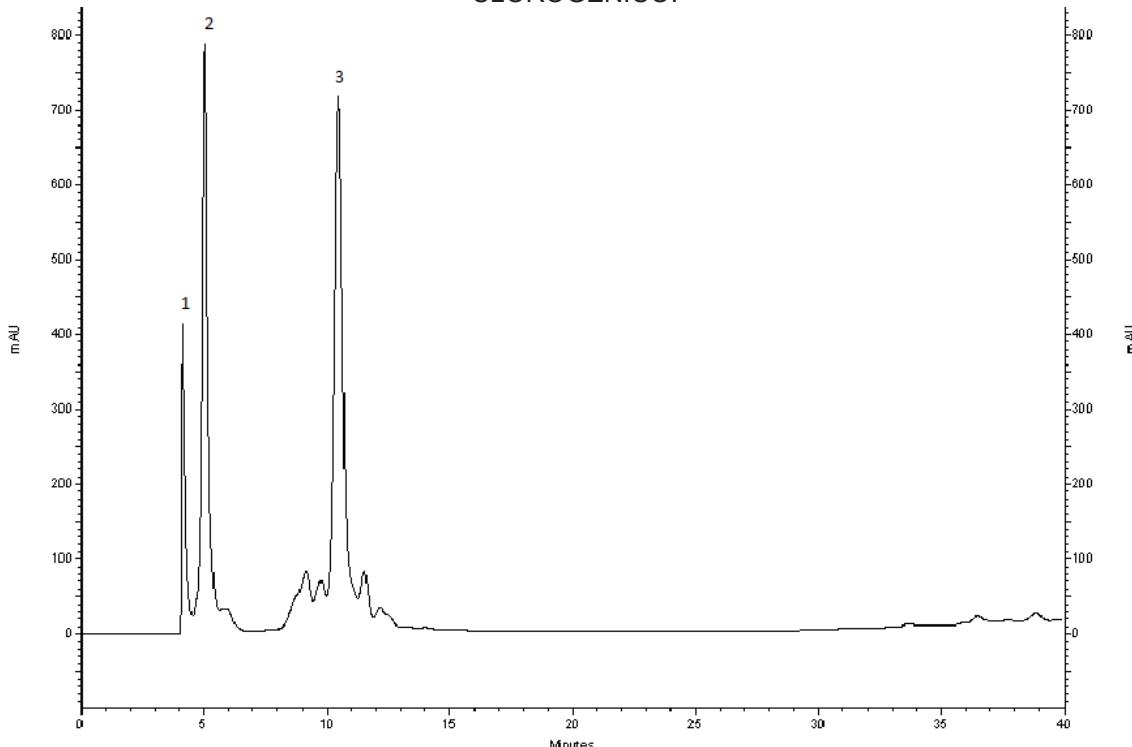
FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: 1: composto nº 1 com tempo de retenção 4,12 min; 2: composto nº 2 com tempo de retenção 5,02 min; 3: composto nº 3 com tempo de retenção 10,45 min (composto majoritário da amostra FLA 1).

A análise do cromatograma obtido sugere que a amostra FLA 1 é uma mistura de três compostos distribuídos nos tempos de retenção 4,12; 5,02 e 10,45 minutos, respectivamente. Sendo o composto majoritário desta fração numerado como 3, seguido dos compostos 2 e 1, de acordo com a intensidade dos picos registrado pelo cromatograma. A análise do perfil UV dos picos 1 e 2 pela base de dados da biblioteca do cromatógrafo sugeriu a presença de ácido clorogênico. Dessa forma, uma co-injeção da amostra e padrão ácido clorogênico foi realizada na proporção 3:1, a fim de se observar um aumento na intensidade dos picos 1 e 2,

resultado do aumento da concentração do ácido clorogênico. O padrão ácido clorogênico utilizado nesta análise foi isolado no laboratório de fitoquímica da UFPR. A FIGURA 13 apresenta o cromatograma obtido após co-injeção das amostras seguindo a mesma metodologia.

FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DA CO-INJEÇÃO DAS AMOSTRA FLA 1 E PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO.

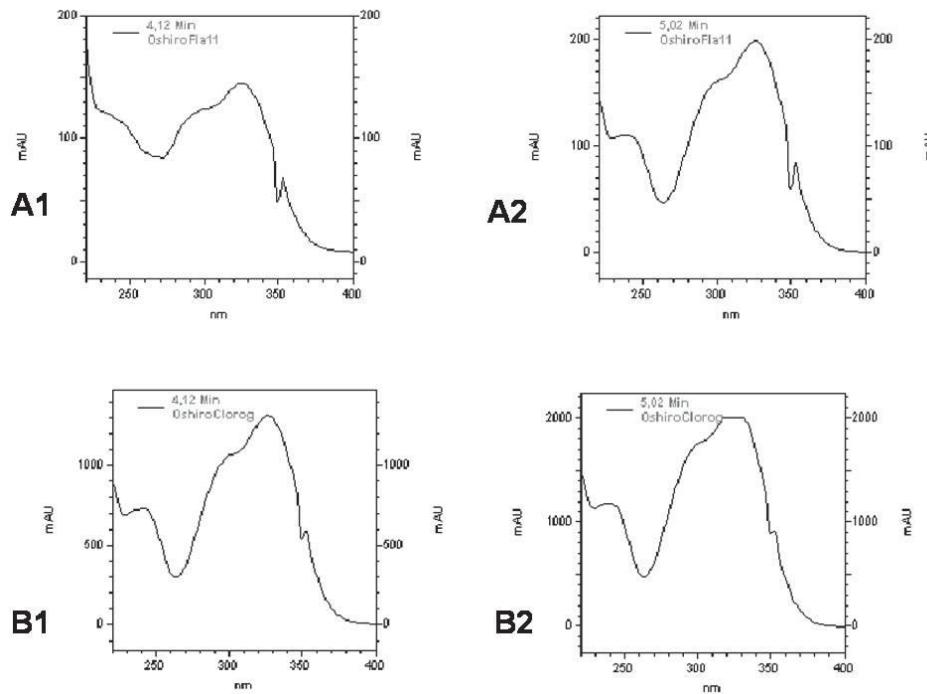


FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: Aumento das intensidades dos picos 1 e 2 após co-injeção com padrão ácido clorogênico.

O aumento da intensidade dos picos nº 1 e nº 2 demonstram a presença de ácido clorogênico na amostra FLA 1, corroborando com o perfil UV sugerido pelo cromatógrafo para os picos nº 1 e nº 2. A FIGURA 14 representa o perfil UV dos picos nº 1 e nº 2 da amostra FLA 1 e o perfil UV para o padrão ácido clorogênico.

Figura 14 - PERFIL UV PARA OS PICOS N° 1 E N° 2 DA AMOSTRA FLA 1

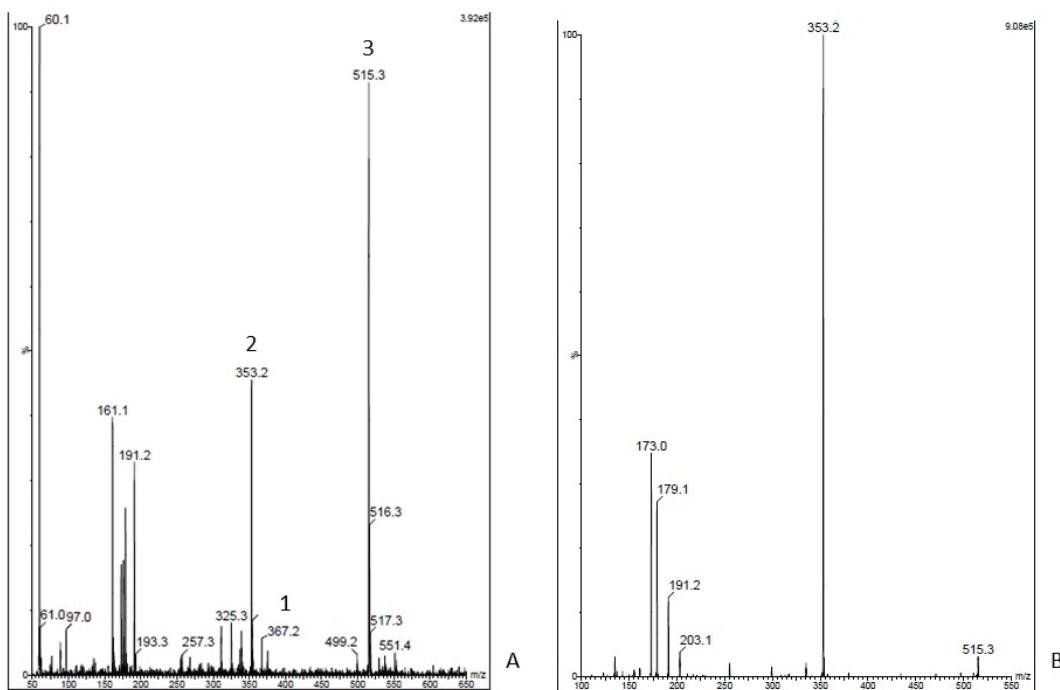


FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: A1: perfil UV para o pico n° 1 (4,12 min); A2: perfil UV para o pico n° 2 (5,02 min); B1 e B2: perfil UV para o padrão ácido clorogênico.

O termo ácido clorogênico representa um conjunto de substâncias, que incluem os ésteres dos ácidos hidroxicinâmico, quínico, coumaroilquínico, feruloíla, cafeoíla e dicafeoíla. Para nomear os compostos n° 1 e n° 2 identificados como ácido clorogênico foi realizado espectroscopia de massa para amostra FLA 1. Do mesmo modo, utilizou-se essa técnica para identificação do composto majoritário n° 3. A FIGURA 15 representa o espectro de massas da amostra FLA 1.

FIGURA 15 - ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA FLA1



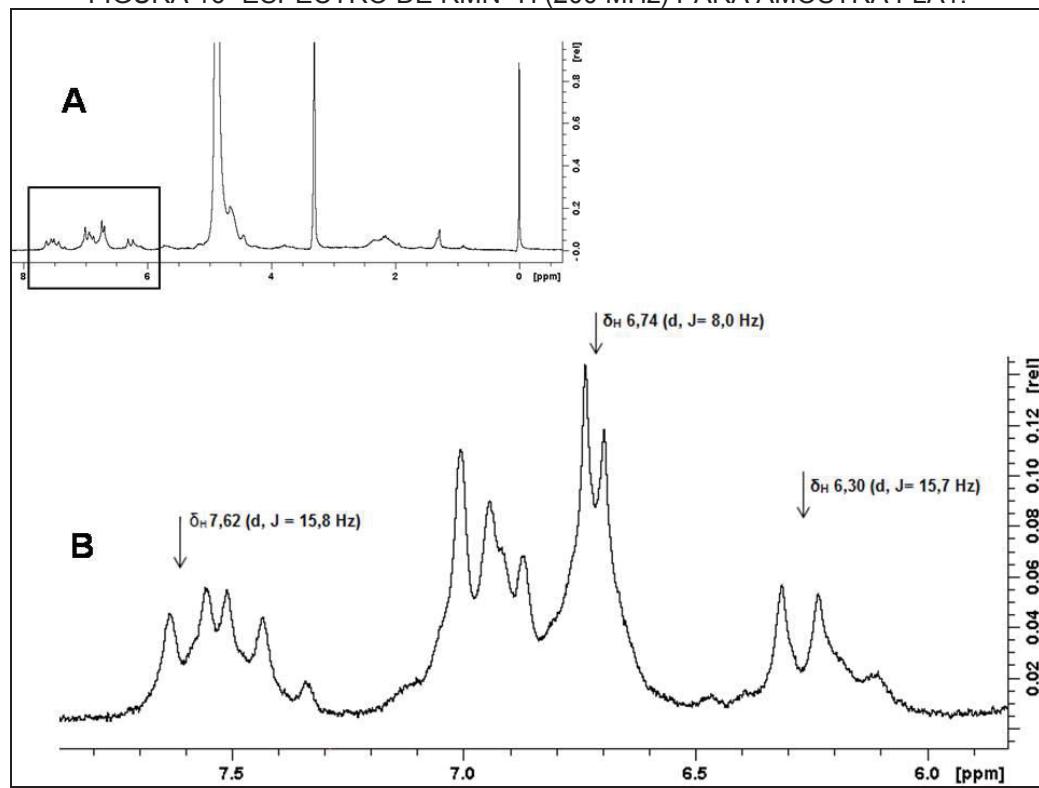
FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: A: identificação dos compostos ácido feruloilquínico (1), ácido cafeoilquínico (2) e ácido dicafeoilquínico (3), pertencentes à família dos ácidos clorogênicos; B: Perfil de fragmentação do ácido dicafeoilquínico, composto majoritário da amostra FLA 1.

O espectro de massas da amostra FLA 1 identificou o composto nº 1 como o ácido feruloilquínico (367,2 m/z), o composto nº 2 como ácido cafeoilquínico (353,2 m/z) e o composto majoritário nº 3 como ácido dicafeoilquínico (515,3 m/z). A presença destes compostos corrobora com a análise de massas realizada para o extrato bruto de *Citronella gongonha*, no qual estes compostos haviam sido identificados. Adicionalmente, foi realizada análise de ^1H e ^{13}C em equipamento de RMN a fim de adquirir informações adicionais sobre a amostra FLA 1.

5.3.5 Identificação de composto por ressonância magnética nuclear

A técnica de RMN é uma das mais utilizadas para identificação de produtos naturais, uma vez que a espectroscopia de RMN mede as propriedades de núcleos (^1H , ^{13}C entre outros) e não de moléculas. A análise do deslocamento químico (δ), multiplicidade dos sinais e integral obtidos no espectro de RMN, possibilita a elucidação estrutural da molécula química. A FIGURA 16 apresenta o espectro de RMN ^1H para a amostra FLA 1.

FIGURA 16- ESPECTRO DE RMN ^1H (200 MHz) PARA AMOSTRA FLA1.

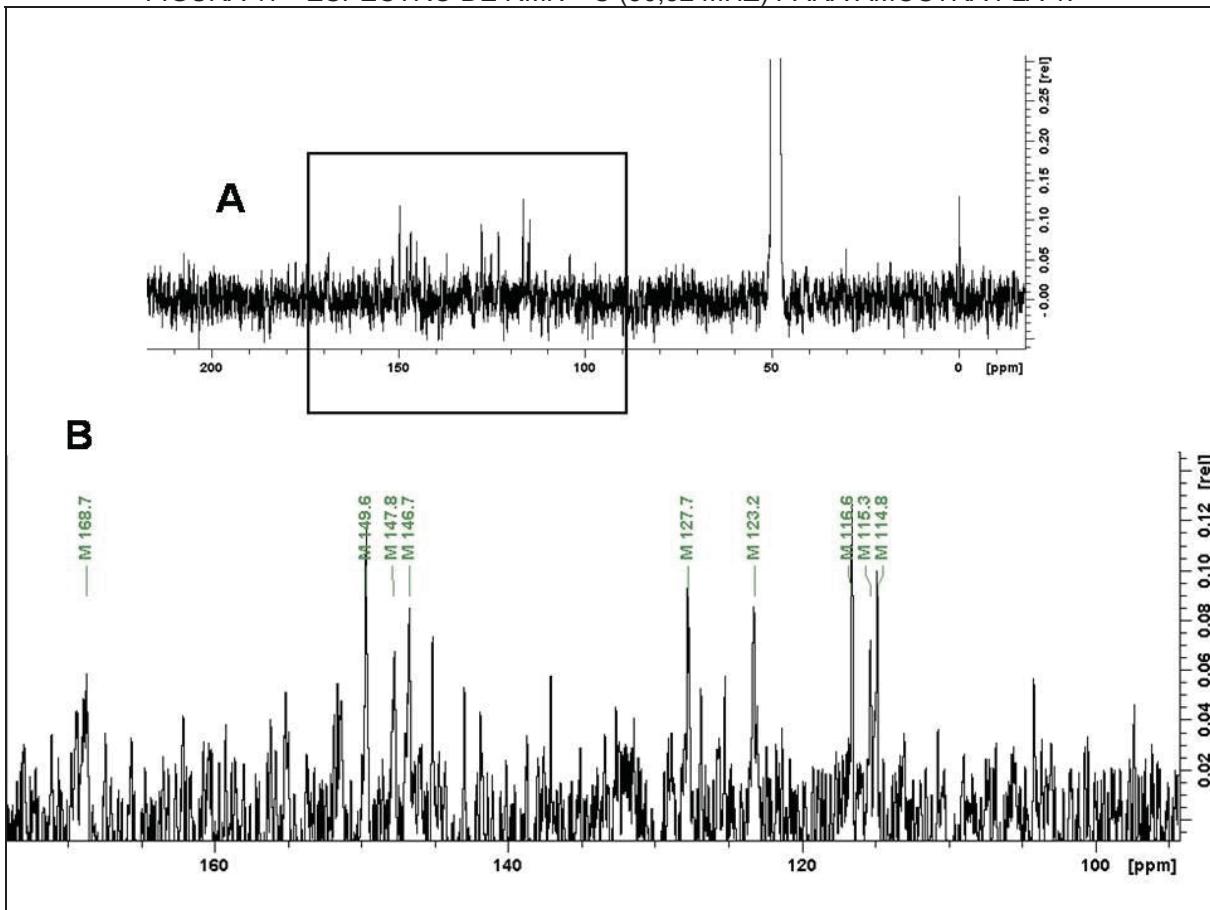
FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: A: visão geral do espectro, referenciado com TMS. B: Região ampliada do espectro (6 – 8 ppm), destacando o deslocamento químico, multiplicidade e constantes de acoplamentos.

A análise do espectro de RMN ^1H foi realizada na região de deslocamento químico entre 5,8 – 8,5, onde é possível observar a região, onde estão contidos os hidrogênios aromáticos presentes em compostos fenólicos.

Foram observados sinais característicos de uma unidade cafeoíla, devido a presença de dois dupletos em δ_H 7,62 e 6,30 referentes a hidrogênios olefínicos em relação ao acoplamento *trans* (d, $J = 15,7$ Hz). Não foi possível observar as constantes de acoplamento do duplo dupletos em δ_H 6,92 referentes aos acoplamentos de posições orto e para, por causa da sobreposição dos picos. Ainda, a presença de picos nas regiões com deslocamento químico de 2,0 - 2,6 ppm e 4,2 – 5,8 ppm não puderam ser observados, pela baixa definição dos picos no espectro e interferência de água no último caso.

Para complementação da análise estrutural desta molécula foi realizado RMN ^{13}C , conforme FIGURA 17:

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (50,32 MHZ) PARA AMOSTRA FLA 1.

FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: A: visão geral do espectro, referenciado com TMS. B: Região ampliada do espectro (100 - 170 ppm), destacando o deslocamento químico dos carbonos.

No espectro de RMN ^{13}C foram observados sinal em δ_c 168 correspondente ao carbono da carboxila de grupo ácido, e sinais em δ_c 149 e 147 característicos de carbono aromático ligados a oxigênio. Além dos sinais δ_c 146 e 115 referentes aos carbonos vinílicos ligados ao anel aromático e ao grupo carboxila.

A partir dos dados coletados para os dois espectros de RMN, é possível identificar parte da estrutura molecular do ácido diclorogênico (ácido dicafeoilquínico) como sugerido no item 5.3.4. Comparando os dados de literatura (JEONG, 2011; LIM, 2003) com os espectros gerados é possível determinar a estrutura molecular referente ao ácido caféico. Considerando que o ácido dicafeoilquínico é ester dos ácidos caféico e quínico, a presença da estrutura do ácido caféico corrobora com os resultados do espectro de massas.

Na TABELA 6 estão os dados encontrados na literatura e os sinais correspondentes ao espectro de ^1H e ^{13}C realizado com a amostra FLA 1.

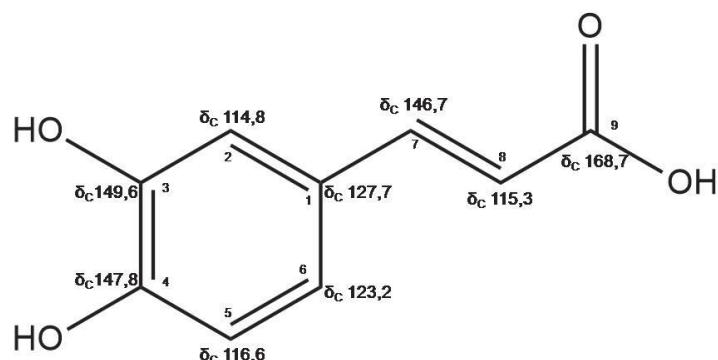
TABELA 6- DESLOCAMENTOS E ACOPLAMENTOS PARA O ESPECTRO DE ^1H E ^{13}C PARA A ESTRUTURA DO ÁCIDO CAFÉICO

POSIÇÃO	Lim et al. (2003)		AMOSTRA FLA 1	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C1	128,1	-	127	-
C2	115,2	7,02 (d, $J= 2,0$ Hz)	114	
C3	146,7	-	149	-
C4	149,4	-	147	-
C5	116,6	6,77 (d, $J= 8,0$ Hz)	116	6,74 (d, $J= 8,0$ Hz)
C6	122,8	6,92 (dd, $J= 8,0; 2,0$ Hz)	122	
C7	146,9	7,53 (d, $J= 16,0$ Hz)	146	7,62 (d, $J= 15,8$ Hz)
C8	116,3	6,21 (d, $J= 15,5$ Hz)	115	6,30 (d, $J= 15,7$ Hz)
C9	171,7	-	168	-

FONTE: A autora (2018).

A FIGURA 18 sugere a estrutura do ácido caféico de acordo com os dados obtidos e a literatura consultada.

FIGURA 18- ESTRUTURA SUGERIDA ATRAVÉS DOS DADOS OBTIDOS COM OS ESPECTROS DE RMN ^1H E ^{13}C .

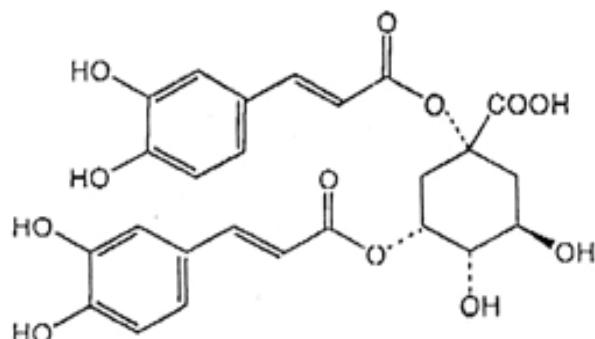


FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: estrutura sugerida com base nos resultados obtidos;

A FIGURA 19 sugere a estrutura completa do ácido dicafeoilquínico composto majoritário das folhas de *Citronella gongonha*.

FIGURA 19 - FORMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO DICAFEOLQUÍNICO



FONTE: A autora (2018).

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

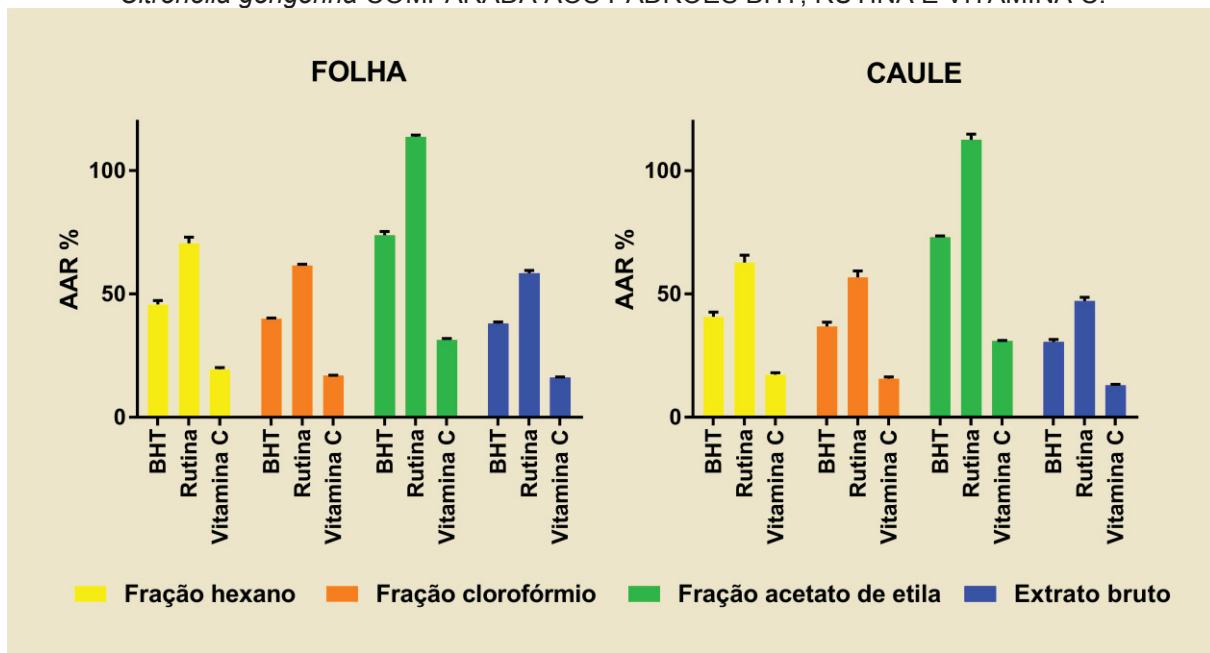
No Brasil, a utilização de plantas medicinais para a prevenção e o tratamento da hipertensão é alternativa frente ao alto custo do medicamento e a falha de distribuição de medicamentos no sistema único de saúde (SUS) (VOSGERAU, 2011; BARRETO, 2015). Trabalhos recentes demonstram os efeitos cardioprotetores da espécie *Viscum album* utilizada na medicina tradicional turca (SUVEREN et al. 2017). Dessa forma, a investigação da atividade antioxidante é passo inicial para seleção de plantas com o potencial cardioprotetor. Os compostos fenólicos são substâncias presentes em abundância em algumas espécies de plantas e possuem a capacidade de combater o stress oxidativo causadoras de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, doenças inflamatórias e câncer (ULLRICH; KISSNER, 2006; GUO et al, 2014). Possuem ação sobre as células musculares lisas, endoteliais, ROS e inibi a RAAS (CHRYSANT; CHRYSANT, 2017).

A propriedade antioxidante da complexa mistura de compostos fenólicos presente no extrato de *Citronella gongonha* ainda não foi registrado. Assim, uma investigação por meio dos ensaios de formação do complexo fosfomolibdenio, redução do radical DPPH e fenóis totais foram conduzidos.

5.4.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

O método de complexação do fosfomolibdênio, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), ocorre em meio aquoso pela reação colorimétrica da solução de fosfomolibdenio. A solução teste inicial possui coloração amarela tornando-se verde à medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz. O método é alternativa simples para avaliar a capacidade antioxidante de componentes lipofílicos e hidrofílicos. O GRÁFICO 1 representa a porcentagem da atividade antioxidante calculada para extrato e frações de *Citronella gongonha* comparada aos padrões BHT, rutina e vitamina C.

GRÁFICO 1 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA PARA EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Citronella gongonha* COMPARADA AOS PADRÕES BHT, RUTINA E VITAMINA C.



FONTE: A autora (2018).

NOTA: Análise de variância (ANOVA) e resultados comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5%.

A fração acetato de etila de folha e caule apresentou maior atividade redutora em comparação com as outras frações e extratos brutos. A atividade antioxidante relativa (AAR%) da fração acetato de etila quando comparada com a vitamina C alcançou os valores máximos de $31,31 \pm 0,64$ e $30,98 \pm 0,19$. Para o BHT, obteve-se atividade superior a 50% apresentando valores de $73,82 \pm 1,51$ e $73,04 \pm 0,47$ e atividade superiores a 100% quando comparado à rutina $113,76 \pm 0,72$ e $112,56 \pm 2,32$, não havendo diferença estatística entre folha e caule. Os

valores numéricos da avaliação quantitativa da atividade antioxidante pelo método de redução do fosfomolibdênio dos extratos e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha* estão apresentados na TABELA 7:

TABELA 7 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR FORMAÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA AOS PADRÕES BHT, RUTINA E VITAMINA C DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha*.

AMOSTRAS	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (AAR%)		
	BHT	RUTINA	VITAMINA C
EXTRATO BRUTO FOLHAS	37,92 ± 0,71 ^a	58,45 ± 1,10 ^b	16,08 ± 0,30 ^b
EXTRATO BRUTO CAULE	30,56 ± 0,97 ^b	47,10 ± 1,50 ^a	12,96 ± 0,41 ^a
FRAÇÃO HEXANO FOLHAS	45,77 ± 1,62 ^d	70,53 ± 2,51 ^d	19,41 ± 0,69 ^d
FRAÇÃO HEXANO CAULE	40,75 ± 1,90 ^c	62,80 ± 2,92 ^c	17,28 ± 0,80 ^c
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO FOLHA	39,97 ± 0,27 ^b	61,59 ± 0,41 ^b	16,95 ± 0,11 ^b
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO CAULE	36,83 ± 1,69 ^d	56,76 ± 2,61 ^b	15,62 ± 0,71 ^b
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA FOLHA	73,82 ± 1,51 ^e	113,76 ± 0,72 ^e	31,31 ± 0,64 ^e
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA CAULE	73,04 ± 0,47 ^e	112,56 ± 2,32 ^e	30,98 ± 0,19 ^e

FONTE: A autora (2018).

NOTA: Valores expressos em média±DP em relação aos padrões BHT, rutina e vitamina C; valores com diferentes letras são significativamente diferentes $p < 0,05$.

A propriedade antioxidante observada para a fração acetato de etila é justificada pela presença de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, catequinas, cumarinas) e flavonóides. Estes metabólitos extraídos do extrato bruto pelo solvente acetato de etila por afinidade são responsáveis em reduzir a solução de fosfomolibdênio. O fato de estes compostos apresentarem em sua estrutura molecular dupla ligações conjugadas, anel aromático e grupamentos hidroxilas contribuem para doação de hidrogênio, o que faz destas moléculas candidatas potenciais para formulação de novos produtos. Por exemplo, medicamentos fitoterápicos que atuam na proteção de macromoléculas como o DNA protegendo-o de danos oxidativos (SHALINI; SRINIVAS, 1987). Ainda, cosméticos com propriedades anti-envelhecimento e conservante alimentar que retardam o processo

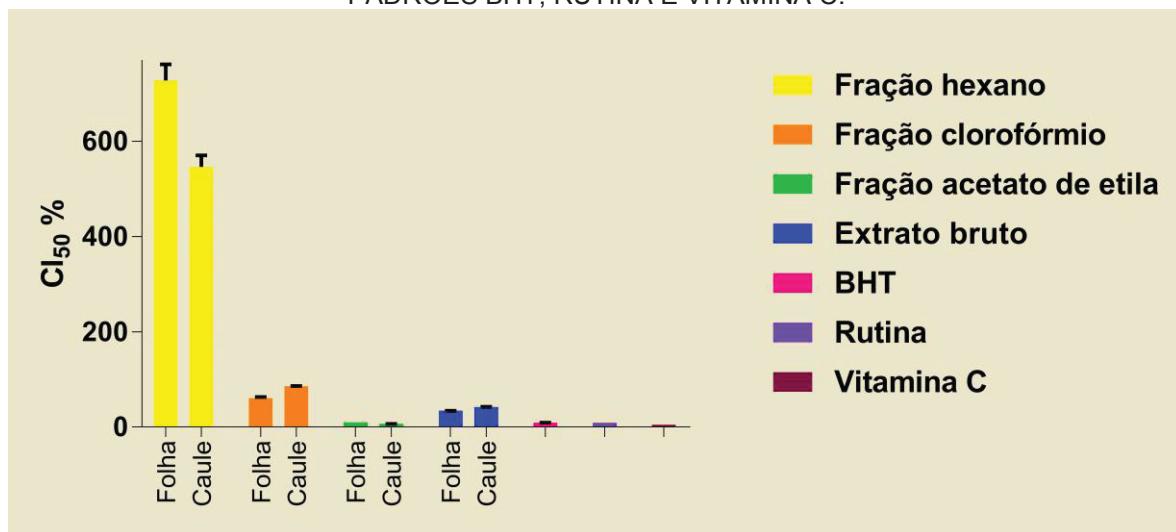
de fermentação e deteriorização mantendo o sabor e valor nutritivo de alimentos (MANACH et al., 2004).

Para complementação do potencial antioxidante do extrato e frações de *Citronella gongonha* foram realizados os estudos de redução do radical DPPH e doseamento de fenóis totais.

5.4.2 Redução do radical DPPH e fenóis totais

O 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) é um radical livre que age como um capturador de outros radicais livres ou de substâncias neutras capazes de estabilizá-lo, por meio de uma reação colorimétrica de oxi-redução. Em solução o radical DPPH· apresenta coloração violeta, quando reduzido emparelha o elétron cedido por um radical hidrogênio de um antioxidante, tornando a solução amarela pela formação da estrutura DPPH-H, reduzido e estável (MENSOR et al. 2001). O GRÁFICO 2 representa a Cl_{50} calculada para extrato e frações obtidos de folha e caule de *Citronella gongonha* comparada aos padrões BHT, Rutina e Vitamina C.

GRÁFICO 2 - Cl_{50} PARA EXTRATO E FRAÇÕES DE *Citronella gongonha* COMPARADA AOS PADRÓES BHT, RUTINA E VITAMINA C.



FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: Cl_{50} : Concentração de inibição 50% do radical DDPH.

NOTA: Análise de variância (ANOVA) e resultados comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5%.

Considerando a análise estatística dos dados obtidos (Teste Tukey) verificou-se que as frações acetato de etila das folhas e caule possuem atividade antioxidante semelhante aos padrões BHT, rutina e vitamina C, pois não há

diferença estatística significativa entre estas amostras. A atividade antioxidante observada para estas frações corrobora com a presença de ácidos fenólicos e catequinas identificados no extrato bruto de folhas e caule por meio da espectrometria de massas. Os resultados numéricos obtidos por meio do método do cálculo da $Cl_{50\%}$, assim como o teor de fenóis totais equivalente em ácido gálico (EAG) $\mu\text{g/mL}$ dos extratos e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha* estão demonstrados na TABELA 8:

TABELA 8– CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% DO RADICAL DPPH E CONTEÚDO DE FENÓIS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha*.

AMOSTRAS	$Cl_{50\%} \pm DP$	Fenóis totais Equivalente em ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)
EXTRATO BRUTO FOLHA	$34,01 \pm 0,256^{\text{a}}$	$6,583 \pm 0,307^{\text{a}}$
EXTRATO BRUTO CAULE	$42,23 \pm 0,29^{\text{a}}$	$3,114 \pm 0,527^{\text{a}}$
FRAÇÃO HEXANO FOLHA	$727,75 \pm 34,48^{\text{b}}$	$1,982 \pm 0,275^{\text{a}}$
FRAÇÃO HEXANO CAULE	$546,46 \pm 24,53^{\text{c}}$	$4,184 \pm 0,212^{\text{a}}$
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO FOLHA	$60,81 \pm 2,346^{\text{a}}$	$4,091 \pm 0,104^{\text{a}}$
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO CAULE	$85,64 \pm 0,564^{\text{d}}$	$3,886 \pm 0,138^{\text{a}}$
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA FOLHA	$10,00 \pm 0,079^{\text{e}}$	$26,492 \pm 4,520^{\text{b}}$
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA CAULE	$6,44 \pm 0,080^{\text{e}}$	$24,706 \pm 3,645^{\text{b}}$
BHT	$9,09 \pm 0,238^{\text{e}}$	---
RUTINA	$8,83 \pm 0,056^{\text{e}}$	---
VITAMINA C	$5,02 \pm 0,055^{\text{e}}$	---

FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: Cl_{50} : Concentração de inibição 50% do radical DDPH.

NOTA: Valores expressos em média $\pm DP$; valores com diferentes letras são significativamente diferentes $p < 0,05$.

A avaliação dos extratos e frações pelo método de Folin-Cicalteu demonstrou que as frações acetato de etila de folhas e caule são ricas em conteúdo de compostos fenólicos em relação as demais amostras testadas, apresentando valores de $26,492 \pm 4,520$ e $24,706 \pm 3,645$ mg em equivalentes de ácido gálico,

respectivamente. O resultado sugere que a propriedade antioxidante encontrada pode ser diretamente correlacionada com o conteúdo de fenóis totais. Rodríguez-Rojo et al. (2012) e Araújo, et al. (2013) apresentaram resultados semelhantes quanto a correlação direta entre o estudo de DPPH e o conteúdo de fenóis totais em ensaios com extratos de folhas de *Rosmarinum officinalis*, corroborando com os resultados encontrados para *Citronella gongonha* para estes dois ensaios.

Na TABELA 9 estão as equações da reta utilizada para o cálculo da IC_{50} dos padrões, extratos e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha*.

TABELA 9- EQUAÇÃO DA RETA PARA OS PADRÕES, EXTRATOS E FRAÇÕES DE CAULE E FOLHA DE *Citronella gongonha* PARA O ENSAIO DE DPPH.

AMOSTRAS	FOLHA	CAULE
	EQUAÇÃO DA RETA	EQUAÇÃO DA RETA
EXTRATO BRUTO	$y = 1,332x + 4,587; R^2 = 0,995$	$y = 0,986x + 8,187; R^2 = 0,991$
FRAÇÃO HEXANO	$y = 0,053x + 11,56; R^2 = 0,997$	$y = 0,069x + 12,20; R^2 = 0,994$
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	$y = 0,343x + 29,14; R^2 = 0,991$	$y = 0,277x + 26,28; R^2 = 0,991$
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	$y = 3,537x + 14,15; R^2 = 0,993$	$y = 4,941x + 16,42; 0,990$
BHT		$y = 3,792x + 15,55; R^2 = 0,994$
VITAMINA C		$y = 11,12x - 5,824; R^2 = 0,991$
RUTINA		$y = 4,991x + 5,941; R^2 = 0,996$

FONTE: A autora (2018).

Os resultados obtidos nos três ensaios realizados para a avaliação das propriedades antioxidante dos extratos e frações de *Citronella gongonha* são coerentes e demonstram que na fração acetato de etila estão concentrados os compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante da espécie em estudo. Na análise do extrato bruto de folhas e caule em espectrometria de massas foi observada a presença de compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico, além da presença de catequinas, justificando o potencial antioxidante apresentado pelo extrato bruto e fração acetato de etila de folhas e caule de *Citronella gongonha*. É importante considerar que os efeitos observados no teste *in vitro* não necessariamente ocorreram em testes *in vivo*, uma vez que a biodisponibilidade e a metabolização destes compostos podem variar.

Bastos et al. (2007), identificou compostos fenólicos e testou a ação antioxidante pelo método de DPPH· para o extrato de *Ilex paraguariensis*. Considerando que *Citronella gongonha* é conhecida popularmente por falso mate e muitas vezes utilizada como substituinte da *Ilex paraguariensis* (KAREHED, 2001; MAZINE; SOUZA; RODRIGUES, 2005), na TABELA 10 foram apresentados os resultados do estudo realizado por este autor comparados aos resultados obtidos para o extrato bruto de folhas e caule de *Citronella gongonha*.

TABELA 10- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH· DE *Citronella gongonha* COMPARADA A ESPÉCIE *Ilex paraguariensis*

EXTRATOS	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH· (AA%)
<i>Citronella gongonha</i> - folhas	69,68 ± 1,63
<i>Citronella gongonha</i> - caule	57,79 ± 0,32
<i>Ilex paraguariensis</i> - verde	*88,93 ± 0,22
<i>Ilex paraguariensis</i> - tostado	*92,05 ± 0,60

FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: * FONTE: Bastos et al., 2007; AA%: atividade antioxidante relativa (porcentagem).

NOTA: Extrato etanólico de concentração 50 µg/mL.

A atividade antioxidante (AA%) observada para o extrato bruto de folha e caule de *Citronella gongonha*, comparado com os valores registrados para *Ilex paraguariensis* (BASTOS et al., 2007) sugerem que as concentrações de compostos fenólicos são distintas. Dessa forma, a atividade antioxidante para cada espécie é variável, apesar da presença de compostos fenólicos como os ácidos: caféico, clorogênico, quílico, feruloiquílico, dicafeoilquílico e catequinas para as duas espécies.

É interessante observar que a metodologia empregada não considera a cinética de reação para o extrato bruto e frações, pois o ensaio de DPPH· finalizado no tempo de 30 minutos não pondera a possibilidade de a reação de redução do radical ainda estar em progresso. No estudo de Brand-Williams et al. (1995), os autores discutem sobre a cinética de reação para diversos compostos fenólicos, ressaltando que uma reação de redução de cinética rápida corresponde ao elevado número de grupamentos hidroxilas presentes nas moléculas, porém para alguns compostos e misturas o mecanismo é mais complexo. O emprego de uma

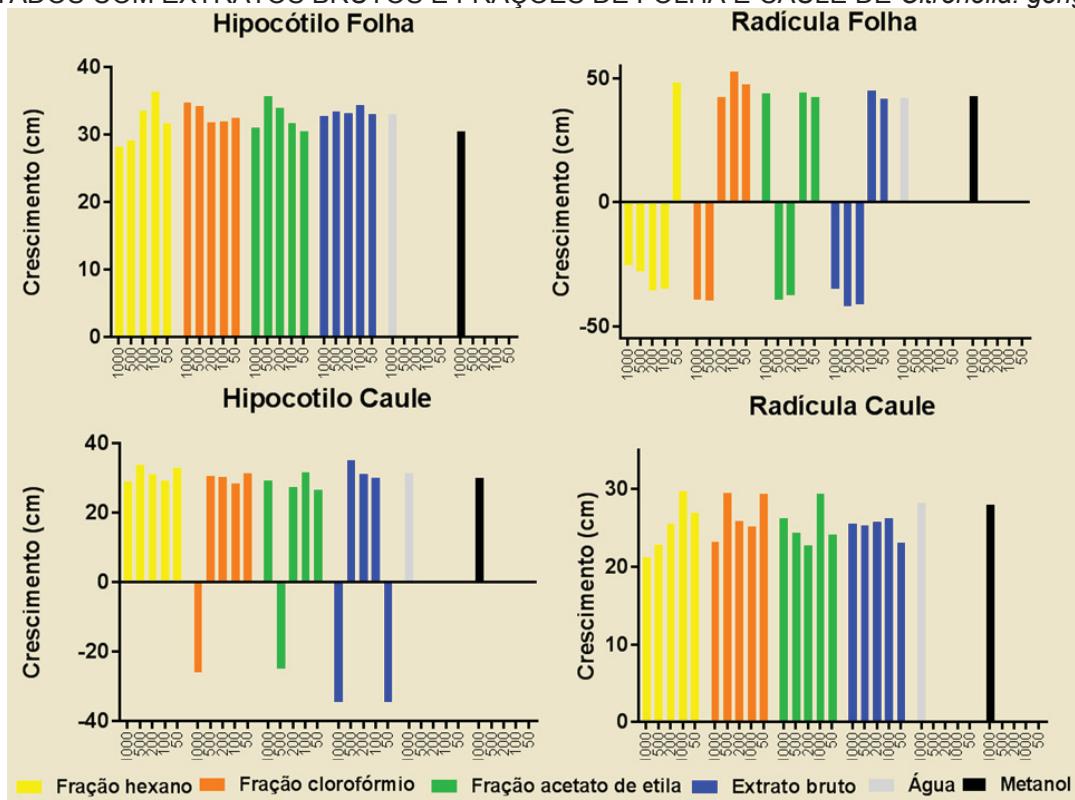
metodologia que avalia a cinética de reação dos extratos e frações definiria com mais precisão o comportamento da mistura de ácidos fenólicos e flavonóides presentes nas folhas e caule de *Citronella gongonha*.

5.5 ATIVIDADE FITOTÓXICA

A fitotóxidade é um efeito direto ou indireto que uma planta ou microorganismos exercem sobre outra pela produção de substâncias químicas (denominados aleloquímicos). Os aleloquímicos são substâncias produzidas pelo metabolismo das plantas e podem atuar inibindo ou estimulando o crescimento das outras espécies de plantas (CALABRESE; BALDWIN, 2002; UNIVERSIDADE BRASIL, 2017). São diversas as fontes de liberação dos compostos aleloquímicos, são elas: voláteis, serrapilheira, solo, decomposição de partes da planta no solo, exsudados da raiz e lixiviação de folhas (FERREIRA; AQUILA, 2000). Por isso a vegetação de uma área pode ter um modelo de sucessão condicionado as plantas pré-existentes e as substâncias químicas que elas liberam no meio. Na natureza há espécies mais sensíveis que outras como exemplo a alface (*Lactuca sativa*) e o tomate (*Lycopersicum esculentum*). Kalburjji (1999) realizou estudo com extrato de trigo e demonstrou a interferência na germinação de outras espécies. Assim como o sorgo (*Sorghum bicolor* L. J Moench) apresenta potencial aleloquímico relacionada ao metabólito sorgolione pertencente à classe das quinonas. Da mesma forma, Castro et al. (1983) evidenciou que extratos aquosos de 3 espécies de plantas inibiram a germinação e o crescimento de sementes de tomate.

Os resultados de crescimento de radícula e hipocôtilo de sementes de alface após a exposição aos extratos brutos e frações de folha e caule de *Citronella gongonha* estão representados no GRAFICO 4:

GRÁFICO 3- CRESCIMENTO RADÍCULA E HIPOCÓTILO PARA SEMENTE DE ALFACE TRATADOS COM EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE *Citronella. gongonha*



FONTE: A autora (2018).

NOTA: Valores negativos representam a inibição do crescimento do hipocôtilo e radícula; Análise de variância (ANOVA) e resultados comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5%.

Os valores numéricos obtidos para os ensaios de germinação e crescimento de radícula e hipocôtilo estão apresentados no APENDICE 6-8. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas relacionadas ao IVG das sementes de *L. sativa* quando tratadas com o extrato e frações de folha e caule de *Citronella gongonha*.

Na avaliação de crescimento do hipocôtilo quando tratados com o extrato bruto e frações do caule de *Citronella gongonha* foram observados resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em relação aos controles água e metanol. A fração acetato de etila na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, a fração clorofórmio na concentração 1000 $\mu\text{g/mL}$ inibiu o crescimento do hipocôtilo de alface sugerindo fitotoxicidade. O extrato bruto na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ inibiu o crescimento do hipocôtilo de alface. A concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ também inibiu o crescimento do hipocôtilo de alface, porém apresentou valores de desvio padrão alto ($34,30 \pm 8,179$), portanto essa concentração não foi considerada como concentração fitotóxica.

Na avaliação de crescimento da radícula quando tratados com o extrato bruto e frações das folhas de *Citronella gongonha* foram observados resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) em relação aos controles água e metanol. O extrato bruto nas concentrações 1000, 500 e 200 µg/mL, a fração acetato de etila nas concentrações 500 e 200 µg/mL, a fração clorofórmio nas concentrações 1000 e 50 µg/mL e todas as concentrações da fração hexano exceto a concentração 50 µg/mL inibiram o crescimento da radícula sugerindo fitotoxicidade. A fração clorofórmio nas concentrações 100 e 50 µg/mL e a fração hexano na concentração de 50 µg/mL estimularam o crescimento da radícula de alface.

A inibição do crescimento vegetal pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos. A literatura mostra uma variedade de extratos de plantas que atuam como inibidoras do crescimento vegetal, sendo este fato associada com a presença de compostos fenólicos. Scognamiglio et al. (2012) demonstrou o potencial fitotóxico do ácido caféico e seu derivados extraídos de *Bellis perennis* L (Asteraceae) na germinação e crescimento das sementes das espécies *Dactylis hispanica* e *Aegilops geniculata*. Um dos mecanismos de ação que podem explicar a atuação dos aleloquímicos é o processo de estresse oxidativo que produzem espécies reativas de oxigênio que geram a degradação celular podendo impedir a germinação, crescimento e fotossíntese das plantas (ALMEIDA et al. 2008). Além desses fatores, no geral, os aleloquímicos podem afetar estruturas celulares, alteração na concentração de fitoesteróis, permeabilidade de membrana, respiração, síntese de pigmentos e proteínas, atividade enzimática e alterações no material genético (RIZVI, 1992).

O estímulo ao crescimento vegetal pode estar associado ao conceito de hormese proposto por Calabrese e Baldwin (2002), na qual uma substância considerada tóxica, quando aplicada em doses menores que a utilizada pode estimular o desenvolvimento vegetal. Silva et al. (2012) reforça este conceito relembrando que alguns herbicidas eram utilizados como reguladores de crescimento, por exemplo a substância glifosina, antecessora do glifosato foi utilizado no Brasil como maturadora de frutos (MESCHEDE et al. 2008).

Observando os valores obtidos para a fração hexano e clorofórmio de folhas de *Citronella gongonha* na avaliação do crescimento da radícula, as duas frações inibiram o crescimento na maior dose testada de 1000 µg/mL e estimularam o

crescimento na menor dose testada de 50 µg/mL, sugerindo o efeito de hormese para estas frações.

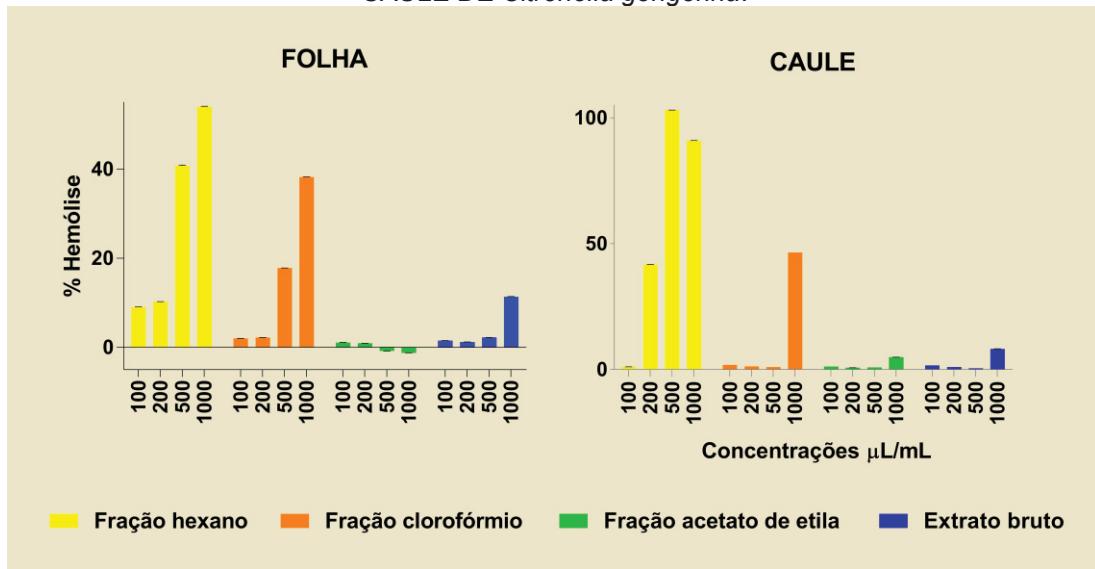
Estudos que avaliem outros parâmetros da fisiologia vegetal, como a fotossíntese, respiração, síntese de proteínas e pigmentos, atividade enzimática se faz necessário para complementação do estudo fitotóxico do extrato bruto e frações de *Citronella gongonha*, uma vez que os aleloquímicos podem influenciar o vegetal por diversos mecanismos de ação. A avaliação da alelopatia é uma importante ferramenta para a prospecção de plantas que possam ser utilizadas como alternativa natural ao uso de agrotóxicos.

5.6 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A avaliação da toxicidade dos extratos brutos e frações compõem uma etapa importante para a caracterização da espécie em estudo. Extratos de plantas podem conter substâncias que causam a hemólise das células sanguínea (SHARMA; JAYASHRI, 2001). Inúmeras são as substâncias que possuem esta atividade biológica, pertencentes às classes de metabólitos secundários: saponinas (WANG et al. 2007; GAUTHIER et al. 2009; OLIVEIRA et al. 2011), antraquinonas (MUNDAY et al. 1995), entre outras.

O ensaio de hemólise *in vitro* avaliou a liberação de hemoglobina dos eritrócitos, indicando a lise celular, após a exposição aos extratos e frações da espécie em estudo. O GRÁFICO 3 ilustra a atividade hemolítica dos extratos brutos e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha*.

GRÁFICO 4- ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha*.



FONTE: A autora (2018).

NOTA: análise de variância (ANOVA) e resultados comparados pelo Teste Tukey com nível de significância em 5%.

O extrato bruto apresentou valores menores que 5% para as concentrações de 100, 200 e 500 µg/mL e o valor máximo de $11,4 \pm 0,028\%$ para a concentração de 1000 µg/mL. A fração acetato de etila apresentou valores negativos de $-0,8 \pm 0,003\%$ e $-1,2 \pm 0,004\%$ para as concentrações de 500 e 1000 µg/mL, respectivamente. Os valores negativos apresentados na fração acetato de etila podem ser interpretados como ausência de atividade hemolítica. A atividade hemolítica foi observada para a fração hexano que atingiu valores superiores a 50% ($54,01 \pm 0,102\%$) para a concentração de 1000 µg/mL. Os valores em porcentagem expressos em média e desvio padrão do extrato bruto e frações da folha de *Citronella gongonha* estão apresentados na TABELA 11:

TABELA 11- ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Citronella gongonha*

CONCENTRAÇÕES µg/mL	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	EXTRATO BRUTO
100	9,06 ± 0,030% ^e	2,00 ± 0,007% ^d	1,1 ± 0,007% ^c	1,5 ± 0,002% ^d
200	10,27 ± 0,021% ^e	2,2 ± 0,015% ^d	0,9 ± 0,005% ^c	1,5 ± 0,011% ^d
500	40,79 ± 0,114% ^f	17,8 ± 0,013% ^e	-0,8 ± 0,003% ^b	2,2 ± 0,010% ^d
1000	54,01 ± 0,102% ^g	38,2 ± 0,054% ^f	-1,2 ± 0,004% ^a	11,4 ± 0,028% ^e

FONTE: A autora (2018).

NOTA: Valores expressos em média±DP; valores com diferentes letras são significativamente diferentes p< 0,05.

As frações acetato de etila e extrato bruto do caule de *Citronella gongonha* apresentaram na concentração de 1000 µg/mL os valores máximos de 4,9 ± 0,008 % e 8,2 ± 0,026 %, respectivamente. A fração hexano apresentou atividade hemolítica, superior à encontrada para a fração hexânica da folha, apresentando valores de 103,0 ± 0,054 % e 90,91 ± 0,030 % para as concentrações de 500 e 1000 µg/mL, respectivamente. Os valores em porcentagem expressos em média e desvio padrão do extrato bruto e frações de caule de *Citronella gongonha* estão apresentados na TABELA 12:

TABELA 12- ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE CAULE DE *Citronella gongonha*.

Concentrações µg/mL	Fração Hexano	Fração Clorofórmio	Fração Acetato de etila	Extrato bruto
100	1,05 ± 0,006% ^a	1,9 ± 0,007% ^a	1,2 ± 0,003% ^a	1,6 ± 0,004% ^a
200	41,72 ± 0,087% ^c	1,3 ± 0,001% ^a	0,7 ± 0,003% ^a	1,0 ± 0,003% ^a
500	103,00 ± 0,054% ^e	1,0 ± 0,009% ^a	0,8 ± 0,005% ^a	0,5 ± 0,003% ^a
1000	90,91 ± 0,030% ^d	46,5 ± 0,020% ^c	4,9 ± 0,008% ^b	8,2 ± 0,026% ^b

FONTE: A autora (2018).

NOTA: Valores expressos em média±DP; valores com diferentes letras são significativamente diferentes p< 0,05.

A partir dos resultados obtidos, não foi observada atividade hemolítica para os extratos brutos de *Citronella gongonha*. O extrato bruto de folhas e caule não

causou dano significativo à membrana dos eritrócitos do sangue de carneiro, evidenciado pela baixa liberação de hemoglobina em solução PBS e demonstrado pela baixa absorbância registrada pelo espectrofotômetro de placas e expresso em % hemólise. Assim, sugere-se ausência de toxicidade para os extratos brutos desta espécie, corroborando com a utilização desta planta como substituto do mate em algumas regiões (MAZINE; SOUZA; RODRIGUES, 2005). A presença de atividade hemolítica encontrada para a fração hexânica desta planta pode estar relacionada com a concentração de substâncias apolares como os terpenos, classe de metabólito secundário que possui a capacidade de interagir com a membrana celular, em alguns casos, potencializando a permeabilidade de absorção de algumas drogas lipofílicas (MENDANHA, 2013). Além de possuir atividade antitumoral e na quimioprevenção de alguns cânceres (RABI, 2008; CROWELL, 1996). A investigação desta fração para a presença destas substâncias é aconselhável, uma vez que os terpenos interagindo com a membrana das células, modificam sua fluidez, sendo de grande interesse para o desenvolvimento de sistemas de distribuição de fármacos com baixa irritação cutânea para o tratamento de enfermidades da pele, como por exemplo, a leishmaniose (ARRUDA, 2005).

5.7 TOXICIDADE: *ARTEMIA SALINA*

Avaliação da toxicidade em *Artemia salina* é um estudo preliminar para caracterização da toxicidade de produtos naturais. É um método simples e reproduzível, podendo ser utilizado no biomonitoramento de substâncias ativas (SIQUEIRA et al. 1998).

A TABELA 13 apresenta os valores da concentração letal 50% (CL_{50}) de *Artemia salina* quando expostas ao extrato bruto e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha*:

TABELA 13 - CL₅₀ PARA EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE *Citronella gongonha* FRENTES A *Artemia salina*

AMOSTRAS	AUSENCIA DE TOXICIDADE ($\mu\text{g/mL}$)	BAIXA TOXICIDADE ($\mu\text{g/mL}$)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato bruto folha	>1000	-	-
Extrato bruto caule	>1000	-	-
Fração hexano folha	>1000	-	-
Fração hexano caule	>1000	-	-
Fração clorofórmio folha	>1000	-	-
Fração clorofórmio caule	>1000	-	-
Fração acetato de etila folha	>1000	-	-
Fração acetato de etila caule	-	863,95	552,33 – 1351,39

FONTE: a autora (2018).

NOTA: análise de estatísticas Probitos com intervalo de confiança de 95%.

De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras testadas apresentaram CE₅₀ superior a 1000 µg/mL, exceto a fração acetato de etila do caule que apresentou CE₅₀ no valor de 863,950 µg/mL com intervalo de confiança de 95% entre 552,326 µg/mL e 1351,392 µg/mL de acordo com análise estatística de Probit. O estudo obedeceu aos critérios de validação estabelecidos para o teste, apresentou imobilidade < que 10% para o controle negativo salina (1% DMSO) e controle positivo para SDS apresentou CE₅₀ no valor de 12,259 µg/mL com intervalo de confiança de 95% entre 9,511 µg/mL e 15,803 µg/mL. Seguindo os critérios de classificação estabelecidos por Meyer et al. (1982), o extrato bruto e frações de folhas e caule de *Citronella gongonha* são não tóxicas por apresentar CE₅₀ > 1000 µg/mL. Exceto a fração acetato de etila do caule que apresentou CE₅₀ < 1000 µg/mL. Neste caso, a fração foi classificada como sendo de baixa toxicidade, de acordo com critério estabelecido por Amarante et al. (2011), pois apresentou CE₅₀ > 500 µg/mL (863,95 µg/mL com intervalo de confiança de 95% entre 552,33 – 1351,39 µg/mL).

Este ensaio serve como ponto de partida para definição de doses de um estudo de toxicidade aguda com camundongos, a fim de observar a toxicidade dos extratos brutos e frações em um modelo *in vivo* (OECD 243, 2001).

6 CONCLUSÃO

A comparação morfoanatômica entre as espécies *Citronella gongonha* e *Citronella paniculata* deve como principais diferenças o formato da nervura central e pecíolo que se apresentaram no formato côncavo-convexo para *Citronella gongonha*, enquanto apareceu no formato plano-convexo para *Citronella paniculata*. Além disso, a presença de uma quantidade maior de células significadas que compõem a bainha de fibras foi observada para *Citronella gongonha*, quando comparada a *Citronella paniculata*. Estes achados são descritos pela primeira vez para as duas espécies do gênero *Citronella*.

Os resultados encontrados no screening fitoquímico de *Citronella gongonha* sugerem a presença de triterpenos / esteroide, flavonoides, compostos fenólicos, cumarinas, taninos e saponinas. Corroborando com os metabólitos secundários registrados para a família Cardiopeteridaceae. Além de corroborar com os resultados das reações com Sudam III para lipídios e Cloreto férrico para compostos fenólicos observados na morfoanatomia da espécie.

Por meio da análise em espectrofotometro de massas do extrato bruto de folhas e caule é possível sugerir pela comparação entre os íons moleculares e perfil de fragmentação a presença de compostos como o ácido caféico, ácido quínico, ácido cafeoilquínico, ácido feruloiquínico, ácido dicafeoilquínico, epicatequina, epicatequina galato, metil epicatequina galato e metil epigalocatequina galato. Estes compostos também estão presentes em amostras de chá mate (*Ilex paraguariensis*) e chá verde (*Camellia sinensis*), bebidas utilizadas como fonte de antioxidantes na dieta, corroborando com a utilização popular desta espécie como alternativa a erva mate. As análises realizadas em CLAE e RMN unidimensional ^1H e ^{13}C sugeriu a presença de ácido dicafeoilquínico como composto majoritário na fração acetato de etila das folhas de *Citronella gongonha*.

A propriedade antioxidante foi evidenciada para fração acetato de etila de folhas e caule, assim como atividade fitotóxica foi observada inibindo/estimulando o crescimento de hipocótilo e radícula de sementes de *Lactuca sativa*.

Observou-se atividade hemolítica para a fração hexanica das folhas e caule desta espécie, sugerindo potencial citotóxico para esta fração. O ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* reportou ausência de toxicidades para os extratos

brutos e frações de folha e caule de *Citronella gongonha*, com exceção da fração acetato de etila do caule que foi classificado como tendo baixa toxicidade.

Estes resultados, reportados pela primeira vez em literatura científica, contribuem para a caracterização fitoquímica e atividades biológicas da espécie *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard, encorajando estudos complementares com o objetivo de identificar substâncias com potencial farmacológico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. D. et al. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. **Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín**. v. 61, p. 4237-4247, 2008.
- AMIGUET, T. V. et al. Phytochemistry and Antifungal Properties of the Newly Discovered Tree *Pleodendron costaricense*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 7, p. 1005-1009, 2006.
- AMMAR, I. et al. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) flowers. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 313-319, 2018.
- ANGELO, P. M; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, p.1-9, 2007.
- APG. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- ARAÚJO, S. G. et al. Atividades antioxidante e fitotóxica do extrato e frações obtidos de *Rosmarinus officinalis*. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 1, 2013.
- ARRUDA, D. C. et al. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.
- AYSELI, M. T; AYSELI, Y. L. Flavors of the future: health benefits of flavor precursors and volatile compounds in plant foods. **Trend Food Sci. Technol.**, v. 48, p. 69-77, 2016.
- BALA, V.; CHHONKER, Y. Recent developments in anti- Trichomonas research: An update review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 232-243, 2018.
- BANERJEE et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 2, p. 134-139, 2008.
- BARRETO, M. et al. Analysis of access to hypertensive and diabetic drugs in the Family Health Strategy, State of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 2, p. 413-424, 2015.
- BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. **Molecules**, v.12, p. 423-432, 2007.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.

- BFG. THE BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W. et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BREMER, B. et al. Phylogenetics of asteroids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 24, p. 274-301, 2002.
- BYNG, J. et al. Phylogenetic relationships of Icacinaceae focusing on the vining genera. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, n. 3, p. 277-294, 2014.
- CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Defning hormesis. **Human & Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 21, n. 1, p. 91-97, 2002.
- CAPUTO, L. F. F.; GITINARA, L. de B.; MANSO, P. P. de A. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, v. 2, p. 123-130. 2011.
- CARVALHO, D. A; RODRIGUES, V. E. G. Florística de Plantas Medicinais Nativas de Remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual na Região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 14, p. 93 – 112, 2008.
- CASTILLO-MITRE, G. et al. Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, p. 125-131, 2017.
- CASTRO P. R. C. et al. Efeitos fitotóxicos de alguns extratos vegetais na germinação do tomateiro (*Lycopersicum esculentum* Mill. cv. Santa Cruz). **Planta Daninha**, v. 6, p. 79-85, 1983.
- CHAN, Y. et al. A secoiridoid and other constituents of *Gonocaryum calleryanum*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1073-1077, 1998.
- CHEN, H. et al. Synthesis and antitumor activity of feruloyl and caffeoyl derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 18, p. 4367-4371, 2014.
- COLLINS, C. H. BRAGA, G. L. BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.
- CHRYSANT, S.; CHRYSANT, G. Herbs Used for the Treatment of Hypertension and their Mechanism of Action. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 9, 2017.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1033-1043, 2000.

- CROTTI, A. et al. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.
- CROWELL, P. L. Symposium on Phytochemicals: Biochemistry and Physiology. Prevention and Therapy of Cancer by Dietary Monoterpenes. 1996.
- DAMTOFT, S. et al. Kingisidic acid and 8-epi-kingisidic acid from Citronella gongonha. **Phytochemistry**, v. 32, n. 4, p. 1071-1072, 1993.
- DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- DINDA, B. et al. Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. An Updated Review, Part 4. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 7, p. 803-833, 2011.
- EXARCHOU, V. et al. Identification and Quantification of Caffeic and Rosmarinic Acid in Complex Plant Extracts by the Use of Variable-Temperature Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 2-8, 2001.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5a ed. Brasília, 2010. Volume I.
- FARZEI, M. H. et al. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. **World J. Gastroenterol**, v. 21, p. 6499, 2015.
- FENG, X. et al. Two new secoiridoid glucosides from Syringa velutina Kom. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, n. 6, p. 702-705, 2009.
- FERRACANE, G. R. et al. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 399-404, 2010.
- FERREIRA, A. G. AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **R. Bras. Fisiol. Veg**, v. 12, p. 175-204, 2000.
- FLORA MALESIANA. Dedication to the memory of Carl Ludwig Blume | Flora Malesiana. Disponível em: < <http://portal.cybertaxonomy.org/flora-malesiana/node/243> >. Acesso em: 17 fev. 2018.
- FLORA SBS. Projeto Flora de São Bento do Sul –SC. Disponível em: < <https://sites.google.com/site/florasbs/cardiopteridaceae/citronella-c> >. Acesso em: 17 fev. 2018.
- FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.
- GAUTHIER, C. L. et al. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 2002-2008, 2009.

- GUO, Z. et al. Antioxidant and anti-inflammatory caffeoyl phenylpropanoid and secoiridoid glycosides from *Jasminum nervosum* stems, a Chinese folk medicine. **Phytochemistry**, v. 106, p. 124-133, 2014.
- HAO, B. et al. Hepatoprotective and antiviral properties of isochlorogenic acid A from *Laggera alata* against hepatitis B virus infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 190-194, 2012.
- HE, M.; MIN, J.; KONG, W. et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74-85, 2016.
- HECK, C. et al. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8394-8403, 2008.
- HOWARD, R. Studies of the icacinaceae iv. Considerations of the new world genera. Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University, v.142, p. 3-60, 1942.
- JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. New York: **McGraw Hill Book**, 1940.
- JEONG, C. et al. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. **Chinese Medicine**, v.6, 2011.
- KALBURTJI, K. L. Research on allelopathy in Greece. **Allelopathy update**, v. 1, p. 37-47, 1999.
- KANEKO, T et al. Secoiridoid and Flavonoid Glycosides from *Gonocaryum Calleryanum*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 115-120, 1995.
- KAREHED, J. Multiple Origin of the Tropical Forest Tree Family Icacinaceae. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 12, p. 2259, 2001.
- KARUNANIDHI, A. et al. In vitro antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the trimethoprim/sulfamethoxazole resistant strain. **Biomed. Res. Int.**, 2012.
- KING, A. YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, p. 213-218, 1999.
- KREMR, D. et al.. UNREMITTING PROBLEMS WITH CHLOROGENIC ACID NOMENCLATURE: A REVIEW. **Química Nova**, v. 39, 2016.
- KULKARNI, R. et al. Caffeoyl glucosides from *Nandina domestica* inhibit LPS-induced endothelial inflammatory responses. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 22, p. 5367-5371, 2015.
- LABOURIAU, L. G. A germinação das sementes. Secretaria-Geral da Organização dos Estados Americanos, Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 1983.

LAMARÃO, C. R.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 257-269, 2009.

LIM, E. et al. Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose: glucosyltransferase is maintained in planta. **Biochem. J.**, v. 373, p. 987 – 992, 2003.

MACÍAS, F. A. CASTELLANO, D. M. MOLINOLLO, J. G. Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MADUNIĆ, J.; MADUNIĆ, I.; GAJSKI, G.; POPIĆ, J.; GARAJ-VRHOVAC, V. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. **Cancer Letters**, v. 413, p. 11-22, 2018.

MAGUIRE, JAMES D. Speed of Germination — Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176, 1962.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANOLESCU, B.; OPREA, E.; BUSU, C.; CERCASOV, C. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway. **Biochimie**, v. 91, n. 11-12, p. 1347-1358, 2009.

MAZINE, F.F.; SOUZA, V.C. & RODRIGUES, R.R. Icacinaceae. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, v.4, p. 227-229, 2005.

MEDRI, M. E. et al. A bacia do Rio Tibagi, Londrina, 2002.

MENDANHA, S. A. et al. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 323-329, 2013.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MESCHEDE, K. D. et al. Baixas doses de glyphosate e seus efeitos no crescimento de. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 7, n. 2, p. 53, 2008.

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

MUNDAY, R. S. et al. Comparative toxicity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 98, n. 2, p. 185-192, 1995.

NAVEED, M.; et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p.368-73, 1964.

OECD 423. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 2001.

OLIVEIRA, D. R. et al. Estudo etnofarmacognóstico da saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke), uma planta medicinal usada por comunidades quilombolas do Município de Oriximiná-PA, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 383-392, 2011.

OLIVEIRA, D.; BASTOS, D. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OMS. Quality control methods for medicinal plant materials World Health Organization Geneva. 1998.

PENG, S. et al. Aqueous extract of *Rabdosia rubescens* leaves: forming nanoparticles, targeting P-selectin, and inhibiting thrombosis. **International Journal of Nanomedicine**, p. 6905, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PRINSLOO, G.; et al. Anti-HIV activity of southern African plants: Current developments, phytochemistry and future research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 133-155, 2018.

RABI, THANGAIYANBISHAYEE, ANUPAM. Terpenoids and breast cancer chemoprevention. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 115, n. 2, p. 223-239, 2008.

REFLORA. Citronella in Flora do Brasil 2020. Distribuição Geográfica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6679>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

RIBÉREAU-GAYON, J; PEYNAUD, E. Les composés phénoliques des végétaux, **Traité d'oenologie**. Edition Dunod, 1968.

RIZVI, S. et al. A discipline called allelopathy. In: (Ed.). Allelopathy: Springer, p.1-10. 1992.

RODRÍGUEZ-ROJO, S. et al. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p.98-103, 2012.

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

SCHORI, M. Cardiopteridaceae. Flowering Plants. **Eudicots**, p. 131-136, 2016.

SCOGNAMIGLIO, M. E. et al. Isolation, distribution and allelopathic effect of caffeic acid derivatives from *Bellis perennis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 108-113, 2012.

SHALINI, V.; SRINIVAS, L. Lipid peroxide induced DNA damage: protection by turmeric (*Curcuma longa*). **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 77, n. 1, 1987.

SHARMA, P, JAYASHRI, D. In vitro hemolysis of human erythrocytes — by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001.

SHIN, H. S. et al. Cathecol groups enable reactive oxygen species scavenging-mediated suppression of PKD-NFkappaB-IL-8 signaling pathway by chlorogenic and caffeic acids in human intestinal cells. **Nutrients**, v. 9, p. 165, 2017.

SILVA, J. C. et al. Efeito hormese de glyphosate em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 3, p. 295-302, 2012.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SINGLETON, V. L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Am. J. Enol. Vitic**, v. 25, p. 119, 1974.

SOARES, S. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUZA, W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

SU, Q. et al. Antiproliferative Triterpenoid Saponins from *Leptaulus citroides* Baill. from the Madagascar Rain Forest. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 6, n. 1, p. 31-39, 2016.

SUÁREZ-QUIROZ, M. et al. Anti-Aspergillus activity of green coffee 5-O-caffeoquinic acid and its alkyl esters. **Microbial Pathogenesis**, v. 61-62, p. 51-56, 2013.

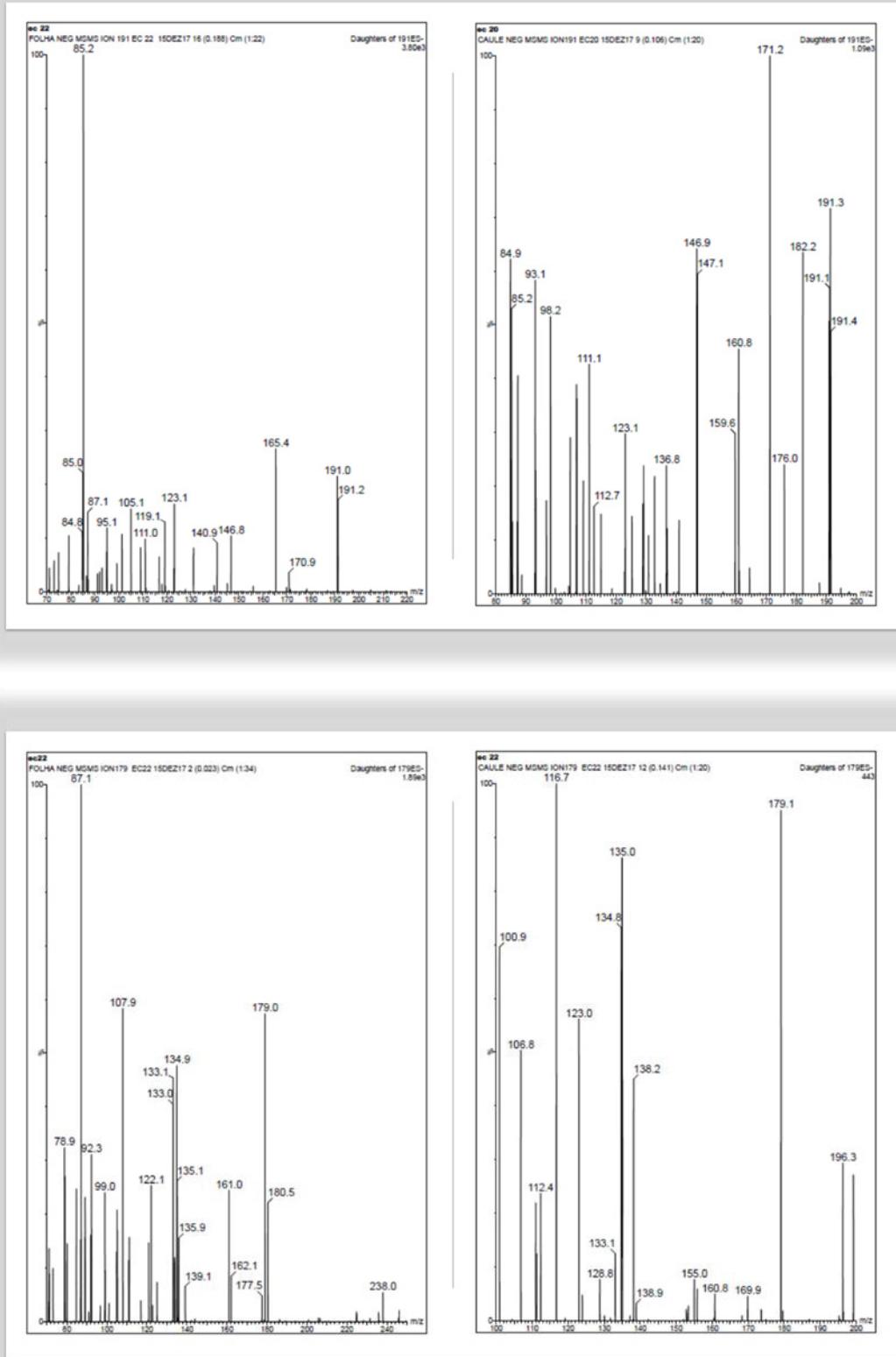
SUVEREN, E. et al. Cardioprotective effects of *Viscum album* L. subsp. *album* (European mistletoe) leaf extracts in myocardial ischemia and reperfusion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 209, p. 203-209, 2017.

THIELE, E. A. et al. Cannabidiol in patients with seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome (GWPCARE4): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. **The Lancet**. 2018.

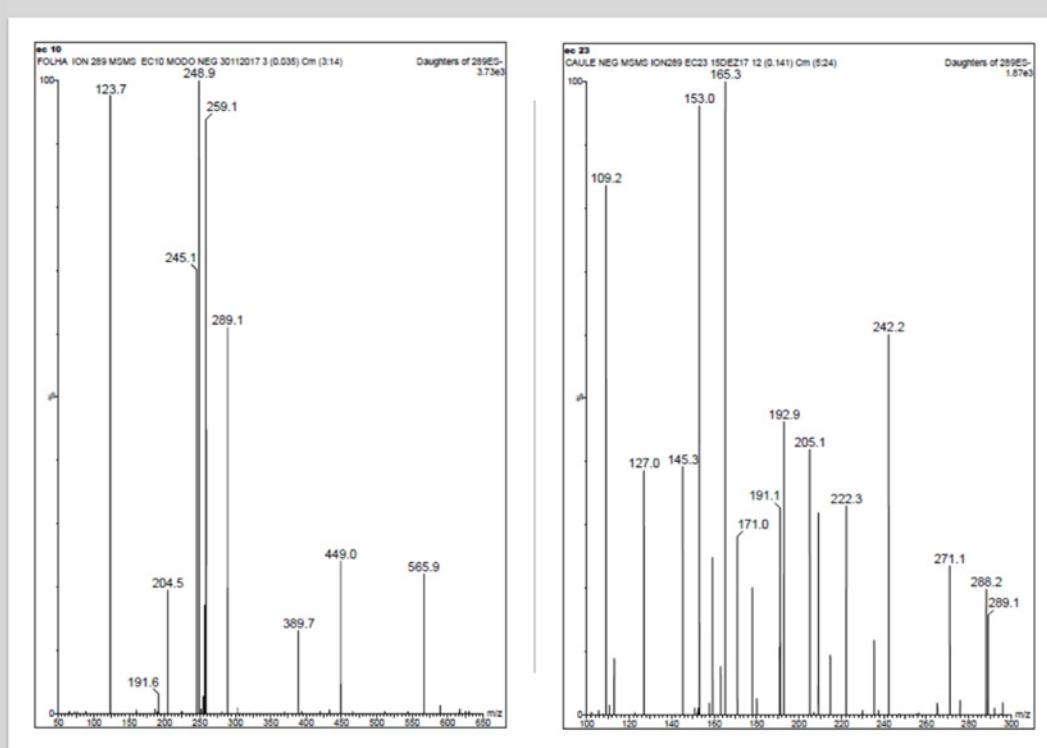
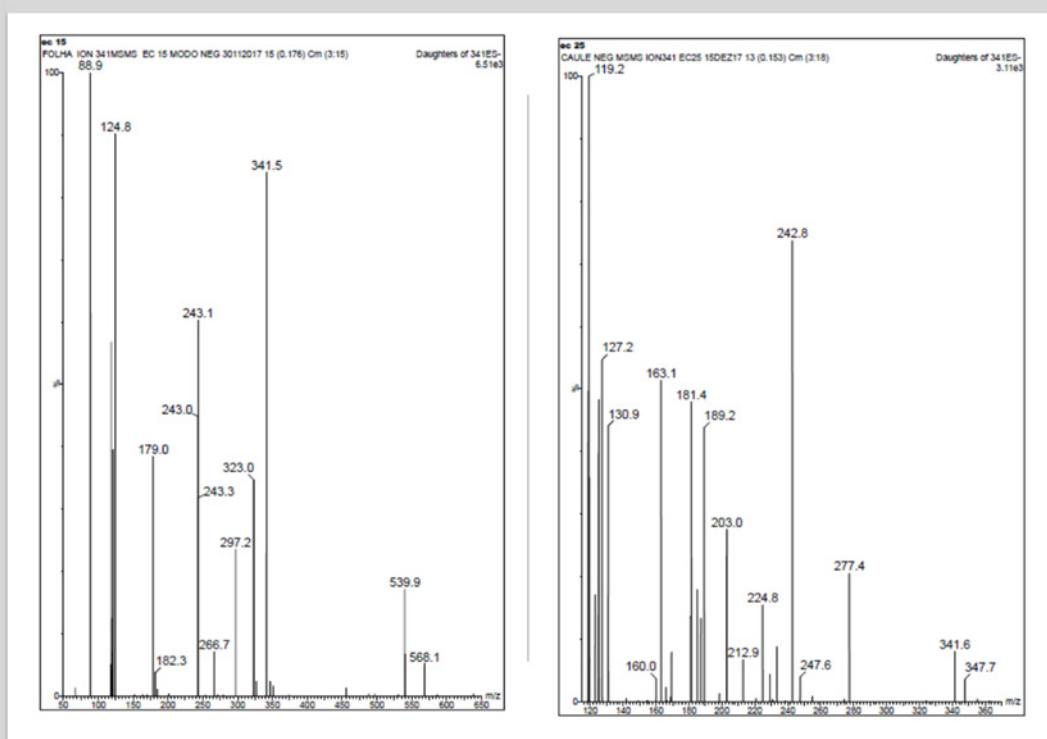
TROPICOS. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/42000230>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

- TOM, E. N. L. et al. The Janus face of chlorogenic acid on vascular reactivity: a study on rat isolated vessels. *Phytomedicine*, v. 23, p. 1037-1042, 2016.
- TORRES, E.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. Composição química dos componentes voláteis de *Capsicodendron dinisii* Schwancke (Canellaceae). *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 130-132, 2010.
- ULLRICH, V.; KISSNER, R. Redox signaling: Bioinorganic chemistry at its best. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 100, n. 12, p. 2079-2086, 2006.
- UNIVERSIDADE BRASIL. Controle químico e efeito de hormese em plantas. Boletim Técnico da Produção Animal: [s.n.], 2017.
- VIANI, R. A. G.; VIEIRA, A. O. S. Flora arbórea da bacia do rio Tibagi (Paraná, Brasil): Celastrales sensu Cronquist. *Acta bot. Bras*, v. 21, p. 457-472, 2007.
- VOSGERAU, M. Z. S. et al. Saúde da Família e Utilização de Medicamentos Anti-Hipertensivos e Antidiabéticos. *Rev Bras Cardiol*, v.24, p. 95-104, 2011.
- YANG, C. S. et al. Inhibition of Carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr*, v. 21, p. 381-406, 2001.
- YUKAWA, G. et al. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochemistry*, v. 69, p.70-74, 2004.
- WAGNER, H.; BLADT. S. **Plant drug analysis**. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.
- WANG et al. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 7, p. 2528-2532, 2007.
- WEN, A. et al. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, v. 20, n. 3, p. 305-311, 2003.

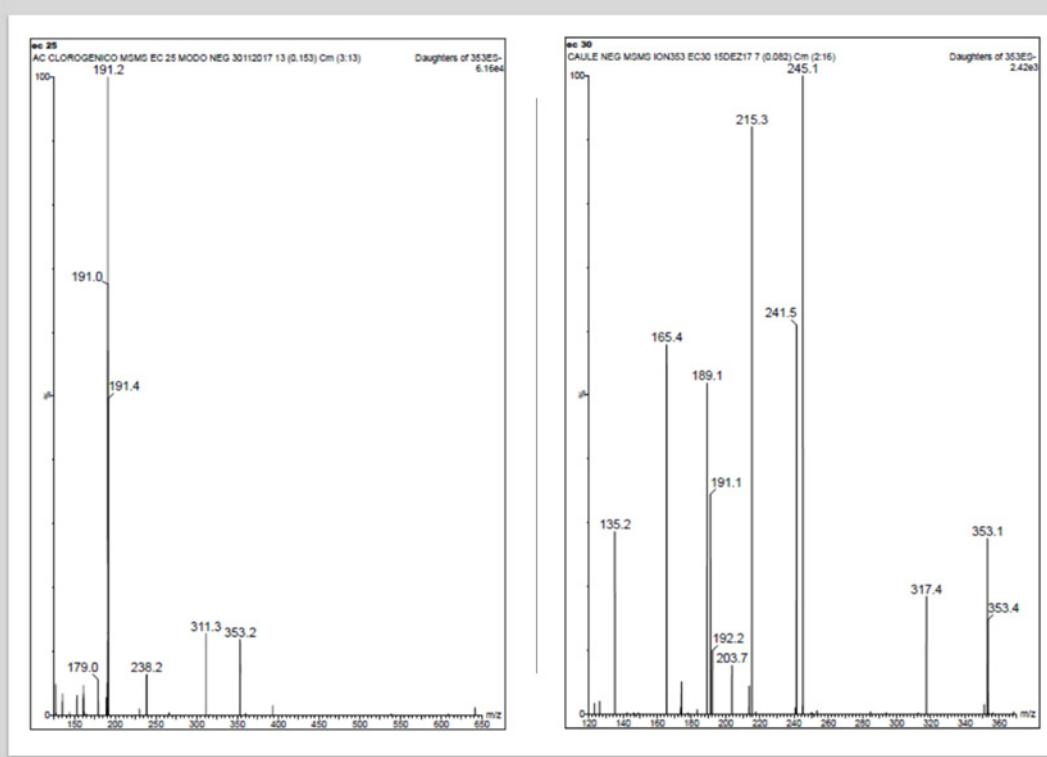
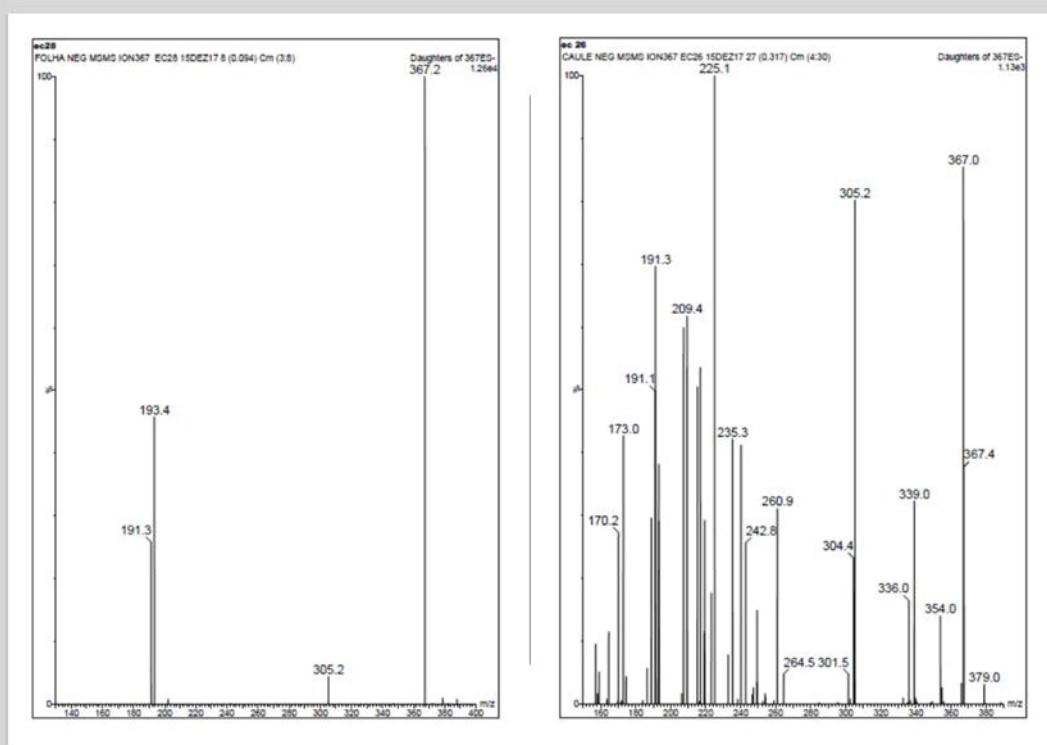
APÊNDICE 1 - ESPECTRO DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha* – ÍONS MOLECULARES 179 (ÁCIDO CAFÉICO) E 191 (ÁCIDO QUÍNICO).



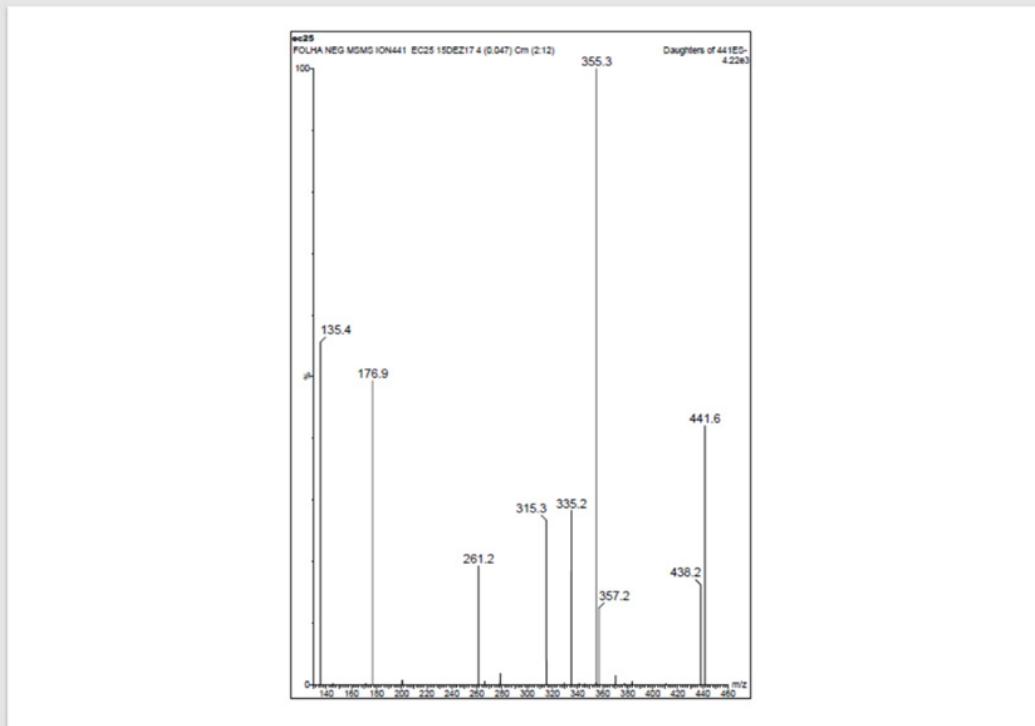
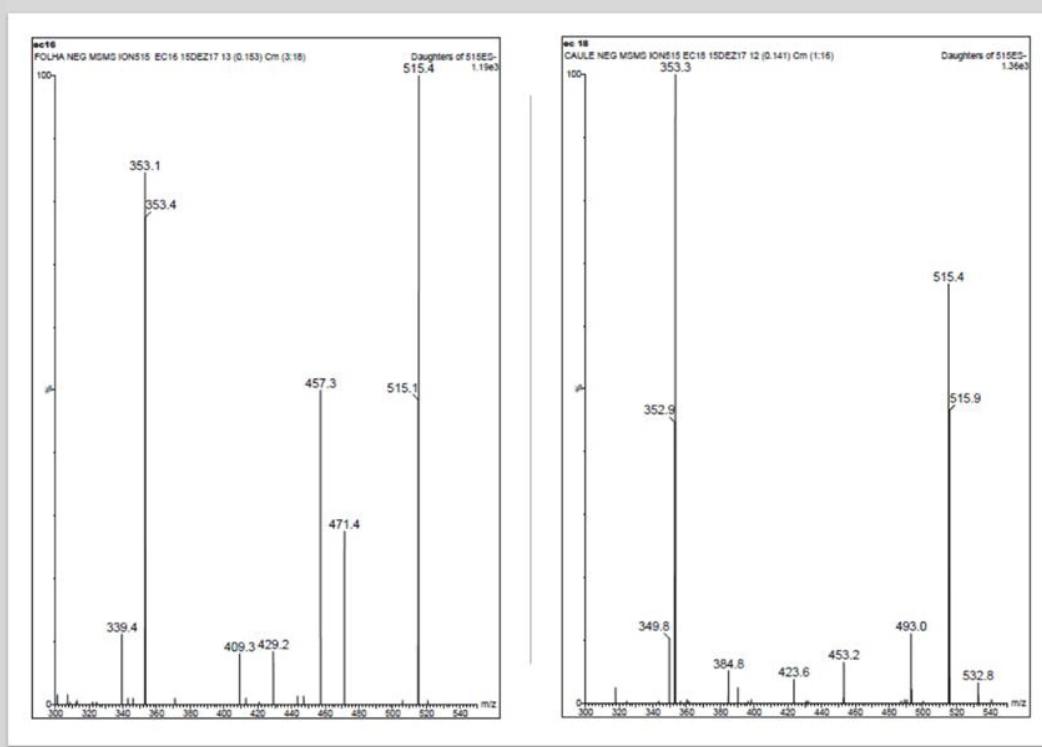
APÊNDICE 2 - ESPECTRO DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha* – ÍONS MOLECULARES 289 (EPICATEQUINA) E 341 (CAFEOIL GLICOSE).



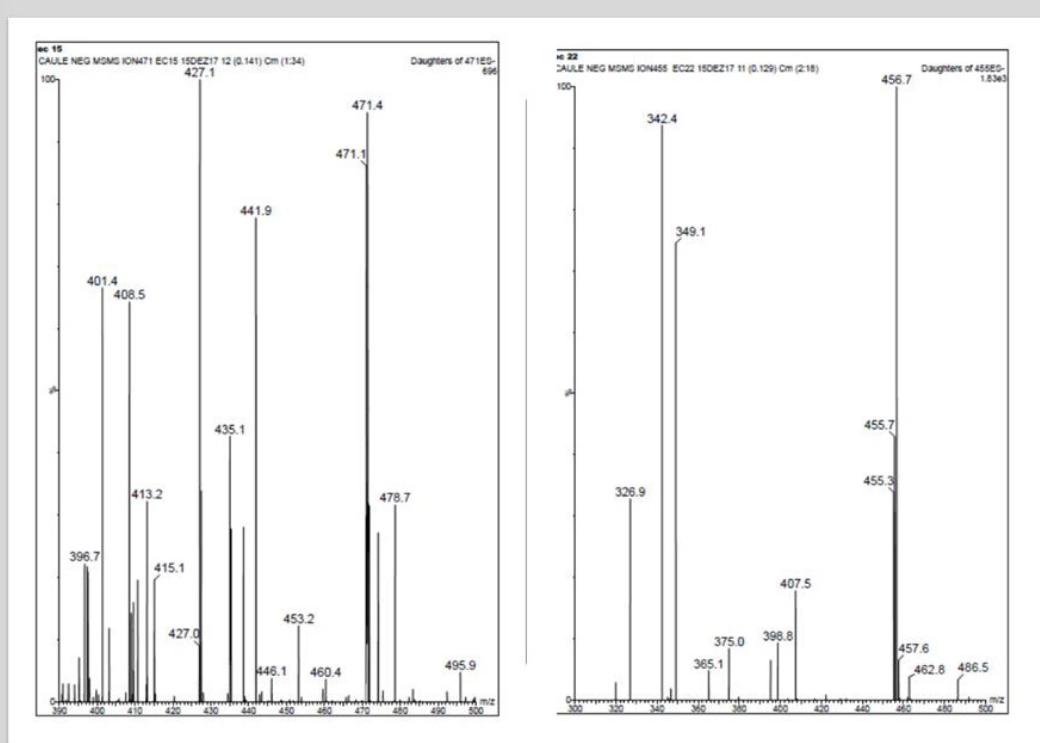
APÊNDICE 3 - ESPECTRO DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha* – ÍONS MOLECULARES 353 (CAFEOLQUÍNICO) E 367 (FERULOIQUÍNICO).



APÊNDICE 4 - ESPECTRO DE FOLHAS E CAULE DE *Citronella gongonha* – ÍONS MOLECULARES 515 (DICAFFEOILQUÍNICO) E 441 (EPICATEQUINA GALATO).



APÊNDICE 5 - ESPECTRO DE CAULE DE *Citronella gongonha* – ÍONS MOLECULARES 455 (METIL EPICATEQUINA GALATO) E 471 (EPIGALOCATEQUINA GALATO).



APÊNDICE 6 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) PARA O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE DE *Citronella gongonha*.

TABELA 14 - ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE *Citronella gongonha* – AVALIAÇÃO DO IVG PARA *Lactuca sativa*

CONCENTRAÇÕES µg/mL	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	EXTRATO BRUTO
1000	4,75± 0,433 ^a	4,87± 0,216 ^a	5,00± 0,000 ^a	5,00± 0,000 ^a
500	4,75± 0,433 ^a	5,00± 0,000 ^a	4,87± 0,216 ^a	5,00± 0,000 ^a
200	5,00± 0,000 ^a	5,00± 0,000 ^a	5,00± 0,000 ^a	5,00± 0,000 ^a
100	5,00± 0,000 ^a	5,00± 0,000 ^a	4,83± 0,290 ^a	4,87± 0,216 ^a
50	5,00± 0,000 ^a	5,00± 0,000 ^a	4,87± 0,216 ^a	5,00± 0,000 ^a

FONTE: A autora (2018).

NOTA: Controles negativos: metanol: 4,83 ± 0,216^a; água: 4,87± 0,290^a; Valores expressos em média ± DP; valores com diferentes letras são significativamente diferentes p< 0,05. Resultados para o Índice de Velocidade de Germinação foram estatisticamente não significativos em relação aos controles metanol e água.

TABELA 15 – ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Citronella gongonha* – AVALIAÇÃO DO IVG PARA *Lactuca sativa*

CONCENTRAÇÕES µg/mL	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	EXTRATO BRUTO
1000	5,00 ± 0,000 ^a	4,37 ± 0,478 ^a	4,75 ± 0,500 ^a	4,70 ± 0,344 ^a
500	5,00 ± 0,000 ^a	4,75 ± 0,288 ^a	5,00 ± 0,000 ^a	4,87 ± 0,250 ^a
200	5,00 ± 0,000 ^a	4,83 ± 0,335 ^a	4,81 ± 0,375 ^a	4,87 ± 0,250 ^a
100	5,00 ± 0,000 ^a	4,87 ± 0,250 ^a	5,00 ± 0,000 ^a	5,00 ± 0,000 ^a
50	5,00 ± 0,000 ^a	5,00 ± 0,000 ^a	4,83 ± 0,335 ^a	4,75 ± 0,500 ^a

FONTE: A autora (2018).

NOTA: Controles negativos: metanol: 5,00 ± 0,000^a; água: 5,00 ± 0,000^a; Valores expressos em média ± DP; valores com diferentes letras são significativamente diferentes p< 0,05. Resultados para o Índice de Velocidade de Germinação foram estatisticamente não significativos em relação aos controles metanol e água.

APÊNDICE 7 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE *Citronella gongonha*.

TABELA 16 - ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE CITRONELLA GONGONHA – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*

CONCENTRAÇÕES µg/mL	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	EXTRATO BRUTO
1000	28,25 ± 12,437 ^a	34,75 ± 3,645 ^a	31,10 ± 5,224 ^a	32,75 ± 10,295 ^a
500	29,25 ± 12,938 ^a	34,30 ± 4,255 ^a	35,75 ± 4,241 ^a	33,50 ± 5,113 ^a
200	33,55 ± 8,874 ^a	31,80 ± 3,515 ^a	34,00 ± 3,937 ^a	33,15 ± 7,058 ^a
100	36,40 ± 12,89 ^a	32,00 ± 3,301 ^a	31,70 ± 4,744 ^a	34,40 ± 3,903 ^a
50	31,70 ± 2,985 ^a	32,55 ± 4,737 ^a	30,50 ± 8,108 ^a	33,10 ± 8,135 ^a

FONTE: A autora (2018).

NOTA: Controles negativos: metanol: 30,50 ± 8,535^a; água: 33,10 ± 5,664^a; Valores expressos em média ± DP; valores com diferentes letras são significativamente diferentes p< 0,05. Resultados para crescimento do hipocótilo foram estatisticamente não significativos em relação aos controles metanol e água.

TABELA 17 - ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA DE CITRONELLA GONGONHA – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO RADÍCULA DE *Lactuca sativa*

CONCENTRAÇÕES µg/mL	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	EXTRATO BRUTO
1000	25,15 ± 10,209 ^a	39,20 ± 4,523 ^e	43,90 ± 6,441 ^f	34,70 ± 11,700 ^c
500	28,00 ± 11,983 ^b	39,60 ± 7,213 ^e	39,30 ± 7,988 ^e	41,70 ± 8,093 ^e
200	35,55 ± 9,409 ^c	42,55 ± 8,476 ^f	37,45 ± 5,800 ^d	40,95 ± 10,404 ^e
100	34,85 ± 14,008 ^c	52,80 ± 7,011 ⁱ	44,25 ± 6,541 ^f	45,00 ± 7,321 ^f
50	48,50 ± 9,436 ^h	47,70 ± 10,835 ^g	42,65 ± 11,774 ^f	41,80 ± 11,169 ^f

FONTE: A autora (2018).

NOTA: Controles negativos: metanol: 42,75 ± 11,431^c; água: 42,25 ± 8,437^c; Valores expressos em média ± DP; valores com diferentes letras são significativamente diferentes p< 0,05.

APÊNDICE 8 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Citronella gongonha*.

TABELA 18 - ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE CITRONELLA GONGONHA – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*

CONCENTRAÇÕES µg/mL	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	EXTRATO BRUTO
1000	29,15± 3,902 ^c	25,75 ± 7,313 ^b	29,30± 8,497 ^c	34,35± 4,725 ^d
500	33,95± 5,142 ^c	30,75± 5,699 ^c	24,85±12,923 ^a	35,10 ± 3,047 ^e
200	31,25± 5,557 ^c	30,35± 8,742 ^c	27,40± 12,030 ^c	31,15± 9,350 ^c
100	29,40± 4,715 ^c	28,50± 11,083 ^c	31,85± 3,525 ^c	30,10 ± 8,251 ^c
50	32,95± 5,370 ^c	31,35± 7,976 ^c	26,65± 12,293 ^c	34,30± 8,179 ^d

FONTE: A autora (2018).

NOTA: Controles negativos: metanol: 30,15 ± 6,83^c; água: 31,55± 4,22^c; Valores expressos em média±DP; valores com diferentes letras são significativamente diferentes p< 0,05.

TABELA 19 - ATIVIDADE FITOTÓXICA DE EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE CAULE DE CITRONELLA GONGONHA – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO RADÍCULA DE *Lactuca sativa*

CONCENTRAÇÕES µg/mL	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	EXTRATO BRUTO
1000	21,20 ± 3,203 ^a	23,20 ± 6,500 ^a	26,30 ± 8,961 ^a	25,55 ± 4,224 ^a
500	22,85 ± 2,127 ^a	29,55 ± 3,800 ^a	24,40 ± 11,186 ^a	25,35± 4,138 ^a
200	25,50 ± 4,129 ^a	25,90 ± 9,449 ^a	22,75 ± 10,103 ^a	25,75 ± 8,508 ^a
100	29,70 ± 4,172 ^a	25,20 ± 9,008 ^a	29,40 ± 3,826 ^a	26,30 ± 7,576 ^a
50	26,95 ± 5,920 ^a	29,45 ± 8,935 ^a	24,15 ± 10,541 ^a	23,15 ± 8,816 ^a

FONTE: A autora (2018).

NOTA: Controles negativos: metanol: 28,00 ± 6,693^a; água: 28,25± 8,142^a; Valores expressos em média ± DP; valores com diferentes letras são significativamente diferentes p< 0,05. Resultados para crescimento da radícula foram estatisticamente não significativos em relação aos controles metanol e água.

ANEXO 1 - DECLARAÇÃO POR COMPARAÇÃO DA ESPÉCIE *Citronela gongonha* (MART.) R.A. HOWARD



PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA
SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO VEGETAL
DIVISÃO DO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL

DECLARAÇÃO

Declaro, para os fins que se fizerem necessários, que identifiquei por análise comparativa uma coleta de *Citronella gongonha* (Mart.) R.A. Howard, planta pertencente à família botânica Cardiopteridaceae, material botânico coletado por Mariana Cardoso Oshiro, no município de Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Capão do CIFLOMA.

Executei essa identificação por comparação com a exsicata de número de tombo MBM 387516 da coleção do Museu Botânico Municipal de Curitiba.

Curitiba, 19 de dezembro de 2016.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcelo L. Brotto".

Marcelo Leandro Brotto
Engenheiro Florestal
matrícula 177474

**ANEXO 2 - EXSICATA MBM 387516 DA ESPÉCIE *Citronela gongonha* (MART.)
R.A HOWARD**



ANEXO 3 - DECLARAÇÃO POR COMPARAÇÃO DA ESPÉCIE *Citronela paniculata* (MART.) R.A. HOWARD



PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA
SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO VEGETAL
DIVISÃO DO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL

DECLARAÇÃO

Declaro, para os fins que se fizerem necessários, que identifiquei por análise comparativa uma coleta de *Citronella paniculata* (Mart.) R.A. Howard, planta pertencente à família botânica Cardiopteridaceae, material botânico coletado por Mariana Cardoso Oshiro, no município de Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Capão do Cifloma.

Executei essa identificação por comparação com a exsicata de número de tombo MBM 297713 da coleção do Museu Botânico Municipal de Curitiba.

Curitiba, 22 de agosto de 2016.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcelo Leandro Brotto".

Marcelo Leandro Brotto
Engenheiro Florestal
matrícula 177474

**ANEXO 4 - EXSICATA MBM 297713 DA ESPÉCIE *Citronella paniculata* (MART.)
R.A. HOWARD**



ANEXO 5- AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO CGEN - IBAMA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS**

**AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO
GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN N°35,
DE 27 DE ABRIL DE 2011
Nº 03/2014**

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa *"Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais"*.

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: **Cinco anos**, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº **02001.001165/2013-47**.

Brasília, 17 de março de 2014.

Volney Zanardi Junior
Presidente