



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ANNY CAROLYNE DA LUZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Bidens pilosa* E
Tithonia diversifolia NO ESPÍRITO SANTO E RESPOSTAS DO
METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO E IRRIGAÇÃO**

VITÓRIA - ES

2018

ANNY CAROLYNE DA LUZ

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Bidens pilosa* E
Tithonia diversifolia NO ESPÍRITO SANTO E RESPOSTAS DO
METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO E IRRIGAÇÃO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci

VITÓRIA - ES
2018

[PÁGINA DA FICHA CATALOGRÁFICA]

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Bidens pilosa* E *Tithonia diversifolia* NO ESPÍRITO SANTO E RESPOSTAS DO METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO E IRRIGAÇÃO

ANNY CAROLYNE DA LUZ

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 22 de março de 2018.

Comissão Examinadora:

Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci - PPGBV/UFES
Orientadora e Presidente da Comissão

Dr. Elias Terra Werner- PPGBV/UFES
Examinador Interno

Dr. Jose Aires Ventura - PPGBV/UFES
Examinador Interno

Dr^a. Sarah Maria Vargas - PPGBAN/UFES
Examinadora Externa

Dr^a. Rita de Cássia Ribeiro Gonçalves - PPGFAR/UFES
Examinadora Externa

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo por possibilitar a realização do meu Doutorado e toda minha formação acadêmica, desde a graduação.

À Fapes pelo financiamento da pesquisa e manutenção da minha bolsa, e pelo seu papel como grande fomentadora da ciência no estado do Espírito Santo.

Aos membros da banca examinadora que aceitaram realizar a avaliação da tese, contribuindo com suas sugestões.

À Do Carmo, minha paciente orientadora, uma mulher inspiradora, exemplo de sensatez e ética neste ambiente acadêmico tão corrompido pela falsa sensação de poder. Sempre disposta a compartilhar tudo que sabe, sem deixar de dar ouvidos as nossas ideias, valorizando a cada um de nós, alunos. E mais que isso, nos defendendo. Do Carmo, obrigada por tudo, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, obrigada por reconhecer meus esforços e dedicação, obrigada por acompanhar tudo tão de perto, há 12 anos! Obrigada por me dar o privilégio de ser amiga de uma pessoa tão admirável.

À Irany, a irmã que escolhi, a grande incentivadora da escolha do meu Doutorado, a minha companheira de jornada biológica e minha consultora *ad hoc*. Obrigada por todas as milhões de dúvidas - com ou sem sentido - que me esclareceu, por todas as horas, dias, meses e anos de bancada, de leitura, releitura de acertos e de erros. Obrigada por me ajudar a trilhar meus caminhos e a tomar as decisões mais difíceis, sendo sempre sincera no que achava que era melhor para mim.

Mainã, a mãe da paciência e da parcimônia, obrigada por me ajudar tanto com afinco e critério. Obrigada por discutir os géis, os pcr's, os DNAs e choros. Quem disse que o RAPD é simples? Obrigada pela sua amizade e por sua disponibilidade.

Miriele, Jean e Juliana, obrigada por toda ajuda no protocolos que desenvolvemos no laboratório, pelo companheirismo e ouvidos para as minhas perguntas.

À toda nossa equipe de laboratório, Suiany, Monique, Gillian, Crist, Judá, Sávio, Alex, obrigada pelo ambiente fraterno em que vivemos, afinal a gente mora na UFES, e por sempre estarem dispostos à ajudar. Obrigada por tantas conversas e risadas que deixaram mais leves esse período de tanto trabalho.

À todos os laboratórios e equipes que tornaram possível a realização de todas as análises. Ao NGACB e aos professores responsáveis pelo laboratório, onde realizei as amplificações e análises de géis, com a colaboração da bióloga Juliana Justino, muitíssimo competente e paciente. Ao LABIOM, laboratório sob responsabilidade do Professor Alexandre, onde realizei as análises de HPLC com o auxílio das técnicas Caroline e Natércia. Agradeço também ao Leonardo Valandro, pela ajuda com o uso do IRGA.

Agradeço à minha mãe, minha fortaleza, ainda que não entendesse minhas escolhas, me apoiou e me apoia. Sem você, eu não teria possibilidades de chegar até aqui. Obrigada por sempre me colocar de pé, me acalmar e enxugar minhas lágrimas.

Ao meu marido, pela paciência nesses tensos últimos dias, pelo companheirismo e dedicação. E, principalmente, obrigada por entender a minha necessidade de estar ausente em tantos momentos.

RESUMO

Bidens pilosa L. e *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray são plantas da família Asteraceae com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais. São plantas utilizadas para diversos fins terapêuticos, principalmente como anti-inflamatória, anti-séptica, hepatoprotetoras e na prevenção do câncer. As plantas dessa família apresentam um complexo sistema de defesa química, com metabólitos secundários derivados: compostos fenólicos, flavonoides, lactonas sesquiterpênicas e poliacetilenos. Estes compostos têm sua produção e acúmulo modificados em resposta às variações ambientais, ontogenéticas e também hereditárias. Assim, é importante controlar e padronizar todas as etapas envolvidas na produção de fitofármacos, desde a seleção do material vegetal inicial, as condições de cultivo, manejo pós-colheita e métodos de extração dos compostos bioativos. Os objetivos deste estudo foram avaliar através de marcadores genéticos, do tipo RAPD, a diversidade genética de diferentes populações de *B. pilosa* e *T. diversifolia*. Bem como, analisar como o manejo das condições de crescimento pode influenciar o crescimento, os parâmetros fotossintéticos, a produção de metabólitos secundários, a atividade antioxidante e citotóxica dessas plantas. *Bidens pilosa* apresentou baixos níveis de similaridade, indicando que o agrupamento encontrado não está apenas relacionado com a localização geográfica, mas, provavelmente, com a dispersão de sementes através de animais e a contaminação de espécies cultivadas com sementes de *B. pilosa*, o que facilitou o fluxo gênico, possibilitando que as populações de locais distantes fossem agrupadas em um cluster mais próximo devido à sua origem comum. Nas análises de *T. diversifolia* foram encontrados altos níveis de diversidade genética, não positivamente correlacionado com a proximidade geográfica. Apesar de muitas vezes ser propagada através de estaquia, *T. diversifolia* se reproduz sexuadamente, com grande número de sementes e apresenta uma abundante variedade de insetos polinizadores, características que contribuem para uma maior variabilidade genética. Em relação ao manejo das condições de crescimento, de modo geral, as aplicações de adubo aumentaram a fotossíntese e a massa seca total nas duas espécies estudadas. Entretanto, as plantas que não receberam adubação, apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante, o que pode estar relacionado à menor disponibilidade de nitrogênio. Esses resultados indicam que há aumento na

produção de metabólitos secundários quando a fotossíntese líquida decresce, consequência da regulação positiva do ácido chiquímico na via da pentose fosfato. As duas espécies não mostraram atividade citotóxica em linfócitos humanos, por outro lado diminuíram a viabilidade celular em sarcoma 180. Portanto, as análises indicam a possibilidade de se padronizar as formas de manejo no cultivo de Asteraceae, a fim de alcançar altos níveis de compostos fenólicos e de biomassa, atrelando o aumento da eficiência da atividade biológica com o aumento da produtividade.

Palavras-chave: RAPD • compostos fenólicos • atividade antioxidante • picão preto • girassol mexicano • fotossíntese • HPLC • MTT • nutrição mineral • déficit hídrico

ABSTRACT

Bidens pilosa L. and *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray are plants of the Asteraceae family with distribution in tropical and subtropical regions. They are plants used for various therapeutic purposes, mainly anti-inflammatory, antiseptic, hepatoprotective and prevention of cancer. The plants of this family present a complex chemical defense system, with derived secondary metabolites: phenolic compounds, flavonoids, sesquiterpene lactones and polyacetylenes. These compounds have their production and accumulation modified in response to environmental, ontogenetic and also hereditary variations. Thus, it is important to control and standardize all phases involved in the production of phytopharmaceuticals, from the selection of the initial plant material, the conditions of cultivation, post-harvest management and extraction methods of the bioactive compounds to final product. The objectives of this study were to evaluate using RAPD molecular markers, the genetic diversity of different populations of *B. pilosa* and *T. diversifolia*. Also analyze how the management of the growth conditions can influence the growth, the photosynthetic parameters, the production of secondary metabolites, the antioxidant and cytotoxic activity of these plants. *B. pilosa* presented low levels of similarity, indicating that the grouping found is not only related to the geographic proximity, but probably to the dispersion of seeds through of animals and the contamination of species cultivated with *B. pilosa* seeds, which facilitated the gene flow, enabling the population of distant sites to be grouped in a closer cluster due to their common origin. In the analyzes of *T. diversifolia* high levels of genetic diversity were found, not positively correlated with the proximity of geographic locations. Although it is often propagated by cuttings, *T. diversifolia* reproduces sexually, with a large number of seeds and presents an abundant variety of pollinators insects, characteristics that contribute to a greater variability genetic. Regarding the management of the cultivation conditions, in general, the fertilizer applications increased the photosynthesis and the total dry mass for the two species studied. However, the plants that did not receive fertilization had the highest levels of phenolic compounds and higher antioxidant activity, a result related to the lower availability of nitrogen to no fertilized plants. These results indicate that there is an increase in the production of secondary metabolites when liquid photosynthesis decreases, resulting from the positive regulation of the shikimic acid in the pentose

phosphate pathway. The species did not show cytotoxic activity in human lymphocytes while decreasing cell viability in sarcoma 180. It is important to standardize the management practices in Asteraceae cultivation in order to achieve high levels of phenolic compounds and biomass, linking the increasing of biological activity efficiency with increased productivity.

Keywords: RAPD • phenolic compounds • antioxidant activity • black-jack • mexican sunflower • photosynthesis • HPLC • MTT • mineral nutrition • water déficit

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Perspectivas para os sistemas produtivos de plantas medicinais.....	19
Figura 2- Inflorescência, frutos e folhas de <i>Bidens pilosa</i>	23
Figura 3 - Estrutura de poliacetileno de <i>Bidens pilosa</i>	24
Figura 4- Flavonoides de <i>Bidens pilosa</i>	25
Figura 5 - Compostos fenólicos de <i>Bidens pilosa</i>	25
Figura 6- <i>Tithonia diversifolia</i>	27
Figura 7 - Metabólitos secundários de <i>Tithonia diversifolia</i>	28
Figura 8 - Principais rotas do metabolismo secundário	30
Figura 11 - Foto de gel de RAPD de amostras <i>Tithonia diversifolia</i>	38
Figura 12- Estrutura química da unidade básica do grupo Fenol	40
Figura 13 - Rotas de síntese dos compostos fenólicos.	41
Figura 14 - Atividade catalisadora da fenilalanina amônia liase	42
Figura 16 - Exemplos de ácidos fenólicos simples	44
Figura 17 - Estruturas químicas de ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico. ..	44
Figura 18 – Cinarina.....	45
Figura 20 - Unidade fundamental de flavonoide	48
Figura 21 - Estrutura química da quercetina	49
Figura 22 - Exemplos de classes de flavonoides	50
Figura 23 - Ácido gálico e ácido elágico.....	51
Figura 24 - Estrutura química de taninos condensados	52
Figura 25 - Etapas da rota biossintética das cumarinas.....	53
Figura 26 - Estabilização dos radicais livres DPPH• e ABTS•	57
Figura 27 - Redução do complexo TPTZ com Fe ³⁺	57
Figura 28 - Reação de redução do Fe ³⁺ em Fe ²⁺	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. PLANTAS MEDICINAIS: USO TRADICIONAL E PERSPECTIVAS DE PRODUÇÃO.....	17
2.2. ASTERACEAE	20
2.2.1. <i>Bidens pilosa</i>.....	22
2.2.2. <i>Tithonia diversifolia</i>.....	26
2.3. METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO: PROCESSOS INTEGRADOS.....	29
2.4. DIVERSIDADE GENÉTICA DE PLANTAS MEDICINAIS E RAPD.....	35
2.5. COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	40
2.5.1. Ácidos fenólicos.....	43
2.5.2. Flavonoides	45
2.5.3. Taninos.....	51
2.5.4. Cumarinas	52
2.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	54
3. OBJETIVO GERAL	61
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
CAPÍTULO 1 – GENETIC DIVERSITY OF POPULATIONS OF <i>Bidens pilosa</i> L. AND <i>Tithonia diversifolia</i> HEMSL. AT ESPÍRITO SANTO	63
CAPÍTULO 2 – DIFFERENT GROWTH CONDITIONS ON <i>Bidens pilosa</i> L. INDUCE CHANGES IN THE PHENOLIC COMPOUND CONTENT, BIOMASS, GAS EXCHANGE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES.....	77
CAPÍTULO 3 - CHANGES ON THE PRIMARY AND SECONDARY METABOLITE ACCUMULATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF <i>Tithonia diversifolia</i> UNDER ORGANIC AND INORGANIC FERTILIZER	103

CAPÍTULO 4 – INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO NOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE <i>Tithonia diversifolia</i> (HEMSL.) A. GRAY E SEUS EFEITOS CITOTÓXICOS EM LINFÓCITOS HUMANOS E SARCOMA 180 DE CAMUNDONGOS.....	118
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	139
REFERÊNCIAS.....	140
ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	150
ANEXO B - Parecer consubstanciado de aprovação pela comissão e ética em pesquisa.....	151

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas medicinais remonta à 4.600 anos, sendo utilizado até hoje como terapia alternativa, ou até mesmo, como única forma de tratamento ao alcance de determinados grupos sociais. O consumo desses vegetais se dá, principalmente através da coleta e não do plantio, o que pode acarretar em desaparecimento de espécies, além não haver garantia da identificação botânica da planta e da asserção da presença dos compostos bioativos.

O cultivo de plantas medicinais pode assegurar a padronização química do material vegetal, constância na sua oferta e certeza da espécie utilizada, aumentando a qualidade e segurança do produto fitoterápico, favorecendo, conseqüentemente, a aceitação e manutenção dos consumidores. Ademais, o cultivo de plantas medicinais auxilia na manutenção da biodiversidade.

Diversas famílias botânicas que apresentam relevância medicinal podem ser cultivadas, entre elas Asteraceae, a qual pertencem as espécies *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia*. *Bidens pilosa* é uma planta herbácea distribuída por toda zona intertropical do planeta, com diversos usos terapêuticos: atividade antidiabética, antimalárica, antitumoral, anticâncer, antimicrobiana, antioxidante e hepatoprotetora. Suas ações medicinais estão relacionadas à presença de ácidos fenólicos, flavonoides e poliacetilenos. *Tithonia diversifolia* é uma planta invasora, de porte arbóreo, nativa da América Central e México. É utilizada para o tratamento tradicional de diabetes, malária, mordida de cobra, sarampo, úlcera, diarreias entre outras. Seus principais constituintes químicos, aos quais são atribuídas as suas diversas ações farmacológicas, são os flavonoides, as lactonas sesquiterpênicas e os ácidos fenólicos.

As ações terapêuticas os vegetais são relacionadas às substâncias produzidas por seu metabolismo secundário. Nas plantas, o metabolismo secundário e primário do carbono são interligados e balanceados por diferentes vias metabólicas, como a do ácido chiquímico, a do mevalonato, a via do ácido cítrico e a via de condensação do acetato. Diversas hipóteses tentam explicar o balanço entre o metabolismo secundário e primário, ou seja, as vantagens adaptativas do investimento da planta em defesa vegetal, visto que representam um custo energético. A maior parte delas defende que as concentrações de metabólitos secundários são negativamente correlacionadas com as taxas de crescimento, sendo esta relação entre metabolismo

primário e secundário dependente da competição por nutrientes, luz, carboidratos e pela fenilalanina.

A produção de metabólitos secundários é o resultado da interação entre processos de síntese, transporte, armazenamento e degradação, controlados pela expressão gênica diferencial. Estes processos são determinados por três fatores principais: características genéticas, estágio de desenvolvimento do vegetal e variações ambientais. Portanto, a caracterização genética e química de espécies vegetais medicinais é importante para conservação dessas espécies e para a adoção de estratégias de seleção, melhoramento e uniformidade no cultivo que resultem em maior produtividade de metabólitos, garantindo matéria-prima padronizada e de qualidade para produção de fitoterápicos.

O aumento da busca por terapias alternativas, produtos naturais, nutracêuticos, compostos bioativos de interesse farmacêutico e fitoterápico evidenciam ainda mais a importância de estudos que auxiliam na padronização da produção e acúmulo de metabólitos secundários de ação medicinal por plantas, promovendo a qualidade, segurança e eficácia no uso dessas substâncias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PLANTAS MEDICINAIS: USO TRADICIONAL E PERSPECTIVAS DE PRODUÇÃO

Há milhares de anos o homem utiliza os recursos vegetais com fins terapêuticos, sendo que a primeira documentação escrita sobre o uso de ervas medicinais data do século 26 a.C., na Mesopotâmia (LONG et al., 2003).

A utilização de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento tópico até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial (LORENZI; MATOS, 2002). O aumento do interesse por fitofármacos relaciona-se a vários fatores: contra-indicações e efeitos colaterais ocasionados pelo uso de fármacos sintéticos, dificuldade de acesso aos medicamentos por algumas camadas da população mundial e, até mesmo, a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

A atenção dirigida pelas autoridades e administrações de saúde para o uso de plantas medicinais aumentou consideravelmente nos últimos anos. Incentivos em investimentos públicos para políticas de uso e desenvolvimento de fármacos à base de plantas medicinais têm sido feitos pela OMS desde 1978, observando-se crescente aceitação da fitoterapia por profissionais de saúde da atenção básica (HOMAR, 2005).

No Brasil, o uso das plantas medicinais implica frequentemente, na coleta de espécies em seus locais de ocorrência natural, sejam nativas ou exóticas (MING et al., 2003), o que pode levar ao seu desaparecimento em uma dada região.

Somente 8% das espécies vegetais brasileiras existentes foram estudadas em termos de compostos bioativos. Portanto, com a rapidez em que tem ocorrido a extinção das espécies vegetais, um grande número de plantas com ações medicinais podem desaparecer antes de seu valor ser reconhecido (SIMÕES et al., 1999), tornando-se improrrogável o aumento de pesquisas nesta área do conhecimento.

É incoerente que plantas medicinais utilizadas em larga escala, quer pela indústria farmacêutica e/ou por programas governamentais, sejam coletadas e não cultivadas. Contudo, essa é caracteristicamente a principal forma de obtenção

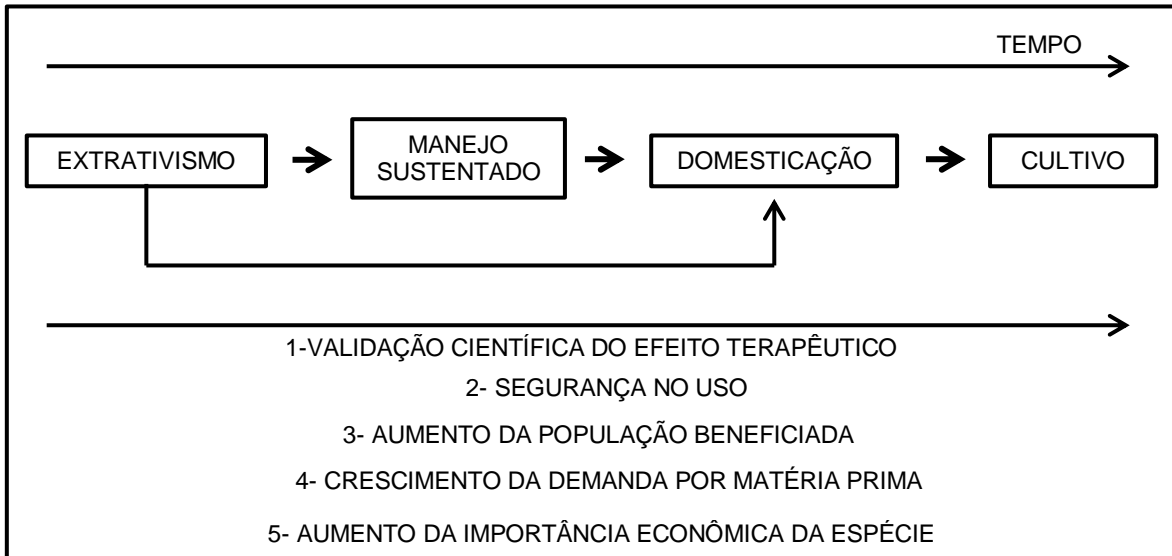
desses materiais vegetais. Poucas são as iniciativas e experiências no cultivo de espécies medicinais, principalmente, das nativas (MING et al., 2003).

Ambientes com reduzida disponibilidade de recursos resultam em plantas que alocam mais substâncias para síntese de compostos fenólicos defensivos contra doenças, insetos ou outras injúrias, ao invés de investirem em crescimento (HERMS, 2002; RIPI et al., 2002). Isso ajuda a difundir a ideia de que para possuir efeito terapêutico a planta deve ser coletada no seu ambiente natural. O que não é válido, visto que já é bastante comum o cultivo das plantas medicinais como, a sálvia (*Salvia officinalis*), a camomila (*Matricaria recutita*), a digitalis (*Digitalis lanata*), a ipeca (*Psychotria ipecacuanha*) e o jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) (MONTANARI, 2002). É importante considerar que as condições ideais para o desenvolvimento e produção de biomassa, nem sempre serão as mais adequadas para a produção de princípios ativos de interesse, pois muitas espécies produzem substâncias bioativas quando submetidas a condições de estresse (SIMÕES et al., 2017).

A domesticação e o cultivo de plantas medicinais podem aliar o aumento da sua produção de metabólitos secundários e de sua produtividade. São inúmeras as vantagens do cultivo de plantas medicinais: padronização química do material vegetal, constância na sua oferta, asserção em relação à espécie utilizada - não ocorrendo troca de espécies como poderia haver em uma coleta, redução no risco de extinção, diminuição do desmatamento, entre outras (MING et al., 2003).

O processo de domesticação e cultivo está atrelado ao aumento da importância econômica de uma espécie medicinal (Figura 1), favorecendo também, a sua validação terapêutica, segurança de uso e, conseqüente aumento da demanda e da população beneficiada.

Figura 1- Perspectivas para os sistemas produtivos de plantas medicinais.



Adaptado de: Montanari (2002)

O cultivo relaciona-se às atividades humanas na condução do processo agrícola, como adubação, poda, preparo do solo, irrigação. A domesticação, por sua vez, está ligada à resposta genética de plantas ou animais ao processo agrícola (MONTANARI, 2002).

Um dos objetivos da domesticação das plantas medicinais é a seleção de indivíduos que se adaptem às condições de cultivo com alta produção de metabólitos secundários. Ao cultivar uma planta selvagem serão desencadeadas mudanças na estrutura genética da população manejada, através das sucessivas gerações cultivadas. Estas mudanças são uma resposta evolutiva da população, que antes estava sujeita às pressões naturais de seleção e que sob cultivo estão sujeitas a pressões diferentes, causadas pelo homem, aumentando, com isso, o grau de parentesco entre as plantas, tornando-as mais uniformes (PETERS, 1994).

Além da importância da manutenção da biodiversidade, vale considerar que o cultivo e domesticação de plantas medicinais aumentam a qualidade e segurança do produto fitoterápico, favorecendo a aceitação e a manutenção dos consumidores. Assim, é importante controlar e padronizar todas as etapas envolvidas na produção de fitofármacos, como a seleção do material vegetal inicial, as condições de cultivo, métodos de extração, e a quantificação de metabólitos secundários ou compostos bioativos no produto final (BOTT et al., 2010)

Várias famílias botânicas são consideradas de importância medicinal, entre as quais encontra-se a Asteraceae, a qual pertencem as espécies *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia*, conhecidas por picão-preto e girassol-mexicano, respectivamente (LORENZI ; SOUZA 1999), que são plantas listadas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009).

2.2. ASTERACEAE

As Asteraceae encontram-se disseminadas por todos os continentes, exceto Antártica, com representação mais ampla nas regiões temperadas e semi-áridas dos trópicos e subtropicais (ROQUE; BAUTISTA, 2008), sendo muitas de suas espécies invasoras (BERETTA et al., 2008). Hodgins et al., (2015) sugerem que múltiplas vias evolutivas podem levar à adaptação durante a introdução e disseminação das espécies de Asteraceae nos diferentes ambientes.

Asteraceae é uma da família vegetal bem sucedida, possui cerca de 23.000 espécies e 1.600 gêneros (ANDERBERG et al., 2007) e representa 10% do total da flora de angiospermas (WILSON, 1988). No Brasil, existem aproximadamente 2.000 espécies e 250 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2008). Esses números são consequência da alta diversificação de suas espécies, não somente em hábitat e forma de vida, como também nos métodos de polinização e dispersão de sementes (CRONQUIST, 1981).

Seu sucesso evolutivo também é atribuído a um desenvolvido sistema químico de defesa, que inclui a produção combinada de compostos secundários derivados (CRONQUIST, 1988), tais como: terpenoides como as lactonas sesquiterpênicas, alcaloides, fenóis e poliacetilenos. Além de sua importância ecológica, os compostos bioativos de Asteraceae tornam essa família relevante em aspectos bioquímicos, econômicos e farmacológicos (CHADWICK et al., 2013; HEINRICH et al., 1998).

As lactonas sesquiterpênicas são um grupo de metabólitos secundários encontrados em todo o reino Plantae, compreendendo mais de 5.000 compostos conhecidos (WEDGE et al., 2000). No entanto, eles são prevalentes em Asteraceae, onde podem ser encontrados quase de forma ubíqua (PICMAN, 1986) e são considerados marcadores taxonômicos (HRISTOZOV et al., 2007; SEAMAN, 1982;

ZDERO; BOHLMANN, 1990), tendo sua produção altamente controlada em nível de tradução (CHADWICK et al., 2013).

As lactonas sesquiterpênicas reduzem danos oxidativos, podendo desempenhar um papel significativo na saúde humana. Apresentam potencial para o tratamento de doenças cardiovasculares e câncer, uma vez que sensibilizam células tumorais para tratamentos com drogas convencionais (CHADWICK et al., 2013).

Além das lactonas sesquiterpênicas, outro grande grupo de metabólitos secundários de Asteraceae são os poliacetilenos, que também são considerados marcadores taxonômicos para a família, caracterizando as suas várias tribos por meio de conjuntos individuais de metabólitos de acetileno, especialmente para o complexo de espécies do gênero *Bidens* (GROMBONE-GUARATINI et al., 2005; KONOVALOV, 2014). Mais de 1.100 tipos de poliacetilenos já foram identificados em plantas desta família (KONOVALOV, 2014). Os compostos de poliacetileno da família Asteraceae possuem efeitos citotóxicos, antimicrobianos, antiinflamatórios, neurotóxicos, fototóxicos (KONOVALOV, 2014).

Os compostos fenólicos também apresentam significativas funções ecológicas e medicinais nestas plantas. Estas substâncias possuem, no mínimo, um anel aromático em que pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Tais compostos são produzidos por plantas e microorganismos e fazem parte do metabolismo animal, que necessitam obtê-los através da alimentação (SIMÕES et al., 1999).

Os compostos fenólicos são atrativos para animais - tendo função na polinização e dispersão de sementes - apresentam atividade alelopática e protegem as plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias (STRACK, 1997). Além disso, possuem diversas propriedades medicinais: antibacteriana, imunoregulatória, expectorante, clareadora da pele, hipocolesterolêmica, hepatoprotetora, analgésica e atividade antioxidante (SIMÕES et al., 1999).

Segundo o sistema de classificação proposto por Anderberg et al., (2007), Asteraceae é dividida em 2 subfamílias (Lacticoideae e Asteroideae) e 17 tribos, das quais, 8 são da primeira (Lactuceae, Mutisieae, Eremothamanceae, Arctotideae, Carduceae, Vernonieae, Liabeae e Eupatorieae) e 9 são da segunda subfamília

(Senecioneae, Tageteae, Heliantheae, Inuleae, Anthemideae, Ursineae, Calenduleae, Cotuleae e Astereae) .

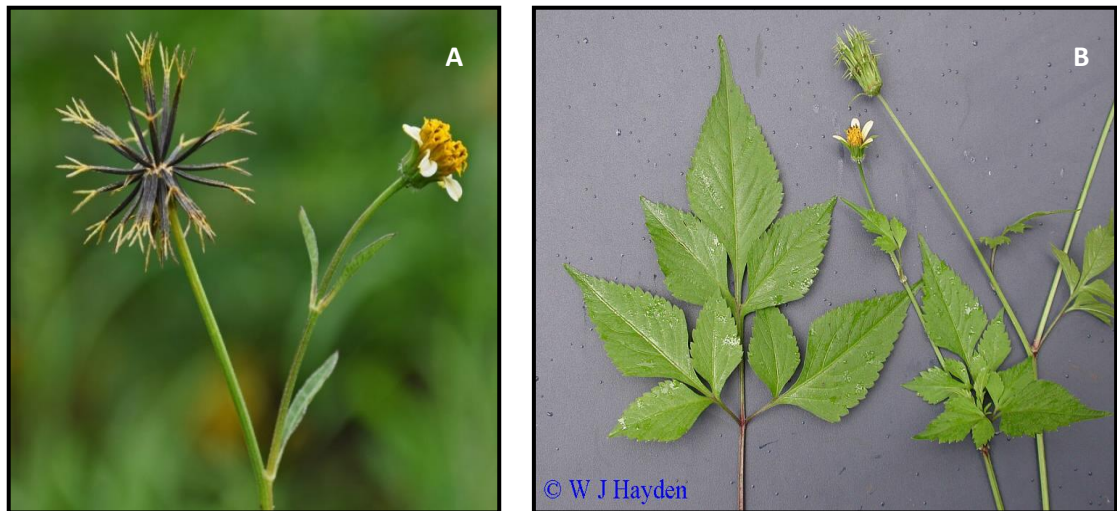
Relações taxonômicas têm sido propostas dentro da tribo Heliantheae, bem como com outras tribos, tendo como base sua composição de metabólitos secundários (CHRISTENSEN; LAM, 1991; JENSEN; SÖRENSEN; LARSEN, 1961). O interesse nesses compostos vai além da quimiotaxonomia, as atividades biológicas das substâncias predominantes na tribo são crescentemente investigadas (ARIDOAN, 2006). *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia* são duas espécies da família Asteraceae, com interesse medicinal, que pertencem à tribo Heliantheae (FERNANDES; RITTER, 2009; MOURA; ROQUE, 2014).

2.2.1. *Bidens pilosa*

O gênero *Bidens* é composto por cerca de 230 espécies de porte herbáceo, a maioria com hábitos ruderais, distribuídos ao longo de toda a zona intertropical do planeta (LORENZI, 2000). Suas espécies apresentam diversos usos: antitérmico, analgésico, hepatoprotetor (JÄGER; HUTCHINGS; VAN STADEN, 1996; MORTON, 1981), contra tumores de mama, esplenomegalia, dores de garganta, problemas de estômago e asma (HARTWELL, 1982; REDL; DAVIS; BAUER, 1992), ação anti-inflamatória (REDL et al., 1994) e antiulcerogênica (DE LA LASTRA et al., 1994).

Bidens pilosa L., conhecida popularmente como picão-preto, é uma erva pequena, anual, com altura de 50 a 130 cm, com inflorescências em capítulos terminais com flores tubulares e radiadas, frutos são aquênios, alongados de cor preta e ganchos aderentes em uma das extremidades (Figura 2A) ramificada desde a base, possui talos tetragonais, é glabra, apresenta folhas opostas, pecioladas, bordas serrilhadas (Figura 2B) e (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 2- Inflorescência, frutos (A) e folhas (B) de *Bidens pilosa*.



Fonte: Flora of Kaxil Kiuc

Bidens pilosa possui seis variedades, sendo que três destas ocorrem no Brasil: *pilosa*, *minor* e *radiata* (SHERFF, 1937). Juntamente à análise das características morfológicas, a identificação de *B. pilosa* pode ser realizada através da quimiotaxonomia e da caracterização molecular (CHIEN et al., 2009).

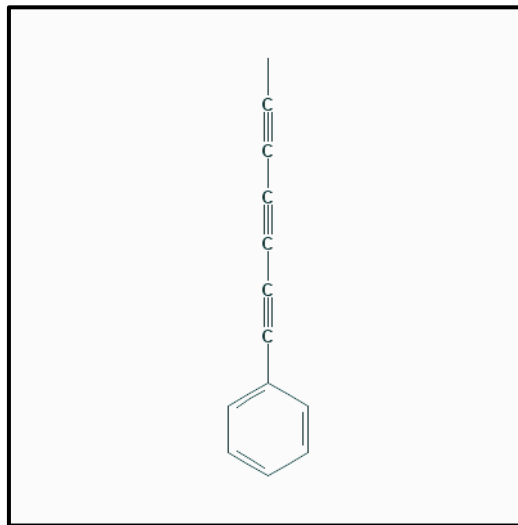
Em todo o mundo, *Bidens pilosa* tem uma longa tradição na medicina popular para tratamento de várias doenças, sendo utilizados diversos tipos de preparações a partir das diferentes partes do vegetal (XUAN; KHANH, 2016).

As ações terapêuticas de *B. pilosa* estão geralmente associadas à presença de compostos fenólicos, como os flavonoides, e também aos poliacetilenos, ambos abundantes em nesta espécie (SILVA et al., 2011; UBILLAS et al., 2009; WANG et al., 2010). É conhecida sua atividade antidiabética (CHIEN et al., 2009) antitumoral (KVIECINSKI et al., 2008), anticâncer (KUMARI et al., 2009), antimicrobiana (CORTÉS-ROJAS et al., 2013), antimalárica (ANDRADE-NETO et al., 2004; KUMARI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2004), hepatoprotetora (KVIECINSKI et al., 2011), antioxidante (KRISHNAIAH et al., 2011). E, é usada para o tratamento da icterícia, condição certificada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 2010).

Já foram isolados 34 compostos acetilenos de *Bidens pilosa*, sendo os poliacetilenos com 13 carbonos os mais frequentes (BOHLMANN; BURKHARDT; ZDERO, 1973; CHRISTENSEN; LAM, 1991; TOWERS; WAT, 1978; WAT et al.,

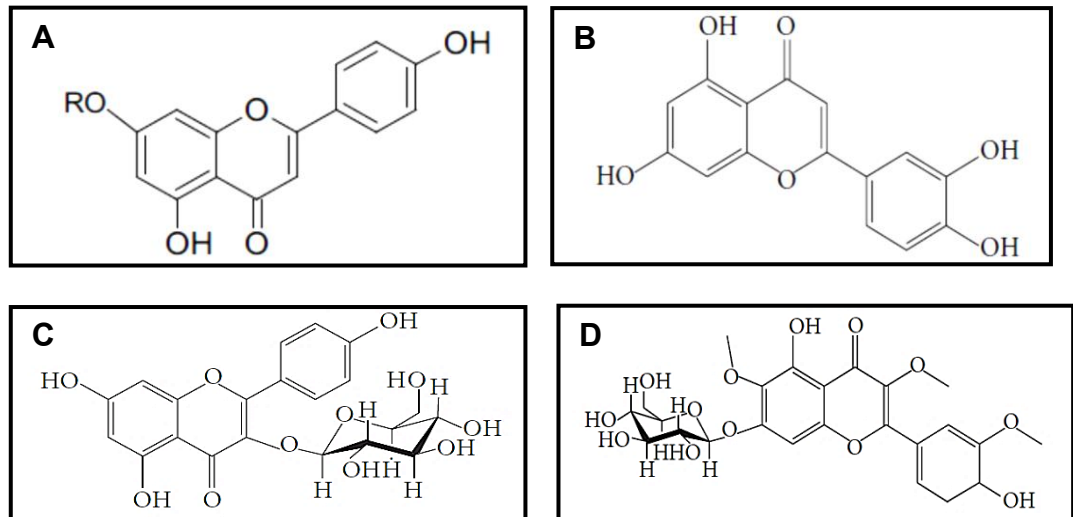
1979), dentre estes o mais representativo é o 1-fenilepta-1,3,5-tri-ino (Figura 3), um composto foto-ativado que absorve radiação ultravioleta e está presente em folhas, caules e raízes (JENSEN; SÖRENSEN; LARSEN, 1961; TOWERS; WAT, 1978; WAT; JOHNS; TOWERS, 1980; WAT et al., 1979). Também foi isolado de *B. pilosa* um grupo de poliacetilenos glicosídeos, que são portadores de um radical de glicose ou ramosa, através de uma ligação -O- glicosídica (GANJEWALA et al., 2008; MEYER, 2002).

Figura 3 - Estrutura de poliacetileno de *Bidens pilosa* (1-fenilepta-1,3,5-tri-ino)



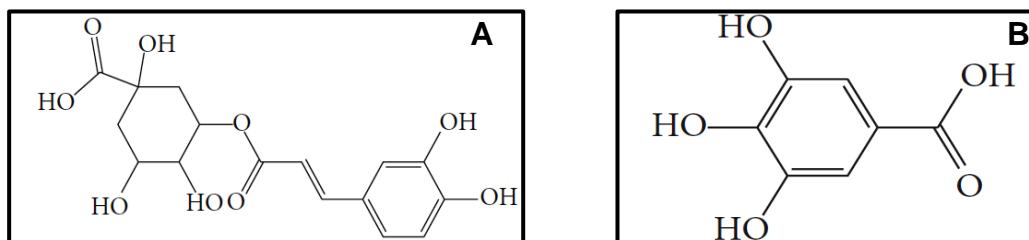
O perfil de flavonoides de *B. pilosa* inclui auronas, chalconas, flavanonas, flavonas e flavonóis com uma ampla variedade nos padrões de O-metilação e glicosilações (BOHM; STUESSY, 2001). Entre as flavonas e flavonóis encontrados em *B. pilosa*, a maior parte deles são glicosídeos de apigenina, luteolina, kaempferol e quercetina (Figura 4) (BOHM; STUESSY, 2001; XUAN; KHANH, 2016).

Figura 4- Flavonoides de *Bidens pilosa*. (A) Apigenina 7-O-glucosídeo, (B) 2-(3,4-Dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona (luteolina), (C) Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo e (D) Quercetina-3,6,3'-trimetil-eter-7-O- β -glucosídeo.



Muitos outros compostos são encontrados em *Bidens pilosa*, entre eles vale destacar os hidrocarbonetos aromáticos simples, dos quais derivam os ácidos vanílico, salicílico e protocatecuico, bem como os fenilpropanóides e seus ácidos fenólicos derivados: ácido coumárico, ferúlico, clorogênico, tânico, gálico e cafeoilquínico (Figura 5) (DEBA et al., 2007; XUAN; KHANH, 2016). São também descritos para a espécie os seguintes metabólitos da via do mevalônico: esteróis, monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e sesquiterpenos (ARROYO et al., 2008; ARROYO; BONILLA; BARREDA, 2010; ATTA; MOUNEIR, 2005; SILVA et al., 2011; XUAN; KHANH, 2016).

Figura 5 - Compostos fenólicos de *Bidens pilosa*: (A) Ácido Clorogênico e (B) Ácido Gálico.



Os metabólitos secundários de *Bidens pilosa* podem apresentar variações por diversos fatores bióticos ou abióticos. CORTÉS-ROJAS et al. (2013) mostraram que

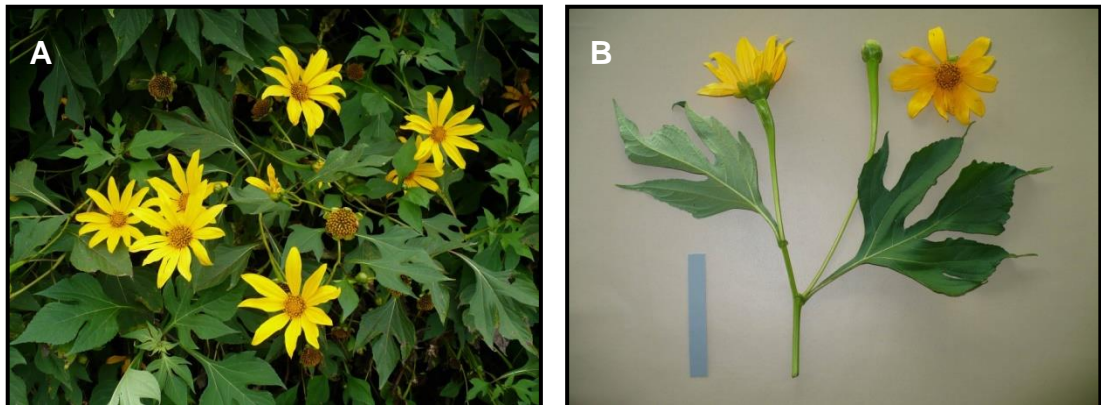
espécimes de *B. pilosa*, de seis localidades, apresentaram diferenças nos perfis cromatográficos, na atividade antioxidante e nos teores totais de taninos e flavonoides, com forte correlação entre esses teores e a atividade antioxidante. Além disso, ANDRADE-NETO et al., (2004), observaram que a atividade antimalárica *in vitro* de *B. pilosa* apresentou significativa variação em relação à época em as plantas eram coletadas, sendo afetadas pelas condições do solo e estação seca ou chuvosa. Com o exposto, torna-se evidente a importância da análise de condições de cultivo que induzam a maior produção de metabólitos secundários com ação biológica em *Bidens pilosa*.

2.2.2. *Tithonia diversifolia*

O gênero *Tithonia*, assim como *Bidens*, pertence à tribo Heliantheae, é nativo do México e América Central (CHAGAS-PAULA, et al., 2012) e compreende 13 espécies (BARUAH et al., 1979; KUO; CHEN, 1998; PEREIRA et al., 1997; PÉREZ, A.L.C.; LARA, M.O.; DE VIVAR, 1992). As espécies deste gênero são anuais ou perenes, e podem ser herbáceas, arbustivas ou árvores. Uma característica importante dessas plantas são suas inflorescências, na maior parte das vezes solitárias, hermafroditas e com corola amarela (CHAGAS-PAULA, et al., 2012). Neste gênero, os constituintes químicos principais são lactonas sesquiterpênicas, diterpenos e flavonoides (AMBRÓSIO et al., 2008; CHAGAS-PAULA et al., 2012; YEMELE BOUBERTE et al., 2006), sendo sua espécie mais estudada a *Tithonia diversifolia*, com aproximadamente 150 compostos isolados (CHAGAS-PAULA, et al., 2012).

Tithonia diversifolia (Hemsley) A. Gray é conhecida como girassol mexicano, margaridão, mão-de-deus, entre outros nomes populares. É uma planta invasora, nativa da América Central e México, podendo atingir entre 1,2 e 5 metros, apresenta folhas simples alternadas, pecioladas, com 7 a 20 cm de comprimento e com 4 a 20 cm de largura, bordas serradas e face abaxial vilosa. Suas flores são capítulos terminais solitários, com brácteas amarelo alaranjadas de 3 a 6 cm de extensão (Figura 6). Pode ser anual, bianual ou perene, dependendo de seu habitat (AKINOLA et al., 2000; ALVES; ROQUE, 2016; KATTO; SALAZAR, 1995).

Figura 6- *Tithonia diversifolia*. (A) Visão geral da planta com capítulos. (B) Detalhes da inflorescência e as folhas acuminadas e serradas.



Fonte: Plant Systematics

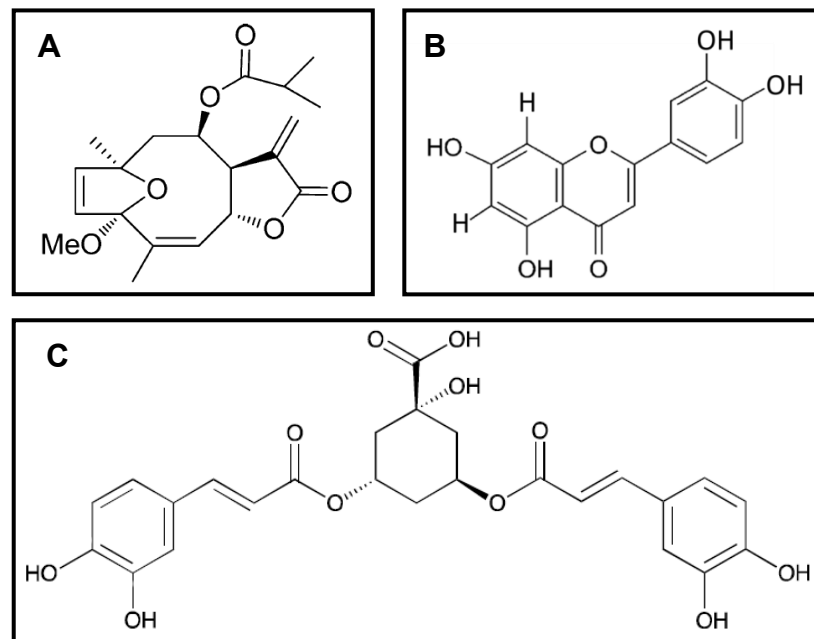
Na natureza, esta espécie se propaga por meio de sementes, podendo ser propagada também por estaquia, tolera condições de acidez do solo, apresenta rápido crescimento, baixa demanda por nutrientes e possui alta produtividade de biomassa (KATTO; SALAZAR, 1995).

Uma planta invasora, como *T. diversifolia*, pode apresentar vantagem frente às espécies nativas na comunidade invadida, em virtude de seus compostos secundários (ALLSTADT et al., 2012; WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010), que podem agir como agentes alelopáticos inibitórios (LI et al., 1993).

Tithonia diversifolia é amplamente utilizada em países da América Central, América do Sul, África e Ásia para o tratamento tradicional de doenças e enfermidades como diabetes, malária, mordida de cobra, sarampo, úlcera gástrica, diarreias, cólicas menstruais e feridas (AJAO; MOTEETEE, 2017). Muitas dessas ações biológicas já foram validadas cientificamente, por exemplo: ação tóxica ao protozoário causador da malária, antidiarreica, hepatoprotetora, preventiva contra o câncer, antiespasmódica, antidiabética, antiviral, citotóxica contra células tumorais, anti-inflamatória, inseticida e repelente (CHAGAS-PAULA, et al., 2012). Da mesma forma, é descrito que algumas doses e preparos dessa planta podem ser tóxicos (PASSONI et al., 2013). Além de medicinal, esta espécie é usada como ornamental, forrageira e, também, na fitorremediação e adubação do solo (CHAGAS-PAULA, et al., 2012; RIBEIRO et al., 2016; AJAO; MOTEETEE, 2017).

Os principais constituintes químicos de *Tithonia diversifolia* pertencem às classes das lactonas sesquiterpênicas, flavonoides (CHAGAS-PAULA et al., 2012) e compostos fenólicos derivados do ácido *trans*-cinâmico, principalmente o ácido cafeoilquínico (Figura 7) (ZHAO et al., 2012b).

Figura 7 - Metabólitos secundários de *Tithonia diversifolia*. (A) Lactona sesquiterpênica (tagitinin F-3-O-metil éter). (B) Luteolina. (C) Derivado de Ácido cafeoilquínico de *Tithonia diversifolia* (ácido 3,5-dicafeoilquínico).



Alcaloides, flavonoides, fenóis, saponinas, taninos e terpenos são mais proeminentes nas folhas de *Tithonia diversifolia*, mas também ocorrem em suas raízes e caules (OLAYINKA; RAIYEMO; ETEJERE, 2015). Além das diferenças de produtividade e armazenamento de compostos secundários nos diferentes órgãos de *T. diversifolia*, outros fatores, como estágio de desenvolvimento vegetal e variações ambientais afetam o metabolismo dessas substâncias.

Em estudo de metabolômica com plantas de *T. diversifolia* de duas localidades, durante 24 meses, houve um padrão sazonal de produção metabólitos (açúcares, lactonas sesquiterpênicas e compostos fenólicos), correlacionado com a quantidade de precipitação e as mudanças de temperatura ao longo do período. Entretanto, nas inflorescências e raízes, a distribuição dos metabólitos foi principalmente afetada pela variação de alguns nutrientes do solo, como cálcio, magnésio, fósforo, potássio e cobre (SAMPAIO; EDRADA-EBEL; DA COSTA (2016). Esses resultados ressaltam

a influência das variações ambientais na produção de compostos bioativos em *T. diversifolia*, bem como a importância da investigação de fatores intrínsecos da planta que também atuem sobre essa produção. Assim, pesquisas que avaliem as condições de cultivo desta espécie resultando em maior rendimento de substâncias com ação medicinal são de grande relevância.

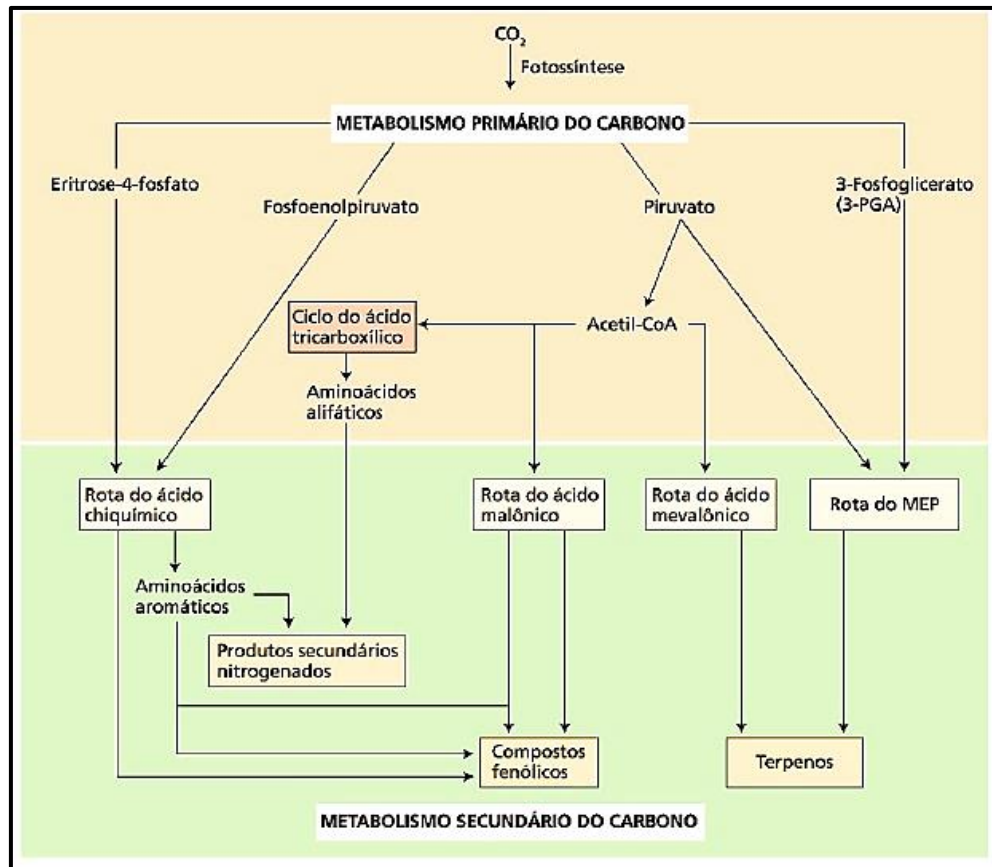
2.3. METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO: PROCESSOS INTEGRADOS

Metabolismo é o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. A presença de enzimas específicas garante a direção dessas reações, estabelecendo rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados, ou simplesmente transformados, são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas são, respectivamente, designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação (BARBOSA, 1994). Essas reações visam, primariamente, atender às exigências fundamentais da célula: energia (ATP), poder redutor (NADPH) e biossíntese das macromoléculas celulares (SIMÕES et al., 2017).

Nos vegetais, todos os componentes orgânicos produzidos são divididos em metabólitos primários e secundários. Os primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia como, os aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Já os metabólitos secundários são, geralmente, definidos como moléculas orgânicas que não têm função direta na fotossíntese, respiração, transporte celular, translocação, assimilação de nutrientes ou síntese de proteínas, lipídeos e carboidratos. São característicos de um determinado grupo vegetal, enquanto os metabólitos primários estão distribuídos por todo o reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A fotossíntese fornece as unidades orgânicas básicas das quais dependem as plantas. A respiração, com seu metabolismo do carbono associado, libera a energia armazenada nos compostos de carbono para o uso celular. Ao mesmo tempo esses processos geram diversos precursores para as diferentes vias metabólicas (TAIZ; ZEIGER, 2009). Dessa forma, o metabolismo primário e secundário do carbono são interligados e balanceados por meio de diferentes rotas de síntese (Figura 8).

Figura 8 - Principais rotas do metabolismo secundário e suas inter-relações com o metabolismo primário



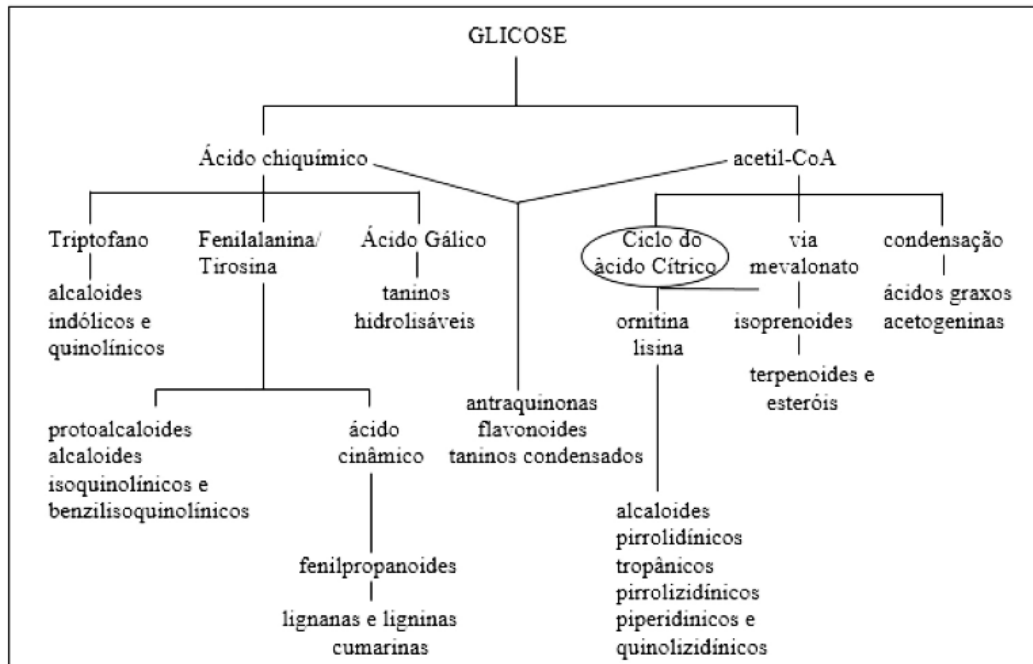
Fonte: TAIZ; ZEIGER (2009)

Através do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Ao longo da glicólise, da rota das pentoses-fosfato e do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), a glicose é convertida em moléculas em eritrose-4-fosfato ou fosfoenolpiruvato, as primeiras da via do ácido chiquímico, a qual origina os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, fenóis, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Além disso, após sucessivas oxidações, a glicose pode ser convertida em acetil-coenzima A (Figura 9) (LEMOS, 2011; SIMÕES et al., 2017).

A acetil-coenzima A (acetil-CoA) pode seguir em três diferentes vias: a) a do ciclo do ácido cítrico, em que serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos; b) a via do mevalonato, que originará os terpenóides, fenóis e os esteróis e; c) a via da condensação do acetato, na qual são formados os derivados do acetato (LEMOS, 2011; SIMÕES et al., 2017). As

rotas de produção de metabólitos secundários pelas vias do ácido chiquímico e da acetil-coenzima A são mostradas na Figura 9.

Figura 9 - Síntese dos metabólitos secundários a partir da glicose.



Fonte: SIMÕES et al. (1999)

Os metabólitos secundários têm as funções ecológicas de proteção contra herbívoros e patógenos, atrativa de polinizadores e dispersores de sementes, competição planta-planta (alelopatia) e nas simbioses planta-microorganismo (TAIZ; ZEIGER, 2009). A produção dessas substâncias representa um custo energético para as plantas que, muitas vezes, determina menor investimento em crescimento. Para explicar essa competição por carbono e nitrogênio entre metabolismo primário e secundário, ou seja, para explicar a alocação de recursos na produção de metabólitos secundários diante das pressões ambientais sofridas pelos vegetais, já foram elaboradas diversas hipóteses (ATSATT; O'DOWD, 1976; BRYANT; CHAPIN; KLEIN, 1983; COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985; HERMS; MATTSON, 1992; LEVIN; YORK, 1978; MCKEY, 1979; RHOADES; CATES, 1976; TUOMI et al., 1984; WHITE, 1974). A maior parte delas defende que as concentrações de metabólitos secundários são negativamente correlacionadas com as taxas de crescimento das plantas e diretamente correlacionadas com seus mecanismos de defesa (HERMS; MATTSON, 1992).

A hipótese de Herms e Mattson (1992), teoria do crescimento/diferenciação, propõe que plantas com menor disponibilidade de recursos investem mais na diferenciação celular em detrimento do crescimento. Essa diferenciação inclui a produção de metabólitos secundários para defesa vegetal. Assim, a distribuição dos recursos entre os processos de crescimento e diferenciação se daria de acordo com o gradiente de recursos disponíveis no ambiente.

A hipótese do balanço carbono/nitrogênio (C/N) sugere que a disponibilidade de luz pode influenciar na razão entre esses dois elementos nas plantas, afetando o metabolismo secundário. Assim, em ambientes com pouca luminosidade o balanço C/N seria reduzido, devido à limitação na assimilação de carbono durante a fotossíntese, diminuindo a concentração de compostos secundários baseados em carbono (compostos fenólicos, ligninas e terpeno), pois esse recurso seria alocado para o crescimento. Diferentemente, em ambientes com maior disponibilidade de luz, as plantas apresentariam maiores concentrações de metabólitos de defesa baseados em carbono, em detrimento daqueles baseados em nitrogênio (BRYANT; CHAPIN; KLEIN, 1983).

A hipótese de disponibilidade de recursos (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985) pressupõe que plantas quando em ambientes com limitação dos nutrientes, irão investir mais em mecanismos de defesa, via metabólitos secundários, para minimizar a perda de tecidos devido a condições como a herbivoria, por exemplo. Esta hipótese sugere que o nível de investimento em defesa aumenta à medida que as taxas de crescimento potenciais se tornem mais limitadas, devido à baixa disponibilidade de recursos, uma vez que tal situação aumenta o valor relativo destes recursos.

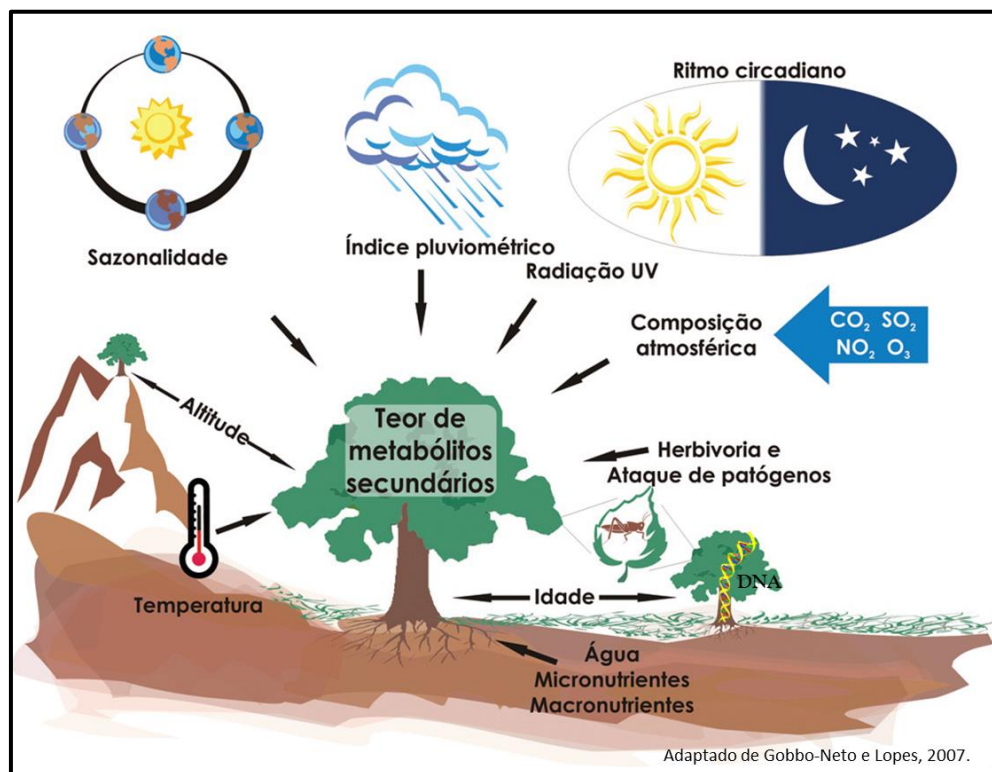
A hipótese da competição de proteínas (JONES; HARTLEY, 1999) postula que há uma concorrência nas vias metabólicas das plantas voltadas para a produção de compostos fotossintéticos *versus* as vias de compostos de defesa. Para esses autores, a síntese de proteínas e de fenilpropanoides, precursores de compostos fenólicos, competem por um recurso comum e limitado, a fenilalanina, que é um ponto de ramificação no final da via do ácido chiquímico localizada entre metabolismo primário e secundário. Em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, as demandas de proteínas para crescimento são reduzidas, aumentando a incorporação de fenilalanina na síntese de compostos fenólicos, elevando a concentração destes compostos.

Portanto, o *trade-off* entre defesa e crescimento depende não apenas da competição por nutrientes, luz e carboidratos disponíveis, mas também da concorrência pela fenilalanina (GAYLER et al., 2008).

Ainda que a maioria das teorias de alocação de recursos para produção de metabólitos secundários se adequem a sistemas específicos a partir dos quais foram postuladas, essas teorias se complementam em explicar de diferentes formas as vantagens adaptativas do investimento da planta em defesa vegetal.

A produção de metabólitos secundários é o resultado da interação entre processos de síntese, transporte, armazenamento e degradação, sendo cada um desses processos controlados pela expressão gênica diferencial, assim são influenciados por três fatores principais: hereditariedade, ontogenia e meio ambiente (Figura 10) (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996; WINK, 1990).

Figura 10 - Principais Fatores que influenciam a produção e acúmulo dos metabólitos secundários



Adaptado de: GOBBO-NETO; LOPES (2007)

Dentre os fatores ambientais, a disponibilidade hídrica afeta a fotossíntese, a condutância estomática, a mobilização de reservas, o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, podendo levar a alterações no seu metabolismo

secundário (HSIAO, 1973; SALISBURY; ROSS, 1985). Assim, a produção de metabólitos secundários pode responder de forma específica ao excesso ou escassez de água em cada espécie vegetal, sendo que algumas podem nem apresentar variações no acúmulo de metabólitos em decorrência desta disponibilidade (GOBBO-NETO; LOPES, 2007a). Estudos sobre as distintas respostas ao déficit hídrico demonstram que tal condição pode aumentar a síntese de glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos (BLUA; HANSCOM; COLLIER, 1988), de alguns terpenoides (LOKAR et al., 1987), antocianinas (JUNG, 2004) e alcaloides (HÖFT; VERPOORTE; BECK, 1996). Já em relação aos compostos fenólicos não foram estabelecidas relações claras entre o estresse hídrico e a concentração dessas substâncias (ANDRE et al., 2009; ATKINSON et al., 2011; HERMS; MATTSON, 1992).

Em *Solanum lycopersicum*, a análise do conteúdo de compostos fenólicos demonstrou pequena ou nenhuma alteração na concentração de flavonoides em seus frutos como resultado do estresse hídrico (ATKINSON et al., 2011). Já em cultivares de *Solanum tuberosum* houve uma redução drástica nos polifenóis sob condições de seca, demonstrada por variações altamente dependentes dos cultivares avaliados (ANDRE et al., 2009). Isso reforça a visão de que o status hídrico da planta influencia de formas diferentes o processo de acumulação de compostos fenólicos relacionados ao estresse nesses organismos.

Em relação aos nutrientes, são poucos os estudos que relacionam a disponibilidade no solo e concentração de nutrientes nas plantas com os seus efeitos sobre o metabolismo secundário. O que é estabelecido é que suas ações não são uniformes em todas as espécies (GOBBO-NETO; LOPES, 2007a). Embora, sejam conhecidas hipóteses como a do balanço entre carbono/nitrogênio, que relacionam a disponibilidade de nitrogênio e o acúmulo de compostos secundários baseados em carbono, como os compostos fenólicos, (BRYANT; CHAPIN; KLEIN, 1983) e a hipótese de competição por proteínas (WRIGHT et al., 2010). Estudos prévios descrevem essa variação na concentração de compostos fenólicos em morango, tomate e espinaheira-do-mar, cultivados com o uso de diferentes fertilizantes (HEINÄÄHO; PUSENIUS; JULKUNEN-TIITTO, 2006; TOOR; SAVAGE; HEEB, 2006; WANG; MILLNER, 2009).

Os micronutrientes atuam em muitas das reações bioquímicas de síntese de compostos fenólicos na rota do ácido chiquímico (KIRKBY; RÖMHELD, 2007). Um

exemplo é o manganês, que exerce um papel primordial na ativação de várias enzimas envolvidas no ciclo do ácido cítrico, na via do ácido chiquímico e na via biossintética dos isoprenoides (LIDON; HENRIQUES, 1993).

Outro elemento, o cobre, tem sua ação no metabolismo secundário relacionada à estrutura das enzimas polifenoloxidase, ascorbato oxidase e diamino oxidase, que ocorrem nas paredes celulares e atuam nas vias biossintéticas de compostos fenólicos, quinonas, lignina e fitoalexinas. A deficiência de cobre diminui a atividade dessas enzimas, levando ao acúmulo de fenóis e à diminuição da lignificação, o que torna as plantas mais suscetíveis aos patógenos (KIRKBY; RÖMHELD, 2007).

O boro exerce função na membrana plasmática dos vegetais, em tecidos com baixas concentrações deste micronutriente a atividade da ATPase e as taxas de absorção de íons são diminuídas, tornando as membranas permeáveis. Este efeito pode estar relacionado às mudanças no metabolismo dos fenóis nas paredes celulares associadas com essa deficiência. Sob condições de deficiência de boro, a via da pentose fosfato torna-se meio predominante de degradação dos carboidratos, levando ao aumento da formação de compostos fenólicos pela via do ácido chiquímico. O conseqüente acúmulo de fenóis e o aumento da atividade da polifenoloxidase determina a produção de compostos intermediários altamente reativos, tais como as quinonas. Estes compostos intensificam a produção de radicais superóxido, que por sua vez danificam as membranas em decorrência da peroxidação de lipídeos (KIRKBY; RÖMHELD, 2007).

Além da influência exercida pelos fatores abióticos, na produção e acúmulo de metabólitos secundários, as características genéticas são determinantes neste processo.

2.4. DIVERSIDADE GENÉTICA DE PLANTAS MEDICINAIS E RAPD

A análise genética de plantas medicinais é importante não apenas para sua domesticação, mas também para sua conservação e manejo eficiente (CARVALHO et al., 2009), uma vez que a qualidade do produto fitoterápico final é resultado da interação entre as técnicas de cultivo adotadas na produção das plantas medicinais com as características genéticas da população. Isto torna relevante que os indivíduos que compõem a população a ser cultivada possuam similaridade genética, a fim de facilitar o manejo e obter matéria prima quimicamente

homogênea, garantindo a qualidade necessária para a viabilização comercial da técnica da produção (MONTANARI, 2002).

Assim como a influência de fatores abióticos e do estágio de desenvolvimento do vegetal, a diversidade genética também é um fator determinante na da produção e acúmulo diferencial de metabólitos vegetais (BEN EL HADJ ALI; GUETAT; BOUSSAID, 2012; FACANALI et al., 2015; MEISSNER et al., 2015; ŠAMEC et al., 2015). Portanto, a análise da distância genética entre indivíduos é ferramenta importante no estudo de populações e útil para os estudos de avaliação da divergência genética de espécies vegetais medicinais, tanto para o estabelecimento das estratégias de melhoramento de espécies vegetais, quanto para sua conservação (CARVALHO et al., 2009). Além disso, o estudo genético de espécies de plantas medicinais pode estabelecer marcadores que possibilitem autenticar e rastrear a origem da matéria-prima para fitomedicamentos (PERCIFIELD et al., 2007).

Estudos que comparam a variação química e genética de plantas medicinais frequentemente utilizam técnicas de quantificação de teores metabólitos secundários e análises de marcadores moleculares, como os de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (BEN EL HADJ ALI; GUETAT; BOUSSAID, 2012; FACANALI et al., 2015; MEISSNER et al., 2015; ŠAMEC et al., 2015). Essas pesquisas têm a finalidade de avaliar a fonte de variação na produção e acúmulo de dos compostos químicos vegetais.

Šamec et al., (2015) analisaram a variabilidade genética e fitoquímica, através de marcadores RAPD e da quantificação de compostos fenólicos, de seis populações de *Teucrium arduini* L., com resultados que sugerem uma maior influência do meio ambiente na acumulação de compostos fenólicos, quando comparada à influência dos fatores genéticos daquela espécie, nas condições avaliadas pelo grupo. Já em um estudo com análises de marcadores RAPD e caracterização de compostos químicos por HPLC de *Ocimum selloi* Benth., coletado no sul e sudeste do Brasil, foi observado que a variação da composição de óleo essencial entre as diferentes populações não ocorreu devido ao estado fisiológico da planta ou condições de fertilidade do solo, mas sim pela interação do genótipo com os fatores ambientais intrínsecos de cada região geográfica, revelando a importância do fator genético nas principais diferenças entre as populações (FACANALI et al., 2015).

Pesquisas como esta, demonstram a importância da caracterização genética e química das diferentes populações de uma mesma espécie de planta medicinal, tanto para sua conservação e preservação, como também para programas de seleção e melhoramento genético com a finalidade de produzir matéria-prima padronizada e de qualidade para a produção de fitoterápicos.

O uso de marcadores moleculares auxilia no fornecimento de informações sobre o material genético (DNA) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entre as técnicas mais utilizadas para caracterização genética de espécies, em que se desconhecem maiores informações moleculares, encontram-se os marcadores do tipo RAPD (VIDAL et al., 2006), que são uma importante ferramenta de biotecnologia com grande uso na agricultura (HOFFMANN; BARROSO, 2006). Esse procedimento foi desenvolvido simultânea e independentemente por Welsh; McClelland, (1990) e Williams et al., (1990).

As vantagens de utilização de marcadores do tipo RAPD frente a outros incluem a possibilidade de analisar um maior número de amostras por unidade de tempo, o uso de um mesmo conjunto de *primers* em qualquer espécie, o custo por amostra normalmente menor e os procedimentos simples (HOFFMANN; BARROSO, 2006). Além disso, é desnecessário o conhecimento prévio sobre a sequência de nucleotídeos da espécie a ser estudada (LACERDA; ACEDO; LOVATO, 2002). Contudo, o RAPD apresenta a desvantagem de ser de baixa reprodutibilidade de um laboratório para outro, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais (MILACH, 1998).

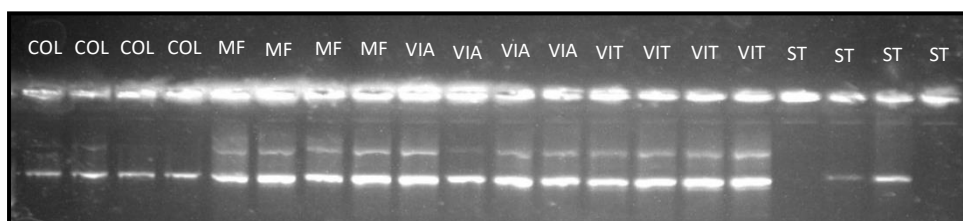
O RAPD é uma técnica *in vitro* que consiste na amplificação de DNA genômico por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando *primers* de sequência arbitrária com cerca 10 nucleotídeos, tamanho suficientemente pequeno para que uma sequência aleatória encontre, em qualquer genoma, duas sequências complementares na posição necessária e haja duplicação do DNA (HOFFMANN; BARROSO, 2006). Frequentemente, apenas um *primer* é utilizado em cada reação, tendo este um conteúdo entre 50 e 70% de das bases nitrogenadas guanina e citosina (FRITSCH; RIESEBERG, 1996). As informações fornecidas pela análise de um único *primer* marcador RAPD são insuficientes, sendo preciso analisar diversos *primers*, a fim de gerar um conjunto de resultados úteis (WILLIAMS et al., 1993). O polimorfismo entre os indivíduos é analisado pelo perfil eletroforético dos produtos

de amplificação obtidos pela utilização dos mesmos *primers* e condições de reação (HOFFMANN; BARROSO, 2006).

Uma vez estabelecida a caracterização molecular de um conjunto de genótipos através de marcadores moleculares, torna-se possível avaliar a diversidade genética entre eles, por meio de estimativas da diversidade, que podem ser obtidas por métodos de verificação da similaridade ou da distância existente entre os grupos, com o emprego de diversos coeficientes para este fim (HOFFMANN; BARROSO, 2006), sendo os resultados agrupados em uma matriz utilizada na construção de dendogramas (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

Os marcadores moleculares geram variáveis qualitativas binárias, caracterizadas pela presença ou ausência da uma marca, no caso do RAPD a banda (Figura 11). Nesse caso, os estados do caráter são designados por zeros (0) e uns (1) (DUNN; EVERITT, 1980), o número 1 indica a presença da banda e 0, a ausência (SKROCH; TIVANG; NIENHUIS, 1992). Genótipos que possuam maior coincidência de presenças e/ou ausências das bandas serão considerados mais similares entre si. A partir dessas variáveis é possível se obter uma matriz de similaridades (ou distância) entre os genótipos analisados e realizar seu agrupamento.

Figura 9 - Foto de gel de RAPD de amostras de DNA *Tithonia diversifolia* de diferentes localidades, amplificadas com único primer, através de PCR.



Fonte: Anny Carolyne da Luz

Após o estabelecimento de uma matriz de dados padronizados, são utilizados coeficientes de dissimilaridade ou similaridade para quantificar o quanto os indivíduos são parecidos ou não. Os coeficientes de similaridade para dados binários são fundamentados na comparação entre o número de atributos comuns para um par de objetos e o número total de atributos envolvidos (MEYER, 2002).

Os coeficientes de similaridade podem ser divididos em dois grupos: os que consideram a ausência conjunta e aqueles que não a consideram. Esta

característica é importante para marcadores RAPD, pois a ausência de banda amplificada em dois genótipos não significa, necessariamente, similaridade entre eles (DUARTE; SANTOS; MELO, 1999). Um coeficiente amplamente utilizado é o de Jaccard, que compara o número de presenças de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas (MEYER, 2002).

É frequente o uso do coeficiente de Jaccard para populações dentro de uma mesma espécie (ALFENAS, 1998), este juntamente ao coeficiente de Sorensen-Dice, são os mais utilizados para estudos de variabilidade genética em espécies medicinais (CARVALHO et al., 2009).

A análise de agrupamentos se destaca como método estatístico para o estudo de marcadores moleculares por não exigir pressuposição inicial quanto à distribuição de probabilidades (MEYER, 2002). As técnicas de agrupamentos têm por objetivo agrupar indivíduos mais semelhantes em uma mesma classe. De forma geral, o número de classes a ser formado não é conhecido inicialmente (MANLY, 1994).

Uma das formas de agrupar os resultados obtidos pelos marcadores moleculares é o uso de dendrogramas, nos quais o primeiro passo a ser executado é o cálculo das medidas de dissimilaridade, ou similaridade, entre todos os pares possíveis de indivíduos, formando grupos por processos aglomerativos ou divisivos (MEYER, 2002). Nesses processos, são estabelecidos, arbitrariamente, os centros dos grupos, e cada indivíduo é agrupado em relação ao centro mais próximo. Novos centros são calculados e cada indivíduo se move para o grupo cujo centro seja mais próximo de si. O processo continua até que haja estabilidade nos grupos (DUNN, G.; EVERITT, 1980; MANLY, 1994).

Entre os diversos métodos de ligação existentes, um dos mais utilizados é o UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*) (DUARTE; SANTOS; MELO, 1999). O UPGMA é um método aglomerativo de ligação média baseado em média aritmética: os coeficientes de similaridade, ou dissimilaridade, médios entre o indivíduo a ser agrupado e os indivíduos do grupo já existente são calculados. É um método ponderado, que atribui pesos iguais a todos os ramos do dendrograma, sendo o número de indivíduos que compõem cada ramo não considerado (BUSSAB; MIAZAKI; ANDRADE, 1990). É o algoritmo mais comum nos estudos de divergência genética (DUARTE; SANTOS; MELO, 1999). Nele as relações são identificadas em ordem de similaridade e o dendrograma é construído a partir das duas unidades mais similares, tratando-se como uma unidade,

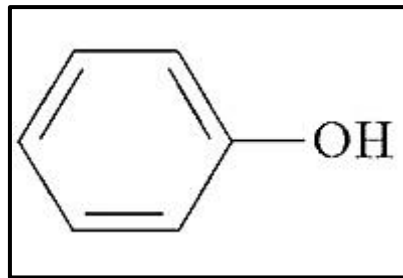
posteriormente a outra unidade com maior similaridade é identificada e assim por diante (MEYER, 2002). Este tem sido o método mais utilizado para caracterização de diversidade genética em plantas medicinais (CARVALHO et al., 2009).

A técnica de RAPD é adequada para a análise de variabilidade genética em Asteraceae, visto que *B. pilosa* e *T. diversifolia* são espécies com poucas informações genéticas descritas, assim a utilização de pequenos *primers* de sequência arbitrária é ideal. É uma metodologia compatível com uma gama de análises multivariadas que permitem a análise de parâmetros genéticos entre populações. Além disso, seus resultados permitem a comparação desses fatores de diversidade genética com caracteres de diversidade química e morfológica.

2.5. COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos fenólicos são substâncias que contêm um grupo fenol: um anel aromático com uma hidroxila funcional (Figura 12). Representam cerca de 10.000 compostos de grande diversidade química e diversas funções nos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

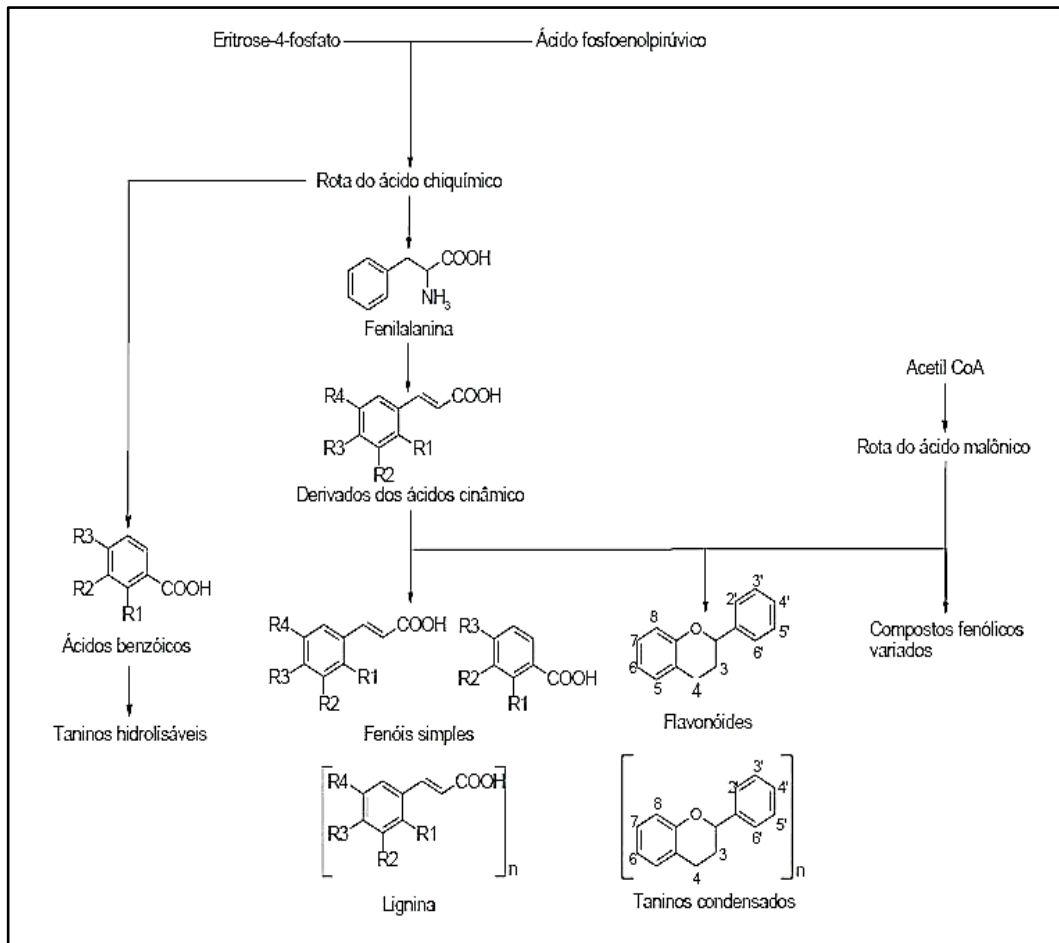
Figura 10- Estrutura química da unidade básica do grupo Fenol.



São sintetizados por diferentes vias metabólicas (Figura 13), sendo nas plantas mais expressiva a rota do ácido chiquímico (TAIZ; ZEIGER, 2009). Essas rotas biossintéticas, que não estão presentes em animais, formam os aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina e triptofano (SIMÕES et al., 2017).

As classes mais abundantes de compostos fenólicos são derivadas da fenilalanina, aminoácido aromático sintetizado na rota do ácido chiquímico (TAIZ; ZEIGER, 2009), que é formado pela condensação entre o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, dois metabólitos da glicose (SIMÕES et al., 2017).

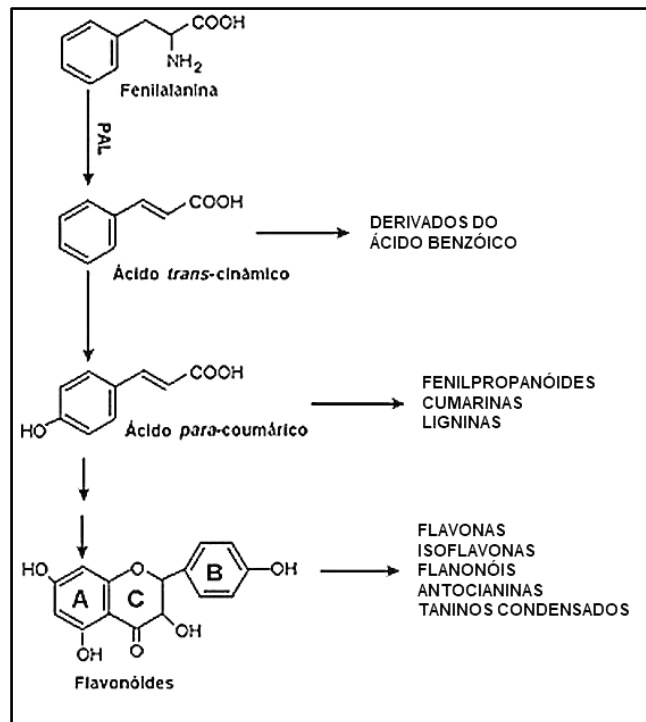
Figura 11 - Rotas de síntese dos compostos fenólicos.



Fonte: Lincon; Taiz (2009)

A reação catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (*PAL*) gera, por meio da eliminação de uma molécula de amônia da fenilalanina, o ácido *trans*-cinâmico, a partir do qual diversos compostos fenólicos são formados (Figura 14) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Figura 12 - Atividade catalisadora da fenilalanina amônia liase (*PAL*) formando diferentes metabólitos secundários vegetais.



Adaptado de: Lemos (2011)

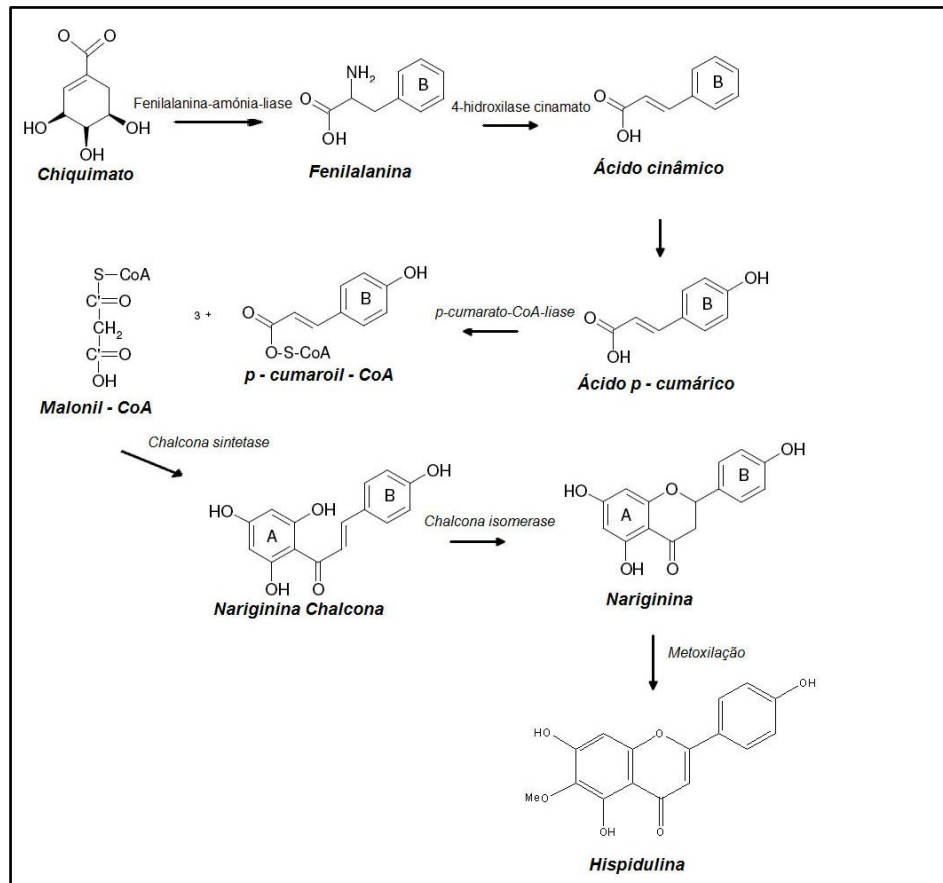
O ácido *trans*-cinâmico e o ácido *p*-cumárico, formados a partir da reação catalisada pela *PAL* e da sequência de reações seguintes a esta que consistem na adição de mais hidroxilas e outros substituintes, são chamados fenilpropanóides, compostos por um anel aromático e uma cadeia lateral de três carbonos (TAIZ; ZEIGER, 2009). A via do ácido chiquímico, através da ação da *PAL*, forma alguns dos metabólitos secundários de maior interesse medicinal: ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e cumarinas.

A atividade da *PAL* é afetada por diversos fatores ambientais. Baixa disponibilidade de nutrientes, pouca luminosidade e também infecções fúngicas estimulam sua síntese, o que resulta em um aumento dos compostos fenólicos. Sua regulação é dada, provavelmente, durante a transcrição (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os compostos fenólicos não são formados apenas pela via do ácido chiquímico, mas também pela via do acetato, a partir da acetil-coenzima A e a malonil-coenzima A; os flavonoides, por exemplo, são formados por compostos provenientes das duas rotas (Figura 15). Cada uma das rotas de biogênese determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante, como é o caso da rota do ácido chiquímico, por meio da qual se obtém compostos com grupos

hidroxila em posição *orto*, formados a partir do ácido cinâmico. Já pela via do ácido malônico são originados compostos com grupos hidroxila em posição *meta*. Dessa forma, os vegetais podem produzir um mesmo composto secundário a partir de intermediários alternativos (SIMÕES et al., 2017).

Figura 15 - Via metabólica de produção da Hispidulina um flavonoide originado do chiquimato, via ácido chiquímico, e do Malonil - Coenzima A, via do acetato.



Fonte: KARAM et al. (2013)

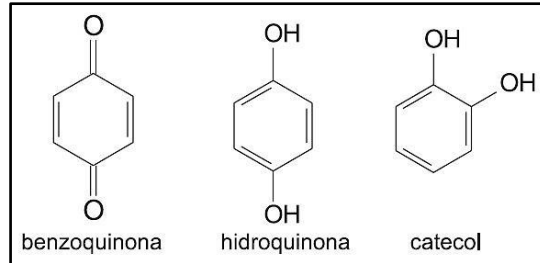
Os compostos fenólicos são classificados em grupos, de acordo com o seu esqueleto básico de carbonos, alguns deles são: fenóis simples (C6), ácidos fenólicos/benzoicos (C6-C1), ácidos cinâmicos e cumarinas (C6-C3), flavonoides e isoflavonoides (C6-C3-C6), diflavonoides (C6-C3-C6)₂, taninos hidrolisáveis (C6-C1)_n, taninos condensados (C6-C3-C6)_n (SIMÕES et al., 2017).

2.5.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos têm como característica um anel benzênico, com um ou mais grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila e

outros substituintes na molécula (Figura 16) (SOARES, 2002), radicais que os conferem poder redutor antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007).

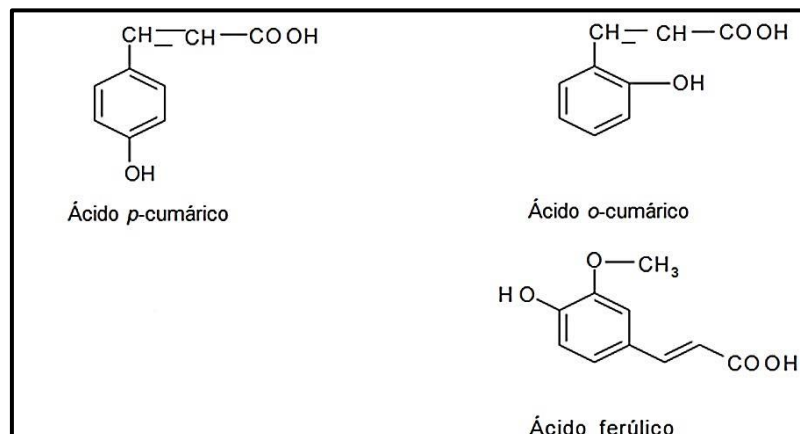
Figura 13 - Exemplos de ácidos fenólicos simples, com um anel benzênico.



Os ácidos fenólicos são divididos em duas classes: os ácidos hidroxibenzoicos e os hidroxicinâmicos (D ARCHIVIO et al., 2007). Os primeiros são componentes dos taninos hidrolisáveis e menos abundantes nos vegetais consumidos pelos humanos (MANACH et al., 2004). Por outro lado, os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal, na forma livre ou esterificada, como no tomate, cerveja café, erva mate, maçã, ameixa e outras frutas, crucíferas, cereais, entre outros (BOURNE; RICE-EVANS, 1998; CLIFFORD, 1999).

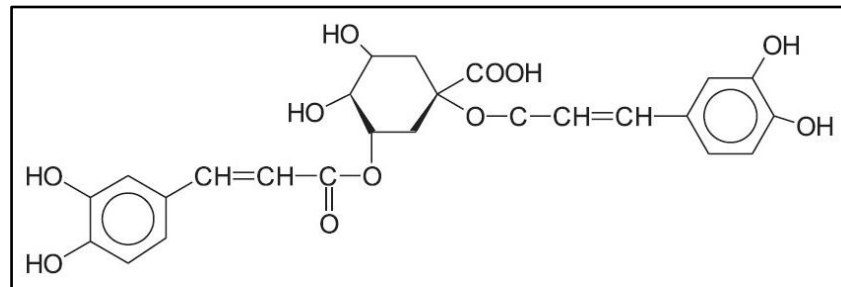
Os derivados do ácido cinâmico mais encontrados na natureza apresentam conformação *trans* e são mais estáveis que os ácidos que apresentam conformação *cis*. Quatro derivados do ácido cinâmico são largamente distribuídos no reino vegetal: ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico (Figura 17) (SIMÕES et al., 2017).

Figura 14 - Estruturas químicas de ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico.



Dentre os derivados dos ésteres do ácido cinâmico, destaca-se o ácido clorogênico. Esse ácido é um derivado do ácido cafeico, e constitui-se, na verdade, em uma mistura de derivados 3,4-, 3,5- e 4,5-dicafeoilquínicos. A cinarina é um ácido clorogênico (ácido 1,3-O-dicafeoilquínico) muito comum em Asteraceae (Figura 18) (SIMÕES et al., 1999).

Figura 15 – Cinarina (ácido 1,3-O-dicafeoilquínico), ácido clorogênico frequente em Asteraceae.



Alguns ácidos fenólicos são reconhecidamente antioxidantes, como o ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido ferúlico (SIMÕES et al., 1999, 2017). A atividade antioxidante desses compostos é relacionada às suas propriedades redutoras inerentes de sua estrutura química. Tais características desempenham um papel importante na quelação de metais de transição e na redução de radicais livres, atuando na iniciação e na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002).

2.5.2. Flavonoides

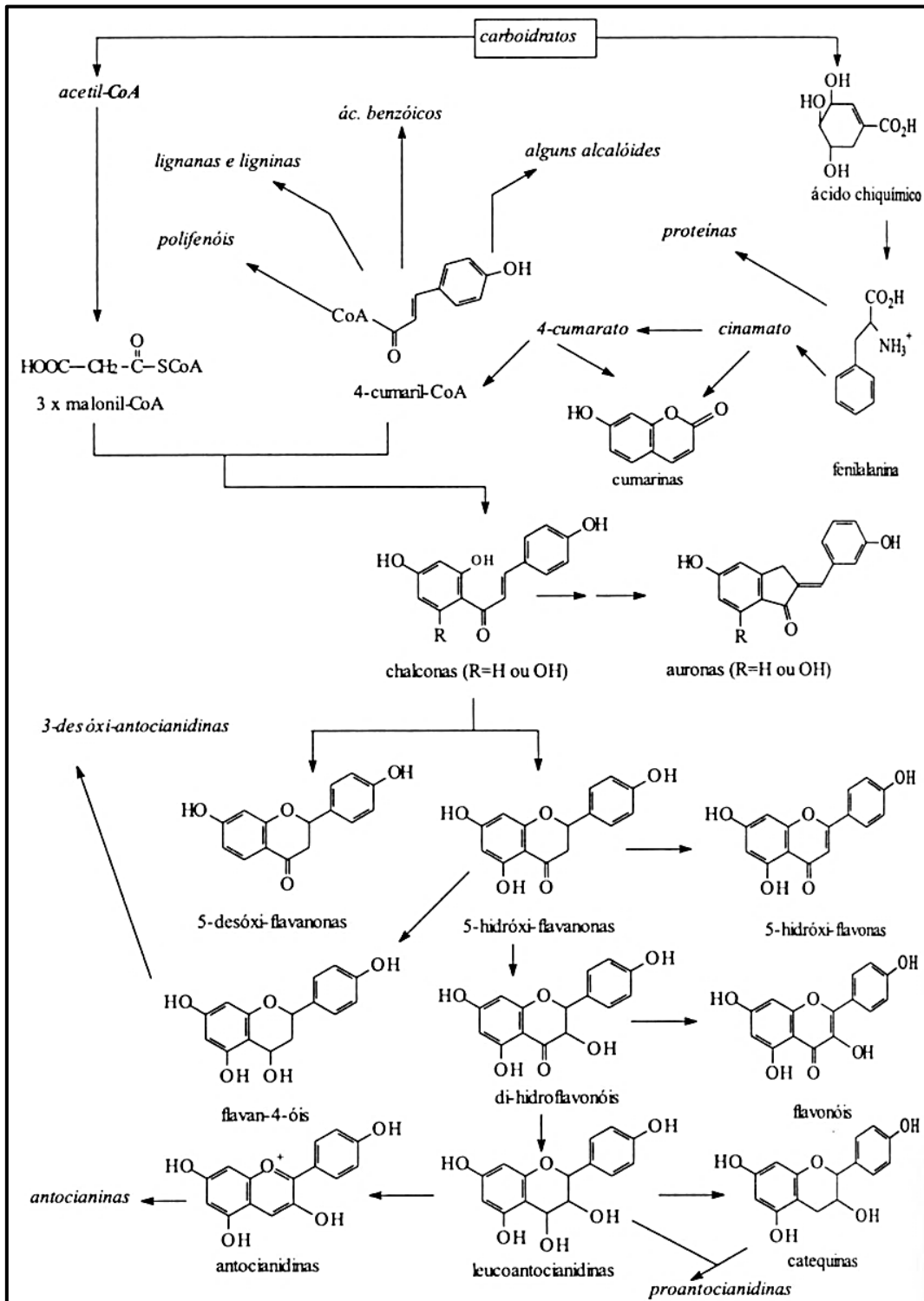
Os flavonoides são distribuídos amplamente no reino vegetal, presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos/heterosídeos (conjugado a açúcares) ou agliconas (forma livre) (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1998), representam um dos mais importantes e diversificados grupos fenólicos (SIMÕES et al., 2017).

Diversas funções nas plantas são atribuídas aos flavonoides, como: proteção contra raios ultravioleta, herbívoros e patógenos, atração de polinizadores e dispersores de sementes, antioxidante, controle da ação de hormônios vegetais, ação alelopática, inibição de enzimas e interação com microorganismos fixadores de nitrogênio (SIMÕES et al., 1999). Seus efeitos benéficos à saúde são relacionados

às propriedades antioxidantes e quelantes significativas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

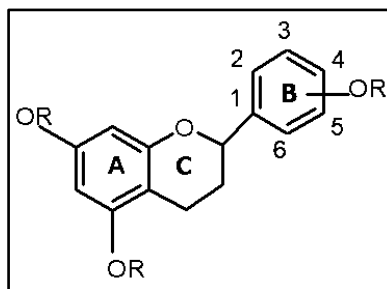
Constituem uma classe de polifenóis, substâncias originadas na via dos fenilpropanóides que apresentam um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros). Os flavonoides são formados a partir da via do ácido chiquímico e da Acetil-CoA (Figura 19) e são constituídos de dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma cadeia de três carbonos, o anel A é oriundo do acetato, via ácido malônico, e o anel B é proveniente da via do ácido chiquímico (Figura 20) (SIMÕES et al., 1999, 2017).

Figura 19 - Biossíntese de flavonoides a partir de Acetil-CoA e Ácido Chiquímico.



Fonte: SIMÕES et al. (1999)

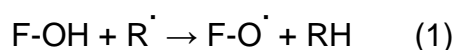
Figura 16 - Unidade fundamental de flavonoide, sua numeração e identificação de seus anéis.



Variações em substituições do anel C levam à diferenciação dos flavonoides em flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Também podem ocorrer substituições nos anéis A e B simultaneamente, originando outros compostos dentro de cada classe de flavonoides (HOLLMAN; KATAN, 1999).

Os flavonoides atuam como antioxidantes primários, sendo as flavonas e os flavonóis as classes mais encontradas nas plantas. O estado de oxidação da cadeia heterocíclica dos flavonoides determina as várias atividades biológicas relacionadas a esse metabólito secundário, como: atividade antiinflamatória, antitumoral, agregação plaquetária, redução da fragilidade e permeabilidade capilar, inibição na destruição do colágeno e redução na incidência de doenças cardiovasculares (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O arranjo espacial dos substituintes no anel é o principal fator na atividade antioxidante dos flavonoides. Bem como a maioria dos outros polifenóis que possuem atividade antioxidante, tanto a configuração como o número total de grupos hidroxila influenciam substancialmente vários mecanismos de atividade antioxidante (BURDA; OLESZEK, 2001; CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; HAENEN et al., 1997; SEKHER PANNALA et al., 2001). Assim, grupos hidroxílicos múltiplos conferem à molécula de flavonoide atividade antioxidante, quelante e prooxidante. Essa capacidade de eliminação de radicais livres por radicais hidroxila, altamente reativos, é dada pela seguinte reação (Equação 1):



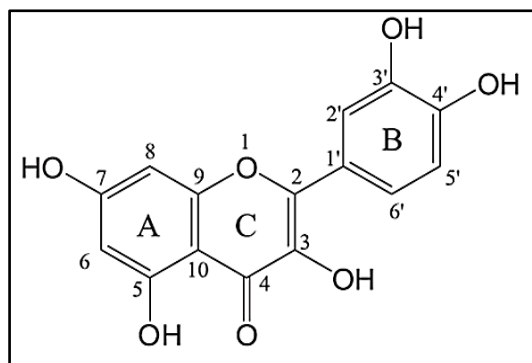
Onde F representa um flavonoide e R^{\cdot} representa um radical livre. A configuração de hidroxilas do anel B é o mais importante determinante da eliminação de espécies reativas de oxigênio EROS (BURDA; OLESZEK, 2001;

HAENEN et al., 1997; SEKHER PANNALA et al., 2001). As hidroxilas no anel B doam hidrogênio e um elétron aos radicais hidroxil, peroxil e peroxinitrito, neutralizando-os e dando origem a um radical flavonoide relativamente estável (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997).

Os diversos tipos de flavonoides existentes são categorizados em diferentes classes, de acordo com suas características químicas e sintéticas (SIMÕES et al., 2017).

As flavonas e os flavonóis são aqueles que têm substituição de hidrogênio por uma hidroxila na posição C-3. São frequentemente oxigenados, e também possuem outros radicais como: hidroxilas, metoxilas, acilas, metilenos, isoprenos, piranos, furanos. As flavonas são derivadas da 2-fenilcromona sendo a apegenina e a luteolina as mais abundantes dos vegetais. Já os flavonóis originam-se a partir da 3-hidróxi-2-fenilcromona, deste grupo os mais encontrados em plantas são quercetina, galangina, canferol e miricetina. Os heterosídeos flavonoídicos, flavonóis associados a dissacarídeos ou trissacarídeos, mais comuns são o 3-rutinosídeo quercetina (rutina) e o 7-glicosídeo luteolina (SIMÕES et al., 2017). Dentre os flavonóis, a quercetina é relevante devido à sua superior ação na inibição de danos oxidativos induzidos por metais e por não-metais, o que é parcialmente atribuído ao seu radical substituinte 3-OH livre (Figura 21) (ARORA; NAIR; STRASBURG, 1998; RATTY; DAS, 1988).

Figura 17 - Estrutura química da quercetina, mostrando o radical substituinte 3-OH livre.



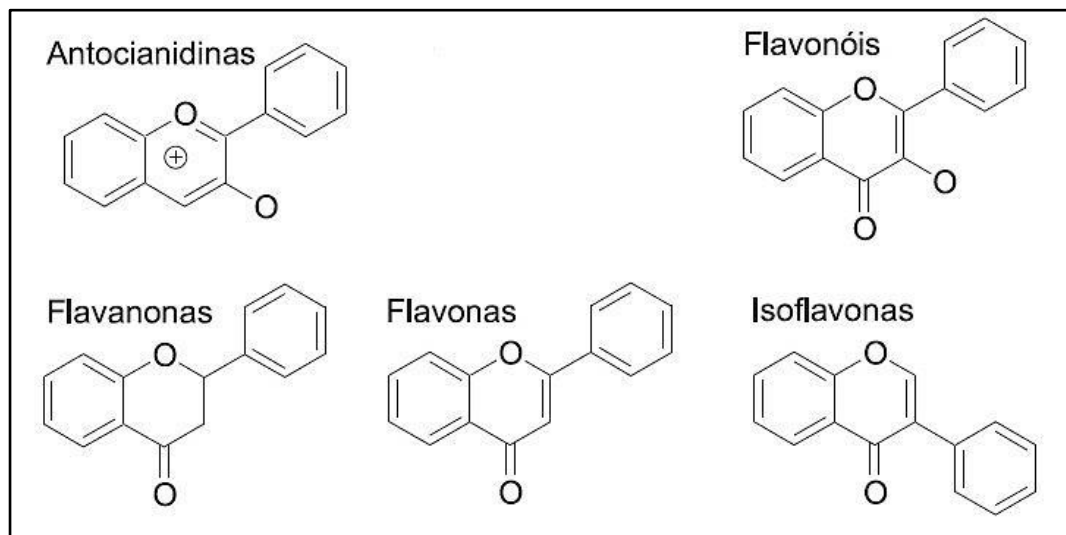
Quando a ligação entre o açúcar e flavonoide é feita entre os carbonos C-1 do açúcar e um ou dois carbonos do anel A do flavonoide (sempre nos carbonos 6 e/ou 8), o composto formado é classificado em flavonoide c-heterosídeo, sendo a principal característica química desse grupo, a resistência à hidrólise ácida.

Flavonoides *c*-heterosídeos derivados de flavonas são identificados ainda em: flavanonas, chalconas, isoflavonas, proantocianidinas, entre outros (SIMÕES et al., 2017).

As flavanonas são intermediários biossintéticos da maioria das classes de flavonoides e se caracterizam pela ligação simples entre os carbonos 2 e 3 em seu núcleo fundamental hidrogenado. Alguns exemplos de flavanonas frequentes em vegetais são a hesperedina, naringenina e naringina (SIMÕES et al., 2017).

Os isoflavonoides (isoflavonas, isoflavanonas, isoflavenos) são caracterizados por uma cadeia arila-C3-arila, do tipo difenil-1,2-propano, alguns dos representantes mais comuns são a daidzeína, a genisteína e o cumestrol. Ao contrário das outras classes de flavonoides, sua distribuição taxonômica é restrita, sendo grande parte dos isoflavonoides relacionados à ação de fitoalexinas (SIMÕES et al., 2017). A Figura 22 mostra alguns exemplos dos diversos tipos de flavonoides e seus respectivos radicais de substituição.

Figura 18 - Exemplos de classes de flavonoides com sua estrutura principal e seus radicais de substituição.



Quase todos os vegetais apresentam algum tipo de flavonoide, o que dificulta a associação exclusiva destes compostos com uma determinada atividade farmacológica. De fato, os humanos ingerem muitos gramas de flavonoides todos os dias, ao ingerirem em frutas, verduras, grãos e vinhos, por exemplo. Entretanto, não há comprovação científica de que estes compostos sejam essenciais à saúde do homem. Embora possam apresentar efeitos mutagênicos e tóxicos, os flavonoides

são, em geral, considerados benéficos à saúde, com indicação de diversas propriedades medicinais e farmacológicas (SIMÕES et al., 2017).

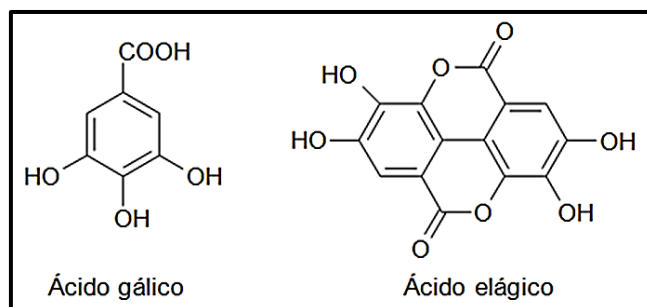
2.5.3. Taninos

Taninos vegetais são polifenóis naturais, derivados do ácido benzoico, de considerável interesse devido a sua habilidade de ligar-se a proteínas e metais (LAGE, 2009) e podem ser classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Os taninos podem ser oxidados em quinonas, as quais formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas, principalmente os grupos sulfídricos da cisteína e amino da lisina, formando complexos irreversíveis, que ocorrem na planta quando seus tecidos são danificados, por auto-oxidação ou oxidação catalisada por enzimas (SGARBIERI, 1996; SIMÕES et al., 1999). A complexação entre taninos e proteínas é determinante para sua ação nas plantas, como fator de controle de insetos, fungos e bactérias (NOZELLA, 2001; SIMÕES et al., 1999). Além de potentes inibidores de enzimas, os taninos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros vegetais (SIMÕES et al., 1999).

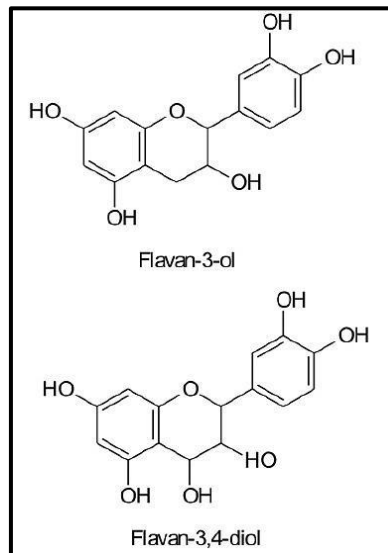
Os taninos hidrolisáveis possuem um poliol central cujas hidroxilas são esterificadas com o ácido tânico. Os galactaninos, um grupo de taninos hidrolisáveis, são formados a partir da ligação entre moléculas de ácido gálico. Já os elagitaninos resultam da hidrólise ácida das ligações éster de resíduos do ácido gálico, que se reagem espontaneamente em ácido elágico (Figura 23) (NOZELLA, 2001; SIMÕES et al., 2017).

Figura 19 - Ácido gálico e ácido elágico, precursores dos taninos hidrolisáveis.



Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela condensação de grupos flavan-3-ols (catequina) ou flavan-3,4-diols (leucoantocianidina), são também chamados proantocianidinas (Figura 24) (NOZELLA, 2001; SILVA, M. R.; SILVA, 1999; SIMÕES et al., 2017).

Figura 20 - Estrutura química de taninos condensados flavan-3-ol (catequina) e flavan-3,4- diol (leucoantocianidina).



Os taninos hidrolisáveis, após hidrólise, produzem carboidratos e ácidos fenólicos como os ácidos gálico, caféico, elágico e tânico (NOZELLA, 2001; SILVA, M. R.; SILVA, 1999). Por outro lado, os taninos condensados são resistentes à hidrólise (NOZELLA, 2001; SILVA, M. R.; SILVA, 1999).

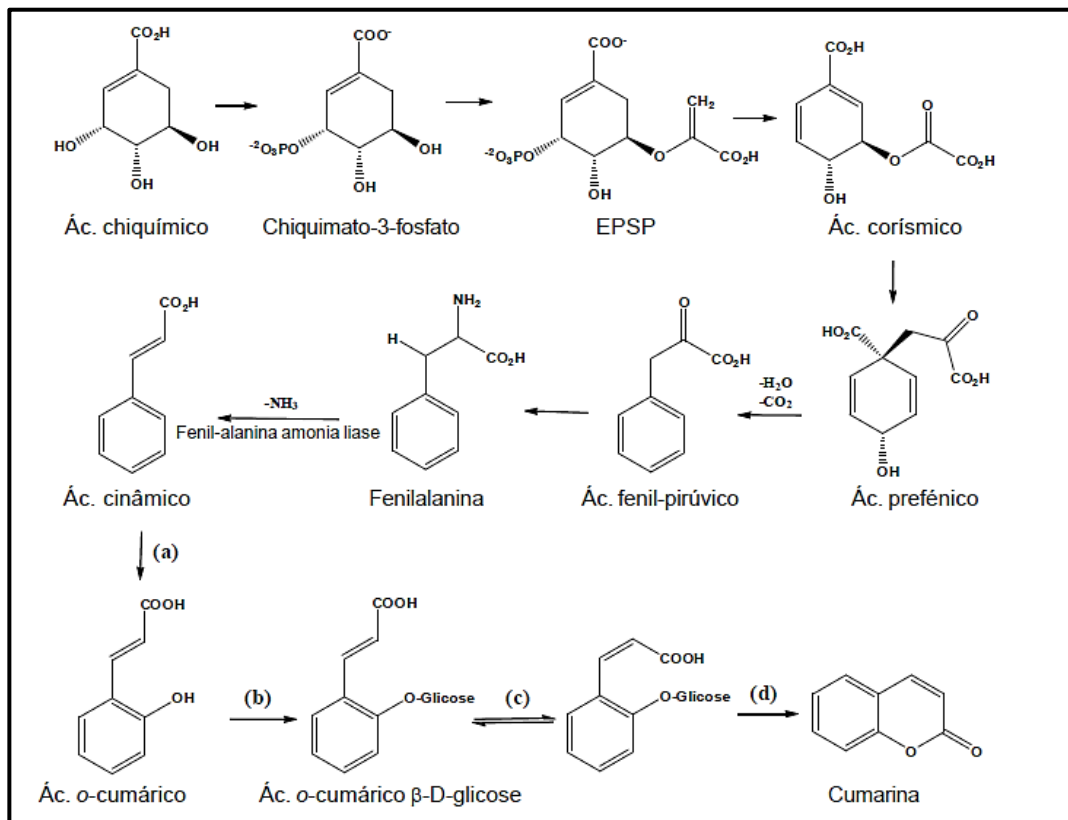
Possuem diversos usos medicinais: tratamento de feridas, hipertensão, hemorragias, inflamações, queimaduras, entre outros. Essas ações podem ser relacionadas com três características principais desses compostos: a complexação com íons metálicos, a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e a capacidade de ligação com macromoléculas (PANSERA et al., 2003; SIMÕES et al., 2017). Devido à ação redutora dos taninos, estudos com radicais antioxidantes indicam sua relevância na prevenção e no tratamento de doenças degenerativas (SIMÕES et al., 2017)

2.5.4. Cumarinas

As cumarinas podem ser encontradas em vegetais, fungos e bactérias, sendo amplamente distribuídas entre as angiospermas, especialmente nas famílias:

Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Leguminosae, Oleaceae, Moraceae e Thymeleaceae (SIMÕES et al., 1999). Quimicamente, seu representante mais simples é a 1,2-benzopirona, exceto esta, todas as outras cumarinas apresentam um grupo hidroxila na posição 7. São derivadas da fenilalanina e um dos seus primeiros precursores é o ácido cinâmico (Figura 25) (SIMÕES et al., 1999).

Figura 21 - Etapas da rota biossintética das cumarinas a partir do Ácido Chiquímico. A hidroxilação *orto* da cadeia lateral do ácido cinâmico catalisada pela enzima trans-cinamato-4-hidroxilase (a). A *o*-glicosilação do ácido *o*-cumárico (b). Uma isomerização *cis/trans* da dupla ligação da cadeia lateral (c). A lactonização do ácido *o*-cumárico por ação enzimática e na presença de calor (d).



Fonte: Czelusniak et al., (2012)

Nas plantas, as cumarinas possuem ações reguladoras do crescimento (PEREIRA et al., 2000), alelopática, proteção contra herbivoria, atração de polinizadores, controle da perda de água e da temperatura (SOUZA et al., 2011).

As cumarinas apresentam diversas atividades biológicas, como: bronquodilatadora, expectorante, anti-neoplásica, efeito narcótico, hemostático, sedativo, espasmolítico, anticoagulante, analgésico, regulador hormonal, vaso dilatador, inibidor da carcinogênese (PEREIRA et al., 2000; SOUZA et al., 2011). Além disso, apresentam ação imunossupressora e antialérgica, com efeitos no tratamento de asma em camundongos (MARINHO et al., 2004). É de relevante

importância farmacêutica, pois apresenta baixa toxicidade para mamíferos (SIMÕES et al., 1999).

2.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

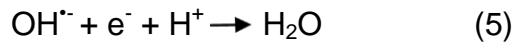
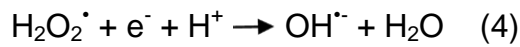
Os antioxidantes são compostos químicos de vasta aplicabilidade, estão presentes em diversos vegetais consumidos pelo homem, e são empregados na indústria farmacêutica, alimentar, de plásticos, óleos entre outras. Podem ser definidos como substâncias que presentes em baixas concentrações, comparativamente ao substrato oxidável, impedem ou retardam a oxidação deste substrato (MIGUEL, 2007), sendo classificados de acordo com a presença ou ausência de ação enzimática.

As enzimas antioxidantes removem espécies reativas ao oxigênio e/ou ao nitrogênio, ou seja, são capazes de bloquear a iniciação da oxidação. Já os antioxidantes não-enzimáticos são moléculas que interagem com as espécies reativas e são consumidos durante a reação. Os antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos, e os sintéticos são classificados como não-enzimáticos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Os compostos antioxidantes são ainda classificados, de acordo com seu modo de ação, em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres. Os antioxidantes secundários agem retardando a iniciação da auto-oxidação, por mecanismos como a complexação de metais, o sequestro de oxigênio, a decomposição de hidroperóxidos formando espécie não-radical, a absorção da radiação ultravioleta e a desativação de oxigênio singleto (ADEGOKE et al., 1998).

O oxigênio, em sua forma molecular (O_2), é o principal acceptor biológico de elétrons e tem papel fundamental nas funções celulares. Entretanto, junto às propriedades benéficas do O_2 ocorre a formação inadvertida das espécies reativas de oxigênio (EROS), como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2^{\cdot}$) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}). As EROS podem ser uma ameaça grave ou causa de morte de células aeróbicas (SCANDALIOS, 2005).

O Superóxido de Oxigênio ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2^{\cdot}$) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) são produzidos por sucessivas reduções univalentes do oxigênio (Equações de 2 à 5) (SMIRNOFF, 1993):



As EROS são capazes de oxidar proteínas celulares, ácidos nucleicos e lipídios, contribuindo para o envelhecimento celular (JUAN; PALLARDÓ; VIÑA, 2000), mutagênese (TAKABE, 2001), carcinogênese (KAWANISHI; HIRAKU; OIKAWA, 2001) e doenças cardíacas (KHAN; BASEER, 2000). Possivelmente, por meio da desestabilização das membranas (MORA et al., 1990), danos no DNA e oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (TAKABE, 2001).

Logo, antioxidantes que reduzam o risco de desenvolvimento de doenças causadas por reações oxidativas em sistemas biológicos são de grande relevância (NAMIKI, 1990; RAMARATHNAM et al., 1995; SIMÕES et al., 2017). Apesar de serem muito efetivos e estáveis, os antioxidantes sintéticos apresentam o uso restrito em muitos países, devido à possibilidade de causarem efeitos indesejáveis em enzimas de vários órgãos humanos. Por outro lado, há grande interesse na pesquisa por antioxidantes naturais, que sejam seguros para o consumo humano (ZANUTTO et al., 2014).

Nas plantas, a maior parte dos antioxidantes isolados são polifenóis (DEBA et al., 2007). Estes compostos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil, que é o radical mais prevalente na autooxidação e possui menor energia que outros radicais, o que favorece o sequestro do seu hidrogênio (DECKER, 1998). O radical resultante, fenoxil, pode reagir com outro radical peroxil, formando um composto que poderá originar novos radicais, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, comprometendo a eficiência do antioxidante. Esta eficiência é determinada pelos grupos funcionais presentes no composto fenólico, pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos (MADHAVI; DESHPANDE; SALUNKHE, 1995; SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Alguns compostos fenólicos isolados de *B. pilosa*, como ácidos dicafeoilquínicos e flavonoides, são descritos como potentes antioxidantes (CHIANG et al., 2004). Essa ação antioxidante foi mostrada em um estudo com extrato bruto de *B. pilosa* e sua fração acetato de etila, no qual os níveis de atividade antioxidante foram tão altos que exerceram ação hepatoprotetora (KVIECINSKI et al., 2011).

Há um interesse crescente nos efeitos protetores dos compostos naturais de origem vegetal contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. Neste contexto, muitos experimentos *in vitro* são realizados para testar a atividade antioxidante de uma dada substância, sendo seguidos da avaliação de atividade antioxidante *in vivo*. A maioria dos métodos avaliativos *in vitro* envolve a inibição de diferentes radicais livres (ARUOMA, 2003; DEBA et al., 2007; FRANKEL; MEYER, 2000; SANCHEZ-MORENO, 2002), que podem ser baseados:

a) na captura do radical peroxila: ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*);

b) no poder de redução do metal: FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*);

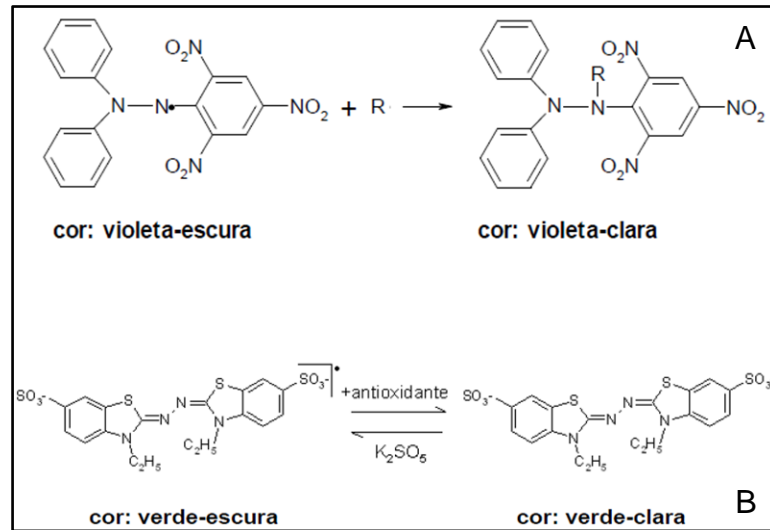
c) na captura do radical hidroxila: método de desoxirribose;

d) na captura de radical orgânico: ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) e DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila);

e) na quantificação de produtos formados durante a peroxidação lipídica: TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), oxidação de LDL (*Low Density Lipoprotein*) e co-oxidação do β -caroteno.

As metodologias DPPH[•], o ABTS^{•+} e o FRAP são muito utilizadas na determinação da atividade antioxidante de produtos naturais e alimentos, devido a sua relativa simplicidade como método: reação de oxi-redução entre o oxidante e o antioxidante (TOMEI; SALVADOR, 2007). Os mecanismos envolvidos nos métodos ABTS^{•+} e DPPH[•] são semelhantes, sendo ambos baseados na geração de radicais e em mudanças nos espectros de absorção do radical livre decorrente de sua redução. O ABTS^{•+} é aplicável aos sistemas antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, enquanto o DPPH[•] aos sistemas hidrofóbicos (TEOW et al., 2007). A Figura 26 mostra a reação de redução dos radicais livre DPPH[•] (A) e ABTS^{•+} (B). Entretanto o método do ABTS^{•+} é mais sensível que o DPPH[•], uma vez que este apresenta um impedimento estérico para que o radical OH de um grupo fenol neutralize seu nitrogênio radicalar centralizado entre os grupos alquila (ALISI et al., 2012).

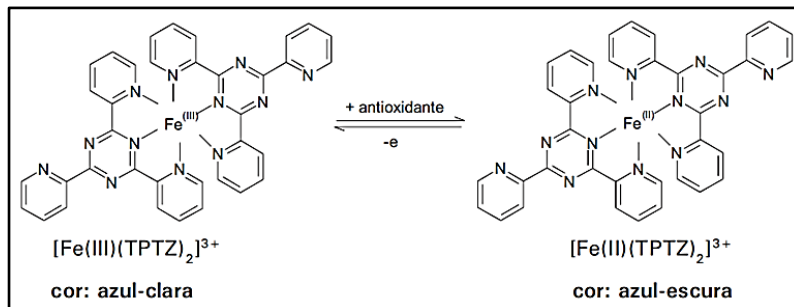
Figura 22 - Estabilização dos radicais livres por antioxidantes, DPPH* (A) (RUFINO et al., 2007b) e ABTS*⁺ (B).



Fonte: RUFINO et al. (2007a); RUFINO et al. (2007b).

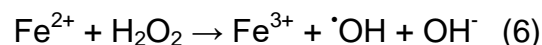
O teste FRAP é um ensaio de capacidade antioxidante que se baseia na habilidade do antioxidante testado em reduzir o íon Fe³⁺ em Fe²⁺ no solvente TPTZ (2,4,6- tripiridil-s-triazina), formando um complexo Fe²⁺-TPTZ azul intenso (Figura 27) (RUFINO et al., 2006).

Figura 23 - Redução do complexo TPTZ com Fe³⁺ por ação de um antioxidante



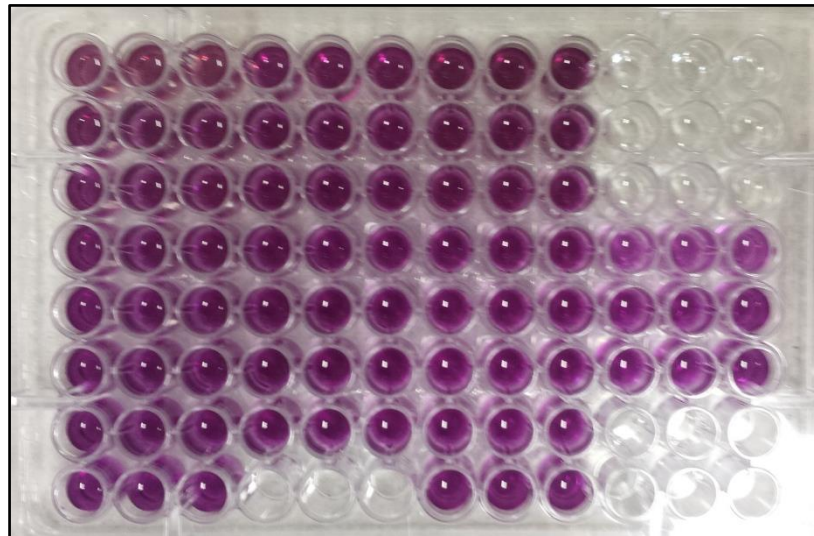
Fonte: Rufino et al. (2006)

A capacidade de quelar metais também tem sido utilizada na avaliação da dos componentes de extratos vegetais em sequestrar os íons metálicos livres, que são catalisadores importantes para a geração de radicais hidroxílicos altamente reativos através da reação de Fenton (equação 6) nos sistemas *in vivo* e *in vitro* (HARZALLAH et al., 2016; WONG et al., 2015).



A Figura 28 exemplifica o resultado de uma reação de redução de Fe^{3+} em Fe^{2+} pela ação antioxidante do extrato hidroalcoólico de *T. diversifolia*, sendo a coloração final de cor roxa dada pela formação do complexo ferrozina- Fe^{2+} . Os agentes quelantes quando presentes em uma amostra não permitem a formação deste complexo, resultando na diminuição da absorbância com uma coloração mais clara (BARROS, 2012).

Figura 24 - Reação de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} pela ação antioxidante do extrato de *T. diversifolia*.



Fonte: Anny Carolyne da Luz

Uma vez que fatores ambientais e intrínsecos das plantas afetam a sua produção de metabólitos secundários, conseqüentemente, a ação antioxidante desses vegetais também é modulada por esses fatores. Da mesma forma, a utilização de diferentes métodos de extração e solventes poderão favorecer a obtenção de uma ou outra classe de compostos secundários, o que também influenciará na resposta antioxidante.

Em estudos com espécimes de *Bidens pilosa* coletados em seis locais do estado de Minas Gerais, utilizando diferentes métodos de análise e partes da planta (folha/flor, caule e raiz) foi demonstrado que o extrato constituído de folha/flor apresentou melhor atividade antioxidante, avaliada pelo método DPPH, quando comparado com os extratos de raiz e de caule, com a maior atividade antioxidante, obtida com o uso do método de extração por maceração dinâmica. Essa pesquisa

também demonstrou que a atividade antioxidante está diretamente relacionada à concentração de compostos fenólicos do extrato (CORTÉS-ROJAS et al., 2013).

Lee et al., 2013 também demonstraram correlação entre a atividade antioxidante, avaliada pelos testes DPPH e ABTS, e o teor total de fenóis e flavonoides em *Bidens pilosa*. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que o extrato metanólico de *Bidens pilosa* apresentou maior poder redutor no teste FRAP que o padrão utilizado (Trolox), sendo este resultado relacionado com a abundante quantidade do composto fenólico ácido 3,5-dicafeoilquínico, na planta.

Kwiecinski et al., (2011) também descreveram, com uso do DPPH, maior atividade antioxidante para a fração acetato de etila das partes aéreas de *B. pilosa* e identificaram maior quantidade de compostos fenólicos nesta fração pelo método Folin-ciocalteu.

Além disso, os extratos etanólico e acetato de etila/etanólico, da planta inteira de *Bidens pilosa* suprimiram a hemólise oxidativa e a peroxidação lipídica e proteica em eritrócitos humanos, induzida pelo radical peroxil. Os extratos também impediram o declínio da atividade da superóxido dismutase (SOD) e a depleção de glutathiona citosólica (GSH) e ATP nos eritrócitos, indicando propriedades protetoras antioxidantes de *B. pilosa* (YANG et al., 2006).

Com base no exposto, os estudos *in vitro* demonstram que a espécie *Bidens pilosa* apresenta uma significativa ação antioxidante. Essa atividade é maior em extratos alcoólicos, hidroalcoólicos e acetato de etila preparados, principalmente, com a planta inteira (BRASIL, 2015).

Da mesma forma que *Bidens pilosa*, *Tithonia diversifolia* também possui atividade antioxidante relevante. Em investigação com os extratos etanólico e aquoso das folhas de *T. diversifolia* foi demonstrada com uso do teste do DPPH, uma capacidade antioxidante, de forma dose dependente, para os extratos aquoso e etanólico (CASTILO et al., 2016). Bem como, no teste do ABTS, o extrato aquoso de *T. diversifolia* mostrou resultados antioxidantes equivalentes ao do padrão n-acetilcisteína (HIRANSAI et al., 2016). Também é descrita a atividade antioxidante das frações acetato de etila e butanólica de *T. diversifolia* frente aos testes DPPH e FRAP, correlacionada ao teor total de compostos fenólicos (PANTOJA; COLMENARES; ISAZA, 2017).

Di Giacomo et al., (2015) compararam os teores de compostos fenólicos e flavonoides dos extratos aquoso, metanólico e diclorometano de *Tithonia diversifolia*,

bem como sua capacidade antioxidante. E, demonstraram que o extrato aquoso, que teve os maiores teores de fenóis e flavonoides, também apresentou a melhor atividade antioxidante entre os três extratos testados. Além disso, foi observado que quando incubado junto ao plasma sanguíneo de um doador saudável, o extrato aquoso causou uma significativa inibição da formação de hidroperóxidos de lipídeos.

A literatura mostra que *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia* são plantas exibem propriedades de promoção da saúde, através de sua capacidade antioxidante e potencial proteção dos sistemas celulares contra danos de estresse oxidativo. Sendo estas relacionadas com seus metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos. Pesquisas que visem promover e padronizar a produção desses compostos, por meio de cultivo e seleção de genótipos, são de grande valor científico/farmacológico/tecnológico/medicinal.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade genética de *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia* em populações de diferentes regiões do Espírito Santo, comparar as respostas do metabolismo primário e secundário dessas espécies sob diferentes condições de adubação e irrigação, além de analisar os efeitos de seus extratos sobre viabilidade celular de linfócitos humanos e de Sarcoma 180 de roedores.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a diversidade genética, por meio de marcadores RAPD, de duas espécies da família Asteraceae (*Bidens pilosa* L. e *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray.), de diferentes populações do Espírito Santo;
- ✓ Investigar as respostas de metabolismo primário de *Bidens pilosa* frente a diferentes condições de adubação (orgânico, químico e controle) e de irrigação (irrigado e suspensão da rega), utilizando parâmetros fotossintéticos e de biomassa;
- ✓ Comparar as respostas de metabolismo primário de *Tithonia diversifolia* submetidas às condições de adubação orgânica, química e controle, através de parâmetros fotossintéticos, de biomassa e área foliar;
- ✓ Verificar a influência das condições de cultivo impostas à *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia*, sobre os seus teores totais de compostos fenólicos (flavonoides, taninos e fenóis);
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante (DPPH, ABTS; FRAP e atividade quelante do Fe^{+2}) das duas espécies de Asteraceae, expostas a diferentes condições de cultivo;
- ✓ Relacionar a variação dos teores totais de compostos fenólicos com a atividade antioxidante das duas espécies de Asteraceae, submetidas às diferentes condições de adubação e irrigação;
- ✓ Quantificar e comparar as concentrações de cumarina luteolina, quercetina, rutina e ácido clorogênico de diferentes frações do extrato hidroalcoólico de

Bidens pilosa e *Tithonia diversifolia*, provenientes de plantas submetidas às diferentes condições de cultivo, em HPLC;

- ✓ Avaliar a viabilidade celular de linfócitos humanos e de Sarcoma 180 de roedores, expostos aos extratos de *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia* derivados de plantas submetidas às diferentes condições de cultivo, por meio do método MTT;
- ✓ Relacionar os índices de viabilidade celular com as diferentes concentrações de luteolina, quercertina, rutina, ácido clorogênico e cumarina.

**CAPÍTULO 1 – GENETIC DIVERSITY OF POPULATIONS OF *Bidens pilosa* L.
AND *Tithonia diversifolia* HEMSL. AT ESPÍRITO SANTO**

RESUMO: *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia* são duas plantas medicinais da família Asteraceae, distribuídas por toda região tropical e subtropical do planeta, com uso fitoterápico bem difundido contra diversas enfermidades: malária, inflamações, diarreias, diabetes, câncer, entre outras. As características químicas dos vegetais, bem como seus efeitos sobre a saúde humana, podem ser alterados por influência e fatores genéticos, ambientais e ontogenéticos. A técnica do RAPD produz marcadores capazes de determinar a similaridade genética entre populações da mesma espécie, análise importante na conservação, domesticação e manejo de plantas medicinais. O objetivo deste trabalho foi comparar a diversidade genética entre diferentes populações de *B. pilosa* e entre diferentes populações de *T. diversifolia* no estado do Espírito Santo. As análises mostraram baixa similaridade entre as populações de *B. pilosa* estudadas, assim como entre as populações de *T. diversifolia*. Em ambas as espécies os grupamentos formados não foram correspondentes às distâncias geográficas entre os locais de coleta. Esse resultado é relacionado às formas de reprodução e propagação destas espécies, que contribuem para alta diversidade genética. Assim, como é esperado em espécies ruderais, essas espécies apresentam alta diversidade genética entre as populações, o que contribui para o sucesso de seu estabelecimento em diferentes regiões. Para produção de fitoterápicos é importante a escolha de um genótipo, a fim de que o fator genético não provoque alterações significantes na matéria-prima.

PALAVRAS-CHAVE: picão-preto, girassol mexicano, RAPD, marcador molecular, plantas medicinais.

ABSTRACT: *Bidens pilosa* and *Tithonia diversifolia* are two medicinal plants of the family Asteraceae, distributed throughout the tropical and subtropical regions of the planet, with widespread phytotherapeutic use against various diseases: malaria, inflammation, diarrhea, diabetes, cancer, among others. The chemical characteristics of plants, as well as their effects on human health, can be altered by influence and genetic, environmental and ontogenetic factors. The RAPD technique produces markers capable of determining genetic similarity between populations from same species, an important analysis in the conservation, domestication and management of medicinal plants. The objective of this work was to compare the genetic diversity among different populations of *B. pilosa* and among different populations of *T. diversifolia* in the state of Espírito Santo. The analyzes showed low similarity between the populations of *B. pilosa* studied, as well as among the populations of *T. diversifolia*. In both species, the groupings formed did not correspond to the geographical distances among the collection locations. These results are related to the ways of reproduction and propagation of these species, which contributes to high genetic diversity. Thus, as expected for ruderal species, these species present high genetic diversity among populations, which contributes to the success of their establishment in different regions. For the production of phytotherapy products is important to choose a genotype, in order to avoid that the genetic factor cause significant changes in the raw material.

KEYWORDS: black-jack, mexican sunflower, RAPD, molecular marker, medicinal plants.

1. INTRODUCTION

Asteraceae is one of the most successful plant families, accounting for around 23.000 species and 1.600 genera (ANDERBERG et al., 2007), representing 10% of the total flora of angiosperms (WILSON, 1988). In Brazil, there are approximately 2.000 species and 250 genera (SOUZA; LORENZI, 2008). They are spread throughout all continents, except Antarctica (ROQUE; BAUTISTA, 2008), and many of their species are invasive (BERETTA et al., 2008). Hodgins et al. (2015) suggest that multiple evolutionary pathways may lead to adaptation during the introduction and dissemination of Asteraceae species in different environments.

Heliantheae is one of the tribes of the Asteraceae family (ANDERBERG et al., 2007) which presents several secondary metabolites, whose biological activities are increasingly investigated, as well as important for chemotaxonomy (ARIDOAN, 2006). *Bidens pilosa* and *Tithonia diversifolia* are two species of the family Asteraceae, with medicinal interest, which belong to the Heliantheae tribe (FERNANDES; RITTER, 2009; MOURA; ROQUE, 2014).

Bidens pilosa L. (Asteraceae), is a species of annual cycle, autogamous, popularly known as black jack, is an herbaceous plant from South America widely distributed across temperate and tropical regions (ABDOU et al., 2010). This specie is used in traditional medicine for treatment of inflammation, allergy, diabetes, cancer, hepatitis and among others disorders (BARTOLOME et al., 2013). *B. pilosa* is a species with high genetic variability, caused by a significant cross-pollination rate, which entails to reduced genetic similarity between genotypes (VIDAL et al., 2007).

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae), a perennial shrub, is native from Mexico and grows in parts of Africa, Australia, Asia and other parts of America. Their extracts are traditionally used in the treatment of diabetes, diarrhea, menstrual cramps, malaria, hematomas, hepatitis, hepatomas and wound healing (CHAGAS-PAULA et al., 2012).

It is known that the phytochemical compounds in the same species varies according factors ontogenetic, environmental and genetics (CHIRINOS et al., 2013; TLILI et al., 2014), which may affect their biological properties. Differences among populations can be established by several markers, among them the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), a dominant marker, has been successfully used to

analyze the genetic diversity of natural populations (ALI et al., 2012; SINGH et. al, 2012; FACANALI et. al, 2015). The RAPD technique produces molecular markers through the use of small primers with arbitrary sequences and, because of that, is a method often useful for investigating species which had not been described genetically. This technique is fast and shows a high potential to detect polymorphism, even when small amount of genomic DNA is available (LACERDA et al., 2002). Furthermore, is able to detect changes in coding and noncoding regions (GAJERA et al., 2010; KATSIOTIS et al., 2009; LIN et al., 2009). Thereby, the RAPD provide a convenient and rapid tool in assessing genetic differences between genotypes, even at a lower intraspecific taxonomic level (GAD et al., 2013).

Genetic analysis of medicinal plants is important for their domestication, conservation and efficient management (CARVALHO et al., 2009), since the quality of the final phytotherapy product is the result of the interaction between the cultivation techniques adopted in the production of medicinal plants, with the genetic characteristics of the population. This makes it relevant that the individuals which compose the population to be cultivated possess genetic similarity, in order to facilitate the management and to obtain chemically homogeneous raw material, guaranteeing the necessary quality for their commercial viability (MONTANARI, 2002).

Thus, the objective of this work was to compare genetically different populations of two species of medicinal plants: *Bidens pilosa* and *Tithonia diversifolia*.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. PLANT MATERIAL

2.1.1. *Bidens pilosa* L.

The aerial parts of ten *Bidens pilosa* adult specimens were randomly selected and collected at four localities of Southeastern Brazil region: Afonso Cláudio (AC) (41° 09' 58.57" W; 20° 15' 07.33"S), Barra de São Francisco (BSF) (40° 54' 51.9" W; 18° 44' 43.9" S), Cariacica (CA) (40° 23' 54.0" W; 20° 17' 28.5" S) and Muniz Freire (MF) (41° 25' 22.593" W; 20° 31' 38.1008" S). Specimens were identified, for all localizations, by the VIES herbarium of the Universidade Federal do Espírito Santo (voucher numbers: 41242, 23026, 23029 and 23030).

2.1.2. *Tithonia diversifolia* Hemsl.

The aerial parts of ten *Tithonia diversifolia* adult specimens were randomly selected and collected at five localities of Southeastern Brazil: Colatina (COL) (19° 30' 08.2" S; 40° 36' 40.7" W), Muniz Freire (MF) (20° 28' 09.9" S; 41° 24' 14.7" W), Santa Teresa (ST) (19° 95' 389"; 40° 55' 783"W), Viana (VIA) (20° 25' 23.184" S; 40° 28' 37.2828" W) and Vitória (VIT) (20° 16' 30.4716" S; 40° 18' 17.5284" W). A voucher specimen (VIES 35297) was deposited in the Central Herbarium of Universidade Federal do Espírito Santo/VIES, Brazil.

2.2. GENETIC ANALYSIS USING RAPD MARKERS

Extraction of genomic DNA was based on the protocol described by Doyle (1987). For this analysis, 100 mg of pools of 10 plants from each locality, previously frozen, were ground in liquid nitrogen with polyvinylpyrrolidone. The obtained powder was mixed with 1mL of CTAB (Cetyl Trimethylammonium Bromide) extraction buffer (2% CTAB, 1.4M NaCl, 100mM Tris-HCl pH 8, 20mM EDTA pH 8), β -mercaptoethanol and proteinase-K, incubated for 30 min at 65°C. After cooling, 500 μ L chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added and centrifuged for 5 min at 12000 RPM. This procedure was repeated twice. The supernatant was treated with RNAse A (10 μ g. μ L⁻¹), at 37° C for 30 min. DNA precipitation was performed with 0.6% (v/v) of cold isopropanol. The formed pellet was washed with 70% ethanol, dried at room temperature and resuspended in 100 μ L of Tris-EDTA pH 8 (TE buffer). Four replicates of DNA extraction were made from each leaf pool of the localities. DNA concentration was evaluated spectrophotometrically by NanoDrop 3300 (Thermo Scientific) and the quality of the DNA was checked by electrophoresis on a 1% agarose gel stained with GelRedTM (BIOTIUMTM).

Initial PCR reactions were performed using thirty-two random decamer primers from the Operon Technology-USA. For *Bidens pilosa*, Twenty-one primers (OPAD-01, OPAD-08, OPAD-10, OPAD-17, OPAD-18, OPD-04, OPD-18, OPG-19, OPI-14, OPI-19, OPI-20, OPE-06, OPE-11, OPE-12, OPP-05, OPP-06, OPP-08, OPP-09, OPP-10, OPF-18, OPF-20) have been selected on the basis of the good resolution and the polymorphism of bands. For *Tithonia diversifolia*, seventeen primers (OPAD-

01, OPAD-08, OPAD-10, OPAD-17, OPAD-18, OPD-04, OPD-18, OPG-19, OPI-14, OPI-19, OPI-20, OPE-06, OPE-09, OPE-12, OPP-05, OPP-06, OPP-08) were selected.

Each PCR reaction was performed in 25µL reaction volume containing 25 ng DNA template, 5 µl de 5x reaction buffer, 2.5 µL 25mM MgCl₂, 0.5 µl 10mM dNTP, 1.25U Taq and 0.3 µL (10 µM) of specific primer, in Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™). The PCR cycles following the conditions: 94°C for 3 min, 40 cycles of desnaturation at 94°C for 1 min, annealing at 35°C for 1 min and extension at 72°C for 2 min. After the cycles, the samples were submitted to a final extension step at 72°C for 10 min. Amplification products were separated on 2% agarose gel in TBE buffer (1x), stained with GelRed™ (BIOTIUM™), visualized under UV light and recorded using a transilluminator LPIX-TOUCH (Loccus Biotecnologia, Brazil).

2.3. STATISTICAL ANALYSIS

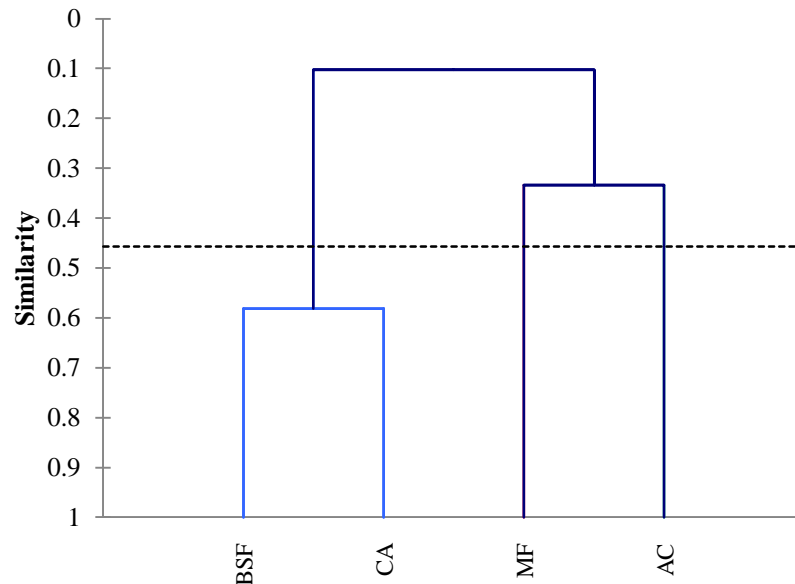
For RAPD analysis, bands were scored as either present (1) or absent (0). The scored RAPD markers were converted into a binomial matrix. From these data, the genetic proximity was estimated applying Jaccard similarity coefficient, only polymorphic loci were used. Clustering analysis was conducted using the Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average (UPGMA) method, using XLSTAT (version 2016.05.33324) for Windows (Addinsoft, New York, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. BIDENS PILOSA L.

The twenty-one selected primers generated 111 discernible and reproducible DNA polymorphic fragments. The amplified bands ranged between 100 and 2000bp. The UPGMA cluster analysis of the Jaccard's similarity coefficient generated a dendrogram demonstrating the overall genetic relationship among the populations. Two groups were formed and there was low similarity between them (10.3%). In the groups, the lowest genetic similarity was found between populations MF and AC (33.3 %) and highest between BSF and CA (58.1 %), as shows in Fig. 1.

Fig. 1. Dendrogram showing genetic variability between four *Bidens pilosa* populations determined by RAPD markers. BSF, Barra de São Francisco; CA, Cariacica; MF, Muniz Freire; AC, Afonso Claudio.



Levels of similarity between BSF and CA and between MF and AF (Fig. 1), shows that the populations are relatively different. These values are close to those obtained with analyzes of other ruderal species. For example, for *Bidens pilosa* and *B. subalternans*, collected in southern and central-western Brazil, the average coefficient of genetic similarity was low, ranging from 22% to 50%, respectively (HERNANDEZ, 2004). For *B. pilosa* populations collected in the state of Paraná, the average genetic similarity was 37% (VIDAL et al., 2005). For *Euphorbia heterophylla*, from the state of Rio Grande do Sul, 40% similarity was found (WINKLER et al., 2003). However, *Eichornia crassipes* has a high genetic similarity, close to 90%, which is explained by the vegetative propagation of this species, which excludes the possibility of genetic recombination (CARDOSO et al., 2002).

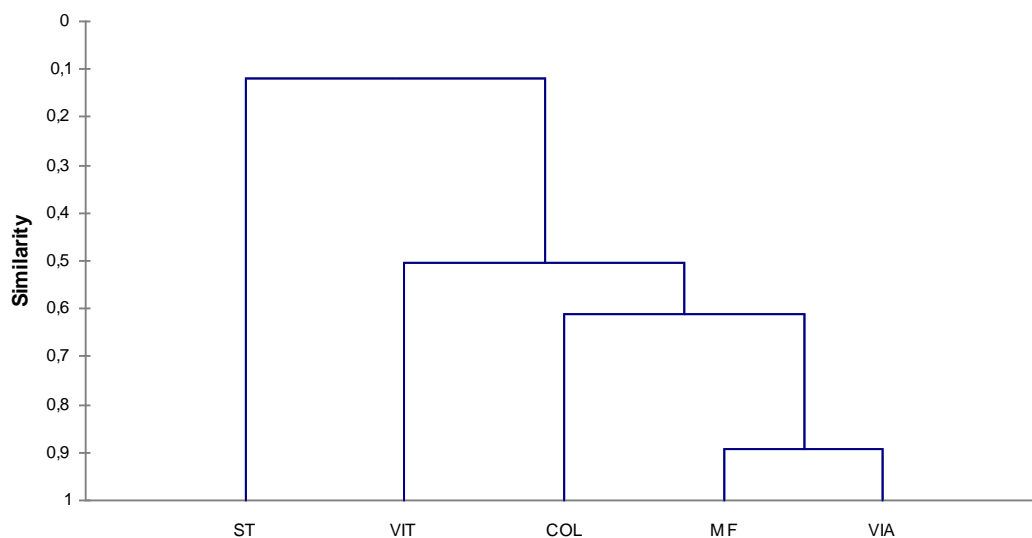
B. pilosa is a autogamous species, display up to 10% of cross-fertilization and reproduces by seeds (SUN AND GARDERS, 1990). It's distributed in all the cultivable regions of many countries and a single plant can produce 3.000 viable seeds (KISSMANN; GROTH, 1999). These characteristics ensure high genetic variability of this species. The low level of similarity observed in the two clusters formed, indicate that clustering is not only related with the proximity of geographic locations. Possibly, seed dispersal through migratory birds or another animals

(zoochory) and with cultivated species seeds contaminated with *B. pilosa* facilitated gene flow by seed (VIDAL et al. 2007), making possible that population from distant locations were grouped into a closer cluster due to their common origin. Vidal et al. (2006) also found high genetic variability among *Bidens* gender of plants from the same population. Lamego et al. (2006) and Vidal et al. (2007) founded low genetic similarity of *B. pilosa* from different populations.

3.2. TITHONIA DIVERSIFOLIA HEMSL.

The seventeen selected primers generated 57 discernible and reproducible DNA fragments, which 34 were polymorphic. The amplified bands ranged between 100 and 2000 bp. The UPGMA cluster analysis of the Jaccard's similarity coefficient generated a dendrogram for *T. diversifolia* samples that shows ST has lower genetic similarity to other populations 12%, with highest genetic similarity found between MF and VIA 89%, indicating high levels of genetic diversity and that clustering is not positively correlated with the proximity of geographical locations, as shown in Fig. 2. Comparisons of genetic diversity among populations of *T. diversifolia* from Mexico also showed high genetic diversity (DEL VAL DIAZ et al., 2017). In the same way, Jing et al. (2012) found high genetic diversity among populations of *Tithonia diversifolia* from China.

Fig. 2. RAPD based dendrogram. ST: Santa Teresa; VIT: Vitória; COL: Colatina; MF: Muniz Freire; VIA: Viana.



Genetic diversity is one of the most important attributes for the species or populations enabling adaptation to new situations. *T. diversifolia* has been described as an invasive plant that can establish itself in different ecosystems (MUOGHALU, 2008). *T. diversifolia* reproduce sexually and vegetatively, produces large numbers of seeds and presents a high diversity of pollinating insects (MUOGHALU; CHUBA, 2005), characteristics that could certainly contribute to a greater genetic variability. Besides that, in well-established species, the majority of the variability is concentrated between the populations (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000).

This comparative molecular analyses of four *B. pilosa* and of five *T. diversifolia* populations from Espírito Santo-Brazil, corroborates with the studies that indicate that ruderal species present high genetic diversity, which contributes to their establishment in several environments. The present study assumes significance as it provides valuable information on the pattern of genetic variation existing in these medicinally important species, being important for the production of herbal medicines the choice of a genotype, in order that the genetic factor does not cause significant alterations in the raw material.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is an integral part of the project financed by FAPES. The authors thank for the doctoral scholarship granted by FAPES an CAPES.

REFERENCES

A.A. ANDERBERG, B.G. BALDWIN, R.G. BAYER, J. BREITWIESER, C. JEFFREY, M.O. DILLON, P. ELDENÄS, V. FUNK, N. GARCIA-JACAS, D.J.N. HIND, P.O. KARIS, H.W. LACK, G. NESOM, B. NORDENSTAM, CH. OBERPRIELER, J.L. PANERO, C. PUTTOCK, H. ROBINSON, T.F. STUESSY, A. S, J. W. AND L. E. W. Compositae. In: JEFFREY, J. W. K. AND C. (Ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants** . Volume VIII Flowering Plants. Eudicots: Asterales Edited by K. Kubitzki. Verlag-Berlin-Heidelberg-Germany: Springer, 2007.

Ali, I.B.H.; Guetat, A.; Boussaid, M., 2012. Chemical and genetic variability of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae), a North African endemic species. **Ind. Crop. Prod.** 40,277–284.

ARIDOAN, B. C. Immunomodulatory Effects of Phytocompounds. In: **Modern Phytomedicine**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2006. p. 341–356.

BERETTA, M. E. et al. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, 2008.

CARDOSO, L.R.; MARTINS, D.; KURAMAR, E.E.; TANAKA, R.H; MORI, E.S. Variabilidade genética de acessos de aguapé coletados no Estado de São Paulo. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, p. 1-5, 2002.

CARVALHO, M. F. et al. Aplicação da análise multivariada em avaliações de divergência genética através de marcadores moleculares dominantes em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 339–346, 2009.

Chagas-Paula, D.A., Oliveira, R.B., Rocha, B.A., Da Costa, F.B., Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chem. Biodivers.** 9, 210–235. 2012.

del Val Díaz, R., Ramírez, J. M. M., Estrada, M. X. F., Leyva, J. F. G., & Sánchez, B. S. (2017). Diversidad genética de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray de michoacán: análisis con marcadores de ADN-SSR. **Ciencia y Tecnología Universitaria**, ano 4, n3. 2017.

Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem bull.** 19, 11–15. 1987.

Facanali, R., Colombo, C.A.; Teixeira, J.P.F.; Ming, L.C.; Zucchi, M.I.; Marques, M.O.M. Genetic and chemical diversity of native populations of *Ocimum selloi* Benth. **Ind. Crop. Prod.** 76, 249–257. 2015.

FERNANDES, A. C.; RITTER, M. R. A família Asteraceae no Morro Santana, Porto

Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, 2009.

Gad, H. A., El-Ahmady, S. H., Abou-Shoerb, M. I., & Al-Azizia, M. M. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. **Phytochem. Anal.** 24, 1–24. 2013.

Gajera, B.B., Kumar, N., Singh, A.S., Punvar, B.S., Ravikiran, R., Subhash, N., Jadeja, G.C. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. **Ind. Crop. Prod.** 32, 491–498. 2010.

Gauer, L., Cavalli-Molina, S. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity (Edinb)**. 84, 647–656. 2000

HERNANDEZ, G.C. **Resistência de *Bidens* spp. aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase: análise de populações com marcadores moleculares e estratégias para seu manejo.** 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Agronomia- Programa de Pós Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

HODGINS, K. A. et al. Comparative genomics in the Asteraceae reveals little evidence for parallel evolutionary change in invasive taxa. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 9, p. 2226–2240, 2015.

JING, Y., LING, T., YA-LI, G., and WEI-BANG, S. “Genetic Diversity of an Alien Invasive Plant Mexican Sunflower (*Tithonia diversifolia*) in China”. **Weed Science**. 60(4):552-557. 2012

Katsiotis, A., Nikoloudakis, N., Linos, A., Drossou, A., Constantinidis, T. Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intra-genetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. **Sci. Hortic.** 121, 103–108. 2009.

Kissmann, K.G., Groth, D. **Plantas infestantes e nocivas.** São Paulo: BASF, 1999, 797 p.

Lacerda, D. R., Acedo, M. D., Lemos Filho, J. D., & Lovato, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, 3(2), 87-92. 200).

Lamego, F. P., Resende, L. V., Da Silva, P. R., Vidal, R. A., Nunes, A. L. Genetic and geographic distance among beggar-ticks accesses susceptible and resistant to acetolactate sintase herbicide inhibitors. **Pesq. agropec. bras.** 41, 963-968. 2006

Lin, K.H., Lai, Y.C., Li, H.C., Lo, S.F., Chen, L.F.O., Lo, H.F. Genetic variation and its relationship to root weight in the sweet potato as revealed by RAPD analysis. **Sci. Hortic.** 120, 2–7. 2009.

MONTANARI, J. I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas** Campinas-SP, 2002. Disponível em: <www.cpqba.unicamp.br %3C%3E> Acessado em 11 de novembro de 2016.

MOURA, L.; ROQUE, N. Asteraceae no município de Jacobina, Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 4, p. 573–587, 2014.

Muoghalu, J.I. Growth, reproduction and resource allocation of *Tithonia diversifolia* and *Tithonia rotundifolia*. **Weed Res.** 48, 157–162. 2008.

Muoghalu, J.I., Chuba, D.K. Seed germination and reproductive strategies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray and *Tithonia rotundifolia* (PM) Blake. **Appl. Ecol. Environ. Res.** 3, 39–46. 2005.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae: caracterização e morfologia floral**. Salvador: [s.n.].

Singh, S., Panda, M.K., Nayak, S. Evaluation of genetic diversity in turmeric (*Curcuma longa* L.) using RAPD and ISSR markers. **Ind. Crops Prod.** 37, 284–291. 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. São Paulo, Nova Odessa, 704p, 2008.

Sun, M., Ganders, F.R. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. **Heredity**. 64. 139-143, 1990.

Tagami, O.K., Gasparin, M.D.G., Schwan-Estrada, K.R.F., Cruz, M.E.S., Itako, A.T., Tolentino Júnior, J.B., Moraes, L.M., and Stangarlin, J.R. Fungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento *in vitro* de fungos patogênicos. **Semina: Ciências agrárias**. 30(2): 285-294. 2009.

Vidal, R. A., Nunes, A. L., Resende, L. V., Lamego, F. P., Silva, P. R. Genetic analysis of *Bidens pilosa* through RAPD technique. **Scientia Agraria**. 8, 399-403. 2007.

Vidal, R.A., Hernandez, G.C., Winkler, L.M., Federizzi, L.C., Da Silva, P.R. Relation between geographic distance and genetic variability within a population of *Bidens spp.* with resistance to ALS inhibitors. **Planta Daninha**, 24, 149-155. 2006.

VIDAL, R.A.; LAMEGO, F.P; NUNES, A.L. Otimização do número de *primers* empregados em RAPD para detectar variabilidade genética entre acessos de picão-preto. **Scientia Agraria**, v. 6, n. 1-2, p. 71-77, 2005.

WILSON, E. O. **Biodiversity**. Washington, D.C.: National Academies Press, 1988.

WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores da acetolactato sintetase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1067-1072, 2003.

CAPÍTULO 2 – DIFFERENT GROWTH CONDITIONS ON *Bidens pilosa* L. INDUCE CHANGES IN THE PHENOLIC COMPOUND CONTENT, BIOMASS, GAS EXCHANGE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES

Após revisão da língua inglesa, e considerações da banca examinadora, este artigo será submetido à revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry Print Edition ISSN: 0021-8561 Web Edition ISSN:1520-5118

1 **Different plant management conditions on *Bidens pilosa* L. induce changes in the**
2 **phenolic compound content, biomass, gas exchange and antioxidant activities**

3 Anny Carolyne da Luz*, Irany Rodrigues Pretti, Mainã Mantovanelli da Mota, Maria do
4 Carmo Pimentel Batitucci.

5 Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando
6 Ferrari 514, Goiabeiras, 29075-910, Vitória, ES, Brazil. 55 27 4009-7251.

7 annydaluz@gmail.com.br

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 **ABSTRACT:**

27 The effect of management on the production of secondary metabolites in plants has been
28 proposed as a mechanism for improving their antioxidant potential. In this study, the impact
29 of fertilization conditions (chemical fertilizer, cattle manure and no fertilizer), in addition to
30 water deficit, on the physiological responses of *Bidens pilosa* was investigated. Plants
31 fertilized with cattle manure, as the organic fertilizer, and irrigated showed high levels of
32 biomass and gas exchange, whereas irrigated and unfertilized plants had the highest content of
33 phenolic compounds and antioxidant activity, although low biomass. The production of
34 secondary metabolites was up-regulated when photosynthesis decreased. The correlation of
35 81% between manganese in leaves and total tannin content reinforces the importance of
36 studying growing conditions of medicinal plants. Once manganese is a micronutrient that acts
37 in the shikimic acid pathway, plays an important role in secondary metabolism, consequently
38 increasing the antioxidant potential of the medicinal plant. Our results demonstrate that
39 phenolic levels and antioxidant activity of *Bidens pilosa* can be manipulated through fertilizer
40 and irrigation management, with the goal of finding the best management combination for
41 achieving higher phenolic concentration, stronger antioxidant activity and a good harvest.

42 **KEYWORDS:** Black-jack, phenolic compounds, water deficit, fertilizer, nutrients,
43 photosynthesis, antioxidant.

44

45

46

47

48

49

50

51 INTRODUCTION

52 *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) is an annual plant and originates from South America.
53 However, it is now widely distributed in most pantropical areas of the world¹. Phytochemical
54 studies identified phenylpropanoid glucosides, diterpenes, polyacetylenes, flavonoids and
55 flavone glycosides as bioactive components from this plant that present several biological
56 activities, such as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antiseptic, hepatoprotective,
57 antimalarial, antihypertensive and hypoglycemic effects and properties that can contribute to
58 the for treatment of jaundice^{1,2}.

59 Diverse secondary metabolites, such as phenolic compounds, possess antioxidant
60 activity and may help protect cells against oxidative damage caused by free radicals and
61 reactive oxygen species (ROS)³. In the cells, the reactions mediated by ROS, protect them
62 from oxidative stress and stabilize redox homeostasis. However, when the pro-
63 oxidant/antioxidant ratio is imbalanced towards ROS production, oxidative stress occurs,
64 which is associated with several diseases⁴.

65 Secondary metabolites represent a chemical interface between plants and the
66 environment. Therefore, variations in the total content and the relative proportions of
67 secondary metabolites in plants are frequently affected by abiotic factors⁵, such as water
68 availability, light intensity, carbon dioxide levels, temperature and fertilization. Thus, the
69 biomass and the concentration of secondary metabolites depend on the growing conditions
70 and management practices, in order to generate standardized and good quality raw material.

71 Considering quality to be one of the main factors related to consumer acceptance and
72 sustainability in the market, it is important to strictly control and standardize all the stages
73 involved in the production of phytopharmaceutical preparations, such as the selection of the
74 starting plant material, cultivation, fertilization, irrigation, extraction conditions, and the
75 quantification of secondary metabolites or bioactive compounds in the final product⁶.

76 The supply and availability of nutrients is the most important factor for higher
77 productivity among the various plant cultivation practices, for which both chemical fertilizers
78 and organic fertilizers are used. Chemical fertilizers are often based on combinations of
79 nitrogen, phosphorus and potassium nutrients. Nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium
80 (K) are essential nutrients which are limiting for plant ⁷. Nitrogen is the mineral element that
81 plants require in the greatest amounts. It serves as a constituent of many plant cell
82 components, including amino acids, proteins, and nucleic acids ⁸. Phosphorus is important in
83 energy storage reactions or in maintaining structural integrity, present in plant tissues as
84 phosphate covalently bound to an organic molecule, such as the sugar-phosphate
85 intermediates of respiration and photosynthesis, and is also a component of nucleic acids,
86 phospholipids, and ATP⁸. Potassium is an important enzyme cofactor and plays a central role
87 in several metabolic processes, such as turgor driven movements, membrane polarization,
88 regulation of osmotic potentials, and protein biosynthesis⁹.

89 Organic fertilizers, such cattle manure, constitute strategic alternatives for increased
90 yield and reduction in production costs, contributing to the balanced supply of macro and
91 micronutrients^{10,11}.

92 Besides being a determinant factor in productivity, the mineral nutrients influence the
93 production of secondary metabolites, source of antioxidants, abundant in medicinal plants.
94 Natural antioxidants have received great attention, as they are effective free radical
95 scavengers and are less toxic than synthetic antioxidants¹².

96 There are several tests for evaluating the antioxidant potential of plant extracts. The
97 majority of the experiments for testing antioxidant activity *in vitro* are defined as inhibition
98 methods involving free radicals¹³. The purpose of this study was to investigate the effects of
99 different management strategies on *B. pilosa* primary and secondary metabolism and the
100 antioxidant activity of the plant.

101 MATERIALS AND METHODS

102 **Plant material and growth conditions.** Seeds of *B. pilosa* were collected in Afonso
103 Claudio (Espírito Santo - Brazil), a voucher specimen was identified by the VIES herbarium
104 of the Universidade Federal do Espírito Santo (VIES 41242), and germinated in pots
105 containing organic soil (pH 6.4) in a greenhouse located in Cariacica (Espírito Santo - Brazil).
106 Pots were brought to field capacity and regularly watered by weight, with no drainage from
107 the pots. The treatments carried out were: control (organic soil), fertilizer (N-P-K 4:14:8 at 0.3
108 g.Kg⁻¹ soil) and organic (cattle manure at 125 g.Kg⁻¹ soil). The experimental design was
109 completely randomized with 20 replicates per treatment. At 120 days after planting, in 10
110 replications per treatment irrigation was suspended until the water potential reached -4 MPa.
111 Therefore, six treatments were established: irrigated control (IC), dry control (DC), irrigated
112 fertilizer (IF), dry fertilizer (DF), irrigated organic (IO) and dry organic (DO).

113 At 130 days after planting, in the pre-flowering stage, gas exchange measurements
114 were performed. The plants were collected for growth measures and to prepare the
115 hydroalcoholic extract. The potting soil for each treatment was collected, and also the leaves,
116 for chemical analysis of nutrients.

117 **Determination of total dry mass.** The total dry mass (TDM) of plant material was
118 measured after drying in an oven at 45°C, until a constant weight was obtained.

119 **Gas Exchange Parameters.** Net photosynthesis (A , expressed in $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$),
120 stomatal conductance (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiration (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), and
121 internal concentration of carbon (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) were determined using a closed infra-
122 red gas analyzer, LICOR 6400 Portable Photosynthesis System (IRGA, Licor Inc., USA).
123 Measurement was performed within the time period 08:00h-11:00h, using fully expanded
124 young leaves, maintaining the air temperature at 27 °C, CO₂ concentration at 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$
125 and photosynthetic photon flux density (PPFD) at 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Moreover, instantaneous

126 water use efficiency (A/E , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) was calculated from the gas exchange
127 measurements^{14,15}.

128 **Hydroalcoholic extract.** The dry aerial parts of ten plants of *B. pilosa*, from each
129 treatment, were powdered and macerated with aqueous ethanol 70% at a ratio of 5:1 (v/w) by
130 72 h, at room temperature. The process was repeated twice to extract the maximum
131 constituents. The resulting solutions were then filtered with filter paper to remove the
132 particles and concentrated using a vacuum evaporator TE-210 (TECNAL, Brazil) to obtain
133 the hydroalcoholic extracts of the *B. pilosa* (HEB) for each of six growth treatments.

134 **Total phenolic content (TPC).** Total phenolic content (TPC) was measured according
135 to the Folin-Ciocalteu method¹⁶. Ethanol solution of HEB at $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($20 \mu\text{L}$) was added
136 to $100 \mu\text{L}$ of Folin-Ciocalteu reagent diluted in distilled water (1:10) (v:v). After 5 min, 80
137 μL of Na_2CO_3 (7.5%) was added and the plate kept in the dark at room temperature for 2 h.
138 The absorbance was measured at 750 nm with a spectrophotometric microplate reader (Epoch
139 Microplate Spectrophotometer – BioTek). Concentrations of gallic acid were 12.5, 25, 50,
140 100, 250, 500 and $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ethanol was used as the blank. TPC was expressed as gallic
141 acid equivalent per gram of dry weight ($\text{mg GAE.g}^{-1} \text{ d.w.}$), compared with a calibration curve
142 of gallic acid $y = 0.0054x + 0.1122$ $R^2 = 0.9992$. For each sample, three replications were
143 performed.

144 **Total tannin content (TTC).** Total tannin content (TTC) was determined according to
145 Folin-Denis method¹⁷ with a few modifications. Ethanol solution of HEB $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$
146 ($500\mu\text{L}$) was added to $500 \mu\text{L}$ of Folin-Denis reagent. After 3 min, $500 \mu\text{L}$ of Na_2CO_3
147 solution (8%) was added, mixed and incubated for 2 h. The mixture was then centrifuged at
148 2000 rpm for 5 min and the absorbance measured at 725 nm. Tannic acid (12.5, 25, 50, 100,
149 500 and $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) was used to calculate the standard $y = 0.0067x + 0.2727$ $R^2 = 0.9721$

150 and the results were expressed as tannic acid equivalents per gram of dry weight (mg TA.g⁻¹
151 d.w.). Ethanol was used as a blank. For each sample, three replications were performed.

152 **Total flavonoid content (TFC).** Total flavonoid content (TFC) was quantified using
153 the colorimetric method with aluminum chloride¹⁸. In sealed tubes, 1500 µL of a 2%
154 methanol solution of AlCl₃·6H₂O was added to 500 µL of methanol solution of HEB 500
155 µg.mL⁻¹ and then kept in the dark for 10 min at room temperature. Concentrations of
156 quercetin used to establish the standard curve of flavonoids were 7.8, 15.62, 31.25, 62.5, 125,
157 250 and 500 µg.mL⁻¹. Absorbance was read at 430 nm. Methanolic AlCl₃ was used as the
158 blank and each measurement was performed in triplicate. TFC in extract was expressed as
159 quercetin equivalent per gram of dry weight (mg QE.g⁻¹ DW), compared with a calibration
160 curve of quercetin $y = 0.0189x + 0.1364$ $R^2 = 0.9966$.

161 **Free radical scavenging activity using the DPPH assay.** In order to measure the
162 radical scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)¹⁹, HEB samples and
163 standard (ascorbic acid) were diluted in methanol (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000
164 µg.mL⁻¹). Methanolic DPPH solution (0.3 mM, 200 µL) was added to 100 µL of the test
165 solution. After 30 min at room temperature in the dark, the absorbance was measured at 517
166 nm using a spectrophotometric microplate reader. A decrease in the absorbance indicates an
167 increase in the scavenging activity. The test was conducted in triplicate and the percentage
168 inhibition of DPPH was calculated as follows: % inhibition of DPPH = $[(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0]$
169 $\times 100$, where Abs_0 = absorbance of control and Abs_1 = absorbance of the sample. Methanol
170 was used as the blank and DPPH solution plus methanol was used as the negative control.
171 Results were expressed as the EC₅₀ value (µg.mL⁻¹), that is the effective concentration of
172 antioxidant agent required to scavenge 50% of DPPH.

173 **Free radical scavenging activity using the ABTS assay.** The ABTS [2,2'-azino-
174 bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] assay²⁰ was performed using a

175 solution prepared by mixing 5 mL of ABTS⁺ (7 mM) with 88 μ L of potassium persulfate (2.5
176 mM). The solution was incubated before use in the dark at room temperature for 16 h. The
177 solution was then diluted with ethanol to absorbance value of 0.700 (\pm 0.05) at 734 nm.
178 ABTS⁺ solution (200 μ L) was mixed with 40 μ L of the test solutions: HEB samples and
179 standard (Trolox) at concentrations of 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 μ g.mL⁻¹.
180 The decrease in absorbance was measured at 734 nm after incubation for 6 min. The test was
181 conducted in triplicate and the scavenging activity was determined using the following
182 formula: % scavenging of ABTS⁺ = [(Abs₀ – Abs₁) / Abs₀] \times 100, where Abs₀ = absorbance
183 of control and Abs₁ = absorbance of the sample. Ethanol was used as the blank and ABTS-
184 potassium persulfate solution plus ethanol was used as the negative control. Results were
185 expressed as the EC₅₀ value (μ g.mL⁻¹).

186 **Chelating activity with Fe²⁺ ions.** The chelating activity²¹ of HEB with ferrous ions
187 was measured using 1 mL of HEB methanolic solution (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and
188 1000 μ g.mL⁻¹) added to 50 μ L of FeCl₂ solution (2 mM) and 200 μ L of ferrozine (5 mM), and
189 incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was recorded at 562 nm in
190 microplate reader. Chelating activity was calculated as follows: chelating activity (%) =
191 [(Abs₀ – Abs₁) / Abs₀] \times 100, where Abs₀ is the absorbance of the ferrozine-Fe²⁺ complex and
192 Abs₁ is the absorbance of the sample. Results were expressed as the EC₅₀ value (μ g.mL⁻¹).
193 EDTA was used as the positive control. The assay was carried out in triplicate.

194 **Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP).** The total antioxidant power of
195 the extracts were determined using the FRAP method²². The FRAP reagent was prepared
196 immediately prior to use, using 25 mL of 0.3 M acetate buffer, 2.5 mL of 10 mM 2,4,6-Tri(2-
197 pyridyl)-s-triazine (TPTZ) and 2.5 mL of 20 mM ferric chloride. 30 μ L of HEB ethanolic
198 solution (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 μ g.mL⁻¹) plus 90 μ L of distilled water
199 were incubated with 900 μ L of the FRAP reagent for 30 min at 37 °C in the dark. The

200 absorbance of the ferrous-TPTZ complex was recorded at 595 nm. The standard curve was
201 constructed using FeSO₄ at concentrations of 250, 500, 1000, 1.500 and 2000 µM. Results
202 were expressed as the EC₅₀ value (µg.mL⁻¹). Each assay was carried out in triplicate.

203 **Statistical analysis.** The data were expressed as mean ± standard error (SE).
204 Statistical analysis was performed using ASSISTAT version 7.7 beta software (Assistat
205 Software, Campina Grande, Paraíba, Brasil.) Data were subjected to one-way analysis of
206 variance and means were compared using Tukey's test at 5% of probability. The Pearson
207 linear correlation coefficient and Principal Component Analysis (PCA) were performed
208 employing XLSTAT for Windows (Addinsoft, New York, USA), using all the six treatments
209 IC, DC, IF, DF, IO and DO.

210 **RESULTS AND DISCUSSION**

211 **Effects of water deficit.** Table 1 presents the chemical characteristics of the soil pots
212 for the different the treatments. Considering the base saturation percentages shown, all of
213 them up to 50%, the soils from the three treatments can be classified as eutrophic²³.

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

Table 1. Chemical characteristics of control, organic and fertilizer soil pots.

Attributes	Control	Organic	Fertilizer
Phosphorus ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.110	0.1310	0.098
Potassium ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.270	0.390	0.410
Sulfur ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0,012	0.013	0.019
Calcium ⁽³⁾ (g.kg ⁻¹)	2.457	2.652	2.262
Magnesium ⁽³⁾ (g.kg ⁻¹)	0.390	0.897	0.468
Organic matter ⁽⁴⁾ (dag.kg ⁻¹)	3.10	4.30	2.90
Iron ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.160	0.118	0.163
Zinc ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.125	0.106	0.105
Copper ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.0021	0.0007	0.0015
Manganese ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.124	0.157	0.143
Boron ⁽⁵⁾ (g.kg ⁻¹)	0.00076	0.00059	0.00067
Sodium ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.140	0.170	0.160
Base Saturation (%)	89.60	90.80	89.70
pH (H ₂ O)	8.00	7.90	7.90

⁽¹⁾Extracted with HCl 0.05 mol.L⁻¹ and H₂SO₄ 0.025 mol.L⁻¹,
⁽²⁾extracted with Ca(H₂PO₄)₂ 0.01 mol.L⁻¹, ⁽³⁾extracted with KCl 1mol.L⁻¹, ⁽⁴⁾Oxidation with: Na₂Cr₂O₇2H₂O 4 mol.L⁻¹ and H₂SO₄ 10 mol.L⁻¹, ⁽⁵⁾extraction with BaCl₂ 2H₂O 0.125%.

For nutrients to be available in the soil it is necessary to have water for the mineralization of macro- and micro-nutrients and organic matter²³. Water deficit directly affects soil nutrient absorption, as shown in Table 2. Comparing the chemical analysis of the leaves for each treatment, nutrient absorption was lower in the non-irrigated plants than in the irrigated plants.

261

Table 2. Chemical analysis of *Bidens pilosa* leaves from different treatments.

	IC	DC	IO	DO	IF	DF
Nitrogen ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	30.10	21.00	29.12	29.19	22.05	18.41
Phosphorus ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	6.00	5.12	5.46	3.79	6.96	5.63
Potassium ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	43.75	26.88	37.50	23.75	34.38	31.25
Calcium ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	29.64	19.65	16.22	25.83	28.39	20.28
Magnesium ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	6.88	5.31	3.75	6.50	7.19	4.06
Sulfur ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	4.87	2.68	4.50	2.12	6.01	4.13
Iron ² (g.kg ⁻¹)	0,89	0,61	0,99	0,54	0,91	0,71
Zinc ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0,52	0,54	0,60	0,41	0,12	0,40
Copper ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0,25	0,20	0,23	0,15	0,25	0,18
Manganese ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0,67	0,43	0,55	0,46	0,77	0,42
Boro ⁽³⁾ (g.kg ⁻¹)	0,85	0,80	0,82	0,90	0,10	0,90

262

Irrigated Control (IC), Dry Control (DC), Irrigated Organic (IO), Dry Organic (DO),

263

Irrigated Fertilizer (IF), Dry Fertilizer (DF).

264

⁽¹⁾ Hot acid digestion, ⁽²⁾ Nitro-perchloric digestion, ⁽³⁾ Dry digestion

265

266

The leaf gas exchange in *B. pilosa* plants shows differences between the treatments

267

(Table 3). Plants grown under IO conditions showed high values for net photosynthesis (*A*),

268

stomatal conductance (g_s) and transpiration (*E*). *E* and *A* are entirely related to g_s , as g_s

269

reflects the inflow and outflow of water and CO₂ from stomates⁸.

270

IO treatment showed an increase in g_s of up to 57% compared to the other treatments,

271

and the reduction in g_s values with all other treatments was accompanied by a decrease in *E*.

272

The relationship between g_s and *E* has been described previously for *B. pilosa*²⁴. However, the

273

increase in g_s observed with organic cultivation may be related to the known effect of bovine

274

manure on transpiration, as this fertilizer stimulates the action of proteins and organic solutes

275

in stomatal opening²⁵.

276 **Table 3.** Effects of different growth conditions on Total Dry Mass, Net photosynthesis, Stomatal
 277 conductance, Transpiration, Intercellular CO₂ and Instantaneous water use efficiency of *Bidens pilosa*

	IC	DC	IO	DO	IF	DF
TDM (g)	3.67 ± 0.57 ^b	1.76 ± 0.25 ^b	10.34 ± 2.09 ^a	5.78 ± 1.03 ^b	2.03 ± 0.24 ^b	3.75 ± 0.71 ^b
A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	8.54 ± 0.50 ^b	9.38 ± 0.37 ^{ab}	10.56 ± 0.25 ^a	6.25 ± 0.46 ^c	10.74 ± 0.2 ^a	9.51 ± 0.16 ^{ab}
<i>g_s</i> (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0.27 ± 0.04 ^{abc}	0.28 ± 0.04 ^{ab}	0.33 ± 0.05 ^a	0.14 ± 0.02 ^c	0.25 ± 0.02 ^{abc}	0.19 ± 0.01 ^{bc}
<i>E</i> (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	2.30 ± 0.18 ^{ab}	2.67 ± 0.17 ^{ab}	2.84 ± 0.16 ^a	1.66 ± 0.17 ^c	2.74 ± 0.07 ^{ab}	2.18 ± 0.06 ^{bc}
<i>C_i</i> (μmol CO ₂ mol ⁻¹)	306.36 ± 5.33 ^a	317.54 ± 4.11 ^a	309.00 ± 5.44 ^a	298.21 ± 6.10 ^a	309.11 ± 3.31 ^a	300.54 ± 2.06 ^a
<i>A/E</i> [μmol CO ₂ (mmol H ₂ O) ⁻¹]	4.18 ± 0.18 ^a	3.81 ± 0.19 ^a	4.03 ± 0.17 ^a	4.46 ± 0.28 ^a	4.01 ± 0.12 ^a	4.46 ± 0.09 ^a

278 Total dry mass (TDM), Net photosynthesis (*A*), Stomatal conductance (*g_s*), Intercellular CO₂ (*C_i*), Transpiration (*E*), Instantaneous water use
 279 efficiency (*A/E*).

280 Irrigated Control (IC), Dry Control (DC), Irrigated Fertilizer (IF), Dry Fertilizer (DF), Irrigated Organic (IO), Dry Organic (DO).

281 All the values shown are mean ± SE (triplicate); SE: standard error;

282 Different letters in the same line indicate statistically significant differences using ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$).

283

284 *C_i* is a physiological characteristic dependent on edaphic conditions, availability of
 285 water and light, although the CO₂ concentration in the mesophyll is characteristic of each
 286 species²⁶. In the current study, the different growth conditions to which *B. pilosa* was
 287 subjected did not significantly affect the concentrations of *C_i*.

288 The *A/E* ratio refers to the efficiency of *E*, that is the amount of water transpired for
 289 CO₂ fixation; the increase in *A* implies water loss by *E*²⁴. There was no statistical difference
 290 between the treatments in the *A/E* ratio.

291 There were no differences between *C_i* and *A/E* in the treatments. In addition,
 292 treatments without irrigation did not always present the lowest values of *E* and *g_s*,
 293 demonstrating that absence of irrigation had few effects on gas exchange parameters.

294 **Phenolic compounds and biomass relations.** The analysis of phenolic compound
 295 content showed no differences in TPC values between treatments (Table 4). However, in the
 296 control treatment, both the tannin content and the flavonoid content were higher with irrigated
 297 conditions than with dry conditions. For the growth in organic conditions, there was no
 298 difference in tannin content, when considering the irrigation conditions. Though, the
 299 flavonoid content was lower with irrigated condition than with water-deficient condition. The

300 treatment with NPK fertilizer resulted in higher tannin content with irrigated condition,
301 although no significant differences in the flavonoid content. The IC treatment presented the
302 highest levels of TTC and TFC.

303

304 **Table 4.** Content of phenolic compounds in *Bidens pilosa* under different growth conditions.

	IC	DC	IO	DO	IF	DF
TPC (mg GAE.g ⁻¹ d.w.)	52.64 ± 5.08 ^a	47.95 ± 2.55 ^a	55.11 ± 2.99 ^a	51.96 ± 0.26 ^a	59.43 ± 3.55 ^a	37.83 ± 1.62 ^a
TTC (mg TA.g ⁻¹ d.w.)	63.37 ± 1.72 ^a	27.05 ± 1.00 ^d	36.96 ± 0.95 ^c	40.09 ± 1.13 ^c	49.64 ± 1.58 ^b	22.48 ± 1.05 ^d
TFC (mg QE.g ⁻¹ d.w.)	24.86 ± 0.20 ^a	19.04 ± 0.87 ^{bc}	13.36 ± 0.67 ^d	21.65 ± 0.58 ^b	17.77 ± 0.73 ^c	19.01 ± 0.49 ^{bc}

305

Total phenolic content (TPC), Total tannin content (TTC), Total flavonoid content (TFC).

306

Irrigated Control (IC), Dry Control (DC), Irrigated Fertilizer (IF), Dry Fertilizer (DF), Irrigated Organic (IO), Dry Organic (DO).

307

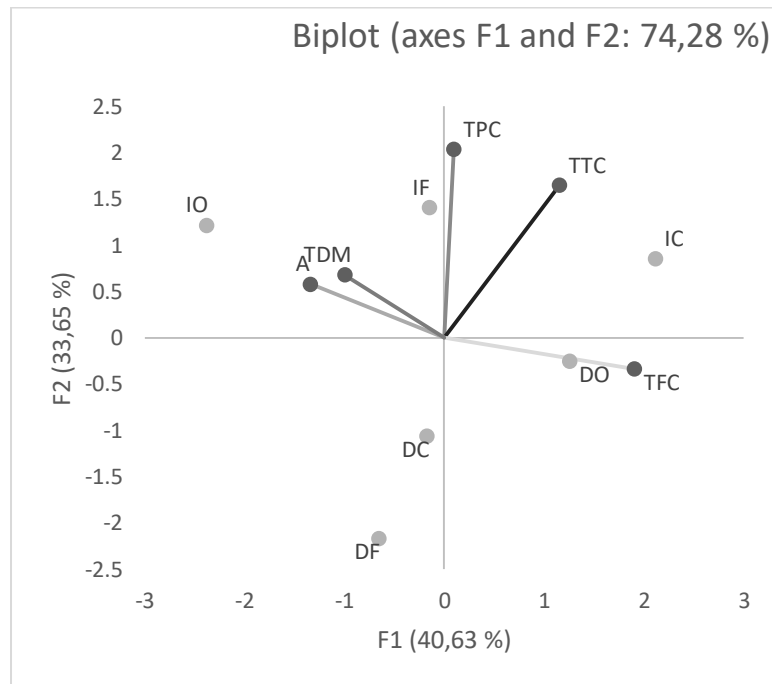
All the values are expressed as mean ± SE (triplicate); SE: standard error. Different letters in the same row indicate statistically significant differences, using ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$)

308 *B. pilosa* presented high averages of TDM and gas exchange parameters (Table 3) with
309 the IO treatment. Under these conditions there was good availability of nutrients in the soil
310 (Table 1), as well as good absorption of the nutrients by the leaves (Table 2). However, the IC
311 growth conditions, with lower mean values in the parameters of gas exchange and TDM than
312 IO, presented the highest TTC and TFC values (Table 4). A similar result was reported with
313 *Orthosiphon stamineus* and *Labisia pumila*; the production of secondary metabolites was up-
314 regulated when photosynthesis decreased^{27,28}. This was probably a result of the low net
315 photosynthetic activity leading to up-regulation of shikimic acid in the pentose phosphate
316 pathway. Previous studies^{27,28} already described that plants under low light levels had reduced
317 net photosynthesis due to accumulation of non-structural carbohydrate in the leaves, that is
318 usually related to an impairment of net photosynthesis and to up-regulation of secondary
319 metabolite production.

320 The results of the current study indicate that *B. pilosa* does not present over
321 accumulation of phenolic compounds as a way to enhance tolerance to drought stress.
322 Analysis of phenolic compound content in *Solanum lycopersicum*²⁹ also found a little or no
323 change in flavonoid concentration in the tomato fruits as a result of water stress. Some
324 cultivars of *Solanum tuberosum* showed a drastic reduction in polyphenols under drought
325 conditions, demonstrated by highly cultivar-dependent variations³⁰. This reinforces the view
326 that the water status of the plant does not always affect the process of stress-related
327 accumulation of phenolic compounds in plants.

328 An evaluation of these data was carried out using PCA to investigate similarities and
329 differences between the treatments, TDM, A and phenolics content to identify the factors
330 influencing each one, as shown in Figure 1.

331



332

333

334

335

Figure 1. Principal component analysis (PCA), biplot, scores and loading plots. Based on different phenolic compounds analyzed in HEB, TDM (Total Dry Mass) and A (Net photosynthesis).

336

337

338

339

340

341

The PCA (Figure 1) showed that the first component accounted for 40.63% of the total variance (74.28), while the second component accounted for 33.65%. The PCA plots indicated that PC1 was dominated by the following variables: A, TDM and TFC; while PC2 was dominated by TPC and TTC. These results indicate that TPC and TTC and the IC treatment are strongly correlated with each other. On the other hand, A and TDM are correlated with the IO treatment.

342

343

344

345

Many theories exist concerning the differences observed in plant secondary metabolism due to abiotic or biotic factors. The resource availability hypothesis³¹ presupposes that slower-growing plants in nutrient-limited environments will invest in greater defenses (secondary metabolites) to minimize tissue loss due to herbivory. This hypothesis suggests

346 that level of defense investment increases as potential growth rates become more limited by
347 resource availability, since this increases the relative value of limited resources.

348 The results for *B. pilosa* under the conditions tested in this study corroborate the
349 resource availability hypothesis: the IC treatment generated plants with low TDM and the
350 highest levels of the secondary metabolites analyzed, while IO treatment resulted in the
351 highest TDM content and low content of phenolic compounds.

352 **Antioxidant activity.** The results for the HEB from different growth condition in the
353 ABTS, DPPH, chelating activity and FRAP assays are shown as EC_{50} values ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in
354 Table 5. A lower EC_{50} value indicates a higher ability of the extract to act as a scavenger,
355 while higher EC_{50} value indicates lower ability of the extract to achieve 50% scavenging
356 activity.

357 The mechanisms involved in the ABTS and DPPH methods are similar and based on
358 changes in the absorption spectra of the free radical because of the reduction. ABTS is
359 applicable to hydrophilic and lipophilic antioxidant systems, whereas DPPH works better in
360 hydrophobic systems³². Furthermore, it should be considered that steric effects might play a
361 fundamental role in the reaction with DPPH. For an efficient radical quenching reaction, the
362 phenolic OH group has to approach the nitrogen centred radical of DPPH. Thus, in the case of
363 large ortho alkyl groups, the energy barrier increase due to steric encumbrance
364 counterbalances the positive electron-releasing radical-stabilizing effect³³. For the ABTS
365 assay, the scavenging activity of IC was significantly higher among the treatments. The IC
366 treatment also showed stronger radical scavenging activity in the DPPH assay (Table 5).

367 The FRAP test is an antioxidant capacity assay that is based on the ability of the
368 antioxidant to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} in TPTZ solvent, forming an intense blue Fe^{2+} -TPTZ

369 complex²². The reducing power obtained with samples from IC and IF treatments were higher
370 than with others treatments.

371 These results are related to the high TFC and TTC values found in HEB from IC
372 conditions being indicative that phenolic compounds and tannins greatly contributed to their
373 antioxidant activity.

374 Chelating activity has been used to determine the ability of components in plant
375 extracts to sequester the free metal ions, which are important catalysts for the generation of
376 highly reactive hydroxyl radicals via the Fenton reaction in both *in vivo* and *in vitro*
377 systems^{34,35}. Flavonoid hydroxyl groups may capture metal ions and this ability depends on
378 the availability and orientation of functional groups³⁴.

379 The analysis of chelating activity of HEB reveals that leaves from the DC treatment
380 had the higher antioxidant activity, following by IC (Table 5). The specificity of the different
381 flavonoids in terms of their chelating activity is reflected in the diverse results of this assay,
382 since each treatment may have stimulated the production of flavonoids with different
383 chemicals structures, in addition to the significant variations in TFC (Table 4).

384

385

386

387

388

389

390

391

392 **Table 5.** Antioxidant activities of *Bidens pilosa* under different growth conditions.

	IC	DC	IO	DO	IF	DF	Trolox	AA	EDTA	FeSO ₄
ABTS										
EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	352.40 ± 16.84 ^c	400.54 ± 13.05 ^{bc}	458.04 ± 1.93 ^b	464.06 ± 21.14 ^b	565.14 ± 16.16 ^a	428.90 ± 17.49 ^b	99.99 ± 0.25 ^d			
DPPH										
EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	222.57 ± 2.83 ^d	415.43 ± 12.11 ^b	598.71 ± 6.43 ^a	339.32 ± 21.33 ^c	388.19 ± 8.15 ^{bc}	392.07 ± 6.01 ^b		16.46 ± 1.11 ^e		
Chelating activity										
EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	501.79 ± 2.40 ^d	226.12 ± 0.29 ^e	778.07 ± 3.52 ^c	942.47 ± 2.60 ^b	1248.96 ± 27.96 ^a	748.62 ± 6.88 ^c			19.71 ± 0.32 ^f	
FRAP										
EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	1419.63 ± 42.36 ^c	1952.18 ± 22.84 ^{ab}	2258.12 ± 70.92 ^a	1900.33 ± 138.62 ^b	1550.17 ± 23.17 ^c	2156.01 ± 39.85 ^{ab}				391.76 ± 4.22 ^d

393 Irrigated Control (IC), Dry Control (DC), Irrigated Fertilizer (IF), Dry Fertilizer (DF), Irrigated Organic (IO), Dry Organic (DO).

394 All the values are shown as mean ± SE (triplicate); SE: standard error.

395 Different letters in the same line indicate statistically significant differences, using ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$)

396

397

398

Explorative analyses. The total contents of phenolic compounds, tannins and

399

flavonoids were not significantly correlated with nutrients, except for a positive correlation

400

between Mn in leaves and TTC (Table 6).

401

Table 6. Pearson correlation analysis between phenolic compound content and leaf nutrients

	TPC	TTC	TFC	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Cu	Mn	B
TPC	1													
TTC	0.680	1												
TFC	-0.149	0.492	1											
N	0.551	0.647	0.217	1										
P	0.278	0.362	-0.158	-0.318	1									
K	0.299	0.661	0.081	0.361	0.661	1								
Ca	0.389	0.791	0.745	0.243	0.268	0.243	1							
Mg	0.549	0.740	0.646	0.249	0.183	0.071	0.940	1						
S	0.394	0.491	-0.192	-0.079	0.943	0.760	0.307	0.177	1					
Fe	0.505	0.493	-0.375	0.261	0.742	0.867	0.026	-0.065	0.867	1				
Zn	0.687	0.366	-0.303	-0.185	0.743	0.228	0.358	0.456	0.720	0.520	1			
Cu	0.569	0.629	-0.112	0.151	0.851	0.846	0.267	0.244	0.850	0.879	0.644	1		
Mn	0.764	0.817	0.069	0.254	0.754	0.653	0.645	0.624	0.835	0.722	0.810	0.833	1	
B	0.332	0.265	0.004	-0.274	0.488	-0.032	0.573	0.531	0.540	0.155	0.737	0.172	0.597	1

402

403

404

405

Total phenolic content (TPC), Total tannin content (TTC), Total flavonoid content (TFC), Nitrogen (N), Phosphorus (P), Potassium (K), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Sulfur (S), Iron (Fe), Zinc (Zn), Copper (Cu), Manganese (Mn), Boron (B). Values represent Pearson's coefficient of correlation ($p \leq 0.05$ considered significant, shown in bold).

406 The protein competition hypothesis³⁶ postulates concurrence in the metabolic
407 pathways of plants for the production of photosynthetic vs. defense compounds. The synthesis
408 of proteins and phenylpropanoids, precursors of phenolic compounds, competes for a common
409 and limited resource, phenylalanine, which is a branch point at the end of the shikimic acid
410 pathway located between primary and secondary metabolism. Therefore, the growth-defense
411 trade-off depends not only on competition for available carbohydrates, but also on
412 competition for phenylalanine³⁷.

413 Manganese exerts a primary role in the activation of several enzymes involved in the
414 tricarboxylic acid cycle, in the shikimic acid pathway and in the biosynthetic pathway of
415 isoprenoids³⁸. Conditions of high soil organic matter content determine lower concentrations
416 of Mn in the plant³⁹. Results presented in Table 1 and Table 2 indicate that organic
417 cultivation, with cattle manure, leads to a higher concentration of organic matter in the soil, as
418 well as a lower concentration of Mn in the leaves. On the other hand, a lower amount of
419 organic matter in the soil and higher concentrations of Mn in the leaves were reported with the
420 irrigated treatments IC and IF. These results, associated with the positive correlation between
421 Mn in leaves and TTC, confirm the previously mentioned protein competition theory (Table
422 6).

423 Correlations between TPC, TTC, TFC and antioxidant activity assays are presented in
424 Table 7.

425

426

427

428

429 **Table 7.** Pearson correlation analysis between phenolic compound content and antioxidant activities

	ABTS	DPPH	Ch	FRAP	TPC	TTC	TFC
ABTS	1						
DPPH	0.362	1					
Ch	0.871	0.109	1				
FRAP	0.006	0.783	-0.128	1			
TPC	0.482	0.092	0.437	-0.477	1		
TTC	-0.035	-0.539	0.217	-0.843	0.680	1	
TFC	-0.517	-0.974	-0.253	-0.685	-0.149	0.492	1

430 Total phenolic content (TPC), Total tannin content (TTC), Total flavonoid content (TFC);
 431 Values represent Pearson's coefficient of correlation ($p \leq 0.05$ considered significant, shown in bold).
 432

433 Plant polyphenols can act as reducing agents, hydrogen donating antioxidants, singlet
 434 oxygen quenchers and, in some cases, metal chelators⁴⁰. For that reason, plant antioxidant
 435 properties have been attributed to their polyphenol constituents^{41,42}. The significant
 436 correlations demonstrated between TFC with DPPH and TTC with FRAP are consistent with
 437 the antioxidant action of these phenolic compounds, found in high amounts in plants grown in
 438 IC conditions.

439 Therefore, primary and secondary metabolite profiles of *B. pilosa* can be improved
 440 through the selection of appropriate management practices, with the purpose of increasing the
 441 biomass or the content of phenolic compounds and, consequently, their antioxidant activity.

442 The present study demonstrates a workable system for obtaining consistent and high
 443 levels of phenolics in leaves of *B. pilosa* for phytopharmaceutical use. We have shown that
 444 extracts from irrigated control plants, not only produce higher yields of polyphenolics, but
 445 also possess higher antioxidant capacity, as compared with the other growth conditions. It is
 446 necessary to emphasize the native condition of the seeds used for this study. These seeds were
 447 collected from specimens found in a natural environment, without any management and
 448 exposed to adversities to which a herbaceous plant must be resistant in order to survive. The

449 native condition of the seeds may have considerable significance for quality control that is
 450 needed for the preparation of other herbal medicines sold as herbal supplements. Genetic
 451 improvement and development of *Bidens pilosa* cultivars may be the target of future studies.

452 **ACKNOWLEDGMENT**

453 The authors thank Jean Vencioneck Dutra for proof reading the manuscript and
 454 Leonardo Valandro Zanetti by supporting the gas exchange measures.

455 **SUPPORTING INFORMATION DESCRIPTION**

456 This work is an integral part of the project Phytochemical, mutagenic and
 457 antimutagenic prospection of *Bidens pilosa* and *Tithonia diversifolia*, financed by FAPES,
 458 EDITAL FAPES N° 007/2014, UNIVERSAL N° 0422/2015.

459

460 **REFERENCES**

- 461 (1) F. Deba, T. Xuan, M. Yasuda, S. T. Chemical Composition and Antioxidant, Antibacterial and
 462 Antifungal Activities of Essential Oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food Control*
 463 **2008**, *19* (4), 364–352.
- 464 (2) Dimo, T.; Rakotonirina, S. V; Tan, P. V; Azay, J.; Dongo, E.; Cros, G. Leaf Methanol Extract
 465 of *Bidens pilosa* Prevents and Attenuates the Hypertension Induced by High-Fructose Diet in
 466 Wistar Rats. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *83* (3), 183–191.
- 467 (3) Kirakosyan, A.; Seymour, E.; Kaufman, P. B.; Warber, S.; Bolling, S.; Chang, S. C.
 468 Antioxidant Capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and
 469 *Crataegus monogyna* (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress. *J. Agric. Food Chem.*
 470 **2003**, *51* (14), 3973–3976.
- 471 (4) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed.; Oxford
 472 University Press: Oxford, **2007**.
- 473 (5) Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Medicinal Plants: Factors of Influence on the Content of
 474 Secondary Metabolites. *Quim. Nova* **2007**, *30* (2), 374–381.
- 475 (6) Cortés-Rojas, D. F.; Chagas-Paula, D. A.; Da Costa, F. B.; Souza, C. R. F.; Oliveira, W. P.
 476 Bioactive Compounds in *Bidens pilosa* L. Populations: A Key Step in the Standardization of
 477 Phytopharmaceutical Preparations. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2013**, *23* (1), 28–35.
- 478 (7) Geuns, J. M. C. Stevioside. *Phytochemistry* **2003**, *64* (5), 913–921.
- 479 (8) Lunt, G. G. Fisiologia Vegetal. *Biochem. Educ.* **1976**, *4* (3), 59–60.

- 480 (9) Clarkson, D. T.; Hanson, J. B. The Mineral Nutrition of Higher Plants. *Annu. Rev. Plant*
481 *Physiol.* **1980**, *31* (1), 239–298.
- 482 (10) Rodrigues, A. C.; Cavalcante, L. F.; Oliveira, A. P. de; Sousa, J. T. de; Mesquita, F. O.
483 Produção e Nutrição Mineral Do Maracujazeiro-Amarelo Em Solo Com Biofertilizante
484 Supermagro e Potássio. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* **2009**, *13* (2), 117–124.
- 485 (11) Patil, N. M. Biofertilizer Effect on Growth, Protein and Carbohydrate Content in Stevia
486 Rebaudiana Bertoni. *Recent Res. Sci. Technol.* **2010**, *2* (10), 42–44.
- 487 (12) Hook, F. Intra-Specific Genetic Diversity , Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities
488 of a Potential *Himalayan swertia* (*Swertia bimaculata* Hook). *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 341–
489 347.
- 490 (13) Choi, C. W.; Kim, S. C.; Hwang, S. S.; Choi, B. K.; Ahn, H. J.; Lee, M. Y.; Park, S. H.; Kim,
491 S. K. Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Capacity between Korean Medicinal
492 Plants and Flavonoids by Assay-Guided Comparison. *Plant Sci.* **2002**, *163* (6), 1161–1168.
- 493 (14) Polley, H. W. Implications of Atmospheric and Climatic Change for Crop Yield and Water Use
494 Efficiency. *Crop Sci.* **2002**, *42* (1), 131–140.
- 495 (15) Thameur, A.; Lachiheb, B.; Ferchichi, A. Drought Effect on Growth, Gas Exchange and Yield,
496 in Two Strains of Local Barley Ardhaoui, under Water Deficit Conditions in Southern Tunisia.
497 *J. Environ. Manage.* **2012**, *113*, 495–500.
- 498 (16) Zhang, Q.; Zhang, J.; Shen, J.; Silva, A.; Dennis, D. A.; Barrow, C. J. A Simple 96-Well
499 Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. *J. Appl. Phycol.*
500 **2006**, *18* (3–5), 445–450.
- 501 (17) Pansera, M. R.; Santos, A. C. a.; Paese, K.; Wasum, R.; Rossato, M.; Rota, L. D.; Pauletti, G.
502 F.; Serafini, L. a. Análise de Taninos Totais Em Plantas Aromáticas e Medicinais Cultivadas
503 No Nordeste Do Rio Grande Do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2003**, *13* (6), 17–22.
- 504 (18) Mraihi, F.; Journi, M.; Chérif, J. K.; Sokmen, M.; Sokmen, A.; Trabelsi-Ayadi, M. Phenolic
505 Contents and Antioxidant Potential of Crataegus Fruits Grown in Tunisia as Determined by
506 DPPH, FRAP, and β -Carotene/Linoleic Acid Assay. *J. Chem.* **2013**, *2013*.
- 507 (19) Duarte-Almeida, J. M.; Santos, R. J. dos; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Avaliação Da
508 Atividade Antioxidante Utilizando Sistema Beta-Caroteno/Ácido Linoléico e Método de
509 Seqüestro de Radicais DPPH. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2006**, *26* (2), 446–452.
- 510 (20) Rufino, M.; Alves, R. E.; de Brito, E. S.; de Moraes, S. M.; Sampaio, C. de G.; Pérez-Jimenez,
511 J.; Saura-Calixto, F. D. Metodologia Científica: Determinação Da Atividade Antioxidante Total
512 Em Frutas Pela Captura Do Radical Livre ABTS^{o+}. Embrapa Agroindústria Trop. *Comun.*
513 *Técnico.* **2007**.
- 514 (21) Jayakumar, K.; Vg, M. K.; Murugan, K. Evaluation of Antioxidant and Antihemolytic
515 Activities of Purified Caulophyllumine-A from Solanum. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2016**, *5*
516 (2), 195–199.
- 517 (22) Rufino, M. D. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S. De; Moraes, S. M. De; Sampaio, C. D. G.; Pérez-
518 Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. Metodologia Científica: Determinação Da Atividade
519 Antioxidante Total Em Frutas Pelo Método de Redução Do Ferro (FRAP). Embrapa
520 Agroindústria Trop. *Comun. Técnico.* **2006**, *125*, 1–4.
- 521 (23) Ronquim, C. C. Conceitos de Fertilidade Do Solo e Manejo Adequado Para as Regioes

- 522 Tropicais. *Embrapa Monit. por Satélite. Bol. Pesqui. e Desenvolv.* **2010**, 8, 26.
- 523 (24) Lemos, J. P.; Galvão, J. C. C.; Silva, A. A.; Fontanetti, A.; Corrêa, M. L. P.; Cecon, P. R.
524 Morfofisiologia de Plantas de Milho Em Competição Com Picão-Preto e Trapoeraba
525 Submetidas a Roçada. *Planta Daninha* **2012**, 30 (3), 487–496.
- 526 (25) da Silva, F. L. B.; Lacerda, C. F. de; Sousa, G. G. de; Neves, A. L. R.; Silva, G. L. da; Sousa,
527 C. H. C. Interaction between Water Salinity and Bovine Biofertilizer on the Cowpea Plants.
528 *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* **2011**, 15 (4), 383–389.
- 529 (26) Ometto, J. P. H. B.; Ehleringer, J. R.; Domingues, T. F.; Berry, J. A.; Ishida, F. Y.; Mazzi, E.;
530 Higuchi, N.; Flanagan, L. B.; Nardoto, G. B.; Martinelli, L. A. The Stable Carbon and Nitrogen
531 Isotopic Composition of Vegetation in Tropical Forests of the Amazon Basin, Brazil. In
532 *Nitrogen Cycling in the Americas: Natural and Anthropogenic Influences and Controls*;
533 Springer, **2006**; pp 251–274.
- 534 (27) Ibrahim, M. H.; Jaafar, H. Z. E.; Rahmat, A.; Rahman, Z. A. The Relationship between
535 Phenolics and Flavonoids Production with Total Non Structural Carbohydrate and
536 Photosynthetic Rate in *Labisia pumila* Benth. under High CO₂ and Nitrogen Fertilization.
537 *Molecules* **2011**, 16 (1), 162–174.
- 538 (28) Ibrahim, M. H.; Jaafar, H. Z. E. Primary, Secondary Metabolites, H₂O₂, Malondialdehyde and
539 Photosynthetic Responses of *Orthosiphon stimanus* Benth. to Different Irradiance Levels.
540 *Molecules* **2012**, 17 (2), 1159–1176.
- 541 (29) Atkinson, N. J.; Dew, T. P.; Orfila, C.; Urwin, P. E. Influence of Combined Biotic and Abiotic
542 Stress on Nutritional Quality Parameters in Tomato (*Solanum lycopersicum*). *J. Agric. Food*
543 *Chem.* **2011**, 59 (17), 9673–9682.
- 544 (30) Andre, C. M.; Schafleitner, R.; Guignard, C. C.; Oufir, M.; Aliaga, C. A. A.; Nomberto, G. G.;
545 Hoffmann, L.; Hausman, J. F.; Evers, D. D.; Larondelle, Y. Modification of the Health-
546 Promoting Value of Potato Tubers Field Grown under Drought Stress: Emphasis on Dietary
547 Antioxidant and Glycoalkaloid Contents in Five Native Andean Cultivars (*Solanum tuberosum*
548 L.)V. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57 (2), 599–609.
- 549 (31) Coley, P. D.; Bryant, J. P.; Chapin, F. S. Resource Availability and Plant Antiherbivore
550 Defense. *Science* (80-.). **1985**, 230 (4728), 895–899.
- 551 (32) Teow, C. C.; Troung, V.; McFeeters, R. F.; Thompson, R. L.; Pecota, K. V; Yencho, G. C.
552 Antioxidant Activities, Phenolic and Beta-Carotene Contents of Sweet Potato Genotypes with
553 Varying Flesh Colours. *Food Chem.* **2007**, 103 (3), 829–838.
- 554 (33) Alisi, M. A.; Brufani, M.; Cazzolla, N.; Ceccacci, F.; Dragone, P.; Felici, M.; Furlotti, G.;
555 Garofalo, B.; La Bella, A.; Lanzalunga, O.; et al. DPPH Radical Scavenging Activity of
556 Paracetamol Analogues. *Tetrahedron* **2012**, 68 (49), 10180–10187.
- 557 (34) Wong, S. P.; Leong, L. P.; Hoe, J.; Koh, W. Antioxidant Activities of Aqueous Extracts of
558 Selected Plants. *Food Chem.* **2015**, 99, 775–783.
- 559 (35) Harzallah, A.; Bhourri, A. M.; Amri, Z.; Soltana, H.; Hammami, M. Phytochemical Content and
560 Antioxidant Activity of Different Fruit Parts Juices of Three Figs (*Ficus carica* L.) Varieties
561 Grown in Tunisia. *Ind. Crops Prod.* **2016**, 83, 255–267.
- 562 (36) Jones, C. G.; Hartley, S. E. A Protein Competition Model of Phenolic Allocation. *Oikos* **1999**,
563 86 (1), 27.

- 564 (37) Gayler, S.; Grams, T. E. E.; Heller, W.; Treutter, D.; Priesack, E. A Dynamical Model of
565 Environmental Effects on Allocation to Carbon-Based Secondary Compounds in Juvenile
566 Trees. *Ann. Bot.* **2008**, *101* (8), 1089–1098.
- 567 (38) Lidon, F. C.; Henriques, F. S. Changes in the Contents of the Photosynthetic Electron Carriers,
568 RNase Activity and Membrane Permeability, Triggered by Excess Copper in Rice.
569 *Photosynthetica-Praha*- **1993**, *28*, 99.
- 570 (39) Malavolta E.; Vitti G.C.; Oliveira, S. A. *Avaliação Do Estado Nutricional Das Plantas*, 2^a.;
571 Potafos, Ed.; Piracicaba, **1997**.
- 572 (40) Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of
573 Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20* (7), 933–956.
- 574 (41) Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds.
575 *Trends Plant Sci.* **1997**, *2* (4), 152–159.
- 576 (42) Martinez-Casas, L.; Lage-Yusty, M.; Lopez-Hernandez, J. Changes in Aromatic Profile, Sugars
577 and Bioactive Compounds When Purple Garlic Is Transformed into Black Garlic. *J. Agric.*
578 *Food Chem.* **2017**, acs.jafc.7b04423.
- 579

CAPÍTULO 3 - CHANGES ON THE PRIMARY AND SECONDARY METABOLITE ACCUMULATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Tithonia diversifolia* UNDER ORGANIC AND INORGANIC FERTILIZER

Após revisão da língua inglesa, e considerações da banca examinadora, este artigo será submetido à revista: *Molecules* ISSN: 1420-3049.

1 Article

2 Changes on the Primary and Secondary Metabolite 3 Accumulation and Antioxidant Activity of *Tithonia* 4 *diversifolia* Under Organic and Inorganic Fertilizer

5 Anny Carolyne da Luz ^{1*}, Irany Rodrigues Pretti ¹, Mainã Mantovanelli da Mota ¹ and Maria do
6 Carmo Pimentel Batitucci ¹

7 ¹ Universidade Federal do Espírito Santo, Avenida Fernando Ferrari, 514, Vitória, Zip Code 29075910, Espírito
8 Santo, Brazil; maria.batitucci@ufes.br

9 * Correspondence: annydaluz@gmail.com; Tel.: +55-27-4009-2589

10 Received: date; Accepted: date; Published: date

11 **Abstract:** *Tithonia diversifolia* is a medicinal species with several biological actions: hepatoprotective,
12 antioxidant, anti-inflammatory, chemoprotective and antidiabetic. These medicinal actions are
13 attributed to their phenolic compounds and sesquiterpene lactones. The variation in the production
14 of secondary metabolites in plants occurs as an adaptive response to the biotic and abiotic factors to
15 which the plant is exposed. The objective of this work was to relate the primary and secondary
16 metabolism of *T. diversifolia* to the conditions of organic fertilization (cattle manure), chemical
17 fertilization (NPK 4:14:8) and without fertilization. Also, to evaluate the contents of phenolic
18 compounds and antioxidant activity. Fertilizer applications increased net photosynthesis and total
19 dry mass of *T. diversifolia* plants. The plants that received organic fertilization had higher total phenol
20 and tannin contents, and higher antioxidant activity, than plants that received chemical fertilization.
21 However, the plants of *T. diversifolia* that did not receive fertilization presented total phenols and
22 tannins up to 90% higher than the other treatments, and also had a significantly higher antioxidant
23 activity. Thus, it is possible to standardize the management practices in the cultivation of *T.*
24 *diversifolia* in order to achieve the best productivity, seeking high levels of phenolic compounds and
25 biomass.

26 **Keywords:** phenolic compounds; tannin; photosynthesis; macronutrients, micronutrients, DPPH,
27 ABTS, FRAP, Chelating activity with Fe²⁺.

29 1. Introduction

30 *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, known as Mexican sunflower, is a shrub plant and belongs
31 to the family Asteraceae. It originated in Mexico and Central America [1], and is a representative
32 example of a plant species that can adapt to different types of environment [2]. It is widely distributed
33 around the world, and considered an invasive species in several tropical and sub-tropical areas of
34 America, Africa and Asia [3–5].

35 The most reported chemical constituents of *T. diversifolia* belong to the class of sesquiterpene
36 lactones, flavonoids [4] and other phenolic substances [6], such as trans-cinnamic acid derivatives [7].
37 Recent studies have shown that extracts and secondary metabolites isolated from *T. diversifolia*
38 exhibited interesting biological activities, such as anti-inflammatory [8,9], antimalarial [10], cytotoxic
39 [11], gastro-protective [12], antimicrobial [13,14], preventive for cancer [15] and antihyperglycemic
40 [16,17]. The roles of plants in disease prevention and treatment have been attributed, in part, to the
41 antioxidant properties of their metabolites, such as phenolic constituents. These compounds are
42 effective antioxidants *in vitro*, and thus might contribute significantly to the protective effects *in vivo*
43 [18].

44 Plant secondary metabolites are synthesized by differing biochemical pathways, and are
45 susceptible to environmental influences, diseases, plant growth stages and herbivory, and act as a
46 chemical interface between the plant and its environment through an adaptive response. Thus, these
47 abiotic and biotic factors determine variations in the production and contents of plant metabolites
48 [2,19].

49 Various forms of management may be sources of variation in the levels, and types, of plant
50 metabolites, such as the use of fertilizers [20]. The supply and availability of nutrients is the most
51 important factor for higher productivity among the various plant cultivation practices. Furthermore,
52 fertilization has been reported to have an influence on the phyto-nutritional quality of crops [21].

53 The character of nutrients released by different fertilizers, and their absorption by plants, can lead
54 to changes in carbon/nitrogen ratios and, consequently, to the production of secondary metabolites
55 [22]. The relation between fertilizers and the phenolic compounds production is a highly relevant
56 issue [23]. Previous studies have observed phenolic variation in strawberry, tomato and sea buckthorn
57 berry grown with different fertilizers [24–26]. Research has shown [21] that inorganic fertilizers reduce
58 the antioxidant levels, while organic fertilizers enhance antioxidant content in plants.

59 Nitrogen (N), phosphorous (P) and potassium (K) are the most limiting factors in crop
60 production [27]. In the last decades, NPK mineral fertilizer has been supplied to crops with massive
61 doses [28]. Organic fertilizers, such cattle manure, constitute an alternative for increased yield of
62 harvest, besides contributing to the balanced supply of macro and micronutrients [29]. Thus, an
63 understanding of the action of these fertilizers on the secondary metabolism and antioxidant potential
64 of medicinal plants is important.

65 The objective of this research was to evaluate the effects of three different fertilization conditions
66 on the primary and secondary metabolism of *Tithonia diversifolia* and the antioxidant properties of this
67 plant. Therefore, organic fertilizer (cattle manure) was compared with inorganic fertilizer (NPK 4:14:8)
68 and an unfertilized control on the biomass, gas exchange parameters, accumulation of phenolics and
69 antioxidant activity in *T. diversifolia*.

70 2. Results and Discussion

71 2.1. Effects of fertilizers on Plant Photosynthetic Parameters and Total Dry Mass

72 Table 1 presents the chemical characteristics of the soil pots for the different treatments.
73 Considering the base saturation percentages shown, all of them up to 50%, the soils from the three
74 treatments can be classified as eutrophic [30,31]. Furthermore, in all treatments, the pH of soil is
75 alkaline (pH> 7).

76 The soil that received the organic cattle manure treatment (“Organic”) presented the highest
77 levels of phosphorus, potassium, sulfur, magnesium, organic matter, iron, zinc, manganese, boron and
78 sodium. The elements calcium and copper were found in higher concentration in the soil that was
79 fertilized with N:P:K (4:14:8) (“Fertilizer”).

80

81

82

83

84

85

86
87**Table 1.** Chemical characterization of control, organic and fertilizer soil pots.

Attributes	Control	Organic	Fertilizer
Phosphorus ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.090	0.146	0.131
Potassium ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.260	0.840	0.220
Sulfur ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.010	0.076	0.033
Calcium ⁽³⁾ (g.kg ⁻¹)	2.652	2.496	3.315
Magnesium ⁽³⁾ (g.kg ⁻¹)	0.390	1.443	0.390
Organic matter ⁽⁴⁾ (dag.kg ⁻¹)	2.60	6.50	2.60
Iron ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.108	0.124	0.112
Zinc ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.0094	0.0146	0.0111
Copper ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.0012	0.0004	0.0017
Manganese ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.139	0.149	0.134
Boron ⁽⁵⁾ (g.kg ⁻¹)	0.00052	0.00097	0.00073
Sodium ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.130	0.640	0.110
Base Saturation (%)	89.10	92.60	89.00
pH (H ₂ O)	8.20	7.40	7.80

88
89
90
91

⁽¹⁾Extracted with HCl 0.05 mol/L and H₂SO₄ 0.025 mol/L,
⁽²⁾Extracted with Ca(H₂PO₄)₂ 0.01 mol/L, ⁽³⁾extracted with
KCl 1mol/L, ⁽⁴⁾Oxidation with: Na₂Cr₂O₇·2H₂O 4 mol/L and
H₂SO₄ 10 mol/L, ⁽⁵⁾extraction with BaCl₂·2H₂O 0.125%.

92
93
94
95
96
97

The comparison of the chemical analysis of the leaves from *T. diversifolia* shows a higher concentration of the macronutrients phosphorus and potassium in the control sample, as shown in Table 2. This treatment also had the highest concentrations of the micronutrients magnesium, sulfur, iron and copper. The micronutrients zinc and boron were found in higher concentrations in the leaves of *T. diversifolia* submitted to the organic treatment. The nitrogen and the manganese were found to be more concentrated in plants treated with the NPK fertilizer.

98

99

100

101

102

103

104

105

Table 2. Chemical analysis of *Tithonia diversifolia* leaves from of control, organic and fertilizer treatments.

	Control	Organic	Fertilizer
Nitrogen ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	24.01	29.40	39.48
Phosphorus ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	4.23	3.33	2.49
Potassium ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	31.25	26.25	24.38
Calcium ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	45.17	24.87	32.34
Magnesium ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	9.13	7.20	4.88
Sulfur ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	5.80	3.87	3.75
Iron ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.69	0.44	0.38
Zinc ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.12	0.89	0.53
Copper ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.21	0.18	0.12
Manganese ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.66	0.68	0.95
Boro ⁽³⁾ (g.kg ⁻¹)	0.14	0.15	0.11

⁽¹⁾Hot acid digestion, ⁽²⁾Nitro-perchloric digestion, ⁽³⁾Dry digestion

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

The soil that had the organic treatment had higher macro and micronutrient concentrations than the other treatments, most of the time. The result of the leaf chemical analysis showed that the concentration of these substances was often higher in the leaves of the control treatment plants.

The absorption of nutrients by plants is complex and determined by several factors, and pH is the main one among them. Although in all treatments the soil was alkaline, in the control, the pH was the highest. The alkalinity of the soil can lead to an increase in the levels of calcium, magnesium and potassium [32], and decrease the availability of boron, copper, iron, manganese and zinc [31,33].

In addition to the pH, the type of fertilizer used can also cause variation in the availability of some nutrients. In corn, for example, phosphate fertilization causes a decrease in zinc content, while nitrogen fertilization may lead to a lack of copper, iron, manganese and zinc [34]. Furthermore, high levels of potassium can induce zinc deficiency [34]. In this study it was observed that the *T. diversifolia* plants from the control presented the highest levels of potassium and phosphorus and the lowest content of zinc.

The leaf gas exchange in *T. diversifolia* plants shows some differences between the treatments (Table 3). Plants grown with NPK fertilizer showed high values for net photosynthesis (A). While the plants submitted to the control treatment presented higher intercellular CO₂ (C_i) and lower rates of intrinsic water use efficiency (A/g_s), instantaneous water use efficiency (A/E) and instantaneous carboxylation efficiency (A/C_i). The stomatal conductance (g_s), transpiration (E) and leaf-to-air vapor pressure differences (V_{pdL}) did not show statistical differences between treatments.

E , V_{pdL} and A are entirely related to g_s . The stomatal opening provides a low resistance route for the diffusion movement of the gases, and also for the loss of water through transpiration, so that g_s reflects the inflow and outflow of water and CO₂ from stomates [35]. The E depends directly on V_{pdL} ,

130 thus representing the difference of the air and water vapor saturation pressure inside the leaf. This is
 131 controlled by the temperature of the leaf, and the vapor pressure of air, which is controlled by the
 132 temperature and humidity of the air surrounding the leaf [35].

133

134 **Table 3.** Effects of different fertilization conditions on total dry mass, leaf area, net photosynthesis, stomatal
 135 conductance, transpiration, leaf-to-air vapor pressure differences, intercellular CO₂, intrinsic water use efficiency,
 136 instantaneous water use efficiency and Instantaneous carboxylation efficiency of *Tithonia diversifolia*.

	Control	Organic	Fertilizer
TDM (g)	5.13 ± 1.29 ^b	21.08 ± 0.62 ^a	18.72 ± 1.48 ^a
LA (cm ²)	122.08 ± 26.32 ^b	483.52 ± 102.25 ^a	504.18 ± 117.15 ^a
A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	13.00 ± 0.51 ^c	15.01 ± 0.28 ^b	17.00 ± 0.39 ^a
g _s (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	0.21 ± 0.00 ^a	0.19 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.01 ^a
Ci (μmol CO ₂ mol ⁻¹)	275.06 ± 5.78 ^a	242.42 ± 5.51 ^b	226.30 ± 6.36 ^b
E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	3.46 ± 0.05 ^a	3.17 ± 0.06 ^a	3.34 ± 0.12 ^a
V _{pdl} (kPa)	1.69 ± 0.01 ^a	1.73 ± 0.02 ^a	1.73 ± 0.02 ^a
A/g _s [μmol CO ₂ (mmolH ₂ O) ⁻¹]	65.15 ± 3.40 ^b	84.80 ± 3.37 ^a	93.99 ± 4.08 ^a
A/E [μmol CO ₂ (mmolH ₂ O) ⁻¹]	3.83 ± 0.18 ^b	4.84 ± 0.14 ^a	5.35 ± 0.17 ^a
A/Ci [(μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) / (μmol CO ₂ mol ⁻¹)]	0.05 ± 0.00 ^c	0.06 ± 0.00 ^b	0.08 ± 0.00 ^a

137 Total dry mass (TDM), leaf area (LA), net photosynthesis (A), stomatal conductance (g_s), intercellular CO₂ (Ci),
 138 transpiration (E), leaf-to-air vapor pressure differences (V_{pdl}), intrinsic water use efficiency (A/g_s), instantaneous
 139 water use efficiency (A/E) and instantaneous carboxylation efficiency (A/Ci). All the values shown are mean ± SE
 140 (triplicate); SE: standard error. Different letters in the same line indicate statistically significant differences using
 141 ANOVA and Tukey's test (q ≤ 0.05).
 142

143 Though the plants of *T. diversifolia* submitted to the control treatment had the highest Ci, they had
 144 the lowest value of A. Since there were no statistical differences between g_s, E and V_{pdl}, the higher Ci
 145 in the control treatment plants can be explained by their smaller leaf area (Table 3), since smaller
 146 leaves present reduced resistance of the boundary layer to CO₂ diffusion and water; that is, facilitating
 147 the entry of CO₂ into the plant. For most plants, CO₂ has rapid internal diffusion after passing through
 148 the stomata. Thus, the limitations to the photosynthetic performance inside the leaf are imposed by
 149 factors other than the internal CO₂ concentration. Although the NPK fertilizer treatment did not
 150 present the highest Ci, it was the one that had the highest A, which resulted in a higher A/Ci index,
 151 that reflect the metabolic efficiency of CO₂ fixation in photosynthesis, and the role of the enzyme
 152 Rubisco [35].

153 The best photosynthetic performance of the plants from the NPK fertilizer treatment may also be
 154 related to the higher concentration of nitrogen in the leaves of *T. diversifolia*, since nitrogen is closely
 155 linked to the carboxylation efficiency of the Rubisco enzyme [35,36]. In addition, the leaves of *T.*
 156 *diversifolia* from the NPK fertilizer treatment showed the highest concentration of manganese, an ionic
 157 micronutrient that plays a key role in the photosynthetic apparatus [37], namely in the water-splitting
 158 system associated with photosystem II, ATP synthesis [38] and Rubisco carboxylase reactions [35].

159 2.2 Total Phenol, Tanin Contents and Antioxidant Activity

160 Despite *T. diversifolia* plants from the NPK fertilizer treatment having the highest productivity in
 161 terms of biomass and photosynthesis, the plants with the control treatment had higher content of
 162 phenolics and better antioxidant activity.

163 The total content of phenolic compounds was affected by the fertilizations conditions (Table 4).
 164 HET (hydroalcoholic extract from *Tithonia diversifolia*) from the control treatment showed higher
 165 averages in all analyses, for total phenols content (TPC) and total tannins content (TTC). In the
 166 analysis of TPC, the HET from the control and organic treatments presented total contents up to 74%
 167 higher than the HET from the NPK fertilizer treatment. The TTC was greater in HET from control
 168 treatment, followed by HET from the organic treatment and finally from the NPK fertilizer treatment;
 169 however, the latter presented TTC up to 89% smaller than the others.

170
 171

Table 4. Content of phenolic compounds of *Tithonia diversifolia* under different cultivation conditions.

	Control	Organic	Fertilizer
TPC (mg GAE.g ⁻¹ d.w.)	108.19 ± 2.75 ^a	94.86 ± 4.65 ^a	27.46 ± 1.22 ^b
TTC (mg TA.g ⁻¹ d.w.)	143.37 ± 4.0 ^a	114.72 ± 1.08 ^b	14.92 ± 1.15 ^c

172
 173
 174
 175
 176

Total phenols content (TPC); Total tannins content (TTC).

All the values are expressed as mean + SE (triplicate); SE: standard error.

Different letters in the same rows indicate statistically significant differences,

ANOVA, test-Tukey ($\alpha \leq 0.05$)

177

178 When comparing HET from the organic treatment with HET from the NPK fertilizer treatment,
 179 the organic fertilizer was efficient in accumulating TPC and TTC (Table 4). This result can be
 180 attributed to large amounts of carbon-rich organic matter in the organic fertilizer [39,40] that increase
 181 the carbon-based secondary metabolites production (phenolic compounds in general). This occurs due
 182 to a greater availability of phenyl alanine, which is the precursor for carbon-based secondary
 183 metabolites [41]. Previous studies have also observed that higher phenolic concentrations occur in
 184 organically fertilized in tomatoes [25], marionberry [42], strawberry [43] and jujube [23].

185
 186
 187
 188
 189

However, the *T. diversifolia* plants that presented the highest levels of TPC and TTC were those
 from the control treatment. Plants grown in the local natural environment resulted in higher phenolic
 content compared to the NPK fertilizer treatments; however, their yields reduced substantially [23].
 This was due to the fact that soils that were not fertilized, even infertile soil, induced an unfavorable
 growing environment. The plant then allocates more resources to synthesize defensive phenolics to
 protect limited nutrient resources from diseases, insects or other injuries [44,45].

190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198

When comparing the average of TDM and net photosynthesis (Table 3) of the control and the
 other two treatments that received fertilization, it is evident in which treatment had a higher allocation
 of resources for the production of phenolic compounds, or for growth. The organic and NPK fertilizer
 treatments had the highest photosynthetic rates and highest mean TDM, while the control presented
 the lowest indices in these parameters. On the other hand, the control had the highest levels of TPC
 and TTC among the treatments. This suggests that the decrease in biomass accumulation was related
 to an increase in the concentration of total phenolics, which is reinforced by the strong negative
 correlation between photosynthesis with TPC ($R^2 = -0.932$) and TTC ($R^2 = -0.952$), as shown in Table 6.
 This result indicates that there was a trade-off between growth and secondary metabolism.

199
 200
 201
 202
 203
 204
 205

This allocation of resources for the synthesis of phenolic compounds, carbon-based secondary
 metabolites, occurs because the production of secondary metabolites was up-regulated in low
 nitrogen fertilization [46]. The *T. diversifolia* plants from the control and from the organic treatment
 presented the lowest levels of nitrogen in their leaves (Table 2). When photosynthetic performance is
 suppressed under insufficient nitrogen supply, as noted in the control, recycling of the enzymatic
 nitrogen required for secondary metabolism may occur, resulting in a possible increase in secondary
 metabolites [47].

206
 207
 208
 209
 210

Moreover, similar results was reported for *Orthosiphon stamineus* [48] and *Labisia pumila* [49]. The
 increase in the production of secondary metabolites when photosynthesis decreased was associated to
 the fact that the low net photosynthetic activity led to up-regulation of shikimic acid in the pentose
 phosphate pathway. Previous studies [48,49] already described that plants under low light levels had
 reduced net photosynthesis due to accumulation of non-structural carbohydrate in the leaves, which is

211 usually related to an impairment of net photosynthesis and to up-regulation of secondary metabolite
212 production.

213 The results for the HET from different cultivation conditions in the ABTS, DPPH, chelating
214 activity and FRAP assays are shown as EC₅₀ values (μg.mL⁻¹) in Table 5. A lower EC₅₀ value indicates a
215 higher ability of the extract to act as a scavenger, while higher EC₅₀ value indicates lower ability of the
216 extract to achieve 50% scavenging activity.

217
218

Table 5. Antioxidant activities of *Tithonia diversifolia* under different cultivation conditions.

	Control	Organic	Fertilizer	Trolox	AA	EDTA	FeSO ₄
ABTS							
EC ₅₀	324.49 ±	448.37 ±	783.25 ±	99.98 ±			
(μg.mL ⁻¹)	13.84 ^c	35.24 ^b	23.01 ^a	28.18 ^d			
DPPH							
EC ₅₀	271.05 ±	465.78 ±	866.58 ±		16.46		
(μg.mL ⁻¹)	6.49 ^c	9.67 ^b	24.28 ^a		±		
					1.36 ^d		
Chelatin g activity							
EC ₅₀	578.09 ±	719.80 ±	821.07 ±			19.71 ±	
(μg.mL ⁻¹)	4.23 ^c	0.62 ^b	5.45 ^a			0.39 ^d	
FRAP							
EC ₅₀	775.18 ±	789.39 ±	3303.27 ±				391.76
(μg.mL ⁻¹)	6.81 ^b	10.72 ^b	121.13 ^a				± 5.16 ^c

219 All the values are shown as mean ± SE (triplicate); SE: standard error. Different letters in the same line indicate
220 statistically significant differences, ANOVA, test-Tukey (q ≤ 0.05).

221

222 Each test performed involves mechanisms based on changes in the absorption spectra of the free
223 radical because of the reduction. ABTS is applicable to hydrophilic and lipophilic antioxidant systems,
224 whereas DPPH works better in hydrophobic [50]. Furthermore, However, it should be considered that
225 steric effects might play a fundamental role in the reaction with DPPH. For an efficient radical
226 quenching reaction, the phenolic OH group has to approach the nitrogen centred radical of DPPH.
227 Thus, in the case of large ortho alkyl groups, the energy barrier increase due to steric encumbrance
228 counterbalances the positive electron-releasing radical-stabilizing effect [51]. The FRAP test is an
229 antioxidant capacity assay that is based on the ability of the antioxidant to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ in TPTZ
230 solvent, forming an intense blue Fe²⁺-TPTZ complex [52]. Chelating activity has been used to
231 determine the ability of components in plant extracts to sequester free metal ions, which are important
232 catalysts for the generation of highly reactive hydroxyl radicals via the Fenton reaction in both *in vivo*
233 and *in vitro* systems [53].

234 The HET from the control showed significantly lower EC₅₀ averages in all antioxidant assays
235 performed (Table 5). Among the treatments that received fertilizers, the organic treatment presented
236 better antioxidant activity, EC₅₀ averages up to 76% lower, than the NPK fertilizer treatment.

237 The best HET performance of the plants from the control, in all of the antioxidant tests carried out
238 in this study, was related to their higher content of phenolic compounds, as a consequence of the
239 lower concentration of nitrogen in their leaves. Table 6 shows the high correlation between TPC and
240 TTC and the antioxidant tests performed. In this case, the correlation is negative because the results of
241 the antioxidant tests are expressed in EC₅₀. Plant polyphenols can act as reducing agents, hydrogen
242 donating antioxidants, singlet oxygen quenchers and, in some cases, metal chelators [54]. For that
243 reason, plant antioxidant properties have been attributed to their polyphenol constituents [18,55].

In a study with *Labisia pumila* [56] grown under different fertilization conditions, the reducing ability was highest in DPPH tests, FRAP and chelating activity was found under organic fertilization. This result had a high correlation with total phenolics and flavonoids, which was found in higher concentrations in said study, and also for the organic cultivation condition.

Table 6. Pearson correlation analysis between phenolic compound content, antioxidant activities and net photosynthesis (A).

	DPPH	ABTS	Ch	FRAP	TPC	TTC	Photo (A)
DPPH	1						
ABTS	0.998	1					
Ch	0.957	0.938	1				
FRAP	0.949	0.967	0.817	1			
TPC	-0.985	-0.994	-0.894	-0.989	1		
TTC	-0.994	-0.999	-0.919	-0.978	0.998	1	
Photo (A)	0.980	0.966	0.996	0.867	-0.932	-0.952	1

Total phenolic content (TPC), total tannin content (TTC), chelating activity (Ch); net photosynthesis [Photo (A)]. Values represent Pearson's coefficient of correlation were not significant ($p \leq 0.05$).

Considering quality to be one of the main factors related to consumer acceptance and sustainability in the market, it is important to strictly control and standardize all of the stages involved in the production of phytopharmaceutical preparations, such as the selection of the starting plant material, cultivation, extraction conditions, and the quantification of secondary metabolites or bioactive compounds in the final product [57]. Our results demonstrate that phenolic levels and antioxidant activity of *Tithonia diversifolia* can be manipulated through fertilizer management, with contrasting responses in relation to productivity, photosynthesis, phenol content and antioxidant activity.

3. Materials and Methods

3.1. Plant material and management conditions

Seeds of *T. diversifolia* were collected in Santa Teresa (Espírito Santo - Brazil), a voucher specimen was identified by the VIES herbarium of the Universidade Federal do Espírito Santo (VIES 35297), and germinated in pots containing organic soil (pH 6.4) in a greenhouse located in Cariacica (Espírito Santo - Brazil). Pots were brought to field capacity and regularly watered by weight, with no drainage from the pots. The treatments carried out were: control (organic soil), fertilizer (N-P-K 4:14:8 at 0.3 g.Kg⁻¹ soil) and organic (cattle manure at 125 g.Kg⁻¹ soil). The experimental design was completely randomized with ten replicates per treatment. At 107 days after planting, in the pre-flowering stage, gas exchange measurements were performed. The plants were collected for growth measurements and to prepare the hydroalcoholic extract. The potting soil for each treatment was collected, and also the leaves, for chemical analysis of nutrients.

3.2. Determination of Leaf Area

Leaf area was measured through the leaf disc method [58]. The fresh leaves of ten plants from each treatment were weighed, and then the discs were withdrawn from the basal portion of the leaf only with fine veins. Ten discs with previously known area (1.76 cm²) were randomly removed and the leaves and their weight were determined. The leaf area was estimated by the formula $LA = LM \times DA/DM$, where LA is the leaf area estimated from the method, LM is the leaf fresh mass, DA is the disc area and DM is the disc fresh mass).

281 3.3. Determination of total dry mass

282 The total dry mass (TDM) of plant material was measured after drying in an oven at 45 °C until a
283 constant weight was obtained.

284 3.4. Gas Exchange Parameters

285 Net photosynthesis (A , expressed in $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), stomatal conductance (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O}$
286 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiration (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and internal concentration of carbon (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$)
287 were determined using a closed infra-red gas analyzer, LICOR 6400 Portable Photosynthesis System
288 (IRGA, Licor Inc., USA). Measurement was performed within the time period 08:00h-11:00h, using
289 fully expanded young leaves, maintaining the air temperature at 27 °C, CO_2 concentration at 400 μmol
290 mol^{-1} and photosynthetic photon flux density (PPFD) at 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Moreover, instantaneous
291 water use efficiency (A/E , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) was calculated from the gas exchange
292 measurements [59,60].

293 3.5. Hydroalcoholic extract

294 The dry aerial parts of ten plants *T. diversifolia*, from each treatment, were powdered and
295 macerated with aqueous 70% ethanol at a ratio of 5:1 (v/w) by 72 h, at room temperature. The process
296 was repeated twice to extract the maximum constituents. The resulting solutions were then filtered
297 with filter paper to remove the particles and concentrated using a vacuum evaporator TE-210
298 (TECNAL, Brazil) to obtain the hydroalcoholic extracts of the *Tithonia diversifolia* (HET) for each of
299 three cultivation treatments.

300 3.6. Total phenolic content (TPC)

301 Total phenolic content (TPC) was measured according to the Folin-Ciocalteu method [61].
302 Ethanol solution of HET at 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (20 μL) was added to 100 μL of Folin-Ciocalteu reagent
303 diluted in distilled water (1:10) (v:v). After 5 min, 80 μL of Na_2CO_3 (7.5%) was added and the plate
304 kept in the dark at room temperature for 2 h. The absorbance was measured at 750 nm with a
305 spectrophotometric microplate reader (Epoch Microplate Spectrophotometer – BioTek).
306 Concentrations of gallic acid were 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ethanol was used as the
307 blank. TPC was expressed as gallic acid equivalent per gram of dry weight ($\text{mg GAE.g}^{-1} \text{ d.w.}$),
308 compared with a calibration curve of gallic acid $y = 0.0054x + 0.1122$ $R^2 = 0.9992$. For each sample, three
309 replications were performed.

310 3.7. Total tannin content (TTC)

311 Total tannin content (TTC) was determined according to Folin-Denis method [62] with a few
312 modifications. Ethanol solution of 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ HET (500 μL) was added to 500 μL of Folin-Denis
313 reagent. After 3 min, 500 μL of Na_2CO_3 solution (8%) was added, mixed and incubated for 2 h. The
314 mixture was then centrifuged at 2000 rpm for 5 min and the absorbance measured at 725 nm. Tannic
315 acid (12.5, 25, 50, 100, 500 and 1000 $\mu\text{.mL}^{-1}$) was used to calculate the standard $y = 0.0067x + 0.2727$ $R^2 =$
316 0.9721 and the results were expressed as tannic acid equivalents per gram of dry weight (mg TA.g^{-1}
317 d.w.). Ethanol was used as a blank. For each sample, three replications were performed.

318 3.8. Free radical scavenging activity using the DPPH assay

319 In order to measure the radical scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [63],
320 HET samples and standard (ascorbic acid) were diluted in methanol (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500
321 and 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Methanolic DPPH solution (0.3 mM, 200 μL) was added to 100 μL of the test
322 solution. After 30 min at room temperature in the dark, the absorbance was measured at 517 nm using
323 a spectrophotometric microplate reader. A decrease in the absorbance indicates an increase in the
324 scavenging activity. The test was conducted in triplicate and the percentage inhibition of DPPH was
325 calculated as follows: % inhibition of DPPH = $[(\text{Abs}_0 - \text{Abs}_1) / \text{Abs}_0] \times 100$, where Abs_0 = absorbance of

326 control and Abs_{s1} = absorbance of the sample. Methanol was used as the blank, and DPPH solution
 327 plus methanol was used as the negative control. Results were expressed as the EC_{50} value ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), as
 328 that is the effective concentration of antioxidant agent required to scavenge 50% of DPPH.

329 3.9. Free radical scavenging activity using the ABTS assay.

330 The ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] assay [64]
 331 was performed using a solution prepared by mixing 5 mL of $ABTS^+$ (7 mM) with 88 μL of potassium
 332 persulfate (2.5 mM). The solution was incubated before use in the dark at room temperature for 16 h.
 333 The solution was then diluted with ethanol to absorbance value of 0.700 (\pm 0.05) at 734 nm. $ABTS^+$
 334 solution (200 μL) was mixed with 40 μL of the test solutions: HET samples and standard (Trolox) at
 335 concentrations of 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The decrease in absorbance was
 336 measured at 734 nm after incubation for 6 min. The test was conducted in triplicate and the
 337 scavenging activity was determined using the following formula: % scavenging of $ABTS^+$ = $[(Abs_0 -$
 338 $Abs_{s1}) / Abs_0] \times 100$, where Abs_0 = absorbance of control and Abs_{s1} = absorbance of the sample. Ethanol
 339 was used as the blank and $ABTS$ -potassium persulfate solution plus ethanol was used as the negative
 340 control. Results were expressed as the EC_{50} value ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

341 3.10. Chelating activity with Fe^{2+} ions.

342 The chelating activity [65] of HET with ferrous ions was measured using 1 mL of HET methanolic
 343 solution (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) added to 50 μL of $FeCl_2$ solution (2 mM)
 344 and 200 μL of ferrozine (5 mM), and incubated at room temperature for ten 10 min. The absorbance
 345 was recorded at 562 nm in microplate reader. Chelating activity was calculated as follows: chelating
 346 activity (%) = $[(Abs_0 - Abs_{s1}) / Abs_0] \times 100$, where Abs_0 is the absorbance of the ferrozine- Fe^{2+} complex
 347 and Abs_{s1} is the absorbance of the sample. Results were expressed as the EC_{50} value ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). EDTA
 348 was used as the positive control. The assay was carried out in triplicate.

349 3.11. Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP).

350 The total antioxidant power of the extracts were determined using the FRAP method [52]. The
 351 FRAP reagent was prepared immediately prior to use, using 25 mL of 0.3 M acetate buffer, 2.5 mL of
 352 10 mM 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) and 2.5 mL of 20 mM ferric chloride. 30 μL of HET
 353 ethanolic solution (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) plus 90 μL of distilled water were
 354 incubated with 900 μL of the FRAP reagent for 30 min at 37 °C in the dark. The absorbance of the
 355 ferrous-TPTZ complex was recorded at 595 nm. The standard curve was constructed using $FeSO_4$ at
 356 concentrations of 250, 500, 1000, 1.500 and 2000 μM . Results were expressed as the EC_{50} value ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
 357 Each assay was carried out in triplicate.

358 3.12. Statistical analysis.

359 The data were expressed as mean \pm standard error (SE). Statistical analysis was performed using
 360 ASSISTAT version 7.7 beta software (Assistat Software, Campina Grande, Paraíba, Brasil.) Data were
 361 subjected to one-way analysis of variance and means were compared using Tukey's test at 5% of
 362 probability. The Pearson linear correlation coefficient were performed using XLSTAT for Windows
 363 (Addinsoft, New York, USA).

364 **Acknowledgments:** This work is an integral part of the project Phytochemical, mutagenic and antimutagenic
 365 prospection of *Bidens pilosa* and *Tithonia diversifolia*, financed by FAPES, EDITAL FAPES N° 007/2014,
 366 UNIVERSAL N° 0422/2015. The authors thank Leonardo Valandro Zanetti by supporting the gas exchange
 367 measures.

368 **Author Contributions:** Anny Carolyne da Luz and Maria do Carmo Pimentel Batitucci conceived and designed
 369 the experiments; Anny Carolyne da Luz, Irany Rodrigues Pretti and Mainã Mantovanelli da Mota performed the
 370 experiments; Anny Carolyne da Luz and Maria do Carmo Pimentel Batitucci analyzed the data; Anny Carolyne
 371 da Luz, Maria do Carmo Pimentel Batitucci, Irany Rodrigues Pretti and Mainã MANTovanelli da Mota wrote the
 372 paper. All authors read and approved the final manuscript.

373 **Conflicts of Interest:** The authors declare not conflict of interest.

374 References

- 375 1. Játem-Lásson, A., Ricardi, M.S., Adamo, G. Herbal traditional medicine of Venezuelan Andes:
376 an ethnopharmacological study. *Phyther. Res.* **1998**, *12*, 53–59.
- 377 2. Sampaio, B. L.; Edrada-Ebel, R.; Da Costa, F. B. Effect of the environment on the secondary
378 metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: A model for environmental metabolomics of plants.
379 *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–11, doi:10.1038/srep29265.
- 380 3. Passoni, F. D.; Oliveira, R. B.; Chagas-Paula, D. A.; Gobbo-Neto, L.; Da Costa, F. B. Repeated-
381 dose toxicological studies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray and identification of the
382 toxic compounds. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *147*, 389–394, doi:10.1016/j.jep.2013.03.024.
- 383 4. Chagas-Paula, D.A., Oliveira, R.B., Rocha, B.A., Da Costa, F. B. Ethnobotany, chemistry, and
384 biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chem. Biodivers.* **2012**, *9*, 210–235.
- 385 5. Moronkola, D. O.; Ogunwande, I. A.; Walker, T. M.; Setzer, W. N.; Oyewole, I. O. Identification
386 of the main volatile compounds in the leaf and flower of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. *J.*
387 *Nat. Med.* **2007**, *61*, 63–66, doi:10.1007/s11418-006-0019-5.
- 388 6. Li, H. H.; Inoue, M.; Nishimura, H.; Mizutani, J.; Tsuzuki, E. Interactions of trans-cinnamic acid,
389 its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination
390 of lettuce. *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 1775–1787, doi:10.1007/BF00982307.
- 391 7. Zhao, G. J.; Xi, Z. X.; Chen, W. S.; Li, X.; Sun, L.; Sun, L. N. Chemical constituents from *Tithonia*
392 *diversifolia* and their chemotaxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* **2012**, *44*, 250–254,
393 doi:10.1016/j.bse.2012.06.019.
- 394 8. Owoyele, V. B., Wuraola, C. O., Soladoye, A. O. & Olaleye, S. B. Studies on the anti-
395 inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. *J. Ethnopharmacol.*
396 **2004**, *90*, 317–321, doi:10.1016/j.jep.2003.10.010.
- 397 9. Chagas-Paula, D. A.; Oliveira, R. B. de; da Silva, V. C.; Gobbo-Neto, L.; Gasparoto, T. H.;
398 Campanelli, A. P.; Faccioli, L. H.; Da Costa, F. B. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia*
399 demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene
400 lactones. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *136*, 355–362, doi:10.1016/j.jep.2011.04.067.
- 401 10. O., Oyewole I., Ibidapo, C. A., Moronkola, D. O., Oduola, A. O.O., A. G.; N.A., and O. J. Anti-
402 malarial and repellent activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) leaf extracts. *J. Med. Plants*
403 *Res.* **2008**, *2*, 171–175.
- 404 11. Kuroda M, Yokosuka A, Kobayashi R, Jitsuno M, Kando H, Nosaka K, Ishii H, Yamori T, M. Y.
405 Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their
406 cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2007**, *55*, 1240–1244.
- 407 12. Moronkola, D. O.; Ogunwande, I. A.; Walker, T. M.; Setzer, W. N.; Oyewole, I. O.; Sánchez-
408 Mendoza, M. E.; Reyes-Ramírez, A.; Cruz Antonio, L.; Martínez Jiménez, L.; Rodríguez-Silverio,
409 J.; Arrieta, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer compound, tagitinin C, from *Tithonia*
410 *diversifolia*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Molecules* **2011**, *16*, 665–674,
411 doi:10.3390/molecules16010665.
- 412 13. Liasu, M.O. and Ayandele, A. Antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts from
413 *Tithonia diversifolia* and *Bryum coronatum* collected from Ogbomoso, Oyo state, Nigeria. *Adv.*
414 *Nat. Appl. Sci.* **2008**, *2*, 2008.
- 415 14. Obafemi, C., Sulaimon, T., Akinpelu, D. & Olugbade, T. Antimicrobial activity of extracts and a
416 germacranolidetype sesquiterpene lactone from *Tithonia diversifolia* leaf extract. *African J.*
417 *Biotechnol.* **2006**, *5*, 1254–1258.
- 418 15. Gu JQ, Gills JJ, Park EJ, Mata-Greenwood E, Hawthorne ME, Axelrod F, Chavez PI, Fong HH,
419 Mehta RG, Pezzuto JM, K. A. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer
420 chemopreventive activity. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 532–536.
- 421 16. Zhao, G.; Li, X.; Chen, W.; Xi, Z.; Sun, L. Three new sesquiterpenes from *Tithonia diversifolia*
422 and their anti-hyperglycemic activity. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1590–1597,

- 423 doi:10.1016/j.fitote.2012.09.007.
- 424 17. Li Xia , Guanghui Huang, Guijun Zhao, Chen Wansheng, Junli Li, S. L. Two new monoterpenes
425 from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity. *Rec. Nat. Prod.* **2013**, *7*, 351–
426 354.
- 427 18. Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends*
428 *Plant Sci.* **1997**, *2*, 152–159, doi:10.1016/S1360-1385(97)01018-2.
- 429 19. Pavarini, D. P.; Pavarini, S. P.; Niehues, M.; Lopes, N. P. Exogenous influences on plant
430 secondary metabolite levels. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2012**, *176*, 5–16,
431 doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002.
- 432 20. Gayler, S.; Grams, T. E. E.; Heller, W.; Treutter, D.; Priesack, E. A dynamical model of
433 environmental effects on allocation to carbon-based secondary compounds in juvenile trees.
434 *Ann. Bot.* **2008**, *101*, 1089–1098, doi:10.1093/aob/mcm169.
- 435 21. Dumas, Y.; Dadomo, M.; Di Lucca, G.; Grolier, P. Effects of environmental factors and
436 agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 369–
437 382, doi:10.1002/jsfa.1370.
- 438 22. Klein, D.R.; Bryant, J.P.; Chapin, F.S., I. Carbon nutrient balance of boreal plants in relation to
439 vertebrate herbivory. *Oikos* **1983**, *40*, 357–368.
- 440 23. Wu, C. Sen; Gao, Q. H.; Kjellgren, R. K.; Guo, X. D.; Wang, M. Yields, phenolic profiles and
441 antioxidant activities of *Ziziphus jujube* mill. in response to different fertilization treatments.
442 *Molecules* **2013**, *18*, 12029–12040, doi:10.3390/molecules181012029.
- 443 24. Wang, S. Y.; Millner, P. Effect of different cultural systems on antioxidant capacity, phenolic
444 content, and fruit quality of strawberries (*Fragaria × arnasa* Duch.). *J. Agric. Food Chem.*
445 **2009**, *57*, 9651–9657, doi:10.1021/jf9020575.
- 446 25. Toor, R. K.; Savage, G. P.; Heeb, A. Influence of different types of fertilizers on the major
447 antioxidant components of tomatoes. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 20–27,
448 doi:10.1016/j.jfca.2005.03.003.
- 449 26. Heinäaho, M.; Pusenius, J.; Julkunen-Tiitto, R. Effects of different organic farming methods on
450 the concentration of phenolic compounds in sea buckthorn leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2006**,
451 *54*, 7678–7685, doi:10.1021/jf061018h.
- 452 27. Chun, J.-H.; Kim, S.; Arasu, M. V.; Al-Dhabi, N. A.; Chung, D. Y.; Kim, S.-J. Combined effect of
453 nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers on the contents of glucosinolates in rocket
454 salad (*Eruca sativa* Mill.). *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, *24*, 436–443, doi:10.1016/j.sjbs.2015.08.012.
- 455 28. Janet, R.; Navrátilová, M. Changes in Agriculture and Food Production in NAE Since 1945. In
456 *Agriculture at a Crossroads North America and Europe (NAE) Report*; Hans R. Herren;
457 McIntyre, B. Ed.; International Assessment of Agricultural Knowledge, Science and Technology
458 for Development: Washington, DC, 2009; pp. 19–78.
- 459 29. Patil, N. M. Biofertilizer effect on growth, protein and carbohydrate content in *Stevia*
460 *rebaudiana* Bertoni. *Recent Res. Sci. Technol.* **2010**, *2*, 42–44.
- 461 30. Ronquim, C. C. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais.
462 *Embrapa Monit. por Satélite. Bol. Pesqui. e Desenvolv.* **2010**, *8*, 26, doi:ISSN 1806-3322.
- 463 31. Prezotti, L. C.; Guarçoni, M. A. *Guia de interpretação de análise de solo e foliar*; 2013; ISBN
464 9788589274210.
- 465 32. BUCKMAN, H. O.; BRADY, N. C. *Natureza e propriedades dos solos*; 2ª.; Freitas Bastos S/A: São
466 Paulo, 1968;
- 467 33. MALAVOLTA, E. *ABC da adubação*; 1ª.; Agronômica ceres: SÃO PAULO, 1989;
- 468 34. Gomes, M. A. F.; Souza, M. D.; Boeira, R. C.; Toledo, L. G. Nutrientes vegetais no meio
469 ambiente: ciclos bioquímicos, fertilizantes e corretivos. *Embrapa Meio Ambient. Doc. 66* **2008**,
470 62.
- 471 35. Taiz, Lincon; Zeiger, E. *Plant Physiology*; 4th ed.; Artmed: Porto Alegre, 2009; ISBN 978-85-
472 363-1614-7.
- 473 36. Marschner, H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*; 2º.; Academic Press: London, 1995; ISBN

- 474 9780124735439.
- 475 37. LICHTENTHALER, H. K.; PARK, R. B. Chemical Composition of Chloroplast Lamellæ from
476 Spinach. *Nature* **1963**, *198*, 1070–1072, doi:10.1038/1981070a0.
- 477 38. Pfeffer, P. E.; Tu, S.-I.; Gerasimowicz, W. V.; Cavanaugh, J. R. *In vivo* NMR studies of corn root
478 tissue and its uptake of toxic metals. *PLANT Physiol.* **1986**, *80*, 77–84, doi:10.1104/pp.80.1.77.
- 479 39. Chang, E. H.; Chung, R. S.; Wang, F. N. Effect of different types of organic fertilizers on the
480 chemical properties and enzymatic activities of an Oxisol under intensive cultivation of
481 vegetables for 4 years. *Soil Sci. Plant Nutr.* **2008**, *54*, 587–599, doi:10.1111/j.1747-
482 0765.2008.00264.x.
- 483 40. Yu, F.-B.; Luo, X.-P.; Song, C.-F.; Zhang, M.-X.; Shan, S.-D. Concentrated biogas slurry enhanced
484 soil fertility and tomato quality. *Acta Agric. Scand. Sect. B - Plant Soil Sci.* **2010**, *60*, 262–268,
485 doi:10.1080/09064710902893385.
- 486 41. Tsormpatsidis, E.; Henbest, R. G. C.; Davis, F. J.; Battey, N. H.; Hadley, P.; Wagstaffe, A. UV
487 irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of
488 commercial importance in Lollo Rosso lettuce ‘Revolution’ grown under polyethylene films.
489 *Environ. Exp. Bot.* **2008**, *63*, 232–239, doi:10.1016/j.envexpbot.2007.12.002.
- 490 42. Asami, D. K.; Hong, Y.-J.; Barrett, D. M.; Mitchell, A. E. Comparison of the total phenolic and
491 ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown
492 using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* **2003**,
493 *51*, 1237–1241, doi:10.1021/jf020635c.
- 494 43. Reganold, J. P.; Andrews, P. K.; Reeve, J. R.; Carpenter-Boggs, L.; Schadt, C. W.; Alldredge, J. R.;
495 Ross, C. F.; Davies, N. M.; Zhou, J. Fruit and soil quality of organic and conventional strawberry
496 agroecosystems. *PLoS One* **2010**, *5*, e12346, doi:10.1371/journal.pone.0012346.
- 497 44. Riipi, M.; Ossipov, V.; Lempa, K.; Haukioja, E.; Koricheva, J.; Ossipova, S.; Pihlaja, K. Seasonal
498 changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of
499 phenolics? *Oecologia* **2002**, *130*, 380–390, doi:10.1007/s00442-001-0826-z.
- 500 45. Herms, D. A. Effects of fertilization on insect resistance of woody ornamental plants:
501 reassessing an entrenched paradigm. *Environ. Entomol.* **2002**, *31*, 923–933, doi:10.1603/0046-
502 225X-31.6.923.
- 503 46. Ibrahim, M. H.; Jaafar, H. Z. E.; Rahmat, A.; Rahman, Z. A. The relationship between phenolics
504 and flavonoids production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in
505 *Labisia pumila* Benth. under high CO₂ and nitrogen fertilization. *Molecules* **2011**, *16*, 162–174,
506 doi:10.3390/molecules16010162.
- 507 47. Tognetti, R.; Johnson, J. D. The effect of elevated atmospheric CO₂ concentration and nutrient
508 supply on gas exchange, carbohydrates and foliar phenolics concentration in live oak (*Quercus*
509 *virginiana* Mill.) seedlings. *Annu. For. Sci.* **1999**, *56*, 379–389.
- 510 48. Ibrahim, M. H.; Jaafar, H. Z. E. Primary, secondary metabolites, H₂O₂, malondialdehyde and
511 photosynthetic responses of *Orthosiphon stimaneus* Benth. to different irradiance levels.
512 *Molecules* **2012**, *17*, 1159–1176, doi:10.3390/molecules17021159.
- 513 49. Ibrahim, M. H.; Jaafar, H. Z. E.; Karimi, E.; Ghasemzadeh, A. Primary, secondary metabolites,
514 photosynthetic capacity and antioxidant activity of the malaysian herb kacip fatimah (*Labisia*
515 *pumila* Benth) exposed to potassium fertilization under greenhouse conditions. *Int. J. Mol. Sci.*
516 **2012**, *13*, 15321–15342, doi:10.3390/ijms131115321.
- 517 50. Teow, C. C.; Troung, V.; McFeeters, R. F.; Thompson, R. L.; Pecota, K. V; Yencho, G. C.
518 Antioxidant activities, phenolic and beta-carotene contents of sweet potato genotypes with
519 varying flesh colours. *Food Chem.* **2007**, *103*, 829–838,
520 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031.
- 521 51. Alisi, M. A.; Brufani, M.; Cazzolla, N.; Ceccacci, F.; Dragone, P.; Felici, M.; Furlotti, G.; Garofalo,
522 B.; La Bella, A.; Lanzalunga, O.; Leonelli, F.; Marini Bettolo, R.; Maugeri, C.; Migneco, L. M.;
523 Russo, V. DPPH radical scavenging activity of paracetamol analogues. *Tetrahedron* **2012**, *68*,
524 10180–10187, doi:10.1016/j.tet.2012.09.098.

- 525 52. Rufino, M. D. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S. De; Morais, S. M. De; Sampaio, C. D. G.; Pérez-
526 Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade
527 antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Comun. técnico* **2006**,
528 *125*, 1–4.
- 529 53. Wong, S. P.; Leong, L. P.; Hoe, J.; Koh, W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected
530 plants. *Food Chem.* **2015**, *99*, 775–783, doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.058.
- 531 54. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of
532 flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933–956, doi:10.1016/0891-
533 5849(95)02227-9.
- 534 55. Martinez-Casas, L.; Lage-Yusty, M.; Lopez-Hernandez, J. Changes in aromatic profile, sugars
535 and bioactive compounds when purple garlic is transformed into black garlic. *J. Agric. Food*
536 *Chem.* **2017**, acs.jafc.7b04423, doi:10.1021/acs.jafc.7b04423.
- 537 56. Ibrahim, M. H.; Jaafar, H. Z. E.; Karimi, E.; Ghasemzadeh, A. Impact of organic and inorganic
538 fertilizers application on the phytochemical and antioxidant activity of kacip fatimah (*Labisia*
539 *pumila* Benth). *Molecules* **2013**, *18*, 10973–10988, doi:10.3390/molecules180910973.
- 540 57. Cortés-Rojas, D. F.; Chagas-Paula, D. A.; Da Costa, F. B.; Souza, C. R. F.; Oliveira, W. P. Bioactive
541 compounds in *Bidens pilosa* L. populations: A key step in the standardization of
542 phytopharmaceutical preparations. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2013**, *23*, 28–35,
543 doi:10.1590/S0102-695X2012005000100.
- 544 58. de Lucena, R. R. M.; de Vasconcelos Batista, T. M.; Dombroski, J. L. D.; Lopes, W. de A. R.; de
545 Oliveira Rodrigues, G. S. Medição de área foliar de aceroleira. *Rev. Caatinga* **2011**, *24*, 40–45.
- 546 59. Polley, H. W. Implications of Atmospheric and Climatic Change for Crop Yield and Water Use
547 Efficiency. *Crop Sci.* **2002**, *42*, 131–140.
- 548 60. Thameur, A.; Lachiheb, B.; Ferchichi, A. Drought effect on growth, gas exchange and yield, in
549 two strains of local barley ardhauoi, under water deficit conditions in southern Tunisia. *J.*
550 *Environ. Manage.* **2012**, *113*, 495–500, doi:10.1016/j.jenvman.2012.05.026.
- 551 61. Zhang, Q.; Zhang, J.; Shen, J.; Silva, A.; Dennis, D. A.; Barrow, C. J. A simple 96-well microplate
552 method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **2006**, *18*,
553 445–450, doi:10.1007/s10811-006-9048-4.
- 554 62. Pansera, M. R.; Santos, A. C. a.; Paese, K.; Wasum, R.; Rossato, M.; Rota, L. D.; Pauletti, G. F.;
555 Serafini, L. a. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no
556 Nordeste do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2003**, *13*, 17–22, doi:10.1590/S0102-
557 695X2003000100002.
- 558 63. Duarte-Almeida, J. M.; Santos, R. J. dos; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Avaliação da atividade
559 antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de
560 radicais DPPH. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 446–452, doi:10.1590/S0101-
561 20612006000200031.
- 562 64. Rufino, M.; Alves, R. E.; de Brito, E. S.; de Morais, S. M.; Sampaio, C. de G.; Pérez-Jimenez, J.;
563 Saura-Calixto, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em
564 frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. *Embrapa Agroindústria Trop. Comun. Técnico*
565 **2007**.
- 566 65. Jayakumar, K.; Vg, M. K.; Murugan, K. Evaluation of antioxidant and antihemolytic activities of
567 purified caulophyllumine-A from Solanum. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2016**, *5*, 195–199.

568
569 © 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the



terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO 4 – INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO NOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A. GRAY E SEUS EFEITOS CITOTÓXICOS EM LINFÓCITOS HUMANOS E SARCOMA 180 DE CAMUNDONGOS

Após revisão da língua inglesa, e considerações da banca examinadora, este artigo será submetido à revista: Revista Brasileira de Plantas medicinais (ISSN: ISSN 1516-0572 versão impressão - ISSN 1983-084X versão on-line).

Influência de diferentes condições de fertilização nos compostos fenólicos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray e seus efeitos citotóxicos em linfócitos humanos e sarcoma 180 de camundongos

***DA LUZ, AC¹; PRETTI, IR¹; MOTA, MM¹; DUTRA, JCV¹; BATITUCCI, MCP¹.**

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari 514, 29075 - 910, Vitória, ES, Brazil.

[*annydaluz@gmail.com](mailto:annydaluz@gmail.com)

RESUMO: *Tithonia diversifolia* é uma planta amplamente utilizada para diversos fins terapêuticos como tratamento de malária, diabetes, inflamações entre outros. Seu uso é difundido nas Américas Central e do Sul, Ásia e África. Esta espécie possui metabólitos secundários com ações antioxidantes e anticarcinogênicas, como os ácidos fenólicos, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de três condições de fertilização (adubo orgânico, NPK 4:14:8 e controle sem adubação) na produção de ácido clorogênico, rutina, quercetina, luteolina, taninos e cumarina em *Tithonia diversifolia*, através de análises em HPLC e, também, avaliar a as suas frações orgânicas em linfócitos humanos e células de sarcoma 180 de camundongos, por meio do teste de viabilidade celular MTT. O tratamento Controle apresentou as maiores concentrações dos compostos fenólicos analisados, bem como foi menos citotóxico para os linfócitos humanos do que para as células de sarcoma 180. Esses resultados favorecem o desenvolvimento de estudos que promovam o melhoramento das condições de cultivo de *T. diversifolia* para o uso medicinal.

PALAVRAS-CHAVE: viabilidade celular, disponibilidade de nutrientes, MTT, HPLC.

ABSTRACT: Influence of different fertilization conditions on the phenolic compounds of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray and their cytotoxic effects on human lymphocytes and mouse sarcoma 180 ascites cells. *Tithonia diversifolia* is a plant widely used for various therapeutic purposes, such as malaria treatment, diabetes, inflammation, among others. Its use is widespread at Central and South America, Asia and Africa. This species has secondary metabolites with antioxidant and anticarcinogenic actions, such as phenolic acids, flavonoids and sesquiterpene lactones. The aim of this work was to evaluate the influence of three fertilization conditions (cattle manure, NPK 4:14:8 and organic soil) of the production of chlorogenic acid, rutin, quercetin, luteolin, tannins and coumarin in *Tithonia diversifolia* by HPLC and also to evaluate the cytotoxicity of their organic fractions in human lymphocytes and mouse sarcoma 180 ascites cells, by MTT cell viability assay. The control treatment showed the highest concentrations of phenolic compounds analyzed, as well as being less cytotoxic for human lymphocytes than for sarcoma cells 180. These results contribute to the development of studies that promote the enhancement of culture conditions of *T. diversifolia* for medicinal use.

KEY WORDS: cell viability, nutrients availability, MTT, HPLC.

INTRODUCTION

Tithonia diversifolia (Hemsley) A. Gray is a plant of Asteraceae family, known as mexican sunflower, daisy, hand-of-god, among other popular names. It is an invasive plant, native from Central America and Mexico (AKINOLA et al., 2000; ALVES; ROQUE, 2016; KATTO; SALAZAR, 1995). It is a plant is widely used at countries of Central America, South America, Africa and Asia for the traditional treatment of diseases like diabetes, malaria, snake bite, measles, gastric ulcer, diarrhea, menstrual cramps and wounds (AJAO; MOTEETEE, 2017). The major chemical constituents of *T. diversifolia* belong to the classes of sesquiterpene lactones, flavonoids (CHAGAS-PAULA et al., 2012) and phenolic compounds derived from trans-cinnamic acid, mainly caffeoylquinic acid, which forms chlorogenic acid (ZHAO et al., 2012). Alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, tannins and terpenes are more prominent in the leaves of *Tithonia diversifolia*, but also occur in their roots and stems (OLAYINKA; RAIYEMO; ETEJERE, 2015). In addition to the differences in the productivity and storage of secondary compounds in the different organs of *T. diversifolia*, other factors, such as the stage of plant development and environmental factors, like the availability of nutrients in the soil, affect the metabolism of these substances (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Phenolic compounds have been reported for interfere at the initiation, promotion and progression of cancer. They might lead to the modulation of proteins in diverse pathways and require the integration of different signals for the final chemopreventive or therapeutic effect (Merino et al., 2015; Ramos, 2008). Considering that the environmental and intrinsic factors of plants affect their production of secondary metabolites, consequently, the biological action of these plants is also modulated by these factors.

Polyphenols can affect the overall process of carcinogenesis by several mechanisms and their effects could depend of tissue or cell type, and may have different responses at high or low doses. This cytotoxic action on cancer cells, as well as healthy cells, can be evaluated by several cellular viability tests (RAMOS, 2008). Among the tests used to evaluate the cell viability: Neutral red, LDH leakage, MTT and the protein assays are the most used. The neutral red and the MTT assay are more relevant since have been described as the most sensitive cytotoxicity assays. Thus, these tests, based on mitochondrial respiratory activity, might be used to detect early signs of toxicity following exposure to a mitochondrial toxicant (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006), as compounds that inhibit mitochondrial respiration, generating reactive oxygen species in the mitochondria, that promotes the damage mitochondrial components (MARULLO et al., 2013).

The MTT (3- [4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) is a yellow tetrazolium salt, water soluble, that is converted to formazan, purple and insoluble in water. This conversion reaction is mediated by the cleavage of the tetrazolium ring by succinate dehydrogenase in the mitochondria, as well as, it can be mediated by NADH or NADPH within the cells and out of mitochondria (Fotakis and Timbrell, 2006; Moraes et al., 2016).

The objective of this study was to evaluate the influence of three fertilization conditions on the production of phenolic compounds in *Tithonia diversifolia*, by HPLC analyses, and the cytotoxic activity of these substances in human lymphocytes and mouse sarcoma 180 ascites cells.

MATERIAL AND METHOD

Plant material and management conditions

Seeds of *T. diversifolia* were collected in Santa Teresa (Espírito Santo - Brazil), a voucher specimen was identified by the VIES herbarium of the Universidade Federal do Espírito Santo (VIES 35297), and germinated in pots containing organic soil (pH 6.4) in a greenhouse located in Cariacica (Espírito Santo - Brazil). Pots were brought to field capacity and regularly watered by weight, with no drainage from the pots. The treatments carried out were: Control (organic soil), Fertilizer (N-P-K 4:14:8 at 0.3 g.Kg⁻¹ soil) and Organic (cattle manure at 125 g.Kg⁻¹ soil). The experimental design was completely randomized with ten replicates per treatment. At 107 days after planting, in the pre-flowering stage the plants were collected to prepare the hydroalcoholic extract. Plant leaves and soil of each treatment were collected and conducted to the chemical analysis of nutrients.

Hydroalcoholic extract

The dry aerial parts of ten plants of *T. diversifolia*, from each treatment, were powdered and macerated with aqueous 70% ethanol at a ratio of 5:1 (v/w) by 72 h, at room temperature. Thereafter, the supernatant was removed and the same powder was submitted to a new maceration with 70% ethanol. After 72 h, the supernatant was removed and the powder was macerated one more time for 72 h, totaling 3 maceration steps. The resulting solutions were then filtered with filter paper to remove the particles and concentrated using a vacuum evaporator TE-210 (TECNAL, Brazil) to obtain the hydroalcoholic the three extracts of the *Tithonia diversifolia* (HET) from each of cultivation treatments.

Crude hydroalcoholic extract fractionation

In order to prepare the fractions were used solvents with increasing polarity (SHAHRAKI et al., 2016). 0.5 g of the HET from each cultivation condition was suspended in 50 mL of distilled water and transferred to a decanter funnel. The aqueous solution was fractionated with different solvents by applying the liquid-liquid partition method with increasing polarity solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol) (DORMAN; HILTUNEN, 2004). The n-hexane (50 mL) solvent was added to the funnel, and the n-hexane fraction was partitioned. In the next step, the remaining of the solvent in the decanter funnel was combined with dichloromethane solvent, and the dichloromethane fraction was then extracted. Subsequently, the remaining solvent from the previous steps was mixed with ethyl acetate, and the ethyl acetate fraction was extracted. At the end, n-butanol solvent was added to the funnel for obtain n-butanol fractions. All fractionates were collected separately and dried at room temperature.

Instrumentation

Instrumentation of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses were carried using on a Shimadzu HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) with solvent delivery system of two pumps (Model LC-20AT, Prominence Liquid Chromatograph, Shimadzu), column oven (Model CTO-20A), UV detector (Model SPD-20A, Prominence Diode Array Detector, Shimadzu) and degasifier (DGU-20A5). Data collection and integration was accomplished using LC Solutions, 1.25 version software. Separation was achieved with on a C18 reverse phase column ZORBAX Eclipse XDB®, Agilent (4.6 mm x 250 mm, 5µm) equipped

with a guard column of same packing material. The mobile phase were filtered through 0.45 μm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Experiments and analyses involving HPLC were performed in the Laboratory of Biomolecular Analysis (LABIOM) at the Federal University of Espírito Santo, Vitória-ES, Brazil.

HPLC conditions

The methanol solution of ethyl acetate fraction was used to detect flavonoids and dichloromethane fraction to detect tannins and coumarins. HPLC assay for flavonoids detection was carried out using an isocratic elution with a flow rate of 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, the column temperature was set to 40°C, a mobile phase of methanol and 2% phosphoric acid (pH 2.60) (40%:60% v/v) and a detection wavelength of 350 nm. The injection volume was 20 μL of each solution and the total run time was 20 minutes for each injection. Identification of flavonoids was performed by comparing their retention times (RT) and spectra with those of known standards: chlorogenic acid, rutin, quercetin and luteolin (Sigma-Aldrich, USA). Chromatographic peaks in the samples were identified on the basis of the standards retention time. Amounts of flavonoids were calculated using a calibration curve equation for each standard. Tannin detection was performed using a mobile phase with 0.1% acid formic solution (Solvent A) and methanol (Solvent B), the flow rate was adjusted to 0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the column was maintained at 40°C. A gradient elution was carried by varying the proportion of solvent B to solvent A, according to the following gradient: 0–15 min, 15% to 33% B; 15–17 min, 33% to 15% B; 17–22 min, 15% B. The injection volume was kept at 20 μL and a detection wavelength of 270 nm. The quantification of the sample was measured by comparing their retention times and spectra with the

standard, gallic acid (Vetec, Brazil) (ROSS; BETA; ARNTFIELD, 2009). For the detection of coumarins, the isocratic mobile phase of acetonitrile and water (40%:60% v/v) was used, with flow rate of 1 mL.min⁻¹ at 274 nm and column temperature was adjusted at 30°C. The injection volume was 10 µL of solution and the total run time was 10 minutes for each injection. Samples quantifications were measured by comparing RT and spectrum of the samples with the standard, coumarin (Sigma-Aldrich, USA) (CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS, 2001). All data are presented as averages of triplicate measurements.

Cell culture

Human lymphocytes were obtained from peripheral blood sample of a healthy nonsmoking volunteer with informed consent, aged between 20 to 30 years, without any history of recent disease, exposures to radiation or drug use and without alcohol ingestion thirty days prior blood donating. The lymphocytes were isolated by the method Ficoll® Paque Plus (Sigma–Aldrich) gradient, as recommended by manufacturer with minimal modifications. All protocols involved were approved by the Research Ethical Committee of UFES (certificate 2.333.879).

Mouse sarcoma 180 ascites cells (S180) were acquired from Banco de Células do Rio de Janeiro. S180 cells were incubated in *Mus musculus* mouse. The protocols were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA / UFES) under process number 89/2015.

The cells (lymphocytes and S180) were cultured with RPMI 1640 (Cultilab) supplemented with antibiotic gentamicin (50 mg.L⁻¹) and antifungal amphotericin B (2 mg.L⁻¹), 20% fetal bovine serum (Gibco) at 37 °C and CO₂ 5% saturation.

MTT assay

The assay of MTT was performed to assess cell viability. The cells (human lymphocytes and S180) were plated in 96-well plates with 2×10^5 cells in each well and treated with different concentrations of Control, Organic and Fertilizer HET: 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 and $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, in a RPMI 1640 medium for 48 h at 37°C in $5\% \text{CO}_2$. After exposure, the medium was removed and MTT ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ of stock in PBS) was added ($20 \mu\text{L}/\text{well}$), and cells were incubated for an additional 3 h with MTT. The absorbance was measured at 595 nm in a microplate reader. The experiment was performed in triplicate and the results were expressed as relative percentage of cell viability in comparison to the control, calculated with the following equation:

$$\% \text{ Cell viability} = (\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

2.8. Statistical analysis

All results were expressed as the means \pm standard error. For HPLC, cytotoxicity assays, were performed ANOVA followed Test Tukey ($p < 0.05$) using ASSISTAT version 7.7 beta software (Assistat Software, Campina Grande, Paraíba, Brazil).

RESULTS AND DISCUSSION

The chemical characteristics of the soil pots for the different treatments are presented in table 1. Considering the base saturation percentages up to 50%, the soils from the three treatments can be classified as eutrophic (PREZOTTI; GUARÇONI, 2013; RONQUIM, 2010). Furthermore, in all treatments, the pH of soil is alkaline ($\text{pH} > 7$).

The elements calcium and copper were found in higher concentration in the soil with Fertilizer. The soil of Organic treatment presented the highest levels of phosphorus, potassium, sulfur, magnesium, organic matter, iron, zinc, manganese, boron and sodium.

TABLE 1. Chemical characters of soil pots

Attributes	Control	Organic	Fertilizer
Phosphorus ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.090	0.146	0.131
Potassium ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.260	0.840	0.220
Sulfur ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.010	0.076	0.033
Calcium ⁽³⁾ (g.kg ⁻¹)	2.652	2.496	3.315
Magnesium ⁽³⁾ (g.kg ⁻¹)	0.390	1.443	0.390
Organic matter ⁽⁴⁾ (dag.kg ⁻¹)	2.60	6.50	2.60
Iron ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.108	0.124	0.112
Zinc ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.0094	0.0146	0.0111
Copper ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.0012	0.0004	0.0017
Manganese ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.139	0.149	0.134
Boron ⁽⁵⁾ (g.kg ⁻¹)	0.00052	0.00097	0.00073
Sodium ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	0.130	0.640	0.110
Base Saturation (%)	89.10	92.60	89.00
pH (H ₂ O)	8.20	7.40	7.80

⁽¹⁾Extracted with HCl 0.05 mol.L⁻¹ and H₂SO₄ 0.025 mol.L⁻¹, ⁽²⁾Extracted with Ca(H₂PO₄)₂ 0.01 mol.L⁻¹, ⁽³⁾extracted with Cl 1mol.L⁻¹, ⁽⁴⁾Oxidation with: Na₂Cr₂O₇·2H₂O 4 mol.L⁻¹ and H₂SO₄ 10 mol.L⁻¹, ⁽⁵⁾extraction with BaCl₂·2H₂O 0.125%.

The chemical analysis of the leaves from *T. diversifolia* shows a highest concentration of the macronutrients phosphorus and potassium and of the micronutrients magnesium, sulfur, iron and copper, in the Control treatment (table 2). The leaves from Organic treatment presented the higher concentrations of the micronutrients zinc and boron. The leaves of plants from fertilizer treatment had shown nitrogen and the manganese at higher levels.

TABLE 2. *Tithonia diversifolia* leaves chemical analysis data.

	Control	Organic	Fertilizer
Nitrogen ⁽¹⁾ (g.kg ⁻¹)	24.01	29.40	39.48
Phosphorus ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	4.23	3.33	2.49
Potassium ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	31.25	26.25	24.38
Calcium ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	45.17	24.87	32.34
Magnesium ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	9.13	7.20	4.88
Sulfur ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	5.80	3.87	3.75
Iron ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.69	0.44	0.38
Zinc ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.12	0.89	0.53
Copper ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.21	0.18	0.12
Manganese ⁽²⁾ (g.kg ⁻¹)	0.66	0.68	0.95
Boron ⁽³⁾ (g.kg ⁻¹)	0.14	0.15	0.11

⁽¹⁾ Hot acid digestion, ⁽²⁾ Nitro-perchloric digestion, ⁽³⁾ Dry digestion

Six phenolic compounds (chlorogenic acid, rutin, quercetin, luteolin, gallic acid and coumarin) were identified and quantified in samples of *Tithonia diversifolia* under different cultivation conditions. The quantification of flavonoids was performed based on spectra and retention time, as follows: chlorogenic acid (RT = 2.954 min), rutin (RT = 5.502 min), quercetin (RT = 14.111 min) and luteolin (RT = 17.200 min) (Figure 1a). For tannins quantification, were used the spectra and retention time of gallic acid (RT = 7.558 min) (Figure 1b) and the quantification of coumarins was based on the retention time and on spectrum of the coumarin (RT = 6.593 min) (Figure 1c).

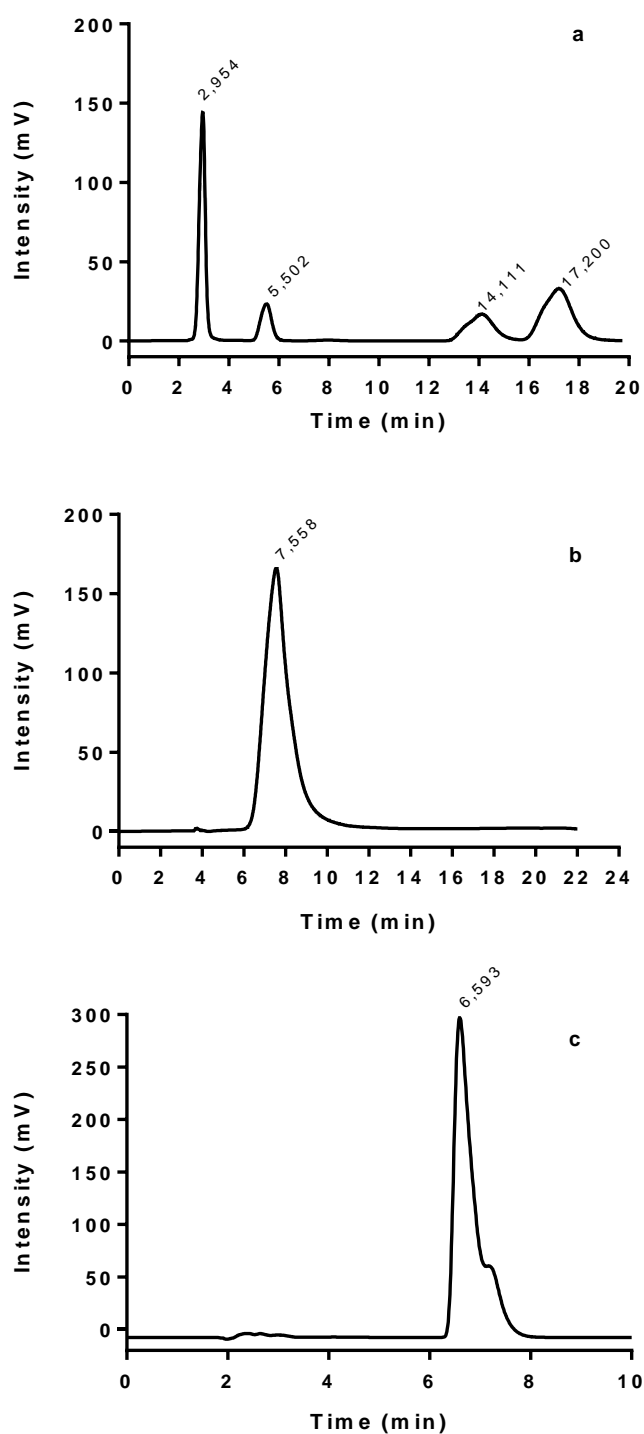


FIGURE 1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) chromatograms of phenolic compounds in the HET fractions. Profile obtained for flavonoids (a): chlorogenic acid (RT: 2,954), rutin (RT: 5.502), quercetin (RT: 14.111), luteolin (RT: 17.200); profile obtained for tannins (b): gallic acid (RT: 7.558); and profile obtained for coumarin (c) (RT: 6.593).

The amount of these substances varied significantly between the treatments, except for quercetin that was not detected. The Control treatment showed the highest concentrations of all quantified substances (Table 3).

TABLE 3. Total phenolic compounds of *Tithonia diversifolia* under different cultivation conditions using HPLC-DAD

	Control	Organic	Fertilizer
Chlorogenic acid ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	90.82 \pm 6.04 ^a	5.34 \pm 0.37 ^b	3.05 \pm 0.19 ^b
Rutin ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	928.41 \pm 68.02 ^a	58.59 \pm 7.97 ^b	20.84 \pm 0.68 ^b
Quercetin ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	nd	nd	Nd
Luteolin ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	8.35 \pm 0.48 ^a	3.52 \pm 0.21 ^b	4.13 \pm 0.16 ^b
Coumarin ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.90 \pm 0.03 ^a	0.36 \pm 0.01 ^c	0.80 \pm 0.04 ^{ab}
Gallic acid ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	8.20 \pm 0.12 ^a	7.62 \pm 0.15 ^b	4.62 \pm 0.03 ^c

All the values shown are mean \pm SE (triplicate); SE: standard error; nd: not detected; Different letters in the same line indicate statistically significant differences using ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$).

From the ethyl acetate fraction of HET, quantification of chlorogenic acid and flavonoids was performed simultaneously and was obtained good separation for the peaks. The rutin showed the highest compound concentrations among the treatments, with concentration of 928.41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in the treatment Control, the highest concentration between all metabolites in all treatments studied. The chlorogenic acid also showed higher concentration in the treatment Control (90.82 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), representing a concentration 30 times higher than the other treatments. Although luteolin also had its highest concentration in Control treatment, the difference in concentrations between treatments showed a lower proportion, varying from 8.35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 3.52 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

The quantification of coumarins and tannins, performed from the dichloromethane fraction of HET, also showed the highest concentrations of these

compounds in the Control treatment, with a coumarin concentration differing from $0.90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $0.36 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and of gallic acid from $8.20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $4.62 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

The highest amount of phenolic compounds detected in the HET from the Control treatment is related to the availability of nutrients in the soil of this treatment, which presented, predominantly, lower concentrations of the nutrients analyzed, in spite of having higher levels of some of the nutrients in the leaf.

Studies that relate soil availability and nutrient concentration in plants with their effects on secondary metabolism are rare, however is established is that their actions are not uniform in all species (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Despite the lack of studies, hypotheses such as carbon/nitrogen balance, which associated the availability of nitrogen and the accumulation of carbon-based secondary compounds (BRYANT; CHAPIN; KLEIN, 1983). In addition, the hypothesis of protein competition (JONES; HARTLEY, 1999) posits competition in plant metabolic pathways for the production of photosynthetic compounds *versus* defense compounds. The synthesis of proteins and phenylpropanoids, precursors of phenolic compounds, compete for a common and limited resource, the phenylalanine, which is a branching point at the end of the shikimic acid pathway, located between primary and secondary metabolism. Under conditions of low nutrient availability, the demands of protein for growth are reduced, increasing the incorporation of phenylalanine in the synthesis of phenolic compounds, increasing the concentration of these compounds.

Some studies describe this variation in the concentration of phenolic compounds in relation to the availability of nutrients in the soil. For *Labisia pumila* Benth was observed that the application of organic fertilizer enhanced the production of total phenolics, flavonoids, ascorbic acid, saponin and glutathione content, compared to the use of inorganic fertilizer. The antioxidant activity was also highest

in plants cultivated with organic fertilizer, indicating that, for this species, the use of chicken dung can enhance the production of secondary metabolites and improve antioxidant activity (IBRAHIM et al., 2013).

In a study with *Ziziphus jujube* Mill the application of organic fertilizer appeared to enhance their phenolics and antioxidant activity accumulation, compared to conventional fertilized *Z. jujube*. Inorganic fertilization supplemented with potassium as an individual nutrient improved the accumulation of phenolics, which demonstrate that phenolics levels and antioxidant activity of *Z. jujube* can be manipulated through fertilizer management, for this species (WU et al., 2013).

Lombardo et al., (2015) demonstrated that providing a balanced supply of nitrogen, phosphorus and potassium (NPK) via fertilizer application can enhance the nutraceutical value of globe artichoke [*Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori], although this effect is modulated by both: genetic factors and soil type.

MTT assay is a cell viability test used to determine cytotoxicity upon exposure to toxic substances and It has been used to verify the viability of human lymphocytes (SAGRILLO et al., 2015; SINHA et al., 2014) and mouse sarcoma 180 cells exposed to natural products (JANA et al., 2014; MORAES et al., 2016). The enzymatic reduction of tetrazolium salts (MTT) is related to the survival of cells that are metabolically active after exposure to the test substance. In this study, the cytotoxicity of *Tithonia diversifolia* was investigated *in vitro* by MTT assay in both cell lines, human lymphocytes and S180. The cell lines were exposed to the hydroalcoholic extract of *T. diversifolia* 50 µg/mL from the different cultivation condition for 48h.

The *Tithonia diversifolia* hydroalcoholic extract reduced the viability of S180, the HET from the Control treatment being the most effective in inducing S180 cell

death, with only 32.59% viable cells (figure 2). On the other hand, for human lymphocytes, the HETs were not cytotoxic, presenting the viability percentage in this cell line around 70%

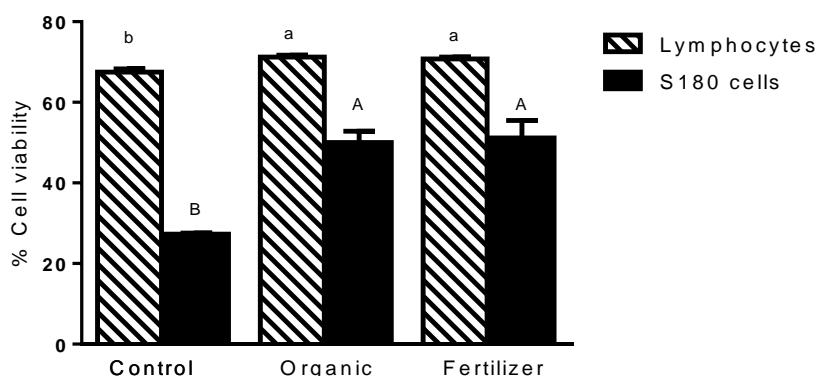


FIGURE 2. The effect of HET from different cultivation condition on the viability in lymphocytes human and S180 cells at $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for 48h.

All the values shown are mean \pm SE (triplicate); SE: standard error;

Different small letters indicate statistically significant differences between Lymphocytes cells. Different capital letters indicate statistically significant differences between S180 cells. Using ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$).

The higher cytotoxic activity of the HETs on the cancer cell line than on the healthy cell line may be related to the flavonoids, since these compounds can trigger apoptosis through modulation of a number of key elements in cellular signal transduction pathways linked to apoptosis in cancer cells (RAMOS, 2008). The highest cytotoxicity was observed in S180 cells exposed to HET from the Control treatment, which also showed the highest concentrations of flavonoids.

Other studies also point out that the effects of phenolic compounds are specific, as carcinogenic cells demonstrate higher sensitivity than normal cells when incubated with this substance (PEREIRA et al., 2015; RAMOS, 2008). In Asteraceae the cytotoxic activity of the flavonoids in tumor cells has been described in several studies (LEITE et al., 2016; SONODA et al., 2004). Gu et al. (2002) tested the

chemotherapeutic potential of sesquiterpenes isolated from *T. diversifolia* and found that compounds displayed significant antiproliferative activity. It also evaluated the cytotoxic effect of aqueous extract of *T. diversifolia* in mouse cancer cells RAW264.7 and human peripheral blood mononuclear cells through the mitochondrial respiration method using MTT, and there was greater cytotoxic activity on the cancer cell line (HIRANSAI et al., 2016).

Das et al., (2009) demonstrated that flavonoids induced apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells via multiple mechanisms including increase in ROS production, activation of kinases, down regulation of survival pathways and inflammatory factors, and activation death receptor and mitochondrial pathways. Without affecting, however, the normal astrocytes, indicating their selective action for controlling glioblastoma. This is particularly appealing for the therapeutic use of phenolic compounds, since currently a major obstacle in cancer therapy is extensive drug toxicity to the normal cells.

This research has demonstrated secondary metabolites levels and biological activity of *Tithonia diversifolia* are influenced by fertilizer management, for achieving higher phenolic concentration and stronger cytotoxic effect against the cancerous cells. Important results for the development of future studies that aimed at improve the management conditions of *T. diversifolia* for medicinal use.

ACKNOWLEDGEMENT

This work is an integral part of the project Phytochemical, mutagenic and antimutagenic prospection of *Bidens pilosa* and *Tithonia diversifolia*, financed by FAPES, EDITAL FAPES N° 007/2014, UNIVERSAL N° 0422/2015. The authors are grateful for the availability of the use of LABIOM and Professor Alexandre M. C

Santos and the techniques Caroline O. Maia and Natércia C. Alves for the assistance in the manipulation of the HPLC.

REFERENCES

- AJAO, A. A.; MOTEETEE, A. N. *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. (Asteraceae: Heliantheae), an invasive plant of significant ethnopharmacological importance: A review. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 396–403, 2017.
- AKINOLA, J. O. et al. Seed treatment methods and duration effects on germination of wild sunflower. **Experimental Agriculture**, v. 36, n. 1, p. 63–69, 2000.
- ALVES, M.; ROQUE, N. Flora da Bahia: Asteraceae – Tribo Heliantheae. **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**, v. 16, p. 63, 25 Nov. 2016.
- BRYANT, J. P., CHAPIN, F. S., KLEIN, D. R. Herbivore-Plant Interactions at Northern Latitudes. **Oikos**, v. 40, p. 357–368, 1983.
- CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng: (“guaco”) Leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, Dec. 2001.
- CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 210–235, Feb. 2012.
- DAS, A.; BANIK, N. L.; RAY, S. K. Flavonoids activated caspases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells but not in human normal astrocytes. **Cancer**, p. NA-NA, 2009.
- DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 193–199, 2004.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, Jan. 2006.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GU JQ, GILLS JJ, PARK EJ, MATA-GREENWOOD E, HAWTHORNE ME, AXELROD F, CHAVEZ PI, FONG HH, MEHTA RG, PEZZUTO JM, K. A. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. **Journal of natural products**, v. 65, n. 4, p. 532–536, 2002.
- HIRANSAI, P. et al. Anti-nitric oxide production, anti-proliferation and antioxidant effects of the aqueous extract from *Tithonia diversifolia*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 950–956, Nov. 2016.
- IBRAHIM, M. H. et al. Impact of organic and inorganic fertilizers application on the phytochemical and antioxidant activity of kacip fatimah (*Labisia pumila* Benth). **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10973–10988, 2013.
- JANA, S. et al. Antitumorogenic potential of linalool is accompanied by modulation of oxidative stress: an in vivo study in sarcoma-180 solid tumor model. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 5, p. 835–848, 4 Jul. 2014.
- JONES, C. G.; HARTLEY, S. E. A Protein competition model of phenolic allocation. **Oikos**, v. 86, n. 1, p. 27, 1999.
- KATTO, C. I. R.; SALAZAR, A. Boton de oro (*Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray) una fuente

proteica alternativo para el tropic. **Livestock Research for Rural Development**, v. 6, n. 3, 1995.

LEITE, P. O. et al. Influência da poluição aérea gerada pelo tráfego veicular na produção do óleo essencial e das atividades antifúngica e citotóxica in vitro de *Cyrtocymura scorpioides* (Lam.) H. Rob. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 27–37, Mar. 2016.

LOMBARDO, S.; PANDINO, G.; MAUROMICALE, G. The nutraceutical response of two globe artichoke cultivars to contrasting NPK fertilizer regimes. **Food Research International**, v. 76, p. 852–859, 2015.

MARULLO, R. et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e81162, 19 Nov. 2013.

MERINO, F. J. Z. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1031–1040, 2015.

OLAYINKA, B. U.; RAIYEMO, D. A.; ETEJERE, E. O. Phytochemical and proximate composition of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. **Annals. Food Science and Technology**, v. 16, n. 1, p. 195–200, 2015.

PEREIRA, W. L. et al. Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 1, p. 798–806, 2015.

PINHO DE MORAES, G. et al. Cytogenotoxic and oxidative status evaluation of *Morinda citrifolia*. **International Archives of Medicine**, 2016.

PREZOTTI, L. C.; GUARÇONI, M. A. **Guia de interpretação de análise de solo e foliar**. [s.l.: s.n.].

RAMOS, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 5, p. 507–526, May 2008.

RONQUIM, C. C. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. **Embrapa Monitoramento por Satélite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 8, p. 26, 2010.

ROSS, K. A.; BETA, T.; ARNTFIELD, S. D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 336–344, 2009.

SAGRILLO, M. R. et al. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 173, p. 741–748, Apr. 2015.

SHAHRAKI, S. et al. Effect of total hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* and its n-hexane and ethyl acetate fractions on ACHN and GP-293 cell lines. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 1, p. 89–96, 2016.

SINHA, S. et al. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 71–77, Jun. 2014.

SONODA, M. et al. Cytotoxic activities of flavonoids from two *Scutellaria* plants in Chinese medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 65–68, Mar. 2004.

WU, C. SEN et al. Yields, phenolic profiles and antioxidant activities of *Ziziphus jujube* mill. in response to different fertilization treatments. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12029–12040, 2013.

ZHAO, G. J. et al. Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic

significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 250–254, 2012.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ A similaridade genética observada entre as populações de *Bidens pilosa* e *Tithonia diversifolia* não correspondem apenas à localização geográfica, podendo estar relacionada às formas de reprodução, polinização e dispersão de sementes dessas plantas;
- ✓ Os resultados encontrados com o uso dos marcadores RAPD, mostram a importância da análise da diversidade entre as populações na produção de metabólitos secundários e atividades biológicas, sendo primordial para a seleção e cultivo de plantas medicinais;
- ✓ O déficit hídrico não determinou alterações relevantes na produção de metabólitos secundários em *Bidens pilosa*.
- ✓ As condições de fertilização influenciaram a produção e acúmulo de compostos fenólicos em *T. diversifolia* e *B. pilosa* e, conseqüentemente, a atividade biológica dessas plantas;
- ✓ Diferentes condições de crescimento podem ser utilizadas a fim de aumentar a produção de metabólitos secundários de importância farmacológica e, também aumentar a biomassa de *B. pilosa* e *T. diversifolia*.

REFERÊNCIAS

- A.A. ANDERBERG, B.G. BALDWIN, R.G. BAYER, J. BREITWIESER, C. JEFFREY, M.O. DILLON, P. ELDENÄS, V. FUNK, N. GARCIA-JACAS, D.J.N. HIND, P.O. KARIS, H.W. LACK, G. NESOM, B. NORDENSTAM, CH. OBERPRIELER, J.L. PANERO, C. PUTTOCK, H. ROBINSON, T.F. STUESSY, A. S, J. W. AND L. E. W. Compositae. In: JEFFREY, J. W. K. AND C. **The Families and Genera of Vascular Plants**. Volume VIII Flowering Plants. Eudicots: Asterales. Edited by K. Kubitzki. Verlag-Berlin-Heidelberg/GERMANY: Springer, 2007.
- ADEGOKE, G. O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in foods-a critical appraisal. **Journal of food science and technology**, v. 35, n. 4, p. 283–298, 1998.
- AJAO, A. A.; MOTEETEE, A. N. *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. (Asteraceae: Heliantheae), an invasive plant of significant ethnopharmacological importance: A review. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 396–403, 2017.
- AKINOLA, J. O. et al. Seed treatment methods and duration effects on germination of wild sunflower. **Experimental Agriculture**, v. 36, n. 1, p. 63–69, 2000.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 1998.
- ALISI, M. A. et al. DPPH radical scavenging activity of paracetamol analogues. **Tetrahedron**, v. 68, n. 49, p. 10180–10187, 2012.
- ALLSTADT, A. et al. Interference competition and invasion: Spatial structure, novel weapons and resistance zones. **Journal of Theoretical Biology**, v. 306, p. 46–60, 2012.
- ALVES, M.; ROQUE, N. Flora da Bahia: Asteraceae – Tribo Heliantheae. **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**, v. 16, p. 63, 2016.
- AMBRÓSIO, S. R. et al. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 10, p. 2052–2060, 2008.
- ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 8, p. 634–639, 2004.
- ANDRE, C. M. et al. Modification of the health-promoting value of potato tubers field grown under drought stress: Emphasis on dietary antioxidant and glycoalkaloid contents in five native Andean cultivars (*Solanum tuberosum* L.)v. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 599–609, 2009.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANVISA. **FORMULÁRIO NACIONAL FITOTERÁPICO: Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- ARIDOAN, B. C. Immunomodulatory Effects of Phytocompounds. In: **Modern Phytochemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. p. 341–356.
- ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1355–1363, 1998.
- ARROYO, J. et al. Effect of the ethanolic extract of *Bidens pilosa* L. on colon cancer induced in rats. v. 69, n. 2, p. 77–83, 2008.
- ARROYO, J.; BONILLA, P.; BARREDA, A. *Bidens pilosa* chemoprotective effect on induced breast cancer in rats. v. 71, n. 3, p. 153–159, 2010.
- ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523–524, p. 9–20, 2003.
- ASTUDILLO-VÁZQUEZ, A. et al. Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on gastrointestinal disease. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7–8, p. 577–580, 2008.

- ATKINSON, N. J. et al. Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9673–9682, 2011.
- ATSATT, P. R.; O'DOWD, D. J. Plant defense guilds. **Science**, v. 193, p. 24–29, 1976.
- ATTA, A. H.; MOUNEIR, S. M. Evaluation of some medicinal plant extracts for antidiarrhoeal activity. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 6, p. 481–485, Jun. 2005.
- BARBOSA, T. M. L. **Metabolismo secundário das plantas superiores e a alelopatia**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 1994.
- BARROS, J. A. C. **Avaliação da atividade antioxidante e antiproliferativa do extrato aquoso de frutas tropicais**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.
- BARUAH, N. C. et al. Sesquiterpene lactones of *Tithonia diversifolia*. Stereochemistry of the tagitinins and related compounds. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 1831–1835, 1979.
- BEN EL HADJ ALI, I.; GUETAT, A.; BOUSSAID, M. Chemical and genetic variability of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae), a North African endemic species. **Industrial Crops and Products**, v. 40, n. 1, p. 277–284, 2012.
- BERETTA, M. E. et al. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, 2008.
- BLUA, M. J.; HANSCOM, Z.; COLLIER, B. D. Glucocapparin variability among four populations *Oflsomeris arborea* Nutt. **Journal of chemical ecology**, v. 14, n. 2, p. 623–633, 1988.
- BOHLMANN, F.; BURKHARDT, T.; ZDERO, C. **Naturally Occurring Acetylenes**. 1. ed. London, New York: Academic Press, 1973.
- BOHM, B. A.; STUESSY, T. F. **Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)**. 1. ed. Vienna: Springer Vienna, 2001.
- BOTT, R. F.; LABUZA, T. P.; OLIVEIRA, W. P. Stability testing of spray- and spouted bed-dried extracts of *Passiflora alata*. **Drying Technology**, v. 28, n. 11, p. 1255–1265, 5 Nov. 2010.
- BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C. Bioavailability of Ferulic Acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 2, p. 222–227, Dec. 1998.
- BRASIL. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Ministério da Saúde. DAF/SCTIE/MS - RENISUS Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso: em 20/01/2018.
- BRASIL. Farmacopéia Brasileira. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 546, 2010.
- BRYANT, J. P., CHAPIN, F. S., KLEIN, D. R. Herbivore-Plant Interactions at Northern Latitudes. **Oikos**, v. 40, p. 357–368, 1983.
- BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2774–2779, Jun. 2001.
- BUSSAB, W. DE O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 1990.
- CAMINAL HOMAR, J. ¿Medicinas complementarias o alternativas? Un dilema para el sistema público. **Atención Primaria**, v. 35, n. 8, p. 389–391, May 2005.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749–760, Jan. 1997.
- CARVALHO, M. F. et al. Aplicação da análise multivariada em avaliações de divergência genética através de marcadores moleculares dominantes em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 339–346, 2009.
- CHADWICK, M. et al. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12780–12805, 19 Jun. 2013.
- CHAGAS-PAULA, D.A., OLIVEIRA, R.B., ROCHA, B.A., DA COSTA, F. B. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 210–

235, 2012.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Ethnobotany, Chemistry, and Biological Activities of the Genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 210–235, Feb. 2012.

CHIANG, Y.-M. et al. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 409–419, Dec. 2004.

CHIEN, S.-C. et al. Anti-diabetic properties of three common *Bidens pilosa* variants in Taiwan. **Phytochemistry**, v. 70, n. 10, p. 1246–1254, Jul. 2009.

CHRISTENSEN, L. P.; LAM, J. Acetylenes and related compounds in heliantheae. **Phytochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–49, Jan. 1991.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362–372, 1 Mar. 1999.

COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN, F. S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v. 230, n. 4728, p. 895–899, 22 Nov. 1985.

CORTÉS-ROJAS, D. F. et al. Bioactive compounds in *Bidens pilosa* L. populations: A key step in the standardization of phytopharmaceutical preparations. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 28–35, 2013.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. [s.l.] Columbia University Press, 1981.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2^a ed. New York: Columbia University Press, 1988.

CRUZ, COSME DAMIÃO; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2003.

CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400–409, 2012.

D ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.

DE LA LASTRA, C. A. et al. Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Bidens aurea*: Comparison with ranitidine and omeprazole. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 42, n. 3, p. 161–168, 1994.

DEBA, F. et al. Herbicidal and fungicidal activities and identification of potential phytotoxins from *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff. **Weed Biology and Management**, v. 7, n. 2, p. 77–83, 2007.

DECKER, E. . Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 241–248, 1998.

DI GIACOMO, C. et al. Effects of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray Extract on Adipocyte Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **Plos one**, v. 10, n. 4, 2015.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B. DOS; MELO, L. C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 427–432, 1999.

DUNN, G.; EVERRIT, B. S. **An introduction to mathematical taxonomy**. New York: Cambridge University Press, 1980.

FACANALI, R. et al. Genetic and chemical diversity of native populations of *Ocimum selloi* Benth. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 249–257, 2015.

FERNANDES, A. C.; RITTER, M. R. A família Asteraceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, 2009.

FERREIRA, M E; GRATTAPAGLIA, D. **Introducao ao uso de marcadores moleculares em analise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

Flora of Kaxil Kiuc. Disponível em: <http://chalk.richmond.edu/flora-kaxil-kiuc/b/Bidens_pilosa.html>. Acesso em: 13 fev. 2018.

- FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 13, p. 1925–1941, 2000.
- FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. H. The Use of Random Amplified Polymorphic. In: **Molecular genetic approaches in conservation**. New York: Oxford University Press on Demand, 1996. p. 504.
- GANJEWALA, D. et al. Plant polyacetylenic glycosides: occurrence, biosynthesis and biological activities. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 113–131, 2008.
- GAYLER, S. et al. A dynamical model of environmental effects on allocation to carbon-based secondary compounds in juvenile trees. **Annals of Botany**, v. 101, n. 8, p. 1089–1098, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GROMBONE-GUARATINI, M. T. et al. Sesquiterpene and polyacetylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae: Heliantheae) from Southeast of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 5, p. 479–486, 2005.
- HAENEN, G. R. M. M. et al. Peroxynitrite Scavenging by Flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 3, p. 591–593, 1997.
- HARBORNE, JB; BAXTER, H; MOSS, G. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2^o ed. London: Taylor & Francis, 1998.
- HARTWELL, J. L. **Plants Used Against Cancer: A Survey**. [s.l.] Quarterman Pub., Incorporated, 1982.
- HARZALLAH, A. et al. Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts juices of three figs (*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 255–267, 2016.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. v. 13, p. 572–584, 2002.
- HEINÄHO, M.; PUSENIUS, J.; JULKUNEN-TIITTO, R. Effects of different organic farming methods on the concentration of phenolic compounds in sea buckthorn leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7678–7685, 2006.
- HEINRICH, M. et al. Ethnopharmacology of mexican Asteraceae (Compositae). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 539–565, 1998.
- HERMS, D. A.; MATTSON, W. J. The dilemma of plants: To grow or defend. **The Quarterly Review of Biology**, v. 67, p. 283–335, 1992.
- HERMS, D. A. Effects of fertilization on insect resistance of woody ornamental plants: Reassessing an entrenched paradigm. **Environmental Entomology**, v. 31, n. 6, p. 923–933, 2002.
- HIRANSAI, P. et al. Anti-nitric oxide production, anti-proliferation and antioxidant effects of the aqueous extract from *Tithonia diversifolia*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 950–956, 2016.
- HODGINS, K. A. et al. Comparative genomics in the Asteraceae reveals little evidence for parallel evolutionary change in invasive taxa. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 9, p. 2226–2240, 2015.
- HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. **Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas**. Documentos 147. Campina Grande: EMBRAPA, 2006.
- HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. **Oecologia**, v. 107, n. 2, p. 160–169, 1996.
- HOLLMAN, P. C. ; KATAN, M. . Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9–10, p. 937–942, 1999.
- HRISTOZOV, D.; DA COSTA, F. B.; GASTEIGER, J. Sesquiterpene lactones-based classification of the family Asteraceae using neural networks and k -nearest neighbors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 1, p. 9–19, 2007.

- HSIAO, T. C. Plant Responses to Water Stress. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 519–570, 1973.
- JÄGER, A. K.; HUTCHINGS, A.; VAN STADEN, J. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 2, p. 95–100, 1996.
- JENSEN, S. L.; SÖRENSEN, N. A.; LARSEN, P. O. Studies related to naturally occurring acetylene compounds: Preliminary investigations in the genus *Bidens*: *Bidens radiata* Thuill and *Bidens ferulaefolia* (Jacq.) DC. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 15, p. 1885–1891, 1961.
- JONES, C. G.; HARTLEY, S. E. A protein competition model of phenolic allocation. **Oikos**, v. 86, n. 1, p. 27, 1999.
- JUAN, S.; PALLARDÓ, F. V.; VIÑA, J. Mitochondrial Oxidative Stress Plays a Key Role in Aging and Apoptosis. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, v. 49, n. 5, p. 427–435, 2000.
- JUNG, S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. **Plant Science**, v. 166, n. 2, p. 459–466, 2004.
- KARAM, T. K. et al. Carqueja (*Baccharis trimeris*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 280–286, 2013.
- KATTO, C. I. R.; SALAZAR, A. Botton de oro (*Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray) una fuente proteica alternativo para el tropic. **Livestock Research for Rural Development**, v. 6, n. 3, 1995.
- KAWANISHI, S.; HIRAKU, Y.; OIKAWA, S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 488, n. 1, p. 65–76, 2001.
- KHAN, M. A.; BASEER, A. Increased malondialdehyde levels in coronary heart disease. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 50, n. 8, p. 261–264, 2000.
- KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas- Funções, Absorção e Mobilidade. **Informações agronômicas**, v. 118, n. 2, p. 1–24, 2007.
- KONOVALOV, D. A. Polyacetylene compounds of plants of the Asteraceae family (Review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 9, p. 613–631, 2014.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.
- KUMARI, P. et al. A promising anticancer and antimalarial component from the leaves of *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, v. 75, n. 01, p. 59–61, 2009.
- KUO, Y.-H.; CHEN, C.-H. Sesquiterpenes from the leaves of *Tithonia diversifolia*. **Journal of natural products**, v. 61, n. 6, p. 827–828, 1998.
- KVIECINSKI, M. R. et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 69–75, Apr. 2008.
- KVIECINSKI, M. R. et al. Brazilian *Bidens pilosa* Linné yields fraction containing quercetin-derived flavonoid with free radical scavenger activity and hepatoprotective effects. **Libyan Journal of Medicine**, v. 6, n. 1, p. 5651, 2011.
- LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD : uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 87–92, 2002.
- LAGE, F. F. **Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em forrageiras**. p. 107, 2009.
- LEE, W. C. et al. Extraction of antioxidant components from *Bidens pilosa* flowers and their uptake by human intestinal CACO-2 cells. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1582–1601, 2013.
- LEMOS, A. DE O. **Alocação de recursos para crescimento versus defesa em espécies de Asteraceae**. RECIFE: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 2011.
- LEVIN, D. A.; YORK JR., B. M. The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 6, p. 61–76, 1978.

- LI, H. H. et al. Interactions of trans-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 8, p. 1775–1787, 1993.
- LIDON, F. C.; HENRIQUES, F. S. Changes in the contents of the photosynthetic electron carriers, RNase activity and membrane permeability, triggered by excess copper in rice. **PHOTOSYNTHETICA-PRAHA**, v. 28, p. 99, 1993.
- LOKAR, L. C. et al. Variation in terpene composition of *Artemisia alba* in relation to environmental conditions. **Biochemical systematics and ecology**, v. 15, n. 3, p. 327–333, 1987.
- LONG, C. et al. Bioactive flavonoids of *Tanacetum parthenium* revisited. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 567–569, 2003.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1999.
- LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil – Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas**. 3ª ed. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2000.
- LORENZI, H.; DE ABREU MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 1ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.
- MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food Antioxidants: Technological: Toxicological and Health Perspectives**. 1º ed. New York: Marcel Dekker, 1995.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.
- MANLY, B. F. J. **Multivariate statistical methods**. 2. ed. London: [s.n.].
- MARINHO, M. G. V.; BRITO, A. G.; CARVALHO, K. A.; BEZERRA-SANTO, C. R.; ANDRADE, L. H. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R. *Amburana cearensis* e cumarina imunomodulam os níveis de anticorpos antígeno-específico em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina. **Acta Farmaceutica Bonaerense Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 47–52, 2004.
- MCKEY, D. The distribution of secondary compounds within plants. In: ROSENTHAL, G. A.; JANZEN, D. H. (Ed.). **Herbivores. Their Interaction with Secondary Plant Metabolites**. New York: Academic Press, 1979. p. 55–133.
- MEISSNER, H. O. et al. Peruvian Maca (*Lepidium peruvianum*): phytochemical and genetic differences in three Maca phenotypes. **International Journal of Biomedical Science**, v. 11, n. 3, p. 131–145, 2015.
- MEYER, A. DA S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
- MIGUEL, M. G. Plantas aromáticas e medicinais como antioxidantes naturais: Métodos de análise. **Curso Teórico Prático**, p. 106–136, 2007.
- MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. [s.l.] S.C.K. Milach, 1998.
- MING, L. C. et al. Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil. **Diversos olhares em Etnobiologia, Etnoecologia e Plantas Medicinais**. (MFB Coelho, P. Costa Júnior & JLD Dpmbroski, org.). Unicen Publicações, Cuiabá, v. 1, p. 149–156, 2003.
- BRASIL. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE Bidens pilosa (Picão – preto)**. BRASÍLIA: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2015. v. 5
- MONTANARI, J. I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. Campinas-SP, 2002. Disponível em: <www.cpqba.unicamp.br %3Cacessado em 11 de novembro de 2016%3E> acessado em: 10 e janeiro de 2018.
- MORA, A. et al. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 4, p. 793–797, 1990.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411–424, 2004.

MORTON, J. F. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America – Bahamas to Yucatan**. Springfield: Charles C. Thomas, 1981.

MOURA, L.; ROQUE, N. Asteraceae no município de Jacobina, Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 4, p. 573–587, 2014.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273–300, 1990.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2001.

OLAYINKA, B. U.; RAIYEMO, D. A.; ETEJERE, E. O. phytochemical and proximate composition of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. **Annals. Food Science and Technology**, v. 16, n. 1, p. 195–200, 2015.

OLIVEIRA, F. . et al. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 39–42, 2004.

PANSERA, M. R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 6, p. 17–22, 2003.

PANTOJA P. K. D.; COLMENARES D. A. J.; ISAZA M. J. H. New caffeic acid derivative from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray butanolic extract and its antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1079–1085, 2017.

PASSONI, F. D. et al. Repeated-dose toxicological studies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray and identification of the toxic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 389–394, 2013.

PERCIFIELD, R. et al. Genetic Diversity in Hypericum and AFLP Markers for Species-Specific Identification of *H. perforatum* L. **Planta Medica**, v. 73, n. 15, p. 1614–1621, 2007.

PEREIRA, RENATA JUNQUEIRA; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 2179–4804, 2012.

PEREIRA, A. M. S. et al. Seasonal Variation in Coumarin Content *Mikania glomerata*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 7, n. 2, p. 1–10, 2000.

PEREIRA, P. S. et al. Sesquiterpene lactones from Brazilian *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1445–1448, 1997.

PÉREZ, A.L.C.; LARA, M.O.; DE VIVAR, A. R. Sesquiterpenoids and diterpenoids from *Tithonia longiradiata*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4227–4231, 1992.

PETERS, C. M. **Sustainable harvest of non-timber plant resources in tropical moist forest: an ecological primer**. Washington: The Biodiversity Support Program, 1994.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 3, p. 255–281, 1986.

Plant Systematics. Disponível em: <<http://www.plantsystematics.org/taxpage/0/0/79/genus/Tithonia.html>>. Acesso em: 2 feb. 2018.

RAMARATHNAM, N. et al. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 3, p. 75–82, 1995.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57–69, 2001.

RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 39, n. 1, p. 69–79, 1988.

REDL, K. et al. Anti-inflammatory active polyacetylenes from *Bidens campylothea*. **Planta Medica**, v. 60, p. 58–62, 1994.

- REDL, K.; DAVIS, B.; BAUER, R. Chalcone glycosides from *Bidens campylotheca*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 1, p. 218–220, Dec. 1992.
- RHOADES, D. F.; CATES, R. G. A general theory of plant antiherbivore chemistry. **Recent Advances in Phytochemistry**, v. 10, p. 168–213, 1976.
- RIBEIRO, R. S. et al. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–18, 2016.
- RIIPI, M. et al. Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? **Oecologia**, v. 130, n. 3, p. 380–390, 2002.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
- ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **Asteraceae: caracterização e morfologia floral**. Salvador: [s.n.].
- RUFINO, M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico**, 2007a.
- RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado técnico**, v. 125, p. 1–4, 2006.
- RUFINO, M. DO S. M. et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Comunicado técnico online, 2007b.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1985.
- ŠAMEC, D. et al. Genetic and phytochemical variability of six *Teucrium arduini* L. populations and their antioxidant/prooxidant behaviour examined by biochemical, macromolecule- and cell-based approaches. **Food Chemistry**, v. 186, p. 298–305, 2015.
- SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: A model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–11, 2016.
- SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121–137, 2002.
- SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, 2005.
- SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **The Botanical Review**, v. 48, n. 2, p. 121–594, 1982.
- SEKHER PANNALA, A. et al. Flavonoid B-Ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161–1168, 2001.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. 1. ed. São Paulo: Varela, 1996.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.
- SHERFF, E. E. **The genus Bidens - Part I - Botanical Series**. Chicago: Field Museum of NATURAL History, 1937. v. XVI
- SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista Nutrição**, v. 12, p. 5–19, 1999.
- SILVA, F. L. et al. Compilation of secondary metabolites from *Bidens pilosa* L. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1070–1102, 2011.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2^a ed. Porto Alegre: Editoras: UFRGS e UFSC, 1999.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre:

Artmed, 2017.

SKROCH, P.W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. **Analysis of genetic relationships using RAPD marker data**. Symposium on applications of RAPD technology to plant breeding. Anais.Minneapolis. Proceedings. Crop Science Society of America, 1992

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, v. 125, n. 1, p. 27–58, 1993.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOUZA, G. S. et al. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de gauco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas DOI: 10.5007/2175-7925.2011v24n3p1. **Biotemas**, v. 24, n. 3, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. **São Paulo, Nova Odessa, 704p**, 2008.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). **Plant Biochemistry**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 1997. p. 387–416.

TAIZ, LINCON; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAKABE, W. Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 6, p. 935–941, 2001.

TANIA P; CASTILO, M. et al. Antioxidant effect of plant extracts of the leaves of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray on the free radical DPPH. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 8, p. 1182–1189, 2016.

TEOW, C. C. et al. Antioxidant activities, phenolic and beta-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 829–838, 2007.

TOOR, R. K.; SAVAGE, G. P.; HEEB, A. Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 1, p. 20–27, Feb. 2006.

TOWERS, G. H. N.; WAT, C.-K. Biological activity of polyacetylenes. **Rev. Latinoamer. Quim**, v. 9, p. 162–170, 1978.

TUOMI, J., NIEMELÄ, P., HAUKIOJA, E., SIRÉN, S. & NEUVONEN, S. Nutrient stress. An explanation for plant antiherbivore responses defoliation. **Oecologia**, v. 61, p. 208–210, 1984.

UBILLAS, R. et al. Antihyperglycemic acetylenic glucosides from *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, v. 66, n. 01, p. 82–83, 2009.

VIDAL, R. A. et al. Relação entre distância geográfica e variabilidade genética de uma população de *Bidens* spp. com resistência aos herbicidas inibidores de ALS. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 149–155, 2006.

WANG, R.; WU, Q.-X.; SHI, Y.-P. Polyacetylenes and flavonoids from the aerial parts of *Bidens pilosa*. **Planta Medica**, v. 76, n. 09, p. 893–896, 2010.

WANG, S. Y.; MILLNER, P. Effect of different cultural systems on antioxidant capacity, phenolic content, and fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9651–9657, 2009.

WAT, C.-K.; JOHNS, T.; TOWERS, G. H. N. Phototoxic and antibiotic activities of plants of the asteraceae used in folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, n. 3, p. 279–290, 1980.

WAT, C. et al. Ultraviolet-mediated cytotoxic activity of phenylheptatriyne from *Bidens pilosa* L. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 1, p. 103–111, 1979.

WEDGE, D. E.; GALINDO, J. C. G.; MACÍAS, F. A. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. **Phytochemistry**, v. 53, n. 7, p. 747–757, 2000.

WEIDENHAMER, J. D.; CALLAWAY, R. M. Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 1, p. 59–69, 2010.

- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7213–7218, 1990.
- WHITE, T. C. R. A hypothesis to explain outbreaks of looper caterpillars, with special reference to populations of *Selidosema suavis* in a plantation of *Pinus radiata* in New Zealand. **Oecologia**, v. 16, p. 279–301, 1974.
- WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531–6535, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K. et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. p. 704–740, 1993.
- WILSON, E. O. (ED.). **Biodiversity**. Washington, D.C.: National Academies Press, 1988.
- WINK, M. Physiology of secondary product information in plants. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M. J. C. (Ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. 1. ed. Oxford: Clarendon, 1990.
- WONG, S. P. et al. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food chemistry**, v. 99, n. DECEMBER 2006, p. 775–783, 2015.
- WRIGHT, D. M. et al. Do leaves of plants on phosphorus-impoverished soils contain high concentrations of phenolic defence compounds? **Functional Ecology**, v. 24, n. 1, p. 52–61, 2010.
- XUAN, T. D.; KHANH, T. D. Chemistry and pharmacology of *Bidens pilosa*: an overview. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 46, n. 2, p. 91–132, 2016.
- YANG, H. L. et al. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 9, p. 1513–1521, 2006.
- YEMELE BOUBERTE, M. et al. Tithoniamarin and tithoniamide: a structurally unique isocoumarin dimer and a new ceramide from *Tithonia diversifolia*. **Natural Product Research**, v. 20, n. 9, p. 842–849, 2006.
- ZANUTTO, F. V. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/ultraviolet libraries. **Process Biochemistry**, v. 12, n. 2, p. 679–693, 2014.
- ZDERO, C.; BOHLMANN, F. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. **Plant Systematics and Evolution**, v. 171, n. 1–4, p. 1–14, 1990.
- ZHAO, G. J. et al. Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 250–254, 2012.

ANEXO A - Certificado de aprovação do comissão de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



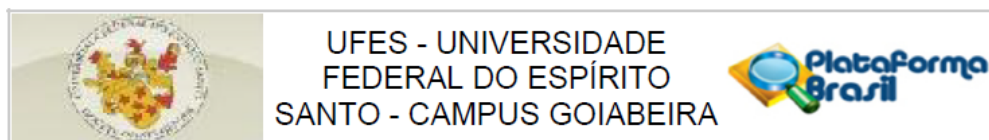
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização Fisiológica, Fitoquímica e de Atividades Biológicas de Plantas Medicinais com Potencial Econômico para Produção de Fitoterápicos", Protocolo nº.89/2015, sob a responsabilidade de Maria do Carmo Pimentel Batitucci que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 04-03-2016

Vigência do Projeto	Início: Abril/2016 Término:Fevereiro/2019
Espécie/Linhagem	Camundongos Swiss(Mus musculus)
Nº de Animais	Experimento Piloto:20 Protocolo Experimental:256 Total:276
Peso/Idade	Peso: 30-40g Idade:6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 04 de março de 2016.

ANEXO B - Parecer consubstanciado de aprovação pela comissão e ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do potencial mutagênico, antimutagênico e citotóxico de plantas medicinais utilizadas pela população capixaba em linfócitos humanos in vitro.

Pesquisador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 71093016.6.0000.5542

Instituição Proponente: Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.333.879

Apresentação do Projeto:

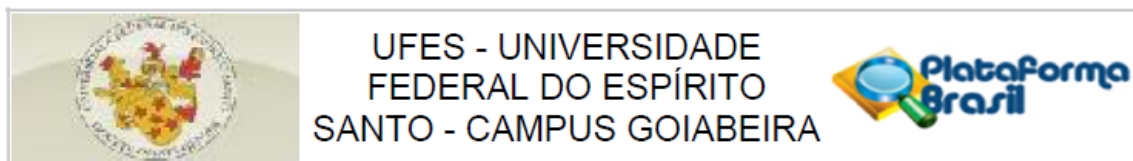
O projeto de pesquisa "Análise do potencial mutagênico, antimutagênico e citotóxico de plantas medicinais utilizadas pela população capixaba em linfócitos humanos in vitro" de Maria do Carmo Pimentel Batitucci, tem por objetivo avaliar o potencial mutagênico, antimutagênico e citotóxico do banco de extratos (e/ou de seus derivados) do Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica da UFES, produzidos a partir de espécies vegetais usadas como medicinais por meio de testes em células humanas (linfócitos) in vitro. Tem como hipóteses que plantas medicinais utilizadas pela população do Espírito Santo possuem efeito citotóxico em linfócitos humanos;-Plantas medicinais utilizadas no estado do Espírito Santo possuem efeito mutagênico em linfócitos humanos;-Plantas medicinais utilizadas no estado do Espírito Santo que não possuem efeito citotóxico em linfócitos, apresentam efeito antimutagênico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial mutagênico, antimutagênico e citotóxico do banco de extratos (e/ou de seus derivados) do Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica da UFES, produzidos a partir de espécies vegetais usadas como medicinais por meio de testes em células humanas (linfócitos) in vitro.

Endereço: Av. Fernando Ferrari,514-Campus Universitário, Prédio Administrativo do CCHN
Bairro: Goiabeiras **CEP:** 29.075-910
UF: ES **Município:** VITORIA
Telefone: (27)3145-9820 **E-mail:** cep.goiabeiras@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.333.879

Objetivo Secundário:

1- Avaliar possível ação mutagênica e antimutagênica dos extratos produzidos a partir de diferentes espécies vegetais utilizadas pela população do ES, em células sanguíneas humanas; 2- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos produzidos a partir de diferentes espécies vegetais utilizadas pela população do ES, através da análise de células sanguíneas humanas; 3- Avaliar a genotoxicidade de extratos produzidos a partir de diferentes espécies vegetais utilizadas pela população do ES, em células sanguíneas humanas; 4- Fornecer subsídios para o uso medicinal seguro de diferentes espécies vegetais utilizadas pela população.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora esclarece que o Projeto oferece riscos mínimos ao doador de sangue, por considerar a eventual possibilidade de hematoma (roxo ou vermelhidão) e/ou dor mínima na região onde ocorrerá a coleta. Esclarece, ainda, que para minimizar os riscos todos os procedimentos serão realizados por profissional da área e, em caso de algum mal estar, será prestado atendimento aos participantes. Após recomendação do Comitê de Ética, outros riscos foram incluídos como alergia derivada do processo de coleta de sangue, pergunta inserida no Questionário de Saúde Pessoal. Destaco, ainda, que foram esclarecidos na metodologia as dúvidas sobre como será o processo de coleta de dados, com as devidas explicações sobre a pesquisa será *in vitro*.

Em relação aos benefícios a pesquisa o trará à população em geral, pois indicará se os extratos de vegetais usados pela população como medicinais têm ação citotóxica, genotóxica e/ou mutagênica sobre células humanas, e ainda se esses extratos podem apresentar alguma atividade que possa prevenir mutações no DNA humano. Como desfecho primário, identificará a citotoxicidade, a genotoxicidade e a antimutagenicidade de extratos/derivados de espécies de plantas medicinais utilizadas no Estado do Espírito Santo.

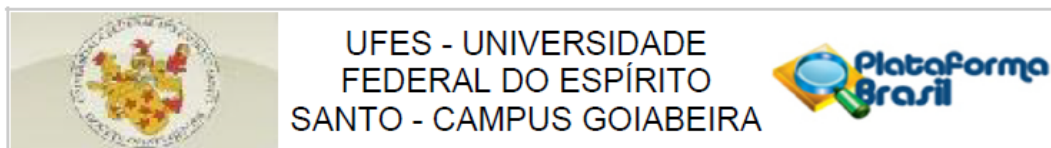
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante cientificamente e socialmente, e está bem delimitado com sólida argumentação teórica e metodológica. Destaco, ainda, que atendeu todas as recomendações apresentadas no Parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No TCLE, apresenta todas as informações necessárias em conformidade com a Resolução 466, de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, tais como: objetivos, procedimentos, riscos,

Endereço: Av. Fernando Ferrari, 514 - Campus Universitário, Prédio Administrativo do CCHN
 Bairro: Goiabeiras CEP: 29.075-910
 UF: ES Município: VITÓRIA
 Telefone: (27)3145-9820 E-mail: cep.goiabeiras@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.333.879

benefícios, indenização, ressarcimento. Além disso, esclarece os procedimentos da pesquisa e esclarece sobre o significado da pesquisa em in vitro.

Recomendações:

Levando em consideração que foram atendidas no Projeto as demandas apresentadas no parecer anterior sobre: 1) Critério de Inclusão; 2) Riscos; 3) Benefícios; 4) Metodologia, recomendo aprovação do Comitê.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado por esse comitê, estando autorizado a ser iniciado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_553693.pdf	05/09/2017 20:57:07		Aceito
Outros	Anexo1_05_09_2017.doc	05/09/2017 20:56:12	Maria do Carmo Pimentel Batitucci	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_05_09_2017.doc	05/09/2017 20:52:54	Maria do Carmo Pimentel Batitucci	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetocomitehumano_05_09_2017.doc	05/09/2017 20:52:37	Maria do Carmo Pimentel Batitucci	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	30/05/2017 10:54:18	Maria do Carmo Pimentel Batitucci	Aceito

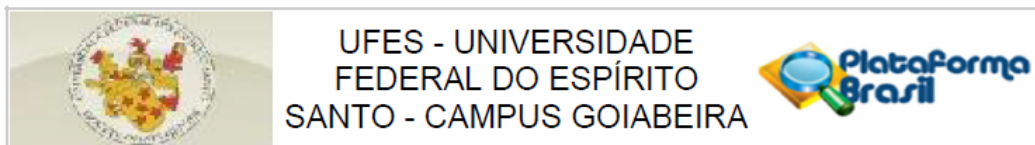
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Fernando Ferrari,514-Campus Universitário, Prédio Administrativo do CCHN
 Bairro: Goiabeiras CEP: 29.075-910
 UF: ES Município: VITORIA
 Telefone: (27)3145-9820 E-mail: cep.goiabeiras@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.333.879

VITORIA, 17 de Outubro de 2017

Assinado por:
Fabiana Pinheiro Ramos
(Coordenador)

Endereço: Av. Fernando Ferrari,514-Campus Universitário, Prédio Administrativo do CCHN
Bairro: Goiabeiras **CEP:** 29.075-910
UF: ES **Município:** VITORIA
Telefone: (27)3145-9820 **E-mail:** cep.goiabeiras@gmail.com