

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

**IRANY RODRIGUES PRETTI**

**INFLUÊNCIA DA DIVERSIDADE GENÉTICA, DE FATORES  
AMBIENTAIS E DA FENOLOGIA SOBRE O METABOLISMO  
SECUNDÁRIO DE *Tithonia diversifolia* HEMSL. (ASTERACEAE)**

VITÓRIA - ES

2018

IRANY RODRIGUES PRETTI

**INFLUÊNCIA DA DIVERSIDADE GENÉTICA, DE FATORES  
AMBIENTAIS E DA FENOLOGIA SOBRE O METABOLISMO  
SECUNDÁRIO DE *Tithonia diversifolia* HEMSL. (ASTERACEAE)**

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.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Pimentel Batitucci

VITÓRIA - ES

2018

[PÁGINA DA FICHA CATALOGRÁFICA]

**INFLUÊNCIA DA DIVERSIDADE GENÉTICA, DE FATORES  
AMBIENTAIS E DA FENOLOGIA SOBRE O METABOLISMO  
SECUNDÁRIO DE *Tithonia diversifolia* HEMSL. (ASTERACEAE)**

**IRANY RODRIGUES PRETTI**

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 04 de maio de 2018.

**Comissão Examinadora:**

---

**Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Pimentel Batitucci - UFES**  
Orientador e Presidente da Comissão

---

**Dr. Antelmo Ralph Falqueto - UFES**  
Examinador Interno

---

**Dr. Paulo Cezar Cavatte - UFES**  
Examinador Interno

---

**Dr<sup>a</sup>. Claudia Masrouah Jamal - UFES**  
Examinador Externo

---

**Dr. Ricardo Machado Kuster - UFES**  
Examinador Externo

*Ao Vau, com amor, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e toda sua equipe de profissionais pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e inovação do Espírito Santo (FAPES) pela concessão da bolsa e financiamento desta pesquisa;

Ao Laboratório de Análises Biomoleculares (LABIOM) da Universidade Federal do Espírito Santo pelo fornecimento de equipamentos e suporte técnico;

À minha orientadora Maria do Carmo, pela amizade, pelos ensinamentos pessoais e profissionais, por acreditar no meu potencial e, sobretudo, pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho. Obrigada pelas inúmeras vezes que me ajudou a encontrar soluções para os obstáculos que encontrei e por ser um exemplo de ética e comprometimento com a Ciência;

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Elias Terra Werner, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Masrouah Jamal, Prof. Dr. Paulo Cezar Cavatte e Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster, pela gentileza em aceitar compor a banca de avaliação deste trabalho;

À professora Claudia Masrouah Jamal pela colaboração nas análises de prospecção fitoquímica;

A todos os amigos do Laboratório de genética Vegetal e Toxicológica. Agradeço a cada um por toda convivência, amizade e ajuda ao longo de toda jornada. Agradeço à Juliana, pela amizade e ajuda com os protocolos de antioxidantes, ao Felipe pela parceria durante os experimentos com os camundongos, à Suiany, Mirieli e Mainã por toda ajuda nos experimentos e discussões sobre os protocolos, à Paula, Judá e Monique, por todo auxílio. Ao Jean agradeço imensamente pela disponibilidade, prontidão e boa vontade para ajudar sempre, seja nos experimentos, nas discussões, nas valiosas dicas ou com as revisões do inglês;

Meu agradecimento especial à amiga Anny! Muito obrigada pela sua disponibilidade incessante! Pela sua amizade, pelas horas intermináveis de experimentos no laboratório, pela busca contínua de conhecimento, pelos

questionamentos. Seu incentivo e apoio foram muito importantes ao longo dessa jornada. Orgulho de ter compartilhado com você mais essa conquista!

À minha mãe, avó e demais familiares, pela compreensão, apoio e força, e mesmo nos dias em que estive distante, sempre souberam estar presente;

Ao Vau, meu companheiro de todas as horas, por toda paciência, compreensão e amor durante todos esses anos. Você foi meu grande incentivador desde o início e, seu otimismo e apoio certamente contribuíram para a conclusão desta importante etapa da minha vida;

À Mel, minha companheira de viagem de quatro patas...você foi um presente!

À Deus, pela vida.

## RESUMO

*Tithonia diversifolia* pertence à família Asteraceae, é originária do México e encontra-se amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais. É uma planta utilizada em países da América Central, América do Sul, África e Ásia para o tratamento de doenças e enfermidades como diabetes, malária, abscessos, hematomas, infecções de pele, úlcera gástrica, diarreias, cólicas menstruais e feridas. Mais de 150 compostos foram isolados de *T. diversifolia*, sendo seus principais constituintes químicos as lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e compostos fenólicos derivados do ácido *trans*-cinâmico. Os metabólitos secundários atuam como uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais. A produção de metabólitos secundários é determinada por quatro fatores principais: genéticos, ontogênicos, morfogenéticos e ambientais. A qualidade do produto fitoterápico resulta da interação entre as condições do local de crescimento das plantas medicinais e as características genéticas da população. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a diversidade genética de populações de *T. diversifolia* através de marcadores genéticos, do tipo RAPD, bem como analisar a influência dos fatores ambientais e fenológicos na produção de compostos fenólicos, além da atividade antioxidante, citotóxica e mutagênica dessas plantas. Os resultados demonstraram altos níveis de diversidade genética, não positivamente correlacionado com a proximidade geográfica, sendo que a população de Santa Teresa (ST) apresentou menor similaridade em relação às demais. *T. diversifolia* se reproduz sexuadamente, com a produção abundante de sementes e grande variedade de insetos polinizadores, características que contribuem para uma maior variabilidade genética. Os teores de compostos fenólicos mostraram-se mais elevados na população de ST no estágio vegetativo, assim como, de modo geral, também apresentou a maior atividade antioxidante. Dentre os fatores ambientais considerados, a temperatura parece atuar de forma mais significativa na produção dos compostos fenólicos em *T. diversifolia*. A composição fitoquímica das espécies pode variar significativamente durante o ciclo fenológico. Portanto, é muito importante identificar e selecionar estágios ontogênicos ideais, para produção das maiores quantidades de compostos bioativos e garantia de homogeneidade da qualidade da matéria-prima. De forma geral, os maiores teores de compostos fenólicos foram encontrados nas plantas



coletadas no estágio vegetativo. O extrato avaliado apresentou maior atividade citotóxica sobre a linhagem celular cancerígena (S180), o que demonstra que o extrato atua de forma diferencial nas duas linhagens celulares avaliadas (S180 e linfócitos humanos). Essa característica ressalta que *T. diversifolia* apresenta potencial terapêutico para o desenvolvimento de novos fármacos. O extrato da planta investigada não mostrou atividade mutagênica em células de sangue periférico de camundongos. Este estudo indica que as variações fitoquímicas e antioxidantes entre as populações são influenciadas por fatores genéticos e pelo estágio fenológico, bem como pelas condições ambientais.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos • antioxidante • fatores ambientais • RAPD • citotoxicidade • mutagenicidade

## ABSTRACT

*Tithonia diversifolia* belongs to the Asteraceae family, is native from Mexico and widely distributed in tropical and subtropical regions. It is a plant used in countries of Central America, South America, Africa and Asia for the treatment of diseases as diabetes, malaria, abscesses, bruises, skin infections, gastric ulcer, diarrhea, menstrual cramps and wounds. More than 150 compounds were isolated from *T. diversifolia*, and their main chemical constituents are sesquiterpene lactones, flavonoids and phenolic compounds derived from trans-cinnamic acid. Secondary metabolites act as a chemical interface between plants and the surrounding environment, so their synthesis is often affected by environmental conditions. The production of secondary metabolites is determined by four main factors: genetic, ontogenic, morphogenetic and environmental. The quality of the phytotherapeutic product results from the interaction between the conditions of the growth site of the medicinal plants and the genetic characteristics of the population. The objectives of this work were to evaluate the genetic diversity of populations of *T. diversifolia* through RAPD genetic markers, as well as to analyze the influence of environmental and phenological factors in the production of phenolic compounds, besides the antioxidant, cytotoxic and mutagenic activity of these plants. The results demonstrated high levels of genetic diversity were found, not positively correlated with geographical proximity, and the population of Santa Teresa (ST) presented a lower similarity than the others. *T. diversifolia* reproduces sexually, with abundant seed production and a great variety of pollinating insects, characteristics that contribute to a greater genetic variability. The levels of phenolic compounds were higher in the ST population at the vegetative stage, as well as, in general, also showed the higher antioxidant activity. Among the environmental factors considered, the temperature seems to act more significantly in the production of phenolic compounds in *T. diversifolia*. The phytochemical composition of plants may vary significantly during the phenological cycle. Therefore, it is very important to identify and select ideal ontogenic stages, to produce the largest quantities of bioactive compounds and guarantee homogeneity of the quality of the raw material. In general, the highest levels of phenolic compounds were found in the plants collected at the vegetative stage. The extract showed a higher cytotoxic activity on the cancer cell line (S180), which shows that the extract acts differentially in the two cell lines evaluated (S180 and

human lymphocytes). This characteristic highlights that *T. diversifolia* presents therapeutic potential for the development of new drugs. The extract of the investigated plant showed no mutagenic activity in peripheral blood cells of mice. This study indicates that phytochemical and antioxidant variations among populations are influenced by genetic factors and phenological stage, as well as by environmental conditions.

**Keywords:** Phenolics compounds • antioxidant • environmental factors • RAPD • cytotoxicity • mutagenicity

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

Figura 1 - <i>Tithonia diversifolia</i> . (A) Visão geral da planta com capítulos. (B) Detalhes da inflorescência e as folhas acuminadas e serreadas.....	22
Figura 2 - Metabólitos secundários de <i>Tithonia diversifolia</i> . (A) Lactona sesquiterpênica (tagitinina C) (B) Luteolina (C) Derivado de Ácido cafeoilquínico (ácido 3,5-dicafeoilquínico).....	24
Figura 3 - Principais rotas do metabolismo secundário e suas inter-relações com o metabolismo primário .....	26
Figura 4 - Síntese dos metabólitos secundários a partir da glicose .....	27
Figura 5 - Principais fatores que influenciam a produção e acúmulo dos metabólitos secundários.....	29
Figura 6 - Estrutura química da unidade básica do grupo Fenol.....	33
Figura 7 - Rotas de síntese dos compostos fenólicos .....	34
Figura 8 - Estrutura química básica dos flavonoides composta por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma ponte de três carbonos.....	35
Figura 9 – (A) Estrutura orto-dihidroxi (catecol) no anel B; (B) Grupos hidroxila nas posições 3 e 5; (C) Ligação 2,3-dupla em conjugação com uma função 4-oxo no anel C.....	36
Figura 10 – Estrutura química de algumas classes de flavonoides.....	38
Figura 11 - Fórmula estrutural do ácido 5-cafeoilquínico e dos ácidos que compõem os ácidos clorogênicos por esterificação .....	39
Figura 12 - Estrutura química básica das cumarinas simples .....	40
Figura 13 - Biossíntese da cumarina a partir do ácido chiquímico .....	41
Figura 14 - Ácido gálico e ácido elágico precursores dos taninos hidrolisáveis. ....	43
Figura 15 - Estrutura química de unidades formadoras dos taninos condensados...43	
Figura 16 - Possíveis mecanismos de ação de um agente antioxidante: transferência de um átomo de Hidrogênio (1), doação de um elétron (2) e quelação de metais de transição, como o $Fe^{+2}$ (3).....	47
Figura 17 - Estabilização dos radicais livres DPPH* por antioxidantes.....	48
Figura 18 - Estabilização dos radicais livres por antioxidantes e sua formação pelo persulfato de potássio .....	49
Figura 19 - Redução do complexo TPTZ com $Fe^{3+}$ por ação de um antioxidante.....	49

Figura 20 - Estrutura química da Ferrozina .....	50
Figura 21 - Estrutura química do ácido linoleico.....	50
Figura 22 - Estrutura química do $\beta$ -caroteno.....	51
Figura 23 - Diagrama ilustrativo demonstrando a origem do micronúcleo a partir de um evento aneugênico (a) ou de um evento clastogênico (b).....	52

## Capítulo 1

Figure 1 - RAPD based dendrogram.. .....	84
Figure 2 - Relative antioxidant activity of <i>T. diversifolia</i> extracts and standards in $\beta$ -carotene/linoleic acid assay.....	94
Figure 3 - Principal components analysis (scores and loading plots, biplot) based on different phytochemical compounds analyzed in HAE of <i>T. diversifolia</i> and their antioxidant activity (DPPH, ABTS, FRAP, Chelating activity and $\beta$ -carotene) in the vegetative (A) and reproductive (B) stages .....	96
Figure 4 - Hierarchical clusters analysis based on phytochemical content and antioxidant activity of HAE from five <i>T. diversifolia</i> populations at vegetative (A) and reproductive (B) stages .....	97

## Capítulo 2

Figure 1: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) profiles of phenolic compounds in the fractions of <i>Tithonia diversifolia</i> extract: (a) profile obtained for chlorogenic acid (peak 1), routine (peak 2), quercetin (peak 3), luteolin (peak 4); (b) profile obtained for gallic acid and (c) profile obtained for coumarin. ....	119
Figure 2: The effect of HAE of <i>T. diversifolia</i> on the viability in lymphocytes human and S180 cells at $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for 48h.....	126

## LISTA DE TABELAS

### Revisão Bibliográfica

Tabela 1 - Classes de compostos fenólicos em plantas.....	33
---	----

### Capítulo 1

Table 1 - Environmental conditions data .....	77
Table 2 - Soil chemical analysis data .....	77
Table 3 - Phytochemical compounds of <i>T. diversifolia</i> in crude HAE from five locations in the vegetative and reproductive stages .....	85
Table 4 - Content of phenolic compounds of <i>Tithonia diversifolia</i> collected from five localities at vegetative and reproductive stages .....	89
Table 5 - Antioxidant activities of <i>Tithonia diversifolia</i> from five populations at vegetative and reproductive stages.....	91
Table 6 - Pearson correlation analysis between phenolic compound contents and antioxidant activities in the vegetative stage .....	98
Table 7 - Pearson correlation analysis between phenolic compound contents and antioxidant activities in the reproductive stage .....	98

### Capítulo 2

Table 1. Environmental conditions data. ....	111
Table 2. Phenolic compounds identified for HPLC-DAD in the different <i>T.diversifolia</i> populations during phenological phases (vegetative and reproductive). ....	118
Table 3. Pearson correlation analysis between phenolic compound contents and environmental factors in the vegetative stage. ....	120
Table 4. Pearson correlation analysis between phenolic compound contents and environmental factors in the reproductive stage.....	120
Table 5. Frequency of micronucleated normochromatic erythrocytes (MNNCE) in 1000 NCE of peripheral blood of Swiss albino mice treated with <i>T. diversifolia</i> extract and controls. ....	127

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	17
2. OBJETIVO GERAL .....	19
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
4.1. <i>Plantas medicinais</i> .....	20
4.2. <i>Tithonia diversifolia</i> .....	22
4.3. <i>Metabolismo secundário de plantas</i> .....	25
4.4. <i>Compostos fenólicos</i> .....	32
4.4.1. <i>Flavonoides</i> .....	35
4.4.2. <i>Ácidos fenólicos</i> .....	38
4.4.3. <i>Cumarinas</i> .....	39
4.4.4. <i>Taninos</i> .....	42
4.5. <i>Atividade antioxidante</i> .....	44
4.6. <i>Mutagênese e citotoxicidade</i> .....	51
4.6.1. <i>Teste do micronúcleo em sangue periférico de roedores in vivo</i> .....	52
4.6.2. <i>Ensaio do MTT</i> .....	53
5. REFERÊNCIAS.....	54
CAPÍTULO 1 .....	71
Abstract.....	73
1. Introduction .....	74
2. Material and methods .....	75
2.1. Chemicals and reagents .....	75
2.2. Plant material.....	76
2.3. Edaphoclimatic data .....	76
2.4. Genetic analysis using RAPD markers .....	77
2.5. Preparation of hydroalcoholic extracts.....	78
2.6. Phytochemical screening.....	79
2.7. Antioxidant activity assays.....	80
2.8. Statistical analysis .....	83
3. Results and discussion .....	83
3.1. Genetic variability .....	83
3.2. Phytochemical composition .....	85

3.3. Antioxidant activity .....	90
3.4. Explorative analyses: Principal component analysis (PCA) and Hierarchical cluster analysis (HCA) .....	94
4. Conclusion .....	98
5. References.....	99
CAPÍTULO 2 .....	106
Abstract.....	108
1. Introduction .....	109
2. Material and Methods .....	111
2.1. Plant material.....	111
2.2. Environmental conditions data.....	111
2.3. Preparation of hydroalcoholic extract.....	112
2.4. Fractionation of crude hydroalcoholic extract .....	112
2.5. Quantification of phenolics compounds by HPLC-DAD .....	113
2.6. Cytotoxicity <i>in vitro</i> .....	114
2.7. Mutagenic activity .....	115
2.8. Statistical analysis .....	116
3. Results and discussion .....	117
3.1. HPLC quantification of compounds.....	117
3.2 MTT .....	124
3.3 Micronucleus assay on peripheral blood of mice .....	126
Conclusion .....	128
References.....	128
ANEXO I.....	134
ANEXO II.....	138
ANEXO III.....	139



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas com fins terapêuticos, seja para tratamento, cura ou prevenção de doenças, constitui uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A partir da segunda metade do século XX, foi observada a expansão do uso de plantas, principalmente pelas populações de países em desenvolvimento. Essa intensificação da utilização de plantas medicinais está associada, entre outros fatores, à dificuldade de acesso aos medicamentos alopáticos e à crença popular de que o natural é inofensivo.

Apesar do aumento no uso de plantas medicinais pela população e crescente aceitação da fitoterapia pelos profissionais de saúde da atenção básica, no Brasil, a utilização de plantas medicinais, frequentemente, se baseia na coleta de espécies em seus locais de ocorrência natural, sejam nativas ou exóticas, o que pode levar a obtenção de um material vegetal com grande variabilidade química e, até mesmo ao desaparecimento de espécies em determinada região.

Os efeitos medicinais das plantas estão diretamente relacionados à produção de metabólitos secundários. Estes desempenham funções ecológicas de proteção contra herbívoros e patógenos, atração de polinizadores e dispersores de sementes, atuam na competição planta-planta (alelopatia) e em simbioses planta-microrganismo. Os metabólitos secundários atuam como uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, assim sua síntese é afetada por condições ambientais. Além dos fatores ambientais, os genéticos e o estágio fenológico também são determinantes na produção de compostos bioativos. Dentre os fatores ambientais estão: temperatura, altitude e disponibilidade de nutrientes no solo.

Muitos estudos apontam que os compostos fenólicos, expressivo grupo de metabólitos secundários, são responsáveis por diversas aplicações farmacológicas de plantas, sendo que, muitas vezes, estas aplicações tem sua origem nas propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas e taninos. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos está diretamente relacionado ao estado de hidroxilação dos seus anéis aromáticos, o que inclui o número e as posições dos grupos hidroxila e glicosilação ou outros substituintes. Os mecanismos das propriedades

antioxidantes são: a eliminação de radicais, quelação e estabilização de cátions divalentes e modulação de enzimas antioxidantes endógenas.

Desse modo, substâncias antioxidantes que minimizem o risco de desenvolvimento de patologias causadas por estresse oxidativo em sistemas biológicos possuem grande relevância. Apesar de serem muito estáveis, os antioxidantes sintéticos apresentam o uso restrito em muitos países, devido à possibilidade de causarem efeitos indesejáveis nos sistemas biológicos. Por outro lado, há grande interesse na pesquisa por antioxidantes naturais, que sejam seguros para o consumo humano.

A investigação quanto à mutagenicidade e citotoxicidade constituem etapas importantes na avaliação toxicológica de plantas para uso medicinal. Dentre estes, o teste do micronúcleo visa detectar e quantificar a ação mutagênica de agentes indutores por quebra cromossômica ou por disfunções do fuso mitótico. O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5difênil brometo de tetrazolina) é um dos mais empregados como indicador colorimétrico da viabilidade celular, avaliando-se a função mitocondrial da célula.

Assim, pesquisas que investiguem a interação entre as condições de crescimento, os fatores intrínsecos das plantas medicinais, como o estágio de desenvolvimento e as características genéticas da população podem sugerir condições que resultem na qualidade do produto fitoterápico final. Nesse sentido, o presente estudo avaliou a influência da diversidade genética, dos estágios fenológicos e dos fatores de ambiente no metabolismo secundário de *Tithonia diversifolia* oriundas de populações de diferentes regiões do Espírito Santo, além de analisar o potencial antioxidante, citotóxico e mutagênico.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da diversidade genética, dos estágios fenológicos e dos fatores de ambiente no metabolismo secundário de *Tithonia diversifolia* oriundas de populações de diferentes regiões do Espírito Santo/Brasil, além de analisar o potencial antioxidante, citotóxico e mutagênico do extrato hidroalcoólico.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a diversidade genética, por meio de marcadores RAPD, de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray de cinco populações do Espírito Santo;
- ✓ Verificar a influência dos fatores de ambiente (altitude, precipitação, temperatura e nutrientes) sobre os teores totais de compostos fenólicos (flavonoides, taninos e fenóis);
- ✓ Investigar a influência da fenologia sobre os teores totais de compostos fenólicos (flavonoides, taninos e fenóis);
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante (DPPH, ABTS; FRAP; atividade quelante do Fe<sup>+2</sup> e  $\beta$ -caroteno) de *Tithonia diversifolia* das diferentes populações em dois estágios fenológicos;
- ✓ Relacionar a variação dos teores de compostos fenólicos com a atividade antioxidante de *Tithonia diversifolia* das cinco populações avaliadas;
- ✓ Quantificar e comparar as concentrações de compostos fenólicos diferentes frações do extrato hidroalcoólico de *Tithonia diversifolia* das cinco populações no estágio vegetativo e reprodutivo, em HPLC;
- ✓ Avaliar a viabilidade celular de linfócitos humanos e de células de Sarcoma 180 de camundongos expostos aos extratos de *Tithonia diversifolia* das cinco populações, nos estágios vegetativo e reprodutivo, por meio do método MTT;
- ✓ Relacionar os índices de viabilidade celular com as diferentes concentrações de compostos fenólicos (luteolina, quercetina, rutina, ácido clorogênico, cumarinas e taninos).
- ✓ Avaliar o potencial mutagênico pelo teste do micronúcleo de extratos de *Tithonia diversifolia* em células de sangue periférico de camundongos.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. *Plantas medicinais*

O uso de plantas com fins terapêuticos, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). A utilização de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento tópico até àquelas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial (LORENZI; MATOS, 2002). O grande uso das plantas na terapêutica, em países como a Índia e a China, caracterizou uma tradição herbalista forte durante vários séculos. Entretanto, mais tarde, enquanto a medicina ocidental atingia maior proeminência, o uso de plantas medicinais teve declínio na Europa e na América do Norte (EVANS, 1997).

Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, foi observada a expansão do uso de plantas, principalmente pelas populações de países em desenvolvimento (JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). O crescimento da procura de drogas vegetais relaciona-se a vários fatores, como contra-indicações, efeitos colaterais e prejuízos ocasionados pelo uso abusivo e/ou incorreto de medicamentos sintéticos, o fato de camadas da população mundial não ter acesso aos medicamentos e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001). Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas mais diversas populações.

O uso empírico e pouco cuidadoso das plantas, fora de seu contexto original e sem respaldo científico, se mostra inadequado para a implantação da fitoterapia, como um sólido recurso terapêutico no atendimento de algumas das necessidades básicas dos serviços de saúde, como tem sido recomendado por órgãos governamentais (BERTOLUCCI; CAPPELLE; PINHEIRO, 2001).

A atenção dirigida à saúde, pelas autoridades e gestores, 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 pelos profissionais de saúde da atenção básica (HOMAR, 2005). Ainda assim, no Brasil, a utilização de plantas medicinais, frequentemente, se baseia na coleta de espécies em seus locais de ocorrência natural, sejam nativas ou exóticas, o que pode levar a obtenção de um material vegetal com grande variabilidade química e, até mesmo ao desaparecimento de espécies em determinada região (MING et al., 2003).

Apenas 8% das espécies vegetais brasileiras foram investigadas quanto aos seus compostos bioativos. Além disso, com a rapidez em que tem ocorrido a extinção das espécies vegetais, um grande número de plantas com ações medicinais podem desaparecer antes mesmo do apontamento de suas possíveis ações (SIMÕES et al., 1999), o que ressalta a importância no aumento de pesquisas nesta área do conhecimento.

Dentre as famílias botânicas de reconhecida importância medicinal, encontra-se a Asteraceae. Esta é uma família vegetal bem sucedida, com cerca de 23.000 espécies e 1.600 gêneros (ANDERBERG et al., 2007) e representa 10% da flora de angiospermas (WILSON, 1988). No Brasil, existem aproximadamente 2.000 espécies e 250 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2008), números que refletem a alta diversificação de suas espécies, tanto em hábitat e forma de vida, como também nos formas de polinização e dispersão de sementes (CRONQUIST, 1981).

O sucesso evolutivo de Asteraceae também é atribuído a um sistema químico de defesa bem desenvolvido, o qual inclui a produção de compostos secundários derivados (CRONQUIST, 1988), tais como: terpenoides como as lactonas sesquiterpênicas, alcaloides, fenóis e poliacetilenos. Além da importância ecológica, os compostos bioativos de Asteraceae tornam essa família relevante em aspectos bioquímicos, econômicos e terapêuticos (CHADWICK et al., 2013; HEINRICH et al., 1998). Dentre as espécies desta família, encontra-se a *Tithonia diversifolia*, que pertence à tribo Heliantheae e é amplamente utilizada para fins medicinais (FERNANDES; RITTER, 2009; MOURA; ROQUE, 2014).

#### 4.2. *Tithonia diversifolia*

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray é originária do México e encontra-se amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo América Central, América do Sul, além de África Tropical e sudeste da Ásia. Frequentemente, *T. diversifolia* é cultivada como uma planta ornamental devido à sua rusticidade e por apresentar grandes inflorescências amarelas (CHAGAS-PAULA et al., 2012). Conhecida como girassol mexicano, margaridão, mão-de-deus, entre outros nomes populares (KATTO; SALAZAR, 1995).

Planta anual, bianual ou perene, dependendo de seu habitat. Apresenta de 1 a 3 m de altura. As folhas são simples, alternadas, lobadas (ocasionalmente as folhas superiores não são lobadas), de ápices agudos ou acuminados e bordas serradas a denteadas, densamente pubescente na porção abaxial, com padrão de venação palmada. Possui inflorescências terminais e axilares, amarelas vistosas, reunidas em capítulos florais solitários, semelhantes aos girassóis, formadas durante o outono e inverno. As brácteas das inflorescências são amarelo alaranjadas de 3 a 6 cm (Figura 1) (ORWA et al., 2009; AKINOLA et al., 2000; ALVES; ROQUE, 2016).



Figura 1 - *Tithonia diversifolia*. (A) Visão geral da planta com capítulos. (B) Detalhes da inflorescência e as folhas acuminadas e serradas. (Fonte: Autora)

A propagação pode realizar-se por estaquia ou sementes, entretanto, as sementes possuem dormência tegumentar (MUOGHALU; CHUBA, 2005). Além disso, a espécie tolera condições de acidez do solo, apresenta rápido crescimento, baixa demanda por nutrientes e alta produtividade de biomassa (KATTO; SALAZAR, 1995).

*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, abscessos, hematomas, infecções de pele, úlcera gástrica, diarreias, cólicas menstruais e feridas (AJAO; MOTEETEE, 2017). Alguns trabalhos apresentam a validação de diversas ações biológicas como: toxicidade ao protozoário causador da malária, hepatoprotetora, quimiopreventiva contra o câncer, antiespasmódica, antidiabética, antiviral, citotóxica contra células tumorais, anti-inflamatória, inseticida e repelente (CHAGAS-PAULA, et al., 2012). Apesar de todas as ações descritas, algumas doses e formas de preparo podem ser tóxicas (PASSONI et al., 2013).

Esta espécie também é usada como ornamental, forrageira, assim como na fitorremediação e como fertilizante orgânico do solo (CHAGAS-PAULA, et al., 2012; RIBEIRO et al., 2016; AJAO; MOTEETEE, 2017). No entanto, *T. diversifolia* pode apresentar um efeito alelopático na germinação de sementes ou no crescimento de outras espécies (TONGMA; KOBAYASHI; USUI, 2001). Plantas invasoras podem apresentar vantagem frente às espécies nativas, em virtude de seus compostos secundários (ALLSTADT et al., 2012; WEIDENHAMER; CALLAWAY, 2010).

Mais de 150 compostos foram isolados de *T. diversifolia*, sendo seus principais constituintes químicos pertencentes às classes das lactonas sesquiterpênicas, flavonoides (CHAGAS-PAULA et al., 2012) e compostos fenólicos derivados do ácido trans-cinâmico (Figura 2) (ZHAO et al., 2012b).

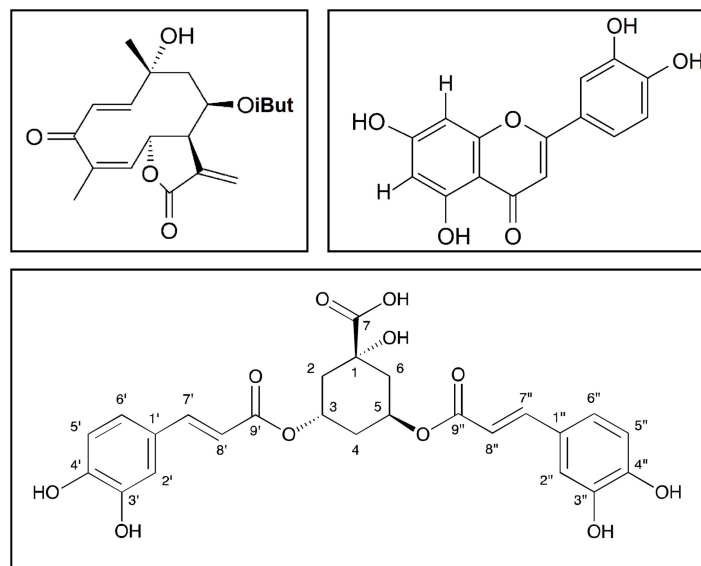


Figura 2 - Metabólitos secundários de *Tithonia diversifolia*. (A) Lactona sesquiterpênica (tagitinina C), adaptado de CHAGAS-PAULA et al. (2012). (B) Luteolina, adaptado de CHAGAS-PAULA et al. (2012). (C) Derivado de Ácido cafeoilquínico (ácido 3,5-dicafeoilquínico), adaptado de PULIDO et al. (2017).

Os constituintes alcaloides, flavonoides, fenóis, saponinas, taninos e terpenos são encontrados por toda a planta, porém são mais amplamente distribuídos nas folhas (EJELONU; ELEKOFEHINTI; ADANLAWO, 2017; OLAYINKA; RAIYEMO; ETEJERE, 2015). Vários ensaios biológicos e farmacológicos têm relatado seus efeitos medicinais, sendo que as atividades biológicas de *T. diversifolia* estão conectadas à presença de determinado metabólito secundário. Contudo, na análise dessas atividades, deve-se ainda considerar as diferentes formas de preparação dos extratos, tipo de solvente extrator e partes utilizadas da planta. Tais fatores podem contribuir para obtenção de extratos com diferentes constituintes químicos e, portanto, diferentes efeitos biológicos.

Oyewole et al. (2008) investigaram o potencial antimalárico de extratos aquosos, etanólicos e metanólicos de *T. diversifolia* em camundongos e, os resultados mostraram até 74% de efetividade contra os parasitas. Outros estudos indicam que a atividade antimalárica de *Tithonia* pode ser atribuída às lactonas sesquiterpênicas (CHADWICK et al. 2013; GOFFIN et al., 2002).

Há um crescente interesse pelos pesquisadores sobre o uso medicinal de *T. diversifolia* no tratamento da diabetes. Miura et al. (2005) relatou o efeito antidiabético do extrato etanólico desta planta em camundongos.



Eles encontraram que os extratos reduziram a glicemia e insulina plasmática após três semanas de administração oral. Thongsom et al. (2013) investigaram o efeito antidiabético do extrato aquoso, desta espécie, com o teste de tolerância de glicose e verificaram que houve redução significativa na glicemia de camundongos normais.

Estudos têm demonstrado que *T. diversifolia* apresenta atividade antimicrobiana contra uma série de patógenos (LINTHOINGAMBI; SINGH, 2013; ANTHONY et al., 2016). Ogundare (2007) e Omwenga et al. (2009) confirmaram a eficácia dos extratos clorofórmico e metanólico na inibição do crescimento de cepas de bactérias e fungos.

Estudo sobre o efeito citotóxico dos extratos aquoso e etanólico de *T. diversifolia*, utilizando larvas de *Artemia salina* foi investigado por Mayara et al. (2016). Ambos os extratos foram considerados não tóxicos. Hiransai et al. (2016) investigaram efeito citotóxico do extrato aquoso de *T. diversifolia* em uma linhagem celular cancerosa de ratos (RAW264.7) e células mononucleares de sangue periférico humano. Os autores concluíram que o extrato foi mais citotóxico para as células cancerosas que para as células saudáveis.

#### 4.3. *Metabolismo secundário de plantas*

Os componentes orgânicos produzidos pelas plantas são divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, e são representados pelos aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os metabólitos secundários podem ser definidos como moléculas orgânicas produzidas pelo vegetal, que não têm função direta nas reações do metabolismo basal tais como: fotossíntese, respiração, transporte celular, translocação, assimilação de nutrientes ou síntese de proteínas, lipídeos e carboidratos. Os metabólitos secundários são característicos de um determinado grupo de plantas, enquanto os metabólitos primários são produzidos por todo o reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2017).

A fotossíntese é a fonte de produção de unidades orgânicas básicas do ciclo vital das plantas. A respiração, através do metabolismo do carbono, libera a energia armazenada para o uso pelos demais componentes celulares e, ao mesmo tempo, gera muitos precursores para as diversas rotas metabólicas (TAIZ; ZEIGER, 2017). Os metabólitos secundários são derivados dos metabólitos primários e são originados por diferentes processos de síntese (Figura 3).

Os metabólitos secundários são classificados em três grupos principais: terpenos (ou isoprenoides), compostos fenólicos (fenilpropanoides e flavonoides) e compostos nitrogenados (alcaloides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos) (FANG et al., 2011).

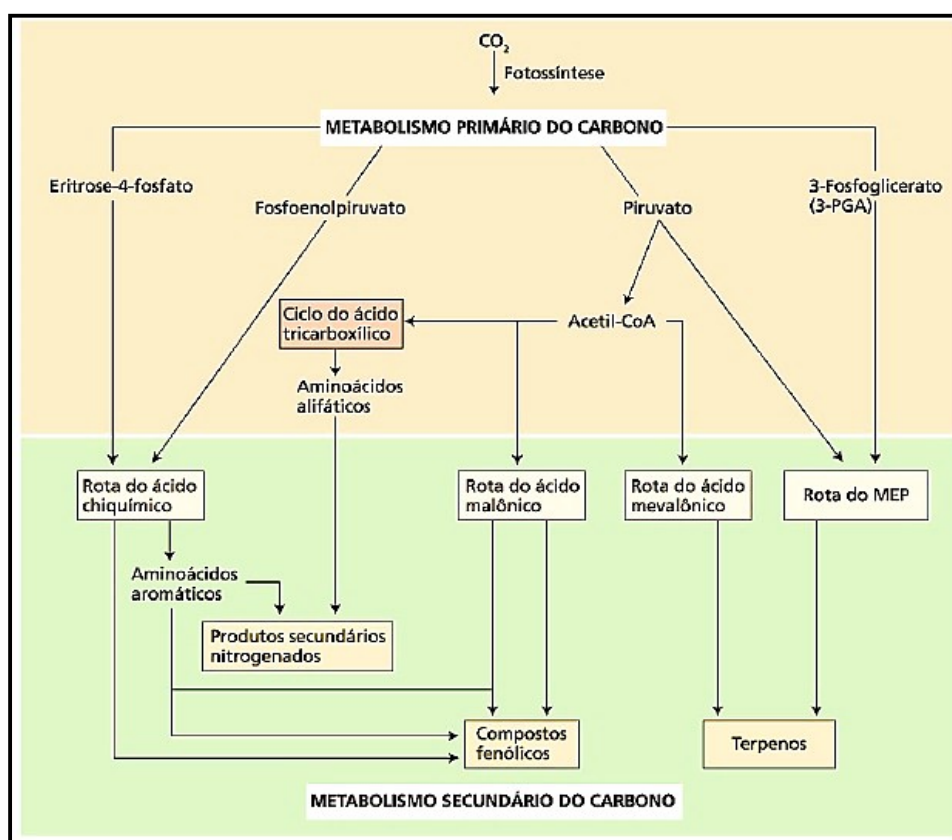


Figura 3 - Principais rotas do metabolismo secundário e suas inter-relações com o metabolismo primário (TAIZ; ZEIGER, 2009)

A partir do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Na glicólise, a partir da glicose são originadas moléculas de eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato, sendo que as últimas entram na via do ácido chiquímico, que forma os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos,

ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Além disso, após sucessivas reações de oxidação, a glicose é convertida em Acetil-Coenzima A (SIMÕES et al, 2017).

A Acetil-Coenzima A (acetil-CoA) pode seguir por três rotas diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato. Na via do ciclo do ácido cítrico, serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato origina os terpenóides e os esteróis. Na via de condensação do acetato são formados os derivados do acetato (LEMOS, 2011; SIMÕES et al., 1999). As rotas de produção de metabólitos secundários a partir do ácido chiquímico e da Acetil-Coenzima A são mostradas na figura 4.

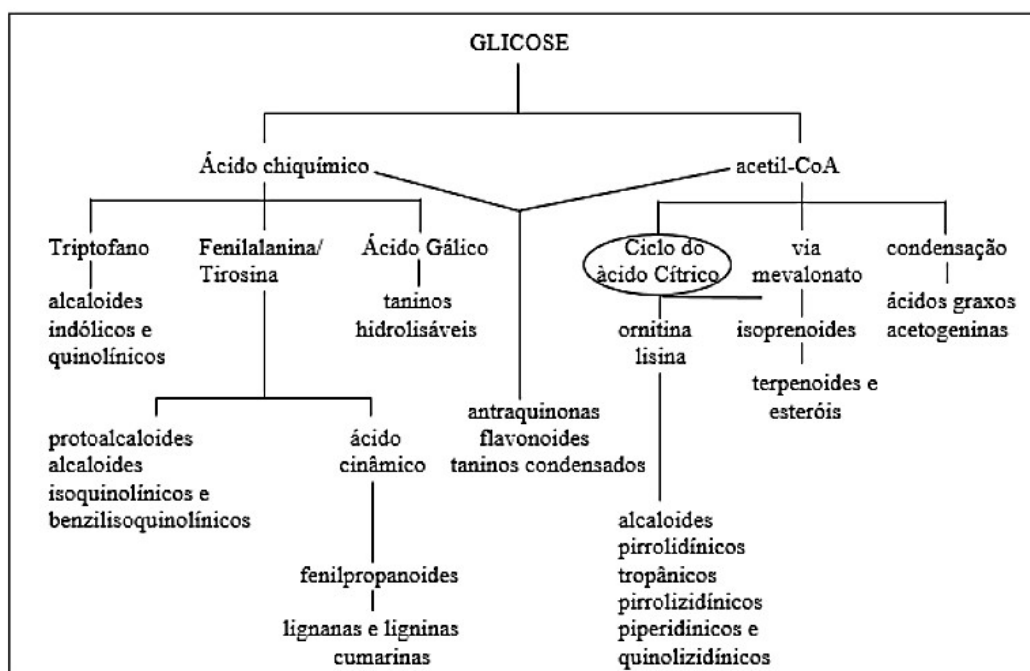


Figura 4 - Síntese dos metabólitos secundários a partir da glicose (SIMÕES et al., 1999)

Os metabólitos secundários desempenham as funções ecológicas de proteção das plantas contra herbívoros e patógenos, atração de polinizadores e dispersores de sementes, atuam na competição planta-planta (alelopatia) e em simbioses planta-microrganismo (TAIZ; ZEIGER, 2017). O conteúdo total dessas substâncias sofre variações temporais e espaciais, assim como as suas proporções relativas (sazonais e diários; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da produção desses

compostos estarem sob controle genético, a expressão pode sofrer modulações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (DARROW; BOWERS, 1997; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; HARTMANN, 1996). Os metabólitos secundários atuam como uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais. De fato, o acúmulo de metabólitos secundários ocorre com maior frequência em plantas sujeitas a pressões ambientais (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR 2011; SOUZA PINTO; KOLB, 2016). Dentre os fatores abióticos que podem alterar sua produção estão: temperatura, seca, salinidade, sazonalidade, ritmo circadiano, altitude, luz, radiação UV, íons metálicos e deficiências de nutrientes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; TLILI et al., 2014).

A produção de metabólitos secundários é o resultado da interação entre processos de síntese, transporte, armazenamento e degradação, e estes processos são influenciados por quatro fatores principais: genéticos, ontogênicos, morfogenéticos e ambientais (Figura 5) (VERMA; SHUKLA, 2015).

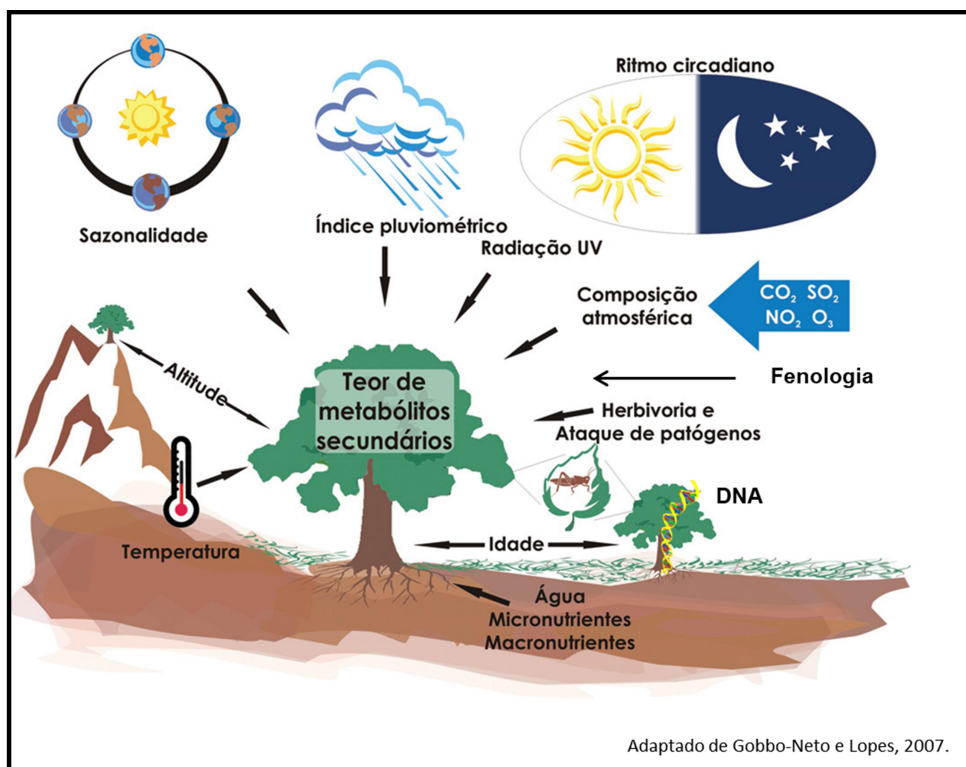


Figura 5 - Principais fatores que influenciam a produção e acúmulo dos metabólitos secundários (Adaptado de GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Como resposta às alterações fisiológicas, decorrentes de estresses bióticos ou abióticos, e fazer a manutenção do equilíbrio, os vegetais produzem os metabólitos secundários, dentre eles, compostos antioxidantes, como mecanismo de proteção (TAIZ; ZAIGER, 2017; OH; TRICK; RAJASHIKAR, 2009). Dessa forma, a produção diferenciada de metabólitos secundários é um dos principais componentes de resistência aos fatores externos (SMIRNOFF, 1998; SINGH; AGRAWAL 2015).

A temperatura é um dos fatores que exerce influência no desenvolvimento vegetal, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários. Em alguns trabalhos, menores temperaturas foram relacionadas com o aumento na produção de tais compostos com propriedades antioxidantes. Albert et al. (2009) submeteram *Arnica montana* L. a diferentes regimes de temperatura e radiação UV-B e, observaram que houve um aumento na síntese de flavonoides resultante da diminuição da temperatura em 5 °C. A concentração de metabólitos antioxidantes, como taninos e flavonoides, nas folhas de *Lafoensia pacari* também é alterada pelos fatores ambientais, com incremento na produção

desses compostos com a diminuição da temperatura (SAMPAIO et al., 2011).

Altitude, como um fator de ambiente, influencia no conteúdo de metabólitos secundários. Plantas estabelecidas em ambientes com maiores altitudes estão expostas a maior nível de radiação UV-B e frequentemente são induzidas a produzir compostos bioativos com função de proteção à radiação (ZIDORN, 2010). O potencial de eliminação de radicais livres dos compostos fenólicos também pode contribuir para a sua atividade protetora contra os danos causados pela radiação UV-B. Em estudo com *Arnica montana* cultivar ARBO, o teor de derivados do ácido cafeico se correlacionou positivamente com a altitude do local de cultivo (SPITALER et al., 2006).

Os nutrientes desempenham controle importante nas vias metabólicas dos vegetais. De acordo com a concentração em que são requeridos pelas plantas, os nutrientes podem ser classificados em: macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre e silício), encontrados em maiores concentrações e micronutrientes (boro, cloro, cobre, ferro, manganês, zinco, sódio, molibdênio e níquel), encontrados em menores quantidades (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Os micronutrientes atuam em muitas das reações bioquímicas de síntese de compostos fenólicos na rota do ácido chiquímico. Nessa via, desempenham funções como constituintes de grupos prostéticos em metaloproteínas e como ativadores de reações enzimáticas. Sua presença em grupos prostéticos permite que eles catalisem processos redox por transferência de elétrons (principalmente os elementos de transição Fe, Mn, Cu e Mo) (KIRKBY; RÖMHELD, 2007). Outros metais (como Zn), além de seu papel catalítico, desempenham um papel estrutural na estabilização de proteínas. Entretanto, quando presente em concentrações elevadas, as mesmas propriedades redox, que tornam os íons metálicos elementos essenciais, levam à formação de espécies reativas de oxigênio. Além disso, pode ocorrer a ligação ectópica de metais a proteínas, o que interfere na conformação estrutural de proteínas (HÄNSCH; MENDEL, 2009).

Dentre os macronutrientes, o fósforo é necessário para a biossíntese de metabólitos primários e secundários, uma vez que este elemento tem funções essenciais como constituinte de ácidos nucleicos e fosfolipídios (biomembranas) e desempenha um papel fundamental no metabolismo energético das células. Compostos fenólicos são metabolizados na via dos fenilpropanóides e enzimas como fenilalanina amônia-liase (PAL) e chalcona isomerase envolvidos na biossíntese de fenólicos são ativadas em plantas com grande disponibilidade de fósforo (NELLY et al., 2009).

Os vegetais mostram grande variabilidade no conteúdo de compostos fenólicos relacionados às condições de ambiente e estágio fenológico. Šamec et al. (2015) relataram que as condições climáticas-geográficas de uma localidade influenciam positivamente o acúmulo de compostos polifenólicos em *T. arduini*. Em outra pesquisa com espécies de *Vaccinium*, avaliou-se o teor total de fenólicos e apresentou grandes variações na quantidade destes compostos dependendo do estágio de colheita: floração e início da formação das bagas, desenvolvimento e amadurecimento das bagas (VENSKUTONIS et al., 2016). Além disso, VLAISAVLJEVIĆ et al. (2016) sugeriram que a diferença no conteúdo fenólico entre os estágios de crescimento do *Trifolium pratense* reflete as mudanças bioquímicas que ocorrem durante o crescimento, bem como as diferenças nas reações aos estresses bióticos e abióticos em diferentes estágios de crescimento.

A sazonalidade é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. Contudo, especialmente em estudos de campo e com plantas anuais, os efeitos da sazonalidade podem ser confundidos com alterações metabólicas sob controle do processo de desenvolvimento internamente controlado pela planta, devendo assim ser considerados em conjunto (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Investigação da metabolômica de *T. diversifolia* estabelecidas em duas localidades, durante 24 meses, revelou um padrão sazonal de produção metabólitos primários e secundários (açúcares, lactonas sesquiterpênicas e compostos fenólicos), correlacionado com a precipitação e a temperatura. Por outro lado, nas inflorescências e raízes, a distribuição dos metabólitos

foi mais influenciada pela variação de alguns nutrientes do solo, como cálcio, magnésio, fósforo, potássio e cobre (SAMPAIO; EDRADA-EBEL; DA COSTA, 2016).

Assim como a influência dos fatores de ambiente e estágio fenológico, a diversidade genética é determinante na produção e acúmulo diferencial de metabólitos vegetais. Frequentemente, estudos que comparam a diversidade química e genética de plantas medicinais utilizam técnicas de quantificação de metabólitos secundários e análises de marcadores moleculares do tipo RAPD (BEN EL HADJ ALI; GUETAT; BOUSSAID, 2012; FACANALI et al., 2015; MEISSNER et al., 2015; ŠAMEC et al., 2015). Essas pesquisas avaliam o teor de compostos químicos vegetais e a fonte de variação na produção destes.

A qualidade do produto fitoterápico resulta da interação entre as condições do local de cultivo adotadas na produção das plantas medicinais e as características genéticas da população. Essa interação ressalta a importância de que os indivíduos que compõem a população a ser cultivada possuam similaridade genética, a fim de obter matéria prima quimicamente homogênea e garantir a qualidade necessária para a viabilização comercial da técnica da produção (MONTANARI, 2002). A investigação genética de plantas medicinais também pode estabelecer marcadores que possibilitem autenticar e rastrear a origem da matéria prima de medicamentos à base de produtos vegetais (PERCIFIELD et al., 2007).

#### *4.4. Compostos fenólicos*

Os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxila (Figura 6), e variam de moléculas simples a compostos altamente polimerizados. Representam em torno de 10.000 compostos de grande diversidade química e funcional nos vegetais (TAIZ; ZEIGER 2017).



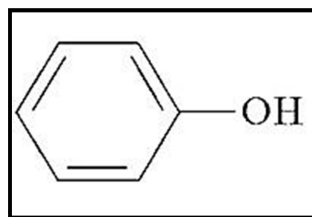


Figura 6 - Estrutura química da unidade básica do grupo Fenol.

Estes compostos apresentam grande diversidade estrutural e estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes, como mostrado na Tabela 1. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007).

Tabela 1 - Classes de compostos fenólicos em plantas (ANGELO; JORGE, 2007).

<b>Classe</b>	<b>Estrutura</b>
Fenólicos simples, benzoquinonas	$C_6$
Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6-C_1$
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	$C_6-C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	$C_6-C_3$
Nafitoquinonas	$C_6-C_4$
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignananas, neolignananas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Os compostos fenólicos são sintetizados por diferentes vias metabólicas (Figura 7), sendo nas plantas a mais expressiva a rota do ácido chiquímico (TAIZ; ZEIGER, 2017). Essas rotas biossintéticas, que não estão presentes em animais, formam aminoácidos aromáticos essenciais: a fenilalanina e o triptofano (SIMÕES et al., 1999). As classes mais abundantes de compostos fenólicos são derivadas da fenilalanina, aminoácido aromático sintetizado na via do ácido chiquímico (TAIZ; ZEIGER, 2017). O ácido chiquímico é formado pela condensação entre o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, dois metabólitos da glicose (SIMÕES et al., 1999).

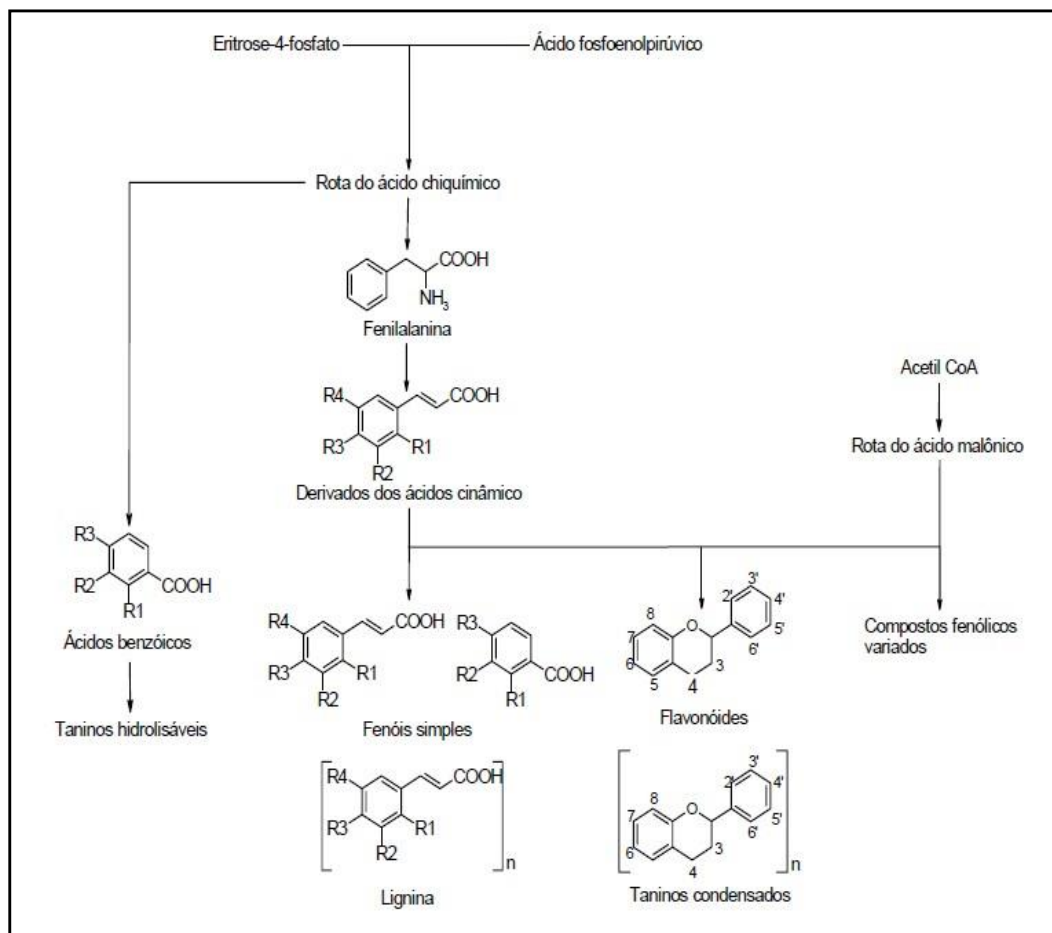


Figura 7 - Rotas de síntese dos compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os compostos fenólicos são geralmente relacionados a respostas de defesa na planta. Contudo, desempenham papel importante em outros processos, como por exemplo, na polinização, na coloração para camuflagem e defesa contra herbívoros bem como atividades antibacterianas e antifúngicas (LIN et al., 2016). Em adição, suas funções fisiológicas e farmacológicas podem ter origem em suas propriedades antioxidantes. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos está diretamente relacionado ao estado de hidroxilação dos seus anéis aromáticos, o que inclui o número e as posições dos grupos hidroxila e glicosilação ou outros substituintes. Os mecanismos das propriedades antioxidantes são: a eliminação de radicais, quelação e estabilização de cátions divalentes e modulação de enzimas antioxidantes endógenas (HUANG; CAI; ZHANG, 2009; OZCAN et al., 2014).

#### 4.4.1. Flavonoides

Os flavonoides são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídios (ligados a açúcares) ou agliconas (na forma livre). São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6–C3–C6 (ANGELO; JORGE, 2007).

A estrutura química desses compostos consiste em dois anéis aromáticos, anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, o anel C (Figura 7). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (SIMÕES et al, 2017). Variações em substituição do anel C originam importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides. Estas substituições incluem oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação (HOLLMAN; KATAN, 1999).

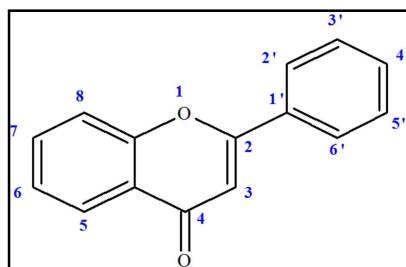


Figura 8 - Estrutura química básica dos flavonoides composta por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma ponte de três carbonos.

Dentre as funções atribuídas aos flavonoides nas plantas estão: proteção à radiação UV, proteção ao ataque de 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 microrganismos fixadores de nitrogênio (SIMÕES et al., 2017).

Estudos apontam importantes atividades biológicas dos flavonoides como anticarcinogênicos, anti-inflamatórios, antioxidantes (YANG et al., 2013; YAN et al., 2014), antivirais, anti-hipertensivos, anti-isquêmicos

(SCHREUDER et al., 2014), anti-hiperglicêmicos, antiolesterolêmicos (PIRIE et al. 2014; TORREZAN et al., 2008), hepatoprotetor (DONG et al., 2013), além de apresentarem efeitos benéficos nos distúrbios da pós-menopausa (KURZER, 2000) e no retardo de doenças neurodegenerativas (DAS et al., 2017; XU et al., 2013).

As principais características estruturais dos flavonoides necessárias para a eliminação eficiente de radicais são: a) estrutura orto-dihidroxi (catecol) no anel B, para deslocalização de elétrons; b) ligação dupla 2,3 em conjugação com uma função 4-oxo no anel C fornece deslocalização de elétrons do anel B; c) grupos hidroxila nas posições 3 e 5 fornecem hidrogênio ligação ao grupo oxo. Estas características estruturais estão evidenciadas na Figura 8.

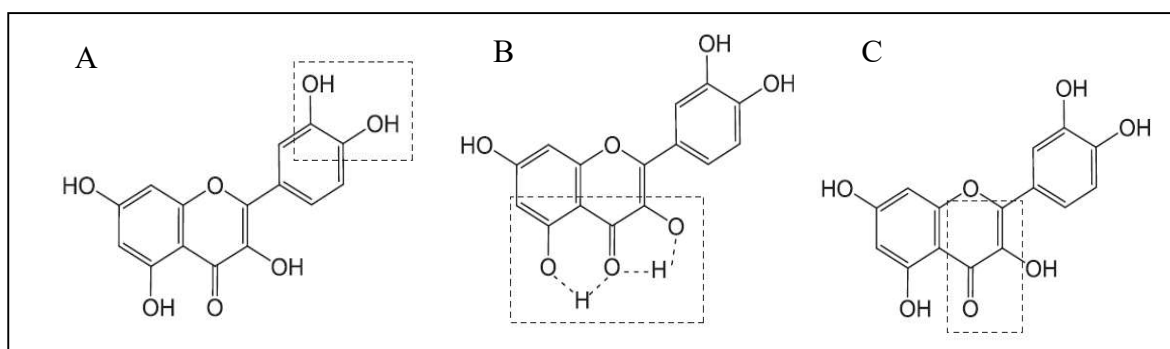


Figura 9 – (A) Estrutura orto-dihidroxi (catecol) no anel B; (B) Grupos hidroxila nas posições 3 e 5; (C) Ligação 2,3-dupla em conjugação com uma função 4-oxo no anel C

O grande número de flavonoides existentes é classificado em diferentes classes, de acordo com suas características químicas e estruturais (SIMÕES et al., 2017).

Flavonas e flavonóis possuem origem biossintética muito semelhante. Os flavonóis são flavonas substituídas na posição C3 por uma hidroxila (DORNAS, 2007). Apigenina e luteolina, livres (agliconas) ou conjugadas (heterosídeos) são as flavonas mais abundantes encontradas nas plantas. Os flavonóis mais encontrados em vegetais são canferol, quercetina e miricetina, os quais estão presentes, por exemplo, no chá preto (*Camellia sinensis* L). Estudos sobre atividade estrutural apontam que a presença de uma hidroxila na posição C3 do anel heterocíclico e um catecol no anel B favorecem a atividade antioxidante (PIETTA, 2000). 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).

Flavonoide c-heterosídeo é formado quando a ligação entre o açúcar e flavonoide é feita entre os carbonos C1 do açúcar e um ou dois carbonos do anel A do flavonoide (C6 e/ou C8). Flavonoides c-heterosídeos derivados de flavonas são identificados ainda em: flavanonas, chalconas, isoflavonas, proantocianidinas, entre outros (SIMÕES et al., 2017).

Antocianidinas são pigmentos responsáveis pelas cores laranja, azul, roxa, vermelho e violeta encontrada em flores, frutos, folhas, caules e tubérculos (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006). Caracterizadas pelo núcleo flavílico que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos, que é condensada por um oxigênio. Pesquisas têm demonstrado que as antocianidinas são compostos bioativos e que possuem capacidade antioxidante, entre vários outros efeitos farmacológicos (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003).

As flavanonas são intermediárias biossintéticas da maioria das classes de flavonoides. Pequenas modificações na molécula, sejam nas posições ou na natureza dos açúcares ou outros substituintes no anel A e/ou B, podem produzir grandes alterações nas propriedades físicas, e por conseguinte, nas propriedades farmacológicas (DORNAS et al., 2007). Esses flavonoides são caracterizados pela ligação simples entre os carbonos 2 e 3 em seu núcleo fundamental hidrogenado, como consequência apresentam centros de assimetria em suas moléculas. Hesperedina, naringenina e naringina são algumas das flavanonas frequentes em vegetais (SIMÕES et al., 2017).

Isoflavonóides apresentam variação estrutural não somente entre o número e tipos dos substituintes, mas também nos níveis de oxidação do anel. Os representantes mais comuns são a daidzeína, a genisteína e o cumestrol. Ao contrário das outras classes de flavonoides, sua distribuição taxonômica é restrita. Grande parte dos isoflavonoides apresentam ação de fitoalexinas, substâncias produzidas pelas plantas em resposta a uma

infecção (SIMÕES et al., 1999). Exercem efeito sobre metabolismo de hormônios sendo considerados fitoestrógenos (KURZER, 2000).

A figura 10 mostra alguns exemplos dos diversos tipos de flavonoides e seus respectivos radicais de substituição.

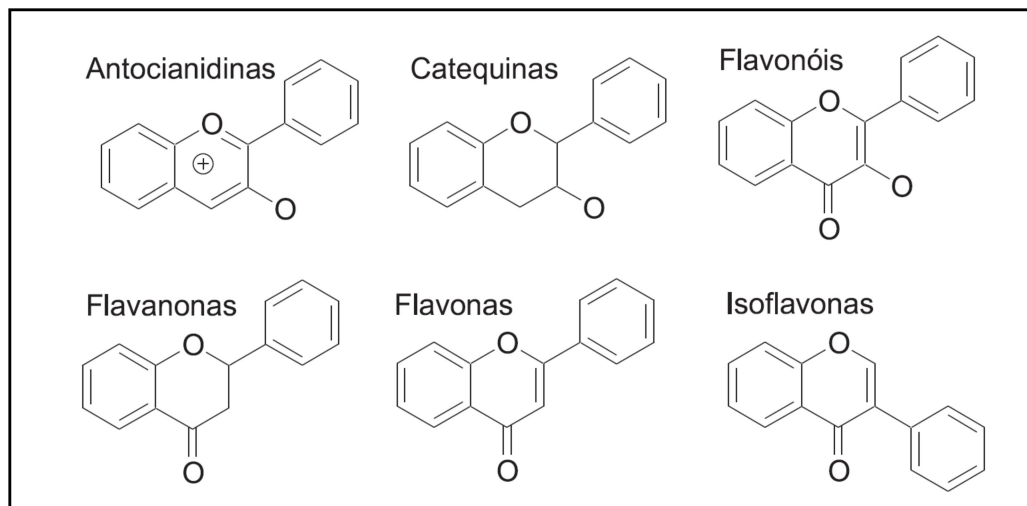


Figura 10 – Estrutura química de algumas classes de flavonoides.

#### 4.4.2. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes (SOARES, 2002a). Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, os quais têm estrutura comum, C6–C1. Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3), sendo os exemplos mais comuns os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Os ácidos hidroxibenzóico são componentes dos taninos hidrolisáveis e menos abundantes nos vegetais consumidos pelos humanos (MANACH et al., 2004). De outro modo, os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal, na forma livre ou esterificada, como o tomate, cerveja café, erva mate, maçã, ameixa e outras frutas, crucíferas, cereais, entre outros (BOURNE; RICE-EVANS, 1998; CLIFFORD, 1999).

Os ácidos clorogênicos são formados pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos trans-cinâmicos: o ácido cafeico (3,4-dihidroxicinâmico), o ferúlico (3-metoxi, 4-hidróxi), sinápico (3,5-dimetóxi, 4-hidróxi) ou o p-cumárico (4-hidróxi). A figura 11 exemplifica um ácido clorogênico e alguns dos ácidos fenólicos que formam os ácidos clorogênicos por esterificação.

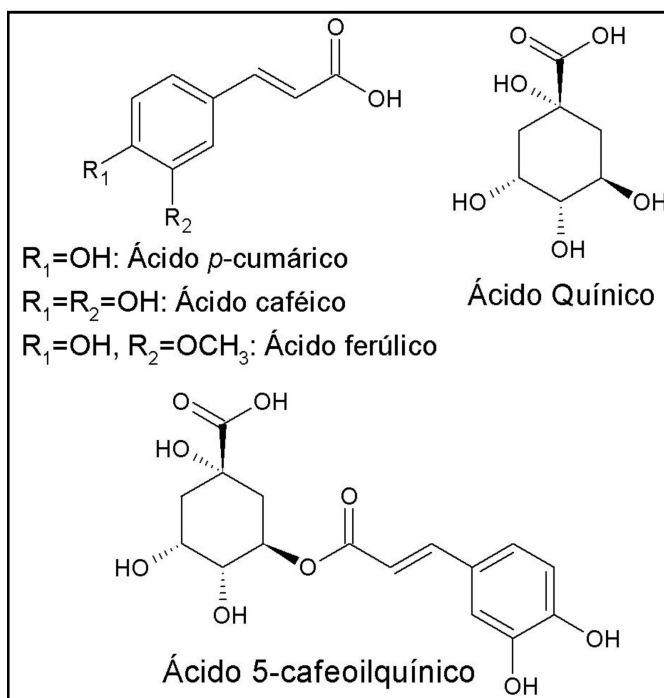


Figura 11 - Fórmula estrutural do ácido 5-cafeoilquínico e dos ácidos que compõem os ácidos clorogênicos por esterificação.

Alguns ácidos fenólicos têm suas propriedades antioxidantes reconhecidas, como o ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido ferúlico (SIMÕES et al., 1999). A atividade antioxidante desses compostos está relacionada às características 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).

#### 4.4.3. Cumarinas

As cumarinas são amplamente distribuídas no reino vegetal e estão presentes em quantidades notáveis em várias famílias como Umbelliferae, Rutaceae e Asteraceae (BORGES et al., 2005). A ocorrência de cumarinas em Asterales é bastante significativa, porém cabe a observação que as

cumarinas de Asteraceae são praticamente de um único tipo, cumarinas simples (RIBEIRO; KAPLAN, 2002). Estas podem ser encontradas em outras espécies de vegetais, fungos e bactérias. O representante mais simples é a 1,2-benzopirona. A estrutura química básica das cumarinas está esquematizada na figura 12.

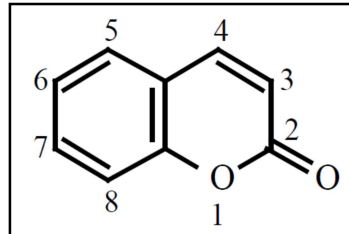


Figura 12 - Estrutura química básica das cumarinas simples.

São derivadas da fenilalanina e um dos seus primeiros precursores é o ácido cinâmico (SIMÕES et al., 1999). A fenilalanina sofre ação da fenilalanina amônia-liase (PAL), a qual retira uma amônia da fenilalanina, e dá origem ao ácido cinâmico, que por sua vez origina o ácido o-cumárico. No ácido cinâmico ocorre a isomerização cis/trans, catalisada pela luz. O ácido o-cumárico sofre, em seguida, glicosilação e isomerização cis/trans, o que é fundamental para o processo de lactonização e formação final da cumarina (Figura 13) (CZELUSNIAK et al., 2012).



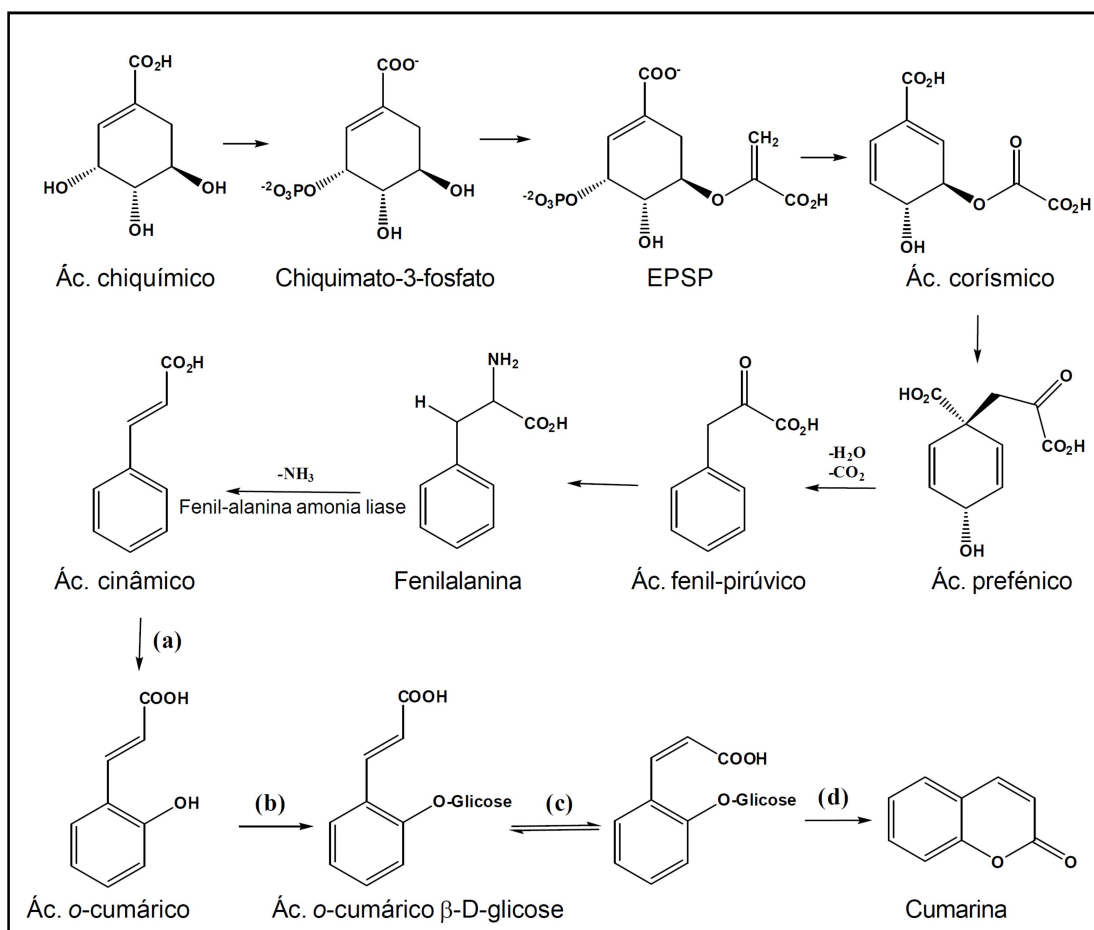


Figura 13 - Biossíntese da cumarina a partir do ácido chiquímico (CZELUSNIAK et al., 2012).

Cumarinas desempenham funções importantes na bioquímica e fisiologia vegetal, como antioxidantes, inibidores de enzimas e precursores de substâncias tóxicas, reguladores de crescimento e defesa contra infecções. Nos sistemas biológicos, esses compostos possuem potencial anti-inflamatório, antioxidante, antialérgico, hepatoprotetor, antitrombótico, antiviral e anticarcinogênico. As hidroxycumarinas são compostos fenólicos típicos e, portanto, atuam como potentes quelantes de metais e sequestradores de radicais livres. Contudo, como as cumarinas são extremamente variáveis em sua estrutura, devido aos vários tipos de substituições em sua estrutura básica, podem ocorrer mudanças sua atividade biológica de acordo com o padrão de substituição (KOSTOVA, 2005). Ressalta-se ainda a relevante importância farmacêutica, pois apresentam, baixa toxicidade para sistemas celulares de mamíferos (SIMÕES et al., 1999).

#### 4.4.4. Taninos

Os taninos são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004). A ligação entre taninos e proteínas ocorre através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e alguns sítios das proteínas, o que confere estabilidade ao complexo. Nas plantas, estes compostos secundários atuam como inibidores da herbivoria e como agentes antimicrobianos (MONTEIRO et al., 2005).

Na forma não oxidada, os taninos se transformam 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. Os taninos são encontrados principalmente nos vacúolos das plantas. Nestes locais, pouco interferem no metabolismo da planta, e somente após lesão ao tecido vegetal, exibem metabolismo eficiente (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; SIMÕES et al., 2017).

São produzidos por ampla variedade de espécies vegetais, podem ser encontrados nas raízes, na casca, nas folhas, nos frutos, nas sementes e na seiva. O teor e o tipo de tanino variam, não só de um vegetal para outro como também entre partes de um mesmo vegetal, além de variações em função das condições ambientais (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004).

Segundo a estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de ácidos gálicos e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do ácido chiquímico, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são mais frequentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico resulte da ligação entre dois ácidos gálicos (Figura 14) (MONTEIRO et al., 2005; SIMÕES et al., 2017).

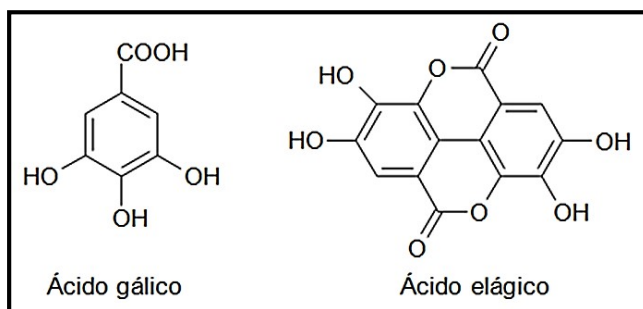


Figura 14 - Ácido gálico e ácido elágico precursores dos taninos hidrolisáveis (Fonte: LAGE, 2009).

Amplamente encontrados no reino vegetal, os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do fenilpropanol. As proantocianidinas apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e a estereoquímica de seus compostos (Figura 15) (MONTEIRO et al., 2005).

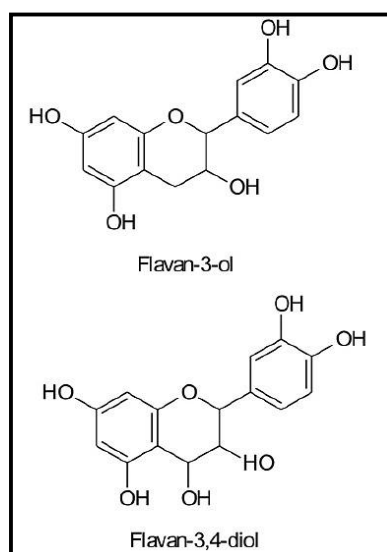


Figura 15 - Estrutura química de unidades formadoras dos taninos condensados (Fonte: ANGELO; JORGE, 2007).

Muitas das aplicações biológicas dos taninos estão relacionadas às suas propriedades adstringentes. As principais ações são: antidiarreica, antimicrobiano, antifúngico. Ademais, como precipitam alcalóides, podem servir de antídoto em casos de intoxicações. Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre

tecidos epiteliais lesionados. Provavelmente, devido à habilidade de ligar-se às proteínas e outras macromoléculas, os taninos também apresentam atividades tóxicas. Outro mecanismo de toxicidade, que pode envolver os taninos, deve-se ao fato desses complexarem-se com facilidade a íons metálicos. Sistemas biológicos, incluindo microrganismos, necessitam de íons metálicos como cofatores enzimáticos. (MONTEIRO et al., 2005; PANSERA et al., 2003).

Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais livres, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis. Esse mecanismo ressalta a relevância desses compostos na prevenção e no tratamento de doenças degenerativas (SIMÕES et al., 2017).

#### *4.5. Atividade antioxidante*

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes serem enzimáticos ou não enzimáticos (MORAIS et al., 2009). As enzimas antioxidantes removem as espécies reativas de oxigênio, 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 consumidas durante a reação. Os antioxidantes naturais, tais como os compostos fenólicos, e sintéticos são classificados como não enzimáticos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

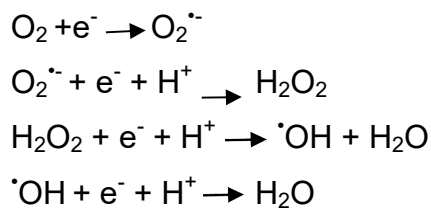
Estresse redox é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, entre outras, e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante. As espécies reativas mais estudadas nos sistemas biológicos incluem as espécies reativas de oxigênio, as espécies reativas de nitrogênio, os radicais derivados de tióis ( $RS\bullet$ ), as espécies reativas de cloro, as espécies reativas de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr (OLIVEIRA et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produtos altamente instáveis e reativos resultantes do metabolismo celular normal e de fatores

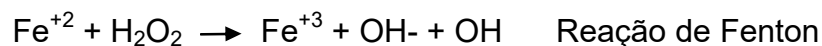
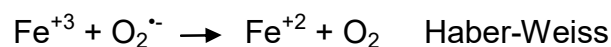
ambientais. A maioria das reações de produção de EROs envolve a redução parcial do oxigênio molecular, em reações que ocorrem naturalmente nos organismos aeróbios (ADEGOKE; FORBES, 2014; (SCANDALIOS, 2005).

EROs é um termo para denominar moléculas, radicalares (radicais livres) ou não radicalares, derivadas do oxigênio (SHARMA et al., 2012). Os radicais livres contém um ou mais elétrons não emparelhados, o que confere a elevada reatividade. Tais radicais são produzidos a partir da perda ou ganho de um elétron de uma molécula ou pela quebra de uma ligação covalente As principais EROs produzidas pelos sistemas biológicos são: ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical peroxil ( $ROO\bullet$ ) (FINKEL; HOLBROOK, 2000; SCANDALIOS, 2005).

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



O ânion superóxido é formado pela adição de um elétron ao oxigênio molecular. Esse processo é mediado pela NADPH oxidase. O principal local para a produção de ânion superóxido é a mitocôndria. O superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio, principalmente, pela ação de superóxidos dismutases. O peróxido de hidrogênio difunde-se facilmente através da membrana plasmática (BIRBEN et al., 2012). Em uma sucessão de reações chamadas reações de Haber-Weiss e Fenton, o  $H_2O_2$  pode se decompor em  $\bullet OH$  na presença de metais de transição como  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  ou o  $Cu^{+2}$  (FENTON, 1984).



O estresse oxidativo está associado a diversas condições patológicas como: doenças cardiovasculares, desordens neurológicas, como o Parkinson e Alzheimer, desordens oftalmológicas, diabetes, isquemia, câncer, entre outras (FINKEL; HOLBROOK, 2000; SHARMA et al., 2012; VALKO et al., 2006). Além disso, o processo de envelhecimento ocorre em grande parte devido à ação prejudicial das EROs. Essas ações estão ligadas à capacidade de oxidar proteínas celulares, ácidos nucleicos e lipídios (VALKO et al., 2007; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Nesse sentido, substâncias antioxidantes que minimizem o risco de desenvolvimento de patologias causadas por estresse oxidativo em sistemas biológicos possuem grande relevância. Apesar de serem muito estáveis, os antioxidantes sintéticos apresentam o uso restrito em muitos países, devido à possibilidade de causarem efeitos indesejáveis em enzimas dos sistemas biológicos. Por outro lado, há grande interesse na pesquisa por antioxidantes naturais, que sejam seguros para o consumo humano (ZANUTTO et al., 2014).

É sabido que muitas espécies vegetais possuem significativa propriedade antioxidante e diferentes classes de substâncias estão associadas por serem responsáveis por essa atividade (KRISHNAVENI et al., 2013). Os compostos fenólicos representam grande parte dos antioxidantes isolados de plantas (DEBA et al., 2007). Estes agem nos organismos vivos por meio de diferentes mecanismos. Dentre estes, podem ser citados: a complexação de íons metálicos, a captura de radicais livres, a decomposição de peróxidos, a inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas e a modulação de vias sinalizadoras celulares (OLIVEIRA et al., 2009). Alguns destes mecanismos estão esquematizados na figura 16.

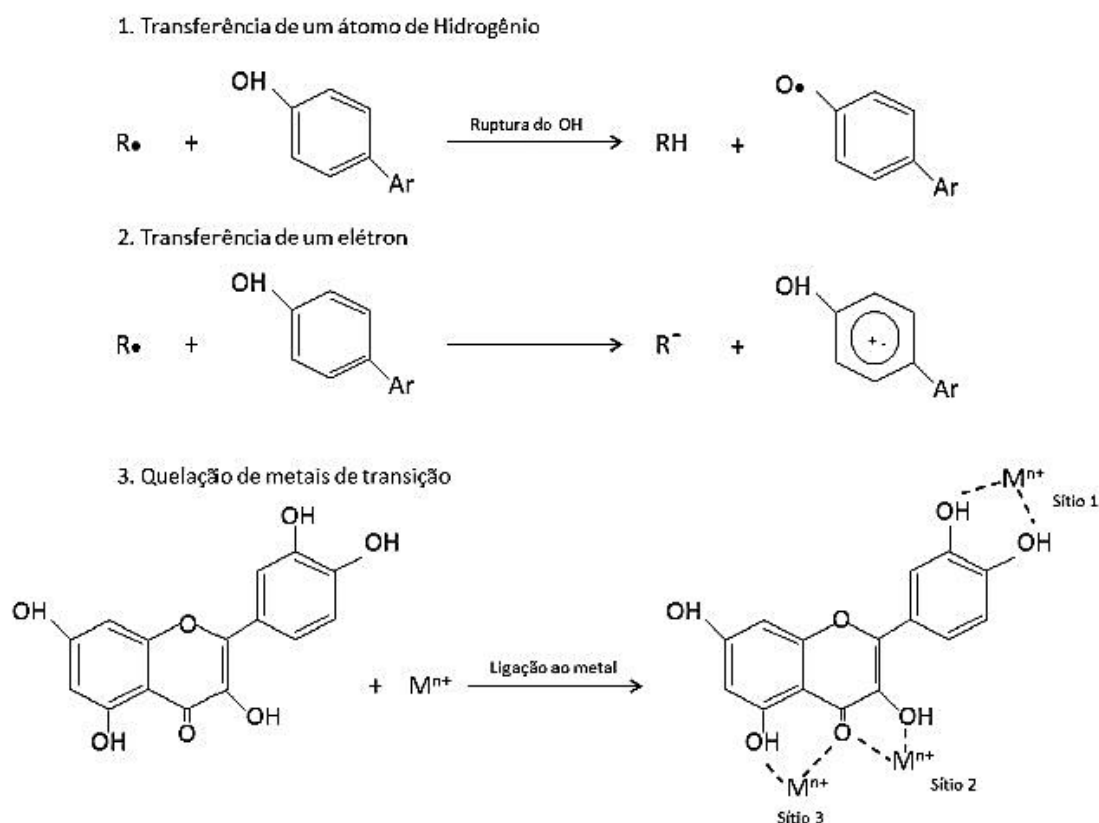


Figura 16 - Possíveis mecanismos de ação de um agente antioxidante: transferência de um átomo de Hidrogênio (1), doação de um elétron (2) e quelação de metais de transição, como o  $\text{Fe}^{+2}$  (3). Adaptado de LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO (2011).

A eficiência antioxidante de compostos bioativos de origem vegetal depende de sua estrutura e da sua concentração. Por sua vez, a quantidade destas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do estágio de desenvolvimento da planta, entre outros aspectos. Sabe-se, ainda, que a capacidade antioxidante é influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extração utilizada (OLIVEIRA et al., 2009).

A avaliação do potencial antioxidante de uma substância e de seus possíveis mecanismos de atuação deve ser baseada na associação de diferentes metodologias, uma vez que nenhum método isolado é capaz de fornecer um quadro abrangente do perfil de mecanismos de ação devido ao complexo processo de oxidação-antioxidação e a variedade de componentes antioxidantes (KHOUDJA; BOULEKBACHE-MAKHLOUF; MADANI, 2014).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante de um composto. Dentre estes métodos estão: ABTS•+ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)) e DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), co-oxidação do β-caroteno, CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*), atividade quelante de íons Fe<sup>+2</sup>, TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*).

Os mecanismos envolvidos nos métodos de avaliação da atividade antioxidante ABTS•+ e DPPH• são semelhantes, e baseados em mudanças nos espectros de absorção do radical livre devido a sua redução. O ABTS•+ é aplicável aos sistemas antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, enquanto o DPPH• aos sistemas hidrofóbicos (TEOW et al., 2007).

O DPPH• é um radical livre estável de cor violeta com absorvância máxima na faixa de 510-520nm (RUFINO et al., 2007a). O ensaio é baseado no decréscimo da absorvância da solução contendo o radical na presença de um antioxidante doador de Hidrogênio, devido à formação de uma forma não-radicalar DPPH-H. Com a redução do DPPH•, a intensidade da cor da solução diminui tornando-se amarela (Figura 17) (SOUSA et al., 2007).

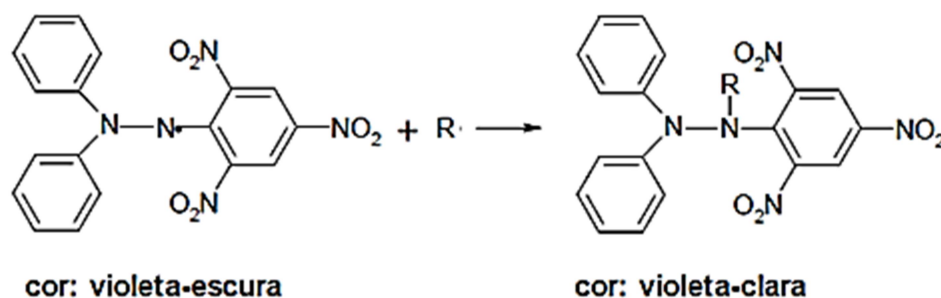


Figura 17 - Estabilização dos radicais livres DPPH• por antioxidantes (RUFINO et al., 2007a).

O método ABTS baseia-se na geração do radical ABTS (ABTS•+), por meio de uma reação química com persulfato de potássio, adquirindo uma coloração escura, azul-esverdeada. A presença de substâncias antioxidantes capazes de neutralizar o ABTS•+ causa o decréscimo da leitura da absorvância a 734nm (Figura 18) (RUFINO et al., 2007b). Além disso, pesquisas demonstram que o ensaio ABTS é mais sensível na



identificação da atividade antioxidante do que o ensaio DPPH, sendo atribuído à maior cinética de reação do ABTS (LEE et al., 2015).

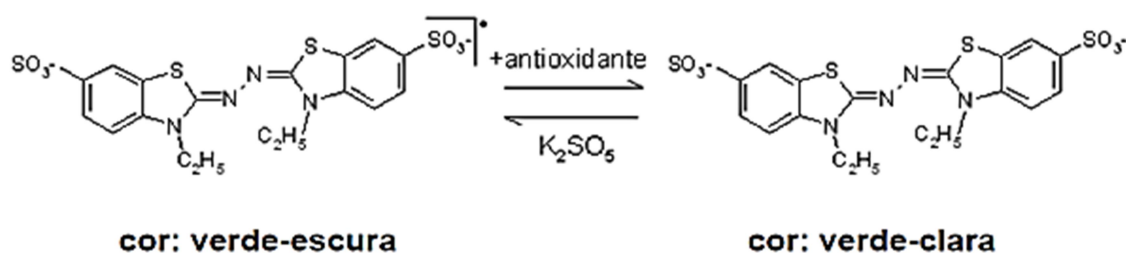


Figura 18 - Estabilização dos radicais livres por antioxidantes e sua formação pelo persulfato de potássio (RUFINO et al., 2007b)

O teste FRAP é um método que se baseia na habilidade de uma substância reduzir o íon  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  do complexo  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ , formando um complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ azul intenso (Figura 19) (RUFINO et al., 2006a). Neste ensaio, quanto maior a capacidade do extrato de reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , mais intensa é a tonalidade azul no comprimento de onda de 593 nm (SILVA; MUNIZ; NUNOMURA, 2013).

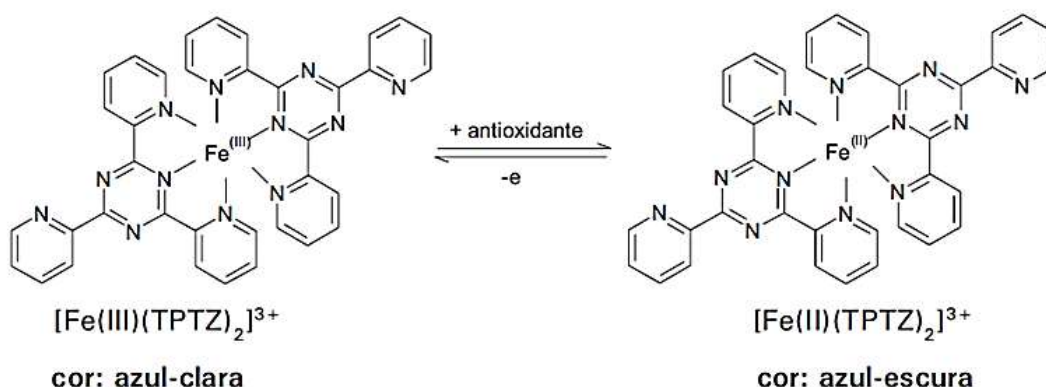


Figura 19 - Redução do complexo TPTZ com  $\text{Fe}^{3+}$  por ação de um antioxidante (RUFINO et al., 2006a).

A avaliação da atividade quelante tem sido utilizada para determinar a capacidade de extratos vegetais em sequestrar íons metálicos livres, como o  $\text{Fe}^{2+}$ . Estes são catalisadores importantes para a geração de radicais hidroxílicos altamente reativos através da reação de Fenton nos sistemas *in vivo* e *in vitro* (HARZALLAH et al., 2016; WONG et al., 2015).

Neste teste, a ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina) forma um complexo estável com o  $\text{Fe}^{2+}$  de coloração roxo escuro (Figura 20). Na presença de um agente quelante, a formação do

complexo estável é diminuída ou impedida, resultando em redução da intensidade da coloração a 562 nm (TANG et al., 2002; BIRBEN et al., 2012).

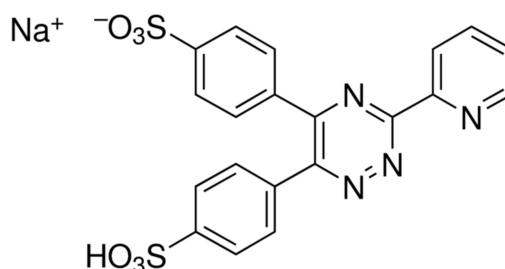


Figura 20 - Estrutura química da Ferrozina.

Os métodos de avaliação da peroxidação lipídica avaliam a capacidade de um composto proteger moléculas de natureza lipídica. O teste que avalia a inibição da co-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico se baseia na oxidação do ácido linoleico em elevada temperatura, com perda de um átomo de hidrogênio do carbono 11, entre duas ligações duplas (Figura 21).

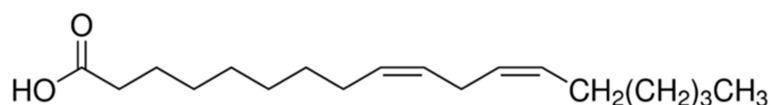


Figura 21 - Estrutura química do ácido linoleico.

O radical formado induz a oxidação da molécula do  $\beta$ -caroteno, uma vez que esta apresenta muitas insaturações que podem ser usadas na recuperação do átomo de hidrogênio perdido pelo ácido linoleico (Figura 22). Ao perder uma conjugação, o  $\beta$ -caroteno sofre descoloração, com redução da absorvância a 470nm. A perda da coloração alaranjada do  $\beta$ -caroteno é mais lenta na presença de substâncias antioxidantes capazes de neutralizar os radicais gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (AMAROWICZ et al., 2004; RUFINO et al., 2006b). É importante ressaltar que antioxidantes apolares exibem maior atividade antioxidante quando em emulsão, pois se concentram na fase lipídica. Já os antioxidantes polares, que dissolvem-se melhor na água, são menos efetivos na proteção de moléculas lipídicas (KOLEVA et al., 2002; RUFINO et al., 2006b).

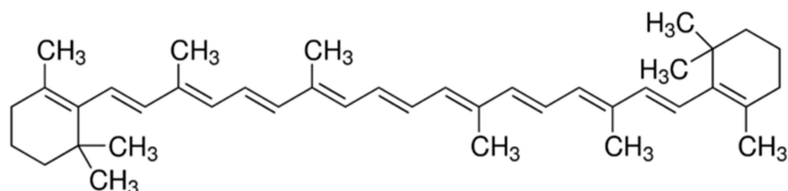


Figura 22 - Estrutura química do  $\beta$ -caroteno.

*Tithonia diversifolia* possui atividade antioxidante relevante, sendo atribuída muitas vezes aos seus constituintes fenólicos.

Os extratos etanólico e aquoso das folhas de *T. diversifolia* exibiram capacidade antioxidante através do teste do DPPH, de forma dose-dependente (TANIA; CASTILO et al., 2016). No teste do ABTS, o extrato aquoso de *T. diversifolia* mostrou expressiva atividade antioxidante, equivalente ao padrão N-acetilcisteína (HIRANSAI et al., 2016). De modo semelhante, foi identificada a atividade antioxidante das frações acetato de etila e butanólica de *T. diversifolia* nos ensaios de DPPH e FRAP, sendo esta atividade correlacionada ao teor de compostos fenólicos totais (PULIDO; DULCEY; MARTÍNEZ, 2017).

Em estudo com extratos aquoso, metanólico e de diclorometano de *Tithonia diversifolia* foram comparados os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides, assim como a capacidade antioxidante. Os autores identificaram que o extrato aquoso apresentou os maiores teores de fenóis totais e flavonoides, e também a maior atividade antioxidante entre os três tipos de extratos testados. Além disso, foi realizada incubação junto ao plasma sanguíneo de doador saudável e, o extrato aquoso promoveu significativa inibição da formação de hidroperóxidos de lipídios (DI GIACOMO et al., 2015).

#### 4.6. Mutagênese e citotoxicidade

A mutagênese tem função importante no desencadeamento da carcinogênese. Nela, a substância que atua sobre o DNA pode ser um agente, por si só, mutagênico ou ainda, pode ser um produto metabólico, que normalmente deveria ser inativado ou eliminado (BUNKOVA; MAROVA, 2005). A ação mutagênica de diversas substâncias envolve a promoção do estresse oxidativo celular, devido à geração de espécies reativas ao DNA (FERGUSON, 1994).

A investigação quanto à genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade constituem etapas importantes na avaliação toxicológica de medicamentos, incluindo os de origem vegetal. Dentre os testes de avaliação de mutagenicidade e citotoxicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo em eritrócitos de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos (RIBEIRO, et al., 2003).

#### 4.6.1. Teste do micronúcleo em sangue periférico de roedores *in vivo*

O teste do micronúcleo visa detectar e quantificar a ação mutagênica de agentes indutores, físicos ou químicos (MACGREGOR, 1987).

O micronúcleo (MN) pode originar-se por quebra cromossômica, que resulta em fragmentos cromossômicos acêntricos (clastogenicidade) ou devido às disfunções do fuso mitótico, durante o processo de divisão celular, em que cromossomos inteiros sofrem atraso em relação aos demais durante a migração para os polos da célula em anáfase (aneugenicidade) (Figura 23) (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013).

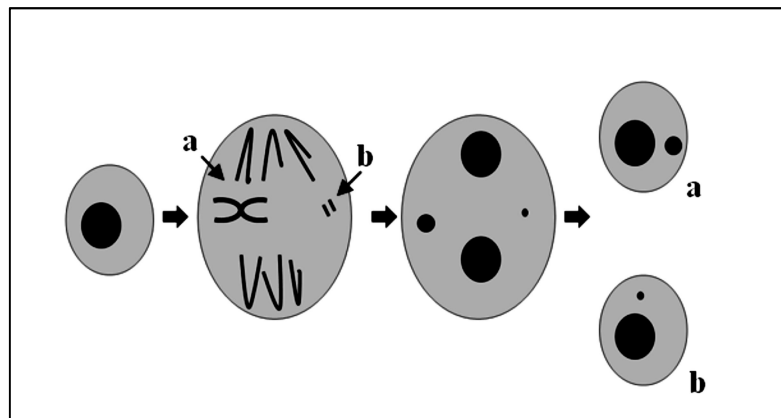


Figura 23 - Diagrama ilustrativo demonstrando a origem do micronúcleo a partir de um evento aneugênico (a) ou de um evento clastogênico (b). Adaptado de Fenech (2005).

Os testes *in vivo* apresentam significativa relevância, uma vez que neles são considerados fatores como a absorção, o metabolismo, a cinética do fármaco e o processo de reparo do DNA (KRISHNA; HAYASHI, 2000), eventos pouco reproduzíveis em ensaios *in vitro*.

#### 4.6.2. Ensaio do MTT

A viabilidade celular é um método muito utilizado para avaliar a citotoxicidade (BEDNARCZUK, 2010). Podem ser utilizados diversos tipos de células, dentre elas pode-se citar as linhagens saudáveis como os linfócitos humanos e linhagens tumorais, como sarcoma 180 (*Mus musculus*).

Dentre os testes utilizados para a avaliação de citotoxicidade, encontra-se o método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5difênil brometo de tetrazolina). O ensaio de MTT é um dos mais empregados como indicador colorimétrico da viabilidade celular, avaliando-se a função mitocondrial da célula (GODÓI et al., 2011). Segundo Mossman (1983), o método MTT se baseia na conversão do MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais que existem somente nas células que são metabolicamente ativas.

A avaliação da citotoxicidade/viabilidade celular *in vitro* é uma importante ferramenta em pesquisas que investiguem a toxicidade de extratos vegetais, uma vez que indicam a habilidade que esses compostos possuem em ocasionar morte celular pelo contato direto com células.

Lu et al. (2017) testaram a fração de acetato de etila do extrato de *T. diversifolia* e verificaram que houve indução à apoptose em células de hepatoma humano HepG<sub>2</sub>.

Flavonoides e sesquiterpenos isolados do extrato etanólico de *Tithonia diversifolia* exibiram atividade citotóxica com indução de morte celular em células HL-60 (KURODA et al., 2007).

## 5. REFERÊNCIAS

ANDERBERG, A. A. In: JEFFREY, C. AND J. W. KADEREIT. **The Families and Genera of Vascular Plants . Volume VIII Flowering Plants. Eudicots: Asterales Edited by K. Kubitzki.** Verlag-Berlin-Heidelberg/GERMANY: Springer, 2007. p. 6–576.

AHMADI, A. et al. Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 6, p. 794–797, 2008.

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.

ALBERT, A. et al. Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. **Oecologia**, v. 160, n. 1, p. 1–8, 2009.

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.

ANTHONEY, S. T. et al. Bioassay screening of the ethanolic extract of *Tithonia diversifolia* leaves on selected microorganisms. **International Journal of Bioassays**, p. 4794–4798, 2016.

BACANLI, M.; BAŞARAN, A. A.; BAŞARAN, N. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p. 160–170, 2015.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes E Aplicações De Taninos E Tanases Em Alimentos. **Alimentos & Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63–72,

2004.

BELCAVELLO, L. et al. Mutagenicity of ipriflavone *in vivo* and *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3–4, p. 996–1000, 2012.

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.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BORGES, F. et al. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 887–916, 2005.

BORS, W.; MICHEL, C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 57–69, 2002.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 1, p. 18, 2007.

BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C. Bioavailability of Ferulic Acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 2, p. 222–227, 1998.

BUNKOVA, R.; MAROVA, M.; NEMECK. Antimutagenic Properties of Green Tea. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 60, p. 25–29, 2005.

CELEGHINI, R. M. S. et al. 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, p. 706–709, 2001.

CHADWICK, M. et al. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People.

**International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12780–12805, 2013.

CHAGAS-PAULA, D.A., et al. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 210–235, 2012.

CHEN, H.Y.; LIN, Y.C.; HSIEH, C.L. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. **Food chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1418–1424, 2007.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 2–3, p. 153–177, 2012.

CHIRINOS, R. et al. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and / or medicinal properties from the Peruvian Andean region. **Industrial Crops and Products**, v. 47, n. 1, p. 145–152, 2013.

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, 1999.

COSTA, A. F. Farmacognosia. v. II. **Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa**, p. 1032, 1982b.

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<sup>a</sup> ed. New York: Columbia University Press, 1988.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

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 dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.

DARROW, K.; BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 1, p. 1–11, 1997.

DAS, A.; BANIK, N. L.; RAY, S. K. NIH Public Access. **Cancer**, v. 116, n. 1, p. 164–176, 2010.

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.

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.

DJERRAD, Z.; KADIK, L.; DJOUAHRI, A. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 440–449, 2015.

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.

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

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

EJELONU, O. C.; ELEKOFEHINTI, O. O.; ADANLAWO, I. G. *Tithonia diversifolia* saponin-blood lipid interaction and its influence on immune system of normal wistar rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 87, p. 589–595, 2017.

- 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.
- FANG, X. et al. Genomics Grand for Diversified Plant Secondary Metabolites. **Plant Diversity and Resources**, v. 33, n. 1, p. 53–64, 2011.
- FENECH, M. *In vitro* micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**, v. 111, p. 3-32, 2005.
- FERGUSON, L.R. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Research**, v. 307, n. 1, p. 395-410, 1994.
- 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.
- GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**, v. 84, n. 6, p. 647–656, 2000.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GODÓI, A. A. et al. Avaliação da atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica de *Urera aurantiaca*. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 92, n. 3, p. 198-202, 2011.
- GOFFIN, E. et al. In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: Tagitinin C. **Planta Medica**, v. 68, n. 6, p. 543–545, 2002.
- GU, J. Q. et al. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 532–536, 2002.
- HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 259–266, 2009.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, n. 1, p. 177–188, 1996.

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.

HAYASHI, M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 4–9, 2016.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.

HEINRICH, M. et al. Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (compositae). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 539–565, 1998.

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.

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.

HOMAR, J. C. ¿Medicinas complementarias o alternativas? Un dilema para el sistema público. **Atención Primaria**, v. 35, n. 8, p. 389–391, 2005.

HUANG, W.-Y.; CAI, Y.-Z.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutrition and cancer**, v. 62, n. 1, p. 1–20, 2009.

JAYAKUMAR, K.; VG, M. K.; MURUGAN, K. Evaluation of antioxidant and antihemolytic activities of purified caulophyllumine-A from *Solanum mauritianum* Scop. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 2, p. 195, 2016.

JUANG, C.L. et al. Investigation of anti-oxidative stress *in vitro* and water apparent diffusion coefficient in MRI on rat after spinal cord injury *in vivo* with *Tithonia diversifolia* ethanolic extracts treatment. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 447–454, 2014.

JÚNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

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.

KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas- Funções, Absorção e Mobilidade. **Informações agrônômicas**, v. 118, n. 2, p. 1–24, 2007.

KOSTOVA, I. Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 1, p. 29–46, 2005.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, n. 455, p. 155-166, 2000.

KURODA, M. et al. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 55, n. 8, p. 1240–1244, 2007.

LEE, M.Y. et al. Identification and anti-human glioblastoma activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* methanolic extract. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2347–2355, 2011.

LEMOS, A. O. **Alocação de recursos para crescimento versus defesa em espécies de Asteraceae**. RECIFE: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 2011.

LIN, D. et al. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, 1374, 2016.

LINTHOINGAMBI, W.; SINGH, M. S. Antimicrobial activities of different solvent

extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsely) A.Gray. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 3, n. 5, p. 50–54, 2013.

Lu, M.-R. et al. Induction of Apoptosis by *Tithonia diversifolia* in Human Hepatoma Cells. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 52, p. 702–706. 2017

LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, A. Micronuclei in genotoxicity assessment : from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers in Genetics**, v. 4, p. 1-17, 2013.

MACGREGOR, J.T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v. 189, n. 2, p. 103–112, 1987.

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

MAYARA, T. 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.

MEDIANI, A.; ABAS, F.; PING, T. C. Influence of Growth Stage and Season on the Antioxidant Constituents of *Cosmos caudatus*. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, p. 344–350, 2012.

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.

ANGELO, M.P.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

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 Mediciniais**. Unicen Publicações, Cuiabá, v. 1, p. 149–156, 2003.

MIRANDA, M. A. F. M. et al. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of**

**Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1083–1092, 2015.

MIURA, T. et al. Antidiabetic Effect of Nitobegiku, the Herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay Diabetic Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 11, p. 2152–2154, 2005.

MONTANARI, J. I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. Campinas-SP, 2002.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. **Quimica Nova**, v. 28, n. 5, p. 892–896, 2005.

MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chá e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315–320, 2009

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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

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 Research**, v. 48, n. 2, p. 157–162, 2008.

MUOGHALU, J. I.; CHUBA, D. K. Seed germination and reproductive strategies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray and *Tithonia rotundifolia* (P.M.) Blake. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 3, n. 1, p. 39–46, 2005.

NELL, M. et al. Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 6, p. 1090–1096, 2009.

OGUNDARE, A. O. Antimicrobial activity of *Tithonia diversifolia* and *Jatropha gossypifolia* leaf extracts. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 2, n. 2, p. 145-150, 2007.

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, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OMWENGA, E. O. et al. Ethnobotanical survey and antimicrobial evaluation of medicinal plants used by the Samburu community (Kenya) for treatment of diarrhoea. **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, n. 18, p. 165–175, 2009.

OYEWOLE, I. O. et al. Anti-malarial and repellent activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) leaf extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 8, p. 171–175, 2008.

OZCAN, T. et al. Phenolics in Human Health. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 5, p. 393–396, 2014.

PADDA, M. S.; PICHA, D. H. Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 176–180, 2008.

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, p. 17–22, 2003.

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.

PERDIGÃO, T. L. **Avaliação morfofisiológica, fitoquímica e mutagênica de *Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Deg exposta a diferentes concentrações de alumínio.** 2012.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 53, n. 2, p. 75–100, 2009.

PIRBALOUTI, A. G. et al. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 6, p. 861–869, 2013.

PORRES-MARTÍNEZ, M. et al. Influence of phenological stage on chemical composition and antioxidant activity of *Salvia lavandulifolia* Vahl . essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 71–77, 2014.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

PULIDO, K. D. P.; DULCEY, A. J. C.; MARTÍNEZ, J. H. I. 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.

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

RAUDONIS, R. et al. Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries. **Journal of Chromatography A**, v. 1233, p. 8–15, 2012.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C. Tendências evolutivas de famílias



produtoras de cumarinas em Angiospermae. **Quimica Nova**, v. 25, n. 4, p. 533–538, 2002.

RIBEIRO, R. S. et al. *Tithonia diversifolia* as a supplementary feed for dairy cows. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–18, 2016.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

RIVERO, R. M. et al. Resistance to cold and heat stress: Accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, v. 160, n. 2, p. 315–321, 2001.

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.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico**, 2006a.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema  $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico**, 2006b.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico**, 2007a.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico**, 2007b.

SAKIHAMA, Y. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v.

177, n. 1, p. 67–80, 2002.

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. et al. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 6, p. 1127–1137, 2011.

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, p. 1–11, 2016.

SANTIAGO, L. J. M.; LOURO, R. P.; DE OLIVEIRA, D. E. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. **Annals of Botany**, v. 86, n. 5, p. 1023–1032, 2000.

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.

SILVA, F. C. et al. Manual de metodos de analises quimicas para avaliacao da fertilidade do solo. **EMBRAPA-CNPS. Documentos**, 1998.

SILVA, C. G. et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological research**, v. 52, p. 229–233, 2005.

SILVA, E. C. C.; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, R. C. S. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 628–633, 2013.

SILVA, L. R. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, p. 36–43, 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2<sup>a</sup> ed.

Porto Alegre: UFRGS e UFSC, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, S.; PANDA, M. K.; NAYAK, S. Evaluation of genetic diversity in turmeric (*Curcuma longa* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 284–291, 2012.

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, set. 1993.

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

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

SPITALER, R. et al. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv . ARBO. **Phytochemistry**, v. 67, p. 409–417, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

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.

THONGSOM, M. et al. Antioxidant and hypoglycemic effects of *Tithonia diversifolia* aqueous leaves extract in alloxan-induced diabetic mice. **Advances in Environmental Biology**, v. 7, n. 9, p. 2116–2125, 2013.

TLILI, N. et al. Phytochemicals and antioxidant activities of *Rhus tripartitum* (Ucria) fruits depending on locality and different stages of maturity. **Food Chemistry**, v.

160, p. 98–103, 2014.

TONA, L. et al. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 31–38, 2000.

TONGMA, S.; KOBAYASHI, K.; USUI, K. Allelopathic activity of Mexican sunflower [*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray] in soil under natural field conditions and different moisture conditions. **Weed Biology and Management**, v. 1, n. 2, p. 115–119, 2001.

VALDÉS, L. et al. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. **Food & function**, v. 6, n. 8, p. 2424–2439, 2015.

VALDEZ-MORALES, M. et al. Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 23, p. 5281–5289, 2014.

VENSKUTONIS, P. R. et al. Variations in antioxidant capacity and phenolics in leaf extracts isolated by different polarity solvents from seven blueberry (*Vaccinium* L.) genotypes at three phenological stages. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 2, p. 1–13, 2016.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, p. 105–113, 2015.

VIJAYARATHNA, S.; SASIDHARAN, S. Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 10, p. 826–829, 2012.

VLAISAVLJEVIĆ, S. et al. Profile of phenolic compounds in *Trifolium pratense* L. extracts at different growth stages and their biological activities. **International Journal of Food Properties**, 2016.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis. 2nd ed. **Heidelberg: Springer Verlag**, 1996.

WAHYUNINGSIH, M. S. H. Isolation , identification and antibacterial activity of flavonoid compound from kembang bulan [*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray] leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 298–301, 2015.

WANG, X. et al. Analysis of flavonoids and antioxidants in extracts of ferns from Tianmu Mountain in Zhejiang Province (China). **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 137–145, 2017.

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, jan. 2010.

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

WONG, S. P.; LEONG, L. P.; WILLIAM KOH, J. H. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 775–783, 2006.

YAO, X. H. et al. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 405–412, 2016.

YESIL-CELIK TAS, O. et al. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 4, p. 443–451, 2007.

YOSR, Z. et al. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 412–419, 2013.

ZANUTTO, F. V. et al. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using

Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Process Biochemistry**, v. 12, n. 2, p. 679–693, 2014.

ZHANG, Q. et al. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, p. 445–450, 2006.

ZHAO, G. et al. Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 250–254, 2012.

ZHU, Y. Z. et al. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. **Natural product reports**, v. 21, n. 4, p. 478–489, 2004.

ZIDORN, C. Altitudinal variation of secondary metabolites in flowering heads of the Asteraceae: Trends and causes. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p.197–203, 2010.

## **CAPÍTULO 1**

O manuscrito intitulado “Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Tithonia diversifolia* Hemsl. (Asteraceae) populations” foi publicado pelo periódico *Industrial Crops and Products* (ISSN: 0926-6690).

**Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Tithonia diversifolia* Hemsl. (Asteraceae) populations**

Irany Rodrigues Pretti<sup>a\*</sup>, Anny Carolyne da Luz<sup>a</sup>, Claudia Masrouah Jamal<sup>b</sup>, Maria do Carmo Pimentel Batitucci<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Department of Biological Sciences, Center for Human and Natural Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, Brazil.

\*Corresponding author: Irany Rodrigues Pretti

Department of Biological Sciences

Laboratory of Plant and Toxicological Genetics

Federal University of Espirito Santo

Av. Fernando Ferrari 514, Goiabeiras, 29075-910, Vitoria, ES, Brazil

Phone: 55 27 99976702

Email address: [iranyrpreti@gmail.com](mailto:iranyrpreti@gmail.com)



## **Abstract**

*Tithonia diversifolia* is a medicinal plant traditionally used in the treatment of diabetes, diarrhea, menstrual cramps, malaria, hematomas, hepatitis, hepatomas and wounds. This work investigated the influence of environmental factors, phenological stage and genetic variability on the secondary metabolite profile and its antioxidant actions. Leaves were collected at the vegetative stage and in the reproductive stage, in five regions of southeastern Brazil. Phytochemical analyses, antioxidant activity and genetic markers as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) were used to evaluate the variability between populations and to generate clusters. The highest contents of phenols, flavonoids and tannins were observed in ST (Santa Teresa) samples, as well as displayed great antioxidant activity. ST showed low genetic similarity to other populations (0.12), indicating high levels of genetic diversity and that clustering it is not positively correlated with the proximity of geographical locations. This analysis indicates that phytochemical and antioxidant variations between populations are influenced by genetic factors as well as environmental conditions.

**Keywords:** Genetic variability, RAPD, phytochemical analysis, phenology, phenolic compounds.

## 1. Introduction

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae), a perennial shrub, is native to Mexico and grows in parts of Africa, Australia, Asia and some parts of America. Its extracts are traditionally used in the treatment of diabetes, diarrhea, menstrual cramps, malaria, hematomas, hepatitis, hepatomas and wound healing (BOTSARIS, 2007; TONA et al., 2000). These effects may be ascribed to the terpenoids and flavonoids presented in aerial parts of *T. diversifolia* (CHAGAS-PAULA et al., 2012; LEE et al., 2011). Several studies investigated the anti-inflammatory, analgesic, antimalarial, antimicrobial and anti-diabetic activities and these investigations revealed the potential of its constituents in different pharmacological/therapeutic treatments (CHAGAS-PAULA et al., 2012). Antioxidant properties of natural products have been investigated, such as the prevention of free radical generation, neutralizing radicals by non-enzymatic mechanisms, or enhancing the activity of endogenous antioxidants system (ZHU et al., 2004).

More than 150 compounds have been isolated from *T. diversifolia*, including sesquiterpenoids, diterpenoids and flavonoids (CHAGAS-PAULA et al., 2012), thus its antioxidant activity is mainly attributed to phenolic compounds (DI GIACOMO et al., 2015). Flavonoids are one of the main classes of *T. diversifolia* constituents that belong to the phenolic compounds group and exhibit anti-carcinogenic, anti-mutagenic, antioxidant and antimicrobial activity (VALDÉS et al., 2015; VALDEZ-MORALES et al., 2014). The use of plants that are rich in phenolic compounds can prevent or delay the development of non-communicable diseases, such as cardiovascular diseases, diabetes and cancer, through processes involving reactive oxygen species (OZCAN et al., 2014). In addition, metabolites of dietary phenols exert modulatory effects in cells, including signaling cascades that are vital for cellular functions, such as growth, proliferation and apoptosis (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Various works have demonstrated that the chemical constituent composition of plants, their content and their biological activities are dependent on environmental factors, such as temperature, precipitation, altitude, soil, season (CHIRINOS et al., 2013; DJERRAD; KADIK; DJOUAHRI, 2015; TLILI et al., 2014); phenological stage (Pirbalouti et al., 2013) and genetics (ŠAMEC et al., 2015). Biochemical and molecular markers, when used together, are often useful for establishing relationships between plant populations (SINGH; PANDA; NAYAK, 2012). There are no reports relating *T. diversifolia* genetic characterization with its environmental growth conditions and phenological stage, and the influence of these factors on the production of secondary metabolites. The present work aimed to characterize the chemical and genetic diversity of five *T. diversifolia* populations growing in the Southeast region of Brazil in the vegetative and reproductive stages, through preliminary phytochemical prospecting, and by assessing phenolic compound quantification, *in vitro* antioxidant activity and molecular markers.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Chemicals and reagents**

ABTS, potassium persulfate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH),  $\beta$ -carotene, linoleic acid, Tween 40, Folin–Ciocalteu reagent, Folin-Denis reagent, ferrozine, TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine) reagent, iron(III) chloride, iron (II) chloride, isoamyl alcohol, standards of gallic acid, tannic acid, rutin, Trolox,  $\alpha$ -tocopherol, ferrous sulphate, ascorbic acid,  $\beta$ -mercaptoethanol and CTAB (Cetyl Trimethylammonium Bromide) were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Chloroform, ethanol (70%), methanol, isopropanol, glacial acetic acid, sodium carbonate, aluminum chloride were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Proteinase-K and RNase A were purchased from Ludwig Biotecnologia (Rio Grande do Sul, Brazil). GoTaq G2 Flexi amplification kits were

obtained from Promega Brazil (São Paulo, Brazil). Primers were purchased from Molecular Brasil (Belo Horizonte, Brazil).

## **2.2. Plant material**

The aerial parts of 10 *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), in September 2014 and April 2015. A voucher specimen (VIES 35297) was deposited in the Central Herbarium of Universidade Federal do Espírito Santo/VIES, Brazil. The samples were air-dried at room temperature for 5 days, pulverized and subsequently submitted to maceration in ethanol 70%.

## **2.3. Edaphoclimatic data**

In order to correlate the chemical variability between localities with the geographic variation and environmental conditions, the data of altitude, accumulated precipitation and average temperature referring to the month of collection are described in Table 1 (Weather Information System / Incaper). The soil chemical analysis data are presented in Table 2, according to the methodology proposed by Silva (2009). The soil collection occurred simultaneously to the collection of the plant material.

Table 1 - Environmental conditions data.

Location	Altitude (m)	Accumulated		Average	
		precipitation (mm)		temperature (° C)	
		2014	2015	2014	2015
ST	612	112.8	64.6	16.9	18.6
VIA	40	21.8	17.8	23.3	25.0
MF	603	17.9	76.4	21.8	23.0
VIT	10	83.2	55.6	23.3	25.1
COL	50	59.6	21.0	23.7	24.9

ST: Santa Teresa; MF: Muniz Freire; VIA: Viana; VIT: Vitória; COL: Colatina.

Table 2 - Soil chemical analysis data.

Location	Calcium (mg/dm <sup>3</sup> )	Potassium (mg/dm <sup>3</sup> )	Phosphorus (mg/dm <sup>3</sup> )	Magnesium (mg/dm <sup>3</sup> )	Iron (mg/dm <sup>3</sup> )	Zinc (mg/dm <sup>3</sup> )	Organic matter (mg/dm <sup>3</sup> )	pH
ST	1082	110	142	73	402	47.4	22000	7.4
VIA	661	72	15	109	215	8.3	21000	6.1
MF	1062	170	21	109	162	3.6	20000	7.5
VIT	1042	39	31	73	155	4.5	64000	6.5
COL	1303	170	75	146	116	12.8	24000	7.3

ST: Santa Teresa; MF: Muniz Freire; VIA: Viana; VIT: Vitória; COL: Colatina.

#### 2.4. Genetic analysis using RAPD markers

Extraction of genomic DNA was based on the protocol described by Doyle (1987) with modifications. For this analysis, 100 mg of homogenized sample of 10 plants from each locality, previously frozen, were ground in liquid nitrogen with polyvinylpyrrolidone. The obtained powder was mixed with 1 mL of CTAB (Cetyl Trimethylammonium Bromide) extraction buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.00 and 20 mM EDTA pH 8.00),  $\beta$ -mercaptoethanol and proteinase-K, incubated for 30 min at 65 °C. After cooling, 500  $\mu$ 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  $\mu$ g. $\mu$ L<sup>-1</sup>), 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  $\mu$ L of Tris-EDTA pH 8.00 (TE buffer). 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 GelRed™ (BIOTIUM™).

Initial PCR reactions were performed using thirty-one random decamer primers from Operon Technology-USA, 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 on the basis of the good resolution and polymorphisms of bands. Each PCR reaction was performed in a 25 µL reaction volume containing 25 ng of DNA template, 5 µl of 5X reaction buffer, 2.5 µL of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 1.25 U of Taq and 0.3 µL (10 µM) of specific primers, in a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™, USA). The PCR cycles followed the following conditions: 94 °C for 3 min, 40 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 35 °C for 1 min and extension at 72 °C for 2 min. After these cycles, the samples were submitted to a final extension step at 72 °C for 10 min. Amplification products were separated on a 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).

## **2.5. Preparation of hydroalcoholic extracts**

The *Tithonia diversifolia* powder was macerated with 70% ethanol, protected from light, in the solvent to powder ratio of 5/1 (v/w) for 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. Then, the resulting liquids were filtered and concentrated under a vacuum evaporator to obtain the crude hydroalcoholic extracts of *T. diversifolia* (HAE).

## **2.6. Phytochemical screening**

### **2.6.1. Preliminary phytochemical prospecting**

The preliminary phytochemical prospection was performed based on color reactions and precipitation in order to identify secondary metabolite groups such as alkaloids, coumarins, flavonoids, naphthoquinones, saponin, steroids, tannins and triterpenoids presents in crude HAEs from all localities: ST, VIA, MF, VIT and COL (Costa, 1982; Costa, 1986; Wagner and Bladt, 1996).

### **2.6.2. Total phenolic content (TPC)**

Total phenolic content (TPC) was measured according to the Folin-Ciocalteu method described by Zhang et al. (2006). In a 96-well microplate, ethanol solutions of HAE 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (20  $\mu\text{L}$ ) were added to 100  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu reagent diluted in distilled water (1:10). After 5 min, 80  $\mu\text{L}$  of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7.5%) were added and the plate was left in the dark at room temperature for 2 hours. The absorbance was measured at 750 nm with a spectrophotometric microplate reader (Epoch Microplate Spectrophotometer – BioTek, USA). TPC was expressed as gallic acid equivalent per gram of dry weight ( $\text{mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$  d.w.). Concentrations of gallic acid were 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $R^2= 0.9994$ ). Ethanol was used as blank. For each sample, three replications were performed.

### **2.6.3. Total tannins content (TTC)**

Total tannin content (TTC) of *T. diversifolia* HAE was measured by the Folin-Denis method (PANSERA et al., 2003) with a few modifications. An ethanol solution of HAE 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (400  $\mu\text{L}$ ) was added to 400  $\mu\text{L}$  of Folin-Denis reagent. After 3 min, 400  $\mu\text{L}$  of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution (8%) was added, mixed and incubated for 1 h. The mixed material was centrifuged at 2000 rpm for 5 min and the absorbance measured at 725 nm. Tannic acid (concentrations 12.5, 25, 50, 100, 500 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was used to calculate the

standard curve ( $R^2 = 0.9907$ ) and the results were expressed as tannic acid equivalents per gram of dry weight ( $\text{mg TA}\cdot\text{g}^{-1}$  d.w.). Ethanol was used as blank. For each sample, three replications were performed.

#### **2.6.4. Total flavonoid content (TFC)**

Total flavonoid content (TFC) was determined using the colorimetric method with aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ), carried out according to Perdigão (2012). The *T. diversifolia* HAE was diluted in methanol at a concentration of  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Five aliquots (0.25, 0.5, 1, 1.5 and 2 mL) were taken from this solution and placed separately in 25 mL volumetric flasks. Each of these volumes was quenched to 2 mL with methanol, and then 0.6 mL of glacial acetic acid, 10 mL of pyridine solution and water (1:4, v/v), and 2.5 mL of a 6.5% (w/v) solution of aluminum chloride in methanol was added, with the volume being made up to 25 mL with distilled water. After 30 min, the samples were read at 420 nm in a spectrophotometer (model SP 2000, Bel Photonics® 2000 UV, Brazil). A blank was made using all of the above reagents, except for the extract and aluminum chloride. Concentrations of rutin used to establish the standard curve were 5, 10, 20, 30 and 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9997$ ). The analysis was performed in triplicate.

### **2.7. Antioxidant activity assays**

#### **2.7.1. Free radical scavenging activity by DPPH assay**

The activity of DPPH radical scavenging was measured according to the protocol described by Harzallah et al. (2016). HAE samples and standard (ascorbic acid) were diluted in methanol (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Methanolic DPPH solution (0.3 mM, 200  $\mu\text{L}$ ) was added to 100  $\mu\text{L}$  of the test solution. After 30 min at room temperature in the dark, the absorbance was measured at 517 nm using a spectrophotometric microplate reader. A decrease in the absorbance indicates an increase in the scavenging activity.



The test was performed in triplicate and the percentage of inhibition of DPPH was calculated as follows: **% inhibition of DPPH** =  $[(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$ , where  $Abs_0$  = absorbance of control and  $Abs_1$  = absorbance of the sample. Methanol was used as a blank and DPPH solution plus methanol was used as a negative control. Results were expressed as an  $EC_{50}$  value ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), indicating the effective concentration of antioxidant agent required to scavenge 50% of DPPH.

### **2.7.2. Free radical scavenging activity by ABTS assay**

The ABTS assay was performed using the method described by Re et al. (1999), with modifications. The  $ABTS^+$  solution was prepared by mixing 5 mL of  $ABTS^+$  (7 mM) with 88  $\mu\text{L}$  of potassium persulfate (2.5 mM). It was incubated before use in the dark at room temperature for 16 h.  $ABTS^+$  solution was diluted with ethanol to an absorbance value of  $0.7 (\pm 0.02)$  at 734 nm. Then, 200  $\mu\text{L}$  of  $ABTS^+$  solution was mixed with 40  $\mu\text{L}$  of the test solution (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), HAE samples and standard (Trolox). The decrease in absorbance was measured at 734 nm after 6 min of incubation. The test was performed in triplicate and the scavenging activity was determined by the following formula: **% scavenging of  $ABTS^+$**  =  $[(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$ , where  $Abs_0$  = absorbance of control and  $Abs_1$  = absorbance of the sample. Results were expressed as  $EC_{50}$  value ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

### **2.7.3. Chelating activity on $Fe^{2+}$ ions**

The chelating activity of crude HAE on ferrous ion was measured using the method of Jayakumar et al. (2016). One milliliter of HAE methanolic solution (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was added to 50  $\mu\text{L}$  of  $FeCl_2$  solution (2 mM) and incubated at room temperature for 5 min. Then, 200  $\mu\text{L}$  of ferrozine (5 mM) was added, mixed and the absorbance measured at 562 nm after 20 min in a microplate reader.

Chelating activity was calculated as follows: **Chelating activity (%)** =  $[(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$ , where  $Abs_0$  is the absorbance of the ferrozine- $Fe^{2+}$  complex and  $Abs_1$  is the absorbance of the sample. Results were expressed as  $EC_{50}$  value ( $\mu g \cdot mL^{-1}$ ). EDTA was used as a positive control. The assay was carried out in triplicate.

#### **2.7.4. Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)**

The total antioxidant capacities of the extracts were determined using the FRAP method according to Rufino et al. (2006). The FRAP working reagent was prepared using 25 mL of 0.3 M acetate buffer, 2.5 mL of TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine) solution and 2.5 mL of 20 mM aqueous ferric chloride solution. The FRAP working solution was prepared immediately prior to use. Then, 30  $\mu L$  of HAE ethanolic solution (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000  $\mu g \cdot mL^{-1}$ ) plus 90  $\mu L$  of distilled water were incubated with 900  $\mu L$  of the FRAP working solution for 30 min at 37 °C in the dark. Absorbance readings were taken at 595 nm to measure the color product (the ferrous-TPTZ complex). The concentrations of standard ( $FeSO_4$ ) were 250, 500, 1000, 1500 and 2000  $\mu M$ . The results were expressed as  $EC_{50}$  value from the calculation of  $\mu M$   $FeSO_4$  equivalents per gram of dry weight. Each assay was carried out in triplicate.

#### **2.7.5. $\beta$ -carotene/linoleic acid assay**

The antioxidant activity was also evaluated using the  $\beta$ -carotene/linoleic acid model system according to Duarte-Almeida et al. (2006). Here, 0.5 mg of  $\beta$ -carotene were dissolved in 1 mL of chloroform, before 80  $\mu L$  of linoleic acid and 530  $\mu L$  of Tween 40 were added. The chloroform was completely evaporated for 30 min with oxygenator, after which 50 mL of oxygenated water was mixed vigorously with the solution. Then, 40  $\mu L$  of HAE ethanolic solution or standard (Gallic acid, trolox and  $\alpha$ -tocopherol) was added to 250  $\mu L$  of the reagent mixture. Absorbance was measured at 470 nm immediately ( $t = 0$  min) and after 120 min of incubation at 50 °C. Forty microliters of ethanol plus 250  $\mu L$  of

the reagent mixture were used as a positive control. The test was performed in triplicate and the antioxidant activity was calculated as the percentage inhibition of oxidation, using the following formula: **% Inhibition of oxidation** =  $[(\Delta\text{Abs}_0 - \Delta\text{abs}_1) / \Delta\text{Abs}_0] \times 100$ , where  $\Delta\text{Abs}_0$  = absorbance initial – absorbance final of control and  $\Delta\text{Abs}_1$  = absorbance initial – absorbance final of sample. Results were expressed as % inhibition of oxidation at the concentration of 500  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

## **2.8. Statistical analysis**

Results were expressed as means  $\pm$  standard error. 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. Clustering analysis was conducted using the Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average (UPGMA) method. For phytochemical analysis and antioxidant assays, ANOVA was performed followed by the t test and the differences between measurements were considered significant at  $p < 0.05$ ; calculations were performed using ASSISTAT version 7.7 beta software (Assistat Software, Campina Grande, Paraíba, Brazil). Principal component analysis (PCA), Pearson Linear Correlation and Hierarchical cluster analysis (HCA) were performed using XLSTAT for Windows (Addinsoft, New York, USA) in order to visualize relationships between the *T. diversifolia* samples in each collection area.

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Genetic variability**

The seventeen selected primers generated 57 discernible and reproducible DNA fragments, of 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

demonstrating the overall genetic relationship between the populations. The dendrogram obtained for *T. diversifolia* samples shows that ST has low genetic similarity to other populations (0.12), with higher genetic similarity found between MF and VIA (0.89), indicating high levels of genetic diversity and that clustering is not positively correlated with the proximity of geographical locations, as shown in Fig. 1. Genetic diversity is one of the most important attributes of 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 (DA SILVA et al., 1998; MUOGHALU; CHUBA, 2005), characteristics that could certainly contribute to a greater genetic variability. Besides that, in inbred species, the majority of the variability is concentrated between the populations (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000).

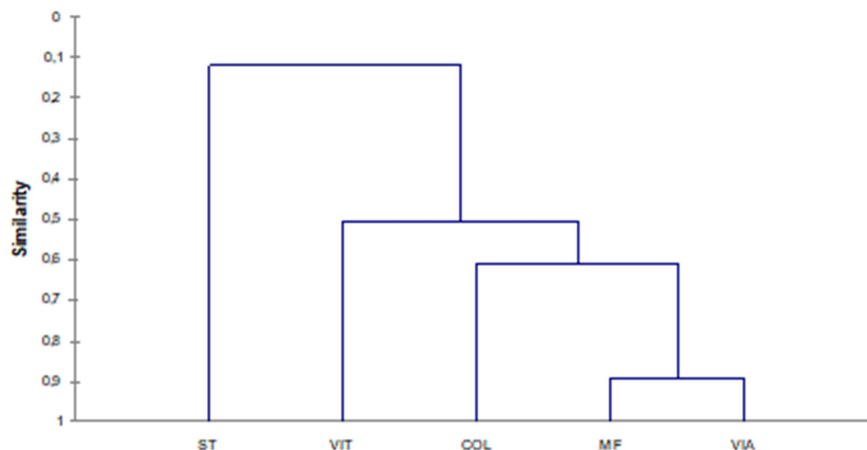


Figure 1 - RAPD based dendrogram. ST: Santa Teresa; VIT: Vitória; COL: Colatina; MF: Muniz Freire; VIA: Viana.

### 3.2. Phytochemical composition

The phytochemical prospecting showed positive results for flavonoids, coumarins, tannins, and steroids, with no indication of the presence of alkaloids and naphthoquinones for all locations; saponins were identified in VIT and COL (vegetative stage) and ST, MF, VIA, VIT and COL (reproductive stage) (Tab. 3). Studies have reported that chemical constituents of plants can be influenced by numerous factors such as genetic differences, temperature, salinity, water availability, luminosity, biotic and abiotic stress, season and phenological stage (CHEYNIER, 2012; CHIRINOS et al., 2013; HARZALLAH et al., 2016), which may be reflected in their pharmacological and therapeutic action.

Table 3 - Phytochemical compounds of *T. diversifolia* in crude HAE from five locations in the vegetative and reproductive stages.

Phytochemical constituents	ST V./ R.	MF V./ R.	VIA V./ R.	VIT V./ R.	COL V./ R.
Flavonoids	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Coumarins	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Steroids	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Triterpenes	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Alkaloids	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Tannins	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Saponins	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+
Naphthoquinones	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

+: presence of reaction; -: nondetected; ST: Santa Teresa; MF: Muniz Freire; VIA: Viana; VIT: Vitória. COL: Colatina; V.: vegetative stage; R.: reproductive stage.

Phytochemical composition defined by the TPC, TFC and TTC contents of all crude HAE was estimated due to data on the antioxidant, toxicological and pharmacological actions of phenolic compounds (Tab. 4). *T. diversifolia* extracts have shown great variability in the content of individual phenolic compound groups related to the growing locations and harvest times. Šamec et al. (2015) reported that the climatic-geographical conditions of a locality, influence positively the accumulation of polyphenolic phytochemicals in species of *T. arduini*. In another research with species of *Vaccinium* L., was evaluated about the

total phenolic content and presented great variations in this compounds amounts depending on harvesting stage: flowering and starting of berry formation, development and ripening of berries (Venskutonis et al., 2016). Besides that, Vlasisavljević et al. (2016) suggested that the difference in phenolic content among the growth stages of *Trifolium pratense* reflects biochemical changes occurring during growth, as well as differences in reactions to biotic and abiotic stresses at different growth stages.

The total phenolic content (TPC) of HAE is shown in Table 4. ST showed a high TPC in vegetative and reproductive stages (188 mg GAE.g<sup>-1</sup> and 113 mg GAE.g<sup>-1</sup>, respectively). Phenolic compounds possessing one or more aromatic rings bearing one or more hydroxyl substituents, confirm the structural characteristic responsible for the strong antioxidant activity attributed to this secondary metabolite (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; HUANG; CAI; ZHANG, 2009). Antioxidant phenolic compounds are able to retard or prevent autoxidation in low concentrations in comparison to the substrate and the resulting radical formed after scavenging must be stable, such as phenoxyl radicals (BORS; MICHEL, 2002; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

The total flavonoid content (TFC) is shown in Table 4. The highest concentration of flavonoids was observed in ST HAE in the vegetative and reproductive stages (166 mg RE.g<sup>-1</sup> and 154 mg RE.g<sup>-1</sup>, respectively). Flavonoids are able to scavenge free radicals directly by hydrogen atom donation. Epidemiological studies revealed that a flavonoid-rich diet is correlated with the increased longevity and decreased incidence of diseases (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

Tannins are important in protecting cellular oxidative damage, including lipid peroxidation; this property may be related to their anti-oxidative activity (OZCAN et al., 2014; PERRON; BRUMAGHIM, 2009). Total tannin content (TTC) was higher in ST HAE in vegetative and reproductive stages (305 mg TA.g<sup>-1</sup> and 134 mg TA.g<sup>-1</sup>,

respectively). In summary, the highest contents of phenols, flavonoids and tannins were observed in ST HAE and its phenol and tannin contents presented a reduction in the second collect (reproductive stage) in this population. Sampaio and collaborators (2016) reported that secondary metabolism is affected in *T. diversifolia* according to changes in the abiotic environmental factors of the location, which are directly related to the harvesting time.

Some studies have reported an association between exposure to metals and the accumulation of phenolic compounds (SAKIHAMA et al., 2002; SANTIAGO; LOURO; DE OLIVEIRA, 2000). ST population at the vegetative and reproductive stages presented higher levels of phenolic compounds (Tab. 4) and high concentrations of Fe and Zn micronutrients in the soil of this locality (Tab. 2). Polyphenol compounds are effective metal chelators (Perron et al., 2009). In our work, exposure to these metals seems to exert a strong influence on the production of secondary metabolite compounds, mainly phenolics and tannins, and consequently on the antioxidant activity.

Temperature is one of the factors that exerts an influence on vegetal development, therefore affecting the production of secondary metabolites; low temperatures have significant influences on secondary metabolite levels. Positive correlations between temperature decrease and higher phenolic compound production was found in several studies (Albert et al., 2009; Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Sampaio et al., 2011). ST locality presented the lowest average temperatures which may have contributed to a higher production of phenolic compounds.

Altitude, an ecological factor, can also affect the content of phenols. Plants growing in high-altitude environments are exposed to higher UV-B radiation and can be induced to produce bioactive compounds with radiation protection function (ZIDORN, 2010). The free radical scavenging potential of plant phenolics may also contribute to their protective activity against damage by UV-B radiation (SPITALER et al., 2006). The content of

phenolic compounds in *T. diversifolia* is higher in high altitude populations, which indicates that this factor significantly influence the control of the phenolics biosynthesis.



365 Table 4 - Content of phenolic compounds of *Tithonia diversifolia* collected from five localities at vegetative and reproductive stages.

Location	TPC (mg GAE.g <sup>-1</sup> ±SE)		TFC (mg RE.g <sup>-1</sup> ±SE)		TTC (mg TA.g <sup>-1</sup> ±SE)	
	Vegetative	Reproductive	Vegetative	Reproductive	Vegetative	Reproductive
ST	188 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 3.26	113 <sub>a</sub> <sup>B</sup> ± 1.13	166 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 5.64	154 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 1.24	305 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 5.58	134 <sub>a</sub> <sup>B</sup> ± 2.56
VIA	87.3 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 2.39	41.9 <sub>b</sub> <sup>B</sup> ± 1.16	102 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 0.57	80.7 <sub>d</sub> <sup>B</sup> ± 1.52	119 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 1.88	44.0 <sub>b</sub> <sup>B</sup> ± 0.41
MF	46.1 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 0.59	30.6 <sub>d</sub> <sup>B</sup> ± 1.50	87.4 <sub>d</sub> <sup>B</sup> ± 3.42	102 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 2.22	47.0 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 2.19	24.9 <sub>d</sub> <sup>B</sup> ± 0.64
VIT	17.6 <sub>d</sub> <sup>B</sup> ± 0.13	35.5 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 1.76	127 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 0.64	139 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 5.48	0.71 <sub>e</sub> <sup>B</sup> ± 0.51	36.8 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 1.58
COL	20.6 <sub>d</sub> <sup>A</sup> ± 2.26	26.0 <sub>e</sub> <sup>A</sup> ± 1.36	76.4 <sub>e</sub> <sup>B</sup> ± 1.66	103 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 0.53	12.6 <sub>d</sub> <sup>B</sup> ± 2.26	38.2 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 1.31

366 All the values are expressed as mean ± SE (n=3); SE: standard error; TPC: total phenols content; TFC: total flavonoids content; TTC: total tannins content. <sup>a-c</sup>, Means in the columns  
367 with different letters are significantly different. <sup>A-B</sup>, Means in the rows with different letters are significantly different, ANOVA, test-t ( $p < 0.05$ ). ST: Santa Teresa; VIA: Viana; MF:  
368 Muniz Freire; VIT: Vitória; COL: Colatina.  
369

370

### 371 3.3. Antioxidant activity

#### 372 3.3.1. Scavenging activity

373 The results of DPPH and ABTS assays were expressed as  $EC_{50}$  values ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and are  
374 shown in Table 5. A lower  $EC_{50}$  value indicates a stronger ability of the extract to act as a  
375 scavenger, while a higher  $EC_{50}$  value indicates a weak ability of the extract to achieve 50%  
376 scavenging reaction. For the DPPH assay, samples of ST showed a radical scavenging activity  
377 that was significantly higher than the other locations in the vegetative and reproductive stages  
378 (71.1 and 191  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively). ST, VIA and MF showed an increase in  $EC_{50}$  value  
379 when compared to vegetative and reproductive stages. A similar antioxidant activity detected  
380 by DPPH test in *T. diversifolia* was reported by Juang and collaborators (2014).

381 For the ABTS assay, the scavenging activity of ST was higher among the localities in the two  
382 phenological stages (221 and 265  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively). In a similar study, leaf samples of *T.*  
383 *diversifolia* showed high antioxidant activity by the ABTS method (THONGSOM et al.,  
384 2013). These results might be strongly connected to the high TPC and TTC values found for  
385 the same plants, being indicative that phenolic compounds and tannins greatly contributed to  
386 their antioxidant activity. Other studies relate the contents of phenolic and tannins compounds  
387 with strong antioxidant activity (CHEN; LIN; HSIEH, 2007; CHIRINOS et al., 2013;  
388 HARZALLAH et al., 2016). Correlations between TPC and TTC with antioxidant activity  
389 assays are displayed in Table 6 and Table 7. At the vegetative stage (Tab. 6), high correlations  
390 were found between TPC and TTC with ABTS ( $R^2 = -0.851$  and  $-0.836$ , respectively). During  
391 the reproductive stage (Tab. 7), high correlations were found between TTC with DPPH ( $R^2 = -$   
392  $0.853$ ) and TPC, TFC and TTC with ABTS ( $R^2 = -0.874$ ,  $-0.829$  and  $-0.942$ , respectively).

393

394

395

396 Table 5 - Antioxidant activities of *Tithonia diversifolia* from five populations at vegetative and reproductive stages.

	DPPH EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )		ABTS EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )		Chelating activity EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )		FRAP EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	
	Vegetative	Reproductive	Vegetative	Reproductive	Vegetative	Reproductive	Vegetative	Reproductive
ST	71 <sub>e</sub> <sup>B</sup> ± 0.97	191 <sub>d</sub> <sup>A</sup> ± 15.6	221 <sub>e</sub> <sup>B</sup> ± 5.23	265 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 0.77	1447 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 78.7	1310 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 20.7	334 <sub>c</sub> <sup>B</sup> ± 14.3	782 <sub>d</sub> <sup>A</sup> ± 17.7
VIA	167 <sub>d</sub> <sup>B</sup> ± 7.63	460 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 9.90	654 <sub>d</sub> <sup>A</sup> ± 45.7	549 <sub>ab</sub> <sup>A</sup> ± 41.4	929 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 9.16	651 <sub>d</sub> <sup>B</sup> ± 10.6	925 <sub>c</sub> <sup>B</sup> ± 17.4	1980 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 26.0
MF	391 <sub>c</sub> <sup>B</sup> ± 11.9	625 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 40.2	1364 <sub>c</sub> <sup>A</sup> ± 17.2	574 <sub>a</sub> <sup>B</sup> ± 38.5	939 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 7.80	875 <sub>c</sub> <sup>B</sup> ± 8.30	1814 <sub>b</sub> <sup>B</sup> ± 9.42	2463 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 38.6
VIT	639 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 48.5	384 <sub>c</sub> <sup>B</sup> ± 7.18	3294 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 143	465 <sub>b</sub> <sup>B</sup> ± 21.9	957 <sub>b</sub> <sup>B</sup> ± 11.3	1263 <sub>ab</sub> <sup>A</sup> ± 35.6	2438 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 36.2	1792 <sub>c</sub> <sup>B</sup> ± 62.3
COL	1083 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 35.1	396 <sub>c</sub> <sup>B</sup> ± 8.50	2545 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 178	460 <sub>b</sub> <sup>B</sup> ± 40.4	1360 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 48.0	1243 <sub>b</sub> <sup>A</sup> ± 7.59	5707 <sub>a</sub> <sup>A</sup> ± 154	2020 <sub>b</sub> <sup>B</sup> ± 60.2
AA	51.5 <sub>c</sub> ± 1.39	51.5 <sub>c</sub> ± 1.39	-	-	-	-	-	-
Trolox	-	-	57.6 <sub>c</sub> ± 0.72	57.6 <sub>d</sub> ± 0.72	-	-	-	-
EDTA	-	-	-	-	17.3 <sub>c</sub> ± 0.24	17.3 <sub>c</sub> ± 0.24	-	-
FeSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	510 <sub>c</sub> ± 0.92	510 <sub>e</sub> ± 0.92

397 All the values are expressed as mean + SE (n=3); SE: standard error; a-f, Means in the columns with different letters are significantly different. A-B, Means in the rows with different letters are significantly different, ANOVA,  
 398 test-t (p< 0.05). ST: Santa Teresa; VIA: Viana; MF: Muniz Freire; VIT: Vitória; COL: Colatina.; AA: ascorbic acid.

399

400

401

402

403

404

405

406

### **3.3.2. Fe<sup>2+</sup> ion-chelating activity**

The chelating activity has been used to determine the ability of components in plant extracts to sequester the free metal ions. The antioxidant activity by the chelating activity of HAE on Fe<sup>2+</sup> was significantly lower for all locations compared to the EDTA standard. VIA and MF showed a reduction of EC<sub>50</sub> in the reproductive stage (Tab. 5).

In general, samples of HAE of *T. diversifolia* showed a weak antioxidant activity profile by the metal ion chelation mechanism, despite their high flavonoid content (Tab. 5). The hydroxyl groups of flavonoids may capture metal ions; this ability depends on the availability of functional groups and their orientation (AHMADI et al., 2008; WONG; LEONG; WILLIAM KOH, 2006). Chelating complexes with divalent cations may form between the 5-OH and 4-oxo group, or between the 3'- and 4'-OH (KUMAR; PANDEY, 2013). In this work, a high positive correlation was observed between flavonoids and chelating activity in the reproductive stage (Tab. 6 and 7). These results suggest that differences in the structural components of phenolic compounds, particularly flavonoids, affect the radical cleansing mechanisms. Studies suggest the influence of structural modifications, that occur during metabolism, modified the flavonoids structure-activity in the radical scavenging and chelating activity (Heim et al., 2002). Thereby, it is possible that alterations in the metabolism of the reproductive stage have induced the production of flavonoids with more attributes required for the chelation of metals.

### **3.3.3. Reducing power (FRAP)**

The reducing power obtained for the samples of ST are higher than those obtained for other locations, with the value of EC<sub>50</sub> (334 µg.mL<sup>-1</sup>) equivalent to the standard in the vegetative stage. VIT and COL exhibited a reduction of EC<sub>50</sub> in the reproductive stage (Tab. 5). In the reproductive stage (Tab. 7), high correlations were observed between

TPC and TTC with FRAP ( $R^2 = -0.930$  and  $-0.957$ , respectively). The higher reducing activity in ST samples may occur due to high phenol, flavonoid and tannin contents, with a similar result to that found by (RAUDONIS et al., 2012). The samples of ST showed the lowest  $EC_{50}$  values for the FRAP test and Pearson correlation analysis showed a strong correlation with the total phenolics and total tannins. As ST sample presented the highest content of these compounds, they are likely to contribute strongly to the antioxidant activity through the electron donation mechanism.

#### **3.3.4. $\beta$ -carotene/linoleic acid model system**

The effects of *T. diversifolia* extracts on the inhibition of peroxidation of  $\beta$ -carotene/linoleic acid under heating were expressed as % inhibition of oxidation. HAE from ST showed greater oxidation protection than the HAE from the other locations in the two phenological stages, with 60.31% and 37.64% in the vegetative and reproductive stages, respectively (Fig. 2).

There were variations in the inhibition of lipid peroxidation potential between populations and the outcrossing of this potential was observed in plants in the reproductive stage. The two stages of *T. diversifolia* development occur during different seasons of the year and the phenological stage is probably the predominant interfering variable in the secondary metabolism pathways, as all plants were located in a tropical climate environment whose seasons are not well defined. Similar studies related the interference of phenological plant stages to the antioxidant activity (GHASEMI PIRBALOUTI et al., 2013; PORRES-MARTÍNEZ et al., 2014). In our study, all populations exhibited enhanced protection against oxidation at the vegetative stage, suggesting a shift in biosynthesis routes or the allocation of phenolic compounds in the vegetative to reproductive stage.

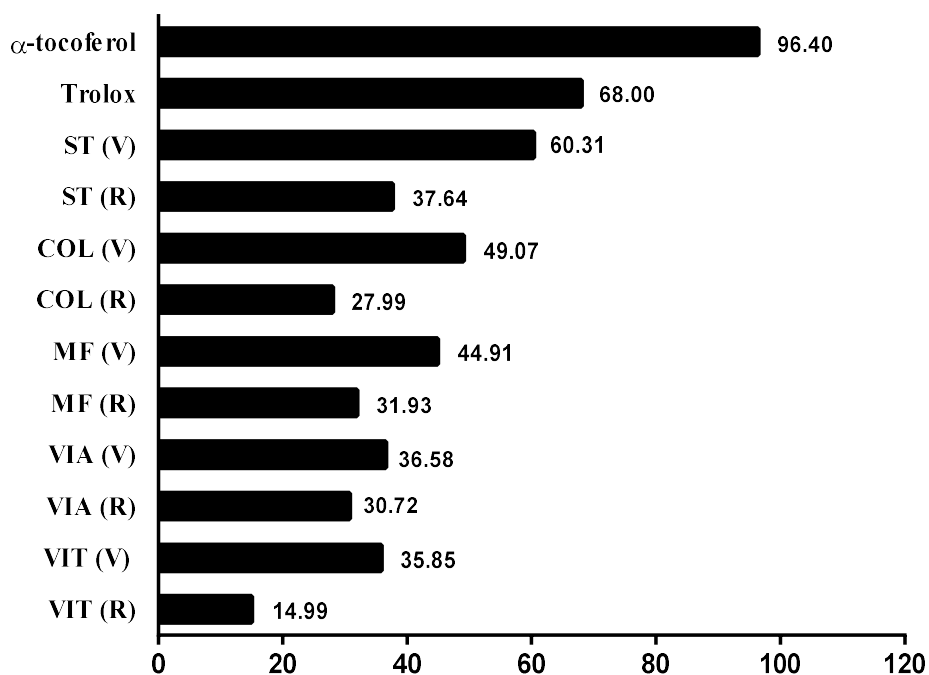


Figure 2 - Relative antioxidant activity of *T. diversifolia* extracts and standards in  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay. V.: vegetative stage; R.: reproductive stage. ST: Santa Teresa; COL: Colatina; MF: Muniz Freire; VIA: Viana; VIT: Vitória.

### 3.4. Explorative analyses: Principal component analysis (PCA) and Hierarchical cluster analysis (HCA)

An evaluation of the data was carried out using principal component analysis (PCA) and Hierarchical cluster analysis (HCA) to investigate similarities and differences between the populations and to identify the factors influencing each one.

The first PCA refers to the vegetative stage (Fig. 3A) and accounts for 64.48% of the total variance (88.49%) in the first component, while the second component accounted for 24.01%. The second PCA refers to the reproductive stage (Fig. 3B) and accounted for 66.84% of the total variance (90.81%) and 23.98% in the second component. Comparisons between PCA plots indicated that for two PCAs, PC1 was dominated by the following variables: TTC, TFC, TPC, DPPH, ABTS and FRAP. These results indicate TPC, TFC and TTC content and that these three antioxidant activities are strongly correlated with each other. HAE ST contains the highest phenol, flavonoid and

tannin levels among all samples, and seem to be the principal contributors to the strong antioxidant activity revealed by the reducing power, ABTS and DPPH scavenging.

Pearson correlation analysis demonstrated a high correlation between ABTS with TPC and TTC in the vegetative stage (Tab. 6). In the reproductive stage, high correlation was demonstrated between TPC, TFC and TTC with ABTS, DPPH, FRAP and  $\beta$ -carotene (Tab. 7). Phenolic compounds, such as flavonoids and tannins, are considered the main factors responsible for the antioxidant capacity of plants (TLILI et al., 2014); in this study, the content of phenolic compounds was strongly related to antioxidant activity in five *T. diversifolia* populations.

Hierarchical cluster analysis (dendrogram) was generated based on antioxidant activity and the phytochemical content of HAE of *T. diversifolia* from five populations at vegetative and reproductive stages. The clustering presented by the HCA in both phenological stages (Fig. 4 A and B) resembles the grouping obtained by the RAPD analysis (Fig. 1). This analysis indicates that phytochemical and antioxidant variations between populations are influenced by genetic factors as well as environmental conditions. It is important to note that there was variation in the grouping of the populations according to harvest time, which can be attributed to changes in the secondary metabolism of the plant in the different phenological stages. The vegetative and reproductive stages can be distinguished by the accentuated production of phenolic compounds that participate in protection against pathogens and pollinating mechanisms, respectively (Farhat et al., 2015). In general, the extracts of ST in the vegetative stage showed high capacity in terms of neutralizing free radicals by DPPH, ABTS, FRAP and  $\beta$ -carotene assays as well as the higher levels of phenolic compounds. The present study confirms the importance of choosing the optimal harvest time.

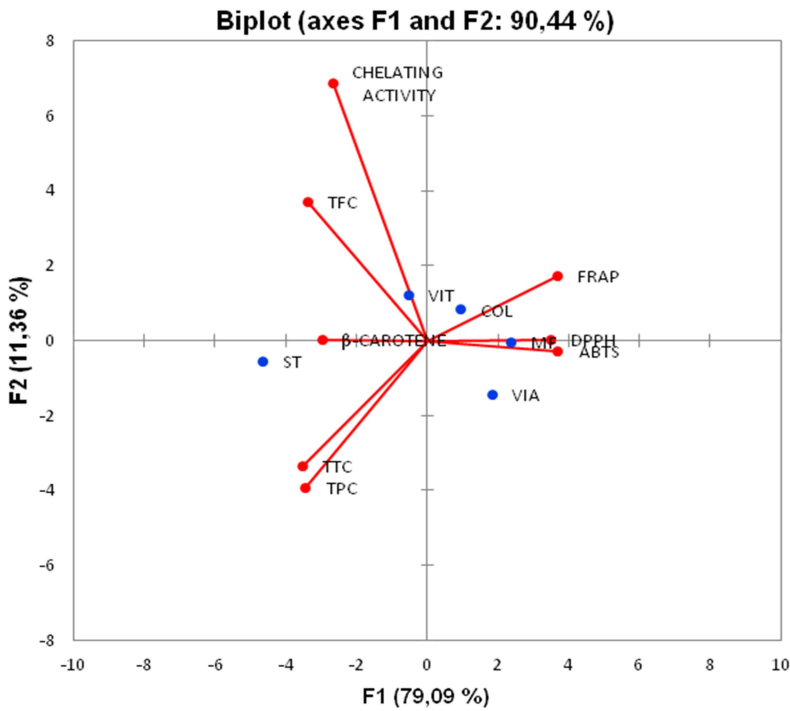
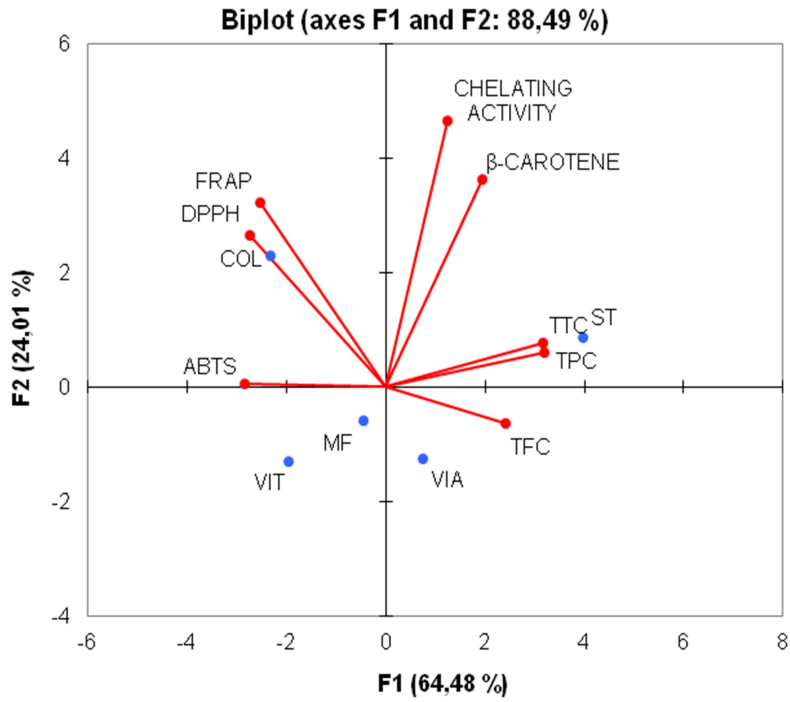


Figure 3 - Principal components analysis (scores and loading plots, biplot) based on different phytochemical compounds analyzed in HAE of *T. diversifolia* and their antioxidant activity (DPPH, ABTS, FRAP, Chelating activity and  $\beta$ -carotene) in the vegetative (A) and reproductive (B) stages.



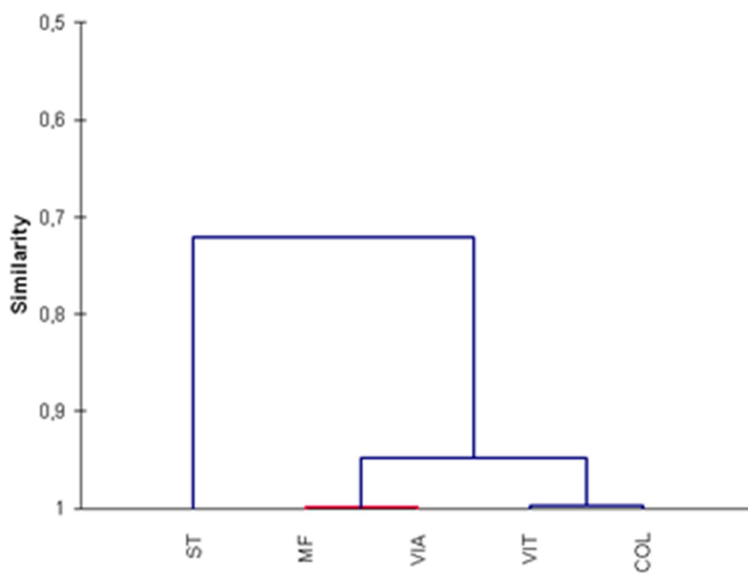
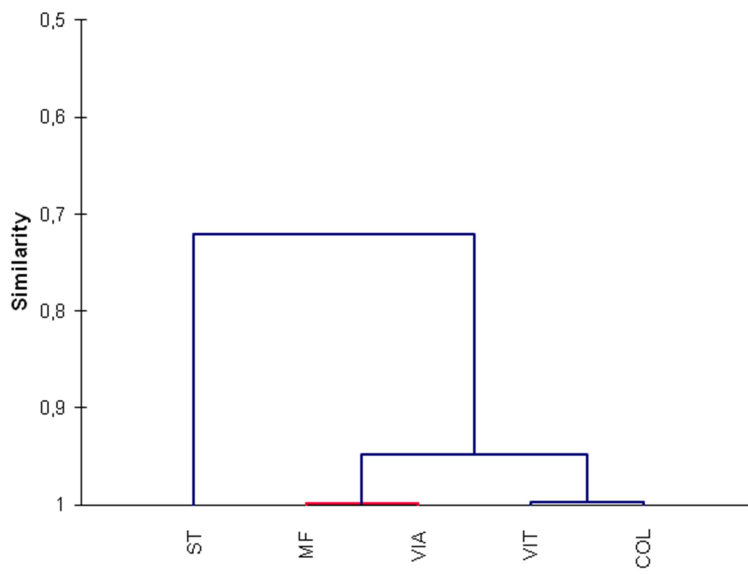


Figure 4 - Hierarchical clusters analysis based on phytochemical content and antioxidant activity of HAE from five *T. diversifolia* populations at vegetative (A) and reproductive (B) stages.

Table 6 - Pearson correlation analysis between phenolic compound contents and antioxidant activities in the vegetative stage.

	TPC	TFC	TTC	DPPH	ABTS	Ch. Activity	FRAP	$\beta$ -Carotene
TPC	<b>1</b>							
TFC	0.767	<b>1</b>						
TTC	0.999	0.770	<b>1</b>					
DPPH (EC <sub>50</sub> )	-0.780	-0.614	-0.754	<b>1</b>				
ABTS (EC <sub>50</sub> )	-0.851	-0.364	-0.836	0.823	<b>1</b>			
Ch.Activity (EC <sub>50</sub> )	0.503	0.359	0.536	0.148	-0.212	<b>1</b>		
FRAP (EC <sub>50</sub> )	-0.707	-0.663	-0.681	0.982	0.703	0.236	<b>1</b>	
$\beta$ -Carotene (%)	0.641	0.130	0.654	-0.222	-0.686	0.731	-0.069	<b>1</b>

The antioxidant activity was calculated in EC<sub>50</sub> for the DPPH, ABTS, Chelating activity and FRAP tests, therefore, negative values are expected for correlations between these antioxidant activity and the content of phenolic compounds. Negative values were obtained in that higher antiradical activity corresponded to lower EC<sub>50</sub> values.

Table 7 - Pearson correlation analysis between phenolic compound contents and antioxidant activities in the reproductive stage.

	TPC	TFC	TTC	DPPH	ABTS	Ch. Activity	FRAP	$\beta$ -Carotene
TPC	<b>1</b>							
TFC	0.679	<b>1</b>						
TTC	0.987	0.681	<b>1</b>					
DPPH (EC <sub>50</sub> )	-0.785	-0.726	-0.853	<b>1</b>				
ABTS (EC <sub>50</sub> )	-0.874	-0.829	-0.925	0.943	<b>1</b>			
Ch.Activity (EC <sub>50</sub> )	0.365	0.829	0.445	-0.675	-0.743	<b>1</b>		
FRAP (EC <sub>50</sub> )	-0.930	-0.770	-0.957	0.954	0.958	-0.567	<b>1</b>	
$\beta$ -Carotene (%)	0.729	0.860	0.659	-0.559	-0.640	0.431	-0.715	<b>1</b>

The antioxidant activity was calculated in EC<sub>50</sub> for the DPPH, ABTS, Chelating activity and FRAP tests, therefore, negative values are expected for correlations between these antioxidant activity and the content of phenolic compounds. Negative values were obtained in that higher antiradical activity corresponded to lower EC<sub>50</sub> values.

#### 4. Conclusion

The results of the investigation of the chemical and genetic diversity in five populations of *T. diversifolia* have revealed a strong role of the genetic structure in the evaluated populations. ST has low genetic similarity to others and the clustering is not positively correlated with the proximity of geographical locations. The present study assumes significance as it provides valuable information on the pattern of genetic variation existing in this medicinally important species. However, the environmental conditions, mainly the nutrients of the soil and the phenological stage, also seem to exert an important influence on the production of phenolic compounds. The present investigation

revealed that *T. diversifolia* contains considerable amounts of total phenolics, flavanoids, and tannins and exhibited great antioxidant activity by effectively scavenging various free radicals. However, it is still unclear which components are playing vital roles for these activities. Therefore, further studies are still needed to elucidate the mechanistic way in which the plant contributes to these properties.

### **Acknowledgements**

This work is an integral part of the project financed by FAPES. The authors thank for the doctoral scholarship granted by FAPES. The authors thank Jean Carlos Vencioneck Dutra for proof reading the manuscript.

### **Conflicts of interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **5. References**

- Ahmadi, A., Hosseinimehr, S.J., Naghshvar, F., Hajir, E., Ghahremani, M., 2008. Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Arch. Pharm. Res.* 31, 794–797.
- Albert, A., Sareedenchai, V., Heller, W., Seidlitz, H.K., Zidorn, C., 2009. Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. *Oecologia* 160, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1277-1>
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bors, W., Michel, C., 2002. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957, 57–69. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02905.x>
- Botsaris, A.S., 2007. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora

- Medicinal. J. Ethnobiol. Ethnomed. 3, 1-8.
- Chagas-Paula, D.A., Oliveira, R.B., Rocha, B.A., Da Costa, F.B., 2012. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). Chem. Biodivers. 9, 210–235. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100019>
- Chen, H.Y., Lin, Y.C., Hsieh, C.L., 2007. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. Food Chem. 104, 1418–1424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.004>
- Cheyrier, V., 2012. Phenolic compounds: From plants to foods. Phytochem. Rev. 11, 153–177. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., Campos, D., 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. Ind. Crops Prod. 47, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025>
- Costa, A.F., 1982. Farmacognosia. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 1032p.
- Costa, A.F., 1986. Farmacognosia. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. 1032p.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. Nat. Prod. Rep. 26, 1001–1043. <https://doi.org/10.1039/B802662A>
- Silva, F.C., BARRETO, W.O., PEREZ, D.V, Silva, C.A., 2009. Manual de métodos de análises químicas para avaliação da fertilidade do solo. EMBRAPA-CNPS. Doc.
- Di Giacomo, C., Vanella, L., Sorrenti, V., Santangelo, R., Barbagallo, I., Calabrese, G., Genovese, C., Mastrojeni, S., Ragusa, S., Acquaviva, R., 2015. Effects of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray extract on adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. PLoS One 10, 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122320>
- Djerrad, Z., Kadik, L., Djouahri, A., 2015. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. Ind. Crops Prod. 74, 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.049>
- Doyle, J.J., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.

- Phytochem. Bull. 19, 11–15.
- Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J. Dos, Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 26, 446–452.
- Farhat, M., Jordán, M.J., Chaouch-Hamada, R., Landoulsi, A., Sotomayor, J.A., 2015. Changes in phenolic profiling and antioxidant capacity of *Salvia aegyptiaca* L. byproducts during three phenological stages. *LWT – Food Sci. Technol.* 63, 791–797.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.015>.
- Gauer, L., Cavalli-Molina, S., 2000. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity (Edinb.)* 84, 647–656.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova* 30, 374–381.
- Harzallah, A., Bhourri, A.M., Amri, Z., Soltana, H., Hammami, M., 2016. Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts juices of three figs (*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. *Ind. Crops Prod.* 83, 255–267.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.043>
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584.  
[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Zhang, Y., 2009. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer* 62, 1–20.  
<https://doi.org/10.1080/01635580903191585>
- Jayakumar, K., VG, M.K., Murugan, K., 2016. Evaluation of antioxidant and antihemolytic activities of purified caulophyllumine-A from *Solanum mauritianum* Scop. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 5, 195.
- Juang, C.L., Yang, F., Hsieh, M., Tseng, H.Y., Chen, S.C., Wen, H.C., 2014. Investigation of anti-oxidative stress in vitro and water apparent diffusion coefficient in MRI on rat after

- spinal cord injury in vivo with *Tithonia diversifolia* ethanolic extracts treatment. BMC Complement. Altern. Med. 14, 447–454. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-447>
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Sci. World J. 2013, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.08.006>
- Lee, M.Y., Liao, M.H., Tsai, Y.N., Chiu, K.H., Wen, H.C., 2011. Identification and anti-human glioblastoma activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* methanolic extract. J. Agric. Food Chem. 59, 2347–2355. <https://doi.org/10.1021/jf105003n>
- Muoghalu, J.I., 2008. Growth, reproduction and resource allocation of *Tithonia diversifolia* and *Tithonia rotundifolia*. Weed Res. 48, 157–162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2007.00613.x>
- Muoghalu, J.I., Chuba, D.K., 2005. Seed germination and reproductive strategies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) gray and *Tithonia rotundifolia* (P.M) blake. Appl. Ecol. Environ. Res. 3, 39–46.
- Ozcan, T., Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L., Delikanli, B., 2014. Phenolics in Human Health. Int. J. Chem. Eng. Appl. 5, 393–396. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.416>
- Pansera, M.R., Santos, a. C. a., Paese, K., Wasum, R., Rossato, M., Rota, L.D., Pauletti, G.F., Serafini, L. a., 2003. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. Rev. Bras. Farmacogn. 13, 17–22. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000100002>
- Perdigão, T.L., 2012. Avaliação morfofisiológica, fitoquímica e mutagênica de *Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Deg exposta a diferentes concentrações de alumínio. 1-82.
- Perron, N.R., Brumaghim, J.L., 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell Biochem. Biophys. 53, 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>
- Pirbalouti, A.G., Firoznejhad, M., Craker, L., Akbarzadeh, M., 2013. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. Rev. Bras. Farmacogn. 23, 861–869.
- Porres-Martínez, M., González-Burgos, E., Carretero, M.E., Gómez-Serranillos, M.P., 2014.

- Influence of phenological stage on chemical composition and antioxidant activity of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oils. *Ind. Crop. Prod.* 53, 71–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.024>
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Raudonis, R., Raudone, L., Jakstas, V., Janulis, V., 2012. Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries. *J. Chromatogr. A* 1233, 8–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.019>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956.  
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rufino, M., Alves, R.E., De Brito, E.S., De Moraes, S.M., Sampaio, C. de G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.D., 2006. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Embrapa Agroindústria Trop. Comun. técnico.*
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H., 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177, 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00196-8)
- Šamec, D., Durgo, K., Grúz, J., Kremer, D., Kosalec, I., Piljac-Žegarac, J., Salopek-Sondi, B., 2015. Genetic and phytochemical variability of six *Teucrium arduini* L. populations and their antioxidant/prooxidant behaviour examined by biochemical, macromolecule- and cell-based approaches. *Food Chem.* 186, 298–305.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.135>
- Sampaio, B.L., Edrada-Ebel, R., Da Costa, F.B., 2016. Effect of the environment on the

- secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: A model for environmental metabolomics of plants. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep29265>
- Sampaio, B.L., Bara, M.T.F., Ferri, P.H., da Costa Santos, S., de Paula, J.R., 2011. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. *Brazilian J. Pharmacogn.* 21, 1127–1137. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000177>
- Santiago, L.J.M., Louro, R.P., De Oliveira, D.E., 2000. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. *Ann. Bot.* 86, 1023–1032.
- Silva, F.C., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos.
- Singh, S., Panda, M.K., Nayak, S., 2012. Evaluation of genetic diversity in turmeric (*Curcuma longa* L.) using RAPD and ISSR markers. *Ind. Crops Prod.* 37, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.022>
- Spitaler, R., Schlorhauser, P.D., Ellmerer, E.P., Merfort, I., Bortenschlager, S., Stuppner, H., Zidorn, C., 2006. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. *Phytochemistry* 67, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.018>
- Thongsom, M., Chunglok, W., Kuanchuea, R., Tangpong, J., 2013. Antioxidant and hypoglycemic effects of *Tithonia diversifolia* aqueous leaves extract in alloxan-induced diabetic mice. *Adv. Environ. Biol.* 7, 2116–2125.
- Tlili, N., Mejri, H., Yahia, Y., Saadaoui, E., Rejeb, S., Khaldi, A., Nasri, N., 2014. Phytochemicals and antioxidant activities of *Rhus tripartitum* (Ucria) fruits depending on locality and different stages of maturity. *Food Chem.* 160, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.030>
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Mesia, K., Penge, O., Lusakibanza, M., Cimanga, K., De Bruyne, T., Apers, S., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2000. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in



Kinshasa, Congo. *Phytomedicine* 7, 31–38. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80019-7)

- Valdés, L., Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., González, S., 2015. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food Funct.* 6, 2424–2439. <https://doi.org/10.1039/c5fo00322a>
- Valdez-Morales, M., Espinosa-Alonso, L.G., Espinoza-Torres, L.C., Delgado-Vargas, F., Medina-Godoy, S., 2014. Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5281–5289. <https://doi.org/10.1021/jf5012374>
- Venskutonis, P.R., Barnackas, Š., Kazernavičiūtė, R., Maždžierienė, R., Pukalskas, A., Šipailienė, A., Labokas, J., Ložienė, K., Abrutienė, G., 2016. Variations in antioxidant capacity and phenolics in leaf extracts isolated by different polarity solvents from seven blueberry (*Vaccinium* L.) genotypes at three phenological stages. *Acta Physiol. Plant.* 38, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2053-y>
- Vlaisavljević, S., Kaurinović, B., Popović, M., Vasiljević, S., 2016. Profile of phenolic compounds in *Trifolium pratense* L. extracts at different growth stages and their biological activities. *Int. J. Food Prop.* 1-33. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1273235>
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant drug analysis* 2nd ed. Heidelb. Springer Verlag.
- Wong, S.P., Leong, L.P., William Koh, J.H., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* 99, 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.058>
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D.A., Barrow, C.J., 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 18: 445–450. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9048-4>
- Zhu, Y.Z., Huang, S.H., Tan, B.K.H., Sun, J., Whiteman, M., Zhu, Y.C., 2004. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Nat. Prod. Rep.* 21, 478–489.
- Zidorn, C., 2010. Altitudinal variation of secondary metabolites in flowering heads of the Asteraceae : trends and causes. *Phytochem. Ver.* 9:197–203 197–203. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9143-7>

## **CAPÍTULO 2**

O manuscrito intitulado “Phytochemicals and antiproliferative and mutagenic activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) depending on locality and phenological stage” será submetido para avaliação ao periódico *Food and Chemical Toxicology* após revisão da língua inglesa.

**Phytochemicals and antiproliferative and mutagenic activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) depending on locality and phenological stage**

Irany Rodrigues Pretti\*, Anny Carlyne da Luz, Jean Carlos Dutra Vencioneck,  
Mainã Mantovanelli da Mota, Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo,  
Vitória–ES, Brazil.

\*Corresponding author: Irany Rodrigues Pretti

Departamento de Ciências Biológicas

Laboratório de Genética Vegetal e Toxicológica

Universidade Federal do Espírito Santo

Av. Fernando Ferrari 514, Goiabeiras, 29075 - 910, Vitória, ES, Brazil

Phone: Tel. 55 27 999746702

Email address: [iranyrpretti@gmail.com](mailto:iranyrpretti@gmail.com)

## **Abstract**

*Tithonia diversifolia* is a plant traditionally used in folk medicine for the treatment of diabetes, menstrual cramps, malaria, hepatitis, hepatomas and wounds. Phenolics compounds (chlorogenic acid, rutin, luteolin, quercetin, coumarin and tannins) were quantified using leaves from plants of different locations and in two phenological stages (vegetative and reproductive). Additionally, cytotoxic and mutagenic activities of the samples were tested by *in vitro* MTT assay and *in vivo* micronucleus test in mice peripheral blood, respectively. The quantification of metabolites was performed using HPLC-DAD. The amount of phenolic compounds was the greatest at the ST sample at vegetative stage, as well as high antiproliferative capacity in S180 cells. The content of phenolic compounds varied significantly among the different populations and the phenological stages. Among the environmental factors analyzed, the temperature seems to act more significantly in the production of phenolic compounds. Our research indicates that the leaves of *T. diversifolia* show n therapeutic potential and can be used for the development of new drugs.

**Keywords:** HPLC, phenolics compounds, micronuclei, MTT, secondary metabolites.

## 1. Introduction

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) is a perennial shrub, known as Mexican Sunflower, that originated in Mexico and widely dispersed in Central America, as well as in Asia and Africa (Chagas-Paula et al., 2012; Miranda et al., 2015). This specie has been traditionally used in folk medicine for treatment of abscesses, malaria, hematomas, muscular cramps, bruises, wounds, skin infections and the treatment of diabetes (Kuroda et al., 2007). More than 150 compounds have been reported from *T. diversifolia*, and it is considered the most studied *Tithonia* species (Chagas-Paula et al., 2012; Zhao et al., 2012). Among the isolated secondary metabolites are the phenolic compounds, which are responsible for the medicinal properties of this plant, such as anticarcinogenic, antimutagenic, antioxidant and antimicrobial activity (Valdez-Morales et al., 2014).

Phenolic compounds are metabolites derived from pentose phosphate, shikimate and phenylpropanoid in plants (Balasundram et al., 2006). These compounds are considered potential antioxidants, therefore may be useful in the prevention of diseases resulting from oxidative stress (Bacanli et al., 2015). Studies indicate the use of plants as sources of natural antioxidants that present low risk and which can be used as an adjunct in the treatment of various diseases (Silva et al., 2005).

Free radicals are capable of damaging the structural and functional components of cells, such as lipids, proteins, carbohydrates, DNA and RNA (Yesil-Celiktas et al., 2007). Natural antioxidants, such as phenolics, can help prevent oxidative damage to cellular components (Yao et al., 2016). However, in spite of their antioxidant action, phenolic compounds may have harmful effects on the

organism due to their possible pro-oxidant properties, depending on the time of exposure and the doses (Silva et al., 2015). Studies show that *T. diversifolia* contains potential cytotoxic compounds that are potential to be developed for future anticancer drug (Wahyuningsih et al., 2015).

Plants of the same species that grow under different environmental conditions show significant differences in the production and accumulation of secondary metabolites, which, in turn, promote the chemical interaction between plants and the environment. Therefore, studies that evaluate the variation in the production of metabolites are very useful in the chemical characterization of plants of the same species, which have been collected in different regions and season (Sampaio et al., 2016). Some factors act as major sources of variation in the levels of secondary metabolites: temperature, precipitation, altitude, soil, season (Chirinos et al., 2013; Djerrad et al., 2015; Tlili et al., 2014), phenological stage (Ghasemi Pirbalouti et al., 2013) and genetic differences (Šamec et al., 2015). Thus, it is important to understand how environmental conditions may affect the production of metabolites, to maximize the yield of active constituents. The objective of this work was to investigate the influence of environmental factors, as well as the phenological stage of *T. diversifolia*, on the production of phenolic compounds using HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection), and evaluate the cytotoxic activity of the hydroalcoholic extract of these plants by *in vitro* MTT assay in two cell lines, as well as its *in vivo* mutagenic potential in peripheral blood cells of mice.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Plant material

The aerial parts of ten *Tithonia diversifolia* adult specimens were randomly selected and collected at five localities of Southeastern Brazil region: 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° 55' 38.9"; 40° 55' 78.3"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), in September 2014 and April 2015. Voucher specimen (VIES 35297) was deposited in the Central Herbarium of Federal University of the Espírito Santo/VIES, Brazil. The samples were air-dried at room temperature and then ground for further analysis.

### 2.2. Environmental conditions data

In order to correlate the chemical variability among localities with the geographic variation and environmental conditions, the data of altitude, accumulated precipitation and average temperature referring to the month of collection are described in Table 1 (Weather Information System/Incapere).

Table 1. Environmental conditions data.

Location	Altitude (m)	Accumulated precipitation (mm)		Average temperature (° C)	
		2014	2015	2014	2015
ST	612	112.8	64.6	16.9	18.6
VIA	40	21.8	17.8	23.3	25.0
MF	603	17.9	76.4	21.8	23.0
VIT	10	83.2	55.6	23.3	25.1
COL	50	59.6	21.0	23.7	24.9

ST: Santa Teresa; MF: Muniz Freire; VIA: Viana; VIT: Vitória; COL: Colatina.

### **2.3. Preparation of hydroalcoholic extract**

The *T. diversifolia* powder was macerated with ethanol 70%, protected from light, in the solvent to powder ratio of 5/1 (v/w) for 72h, at room temperature. The process was repeated twice with same powder to extract the maximum of constituents. Then, resulting liquids were filtered and concentrated under vacuum evaporator TE-210 (TECNAL, Brazil) to obtain the crude hydroalcoholic extracts of *T. diversifolia* (HAE).

### **2.4. Fractionation of crude hydroalcoholic extract**

The fractions were prepared from crude hydroalcoholic extracts; 0.5 g of each HAE was dissolved in distilled water (50 ml). 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) and glass separation funnel (Dorman and Hiltunen, 2004). The n-hexane solvent (50 ml) was added to the funnel, and the n-hexane fraction was then extracted. In the next step, the remainder of the solvent in the settling funnel was mixed with dichloromethane solvent, and the dichloromethane fraction was extracted. Then, 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 to obtain the n-butanol fractions. All fractions were collected separately and dried at room temperature. Three fractions were obtained by successive partition and designated as follows: dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc) and butanol (ButOH).



## 2.5. Quantification of phenolics compounds by HPLC-DAD

HPLC analyses were carried using 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 (Model DGU-20A5). Data collection and integration was accomplished using LC Solutions, 1.25 version software. The separation was performed with a C18 reverse phase column ZORBAX Eclipse XDB®, Agilent (4.6 mm x 250 mm, 5µm). The mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. These analyses were performed in the Laboratory of Biomolecular Analysis (LABIOM) at the Federal University of Espírito Santo, Vitória-ES, Brazil.

The methanolic solution of the ethyl acetate fraction was used for quantification of flavonoids and the dichloromethane fraction was used to quantify tannins and coumarins. The injection volume was 20 µL of each solution. The HPLC assay for the detection of flavonoids was performed using isocratic mobile phase with 1 mL.min<sup>-1</sup> flow, column temperature was adjusted to 40, mobile phase using methanol and 2% phosphoric acid (pH 2.60) (40%: 60% v/v) at 350 nm. Flavonoid identification was performed by comparing retention times (RT) and spectra with known standards: chlorogenic acid, rutin, quercetin and luteolin (Sigma-Aldrich, USA). Chromatographic peaks in the samples were identified based on the retention time of the standards. Tannin detection was performed using the mobile phase with 0.1% formic acid solution (Solvent A) and methanol (Solvent B), the flow rate was adjusted to 0.7 mL.min<sup>-1</sup> at 40°C. A gradient elution was performed by varying the ratio of solvent B to solvent A as follows:

0-15 min, 15% to 33% B; 15-17 min, 33% to 15% B; 17-22 min, 15% B. The detection wavelength was 270 nm. The quantification of the sample was measured by comparing the RT and spectrum with the standard, gallic acid (Vetec, Brazil) (Ross et al., 2009). For detection of coumarins, the protocol according to Celeghini (2001). isocratic mobile phase with flow of 1 mL.min<sup>-1</sup>, the column temperature was adjusted to 30°C, the mobile phase being acetonitrile and water (40%:60% v/v) at 274 nm. Sample quantification was measured by comparing RT and spectrum with the standard, coumarin (Sigma-Aldrich, USA). Data are presented as means of measures in triplicate.

## **2.6. Cytotoxicity *in vitro***

### *2.6.1 Lymphocytes isolation*

Human lymphocytes were obtained from peripheral blood sample of a healthy nonsmoking volunteer with informed consent, 28 aged, without any history of recent disease, exposures to radiation or drug use (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 were approved by the Research Ethical Committee of UFES (approval number 2.333.879).

### *2.6.2 Cell culture*

Mouse Sarcoma 180 Ascites Cells (S180), were acquired from Banco de Células do Rio de Janeiro and were incubated into the peritoneal cavity of albino mice (*Mus musculus*). The protocols with S180 were authorized by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA/UFES) under process number

89/2015. Cells (lymphocytes and S180) were cultured with RPMI 1640 (Cultilab) supplemented with antibiotic gentamicin (50 mg.L<sup>-1</sup>) and antifungal amphotericin B (2 mg.L<sup>-1</sup>), 20% fetal bovine serum (Gibco) at 37 °C and CO<sub>2</sub> 5% saturation.

### 2.6.3 MTT assay

The assay of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) was performed to assess cell viability. The cells (human lymphocytes and S180) were plated in 96-well plates with 2x10<sup>5</sup> cells in each well and treated with *Tithonia diversifolia* extract 10 µg.mL<sup>-1</sup> in medium for 48 h, at 37 °C, in 5% CO<sub>2</sub>. After exposure, the medium was removed and MTT (5 mg.mL<sup>-1</sup> of stock in PBS) was added (20 µL/well), and cells were incubated for an additional 3 h with MTT dye. Then, absorbance at 595 nm was detected in the ELISA reader. The percentage of viable cells was calculated with the following equation:

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

### 2.7. Mutagenic activity

Mutagenicity was assessed by micronucleus assay in mice peripheral blood cells. The protocol was approved by the Research Ethical Committee on Animal Use of the Federal University of Espírito Santo (CEUA/UFES, 036/2015) and was performed in accordance with the ethical principles of animal experimentation.

Forty eight (48) Swiss albino mice (*Mus musculus*), males, with 6–8 weeks of age and about 30 g b.w., randomly selected and supplied by the Central Biotery of the Federal University of the Espírito Santo were housed in plastic cages in

groups of 6 animals, under conditions of controlled light and temperature, with free access to commercial feed and water.

The evaluation of the crude HAE of *Tithonia diversifolia* as a mutagenic agent was performed for the ST and COL localities, which were previously selected from phenolic quantification and antioxidant activity. Five experimental groups were established: (i) groups treated with HAE dissolved in water at final concentrations of 50, 100 and 150 mg.kg<sup>-1</sup> b.w., (ii) positive control that received a single injection intraperitoneal (ip) cisplatin (6 mg.kg<sup>-1</sup>), (iii) negative control treated with saline solution (0.9%). Treatments with HAE and saline were performed orally (gavage) for 5 consecutive days. The animals were euthanized by cervical dislocation, after the time of treatment or the application of the mutagen.

The micronucleus assay was performed as described by Schmid (1975). Peripheral blood samples were collected from the caudal artery and prepared the slides for smear. The cells of peripheral blood were fixed with methanol (100%) stained with Leishman. A total of 2000 normochromatic erythrocytes were analyzed per animal in peripheral blood sample for the presence of microcuclei. Cytological analysis was performed with the use of an optical microscope (1000X).

## **2.8. Statistical analysis**

All results were expressed as the means  $\pm$  standard deviation. For HPLC and mutagenic assays, were performed ANOVA followed Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ) using the open source program R (R Core Team 2016). For cytotoxicity assay

were performed ANOVA followed Test t ( $p < 0.05$ ) using ASSISTAT version 7.7 beta software (Assistat Software, Campina Grande, Paraíba, Brazil).

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. HPLC quantification of compounds**

Six phenolic compounds (chlorogenic acid, rutin, quercetin, luteolin, gallic acid and coumarin) were quantified in samples of the populations of *Tithonia diversifolia* investigated in two phenological stages. The content of these compounds varied significantly between the populations and also between the different phenological phases ( $p < 0.05$ ) (Table 2). The spectra and retention time (RT) were used to quantify: chlorogenic acid (RT= 2.95 min, peak 1), rutin (RT= 5.50 min, peak 2), quercetin (RT= 14.11min, peak 3) and luteolin (RT= 17.20 min, peak 4) (Figure 1a). To quantify the tanins the spectra and RT of gallic acid were used (RT= 7.55 min, peak 1) (Figure 1b) and the quantification of the coumarins were performed using the RT of coumarin (RT= 6.59 min, peak 1) (Figure 1c).

Table 2. Phenolic compounds identified for HPLC-DAD in the different *T. diversifolia* populations during phenological phases (vegetative and reproductive).

		Chlorogenic acid ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Rutin ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Quercetin ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Luteolin ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Coumarin ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Gallic acid ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )
ST	Vegetative	491.50 $\pm$ 21.03 <sup>a</sup>	3334.87 $\pm$ 30.96 <sup>a</sup>	26.72 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	39.75 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	1.43 $\pm$ 0.05 <sup>e</sup>	27.06 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>
	Reproductive	142.13 $\pm$ 8.21 <sup>b</sup>	1520.57 $\pm$ 1.81 <sup>b</sup>	nd	25.25 $\pm$ 0.88 <sup>c</sup>	12.35 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	20.41 $\pm$ 1.86 <sup>b</sup>
VIA	Vegetative	133.89 $\pm$ 4.13 <sup>b</sup>	1005.08 $\pm$ 18.99 <sup>d</sup>	6.51 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	16.72 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>	0.69 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	15.70 $\pm$ 1.00 <sup>c</sup>
	Reproductive	10.38 $\pm$ 0.47 <sup>e</sup>	218.07 $\pm$ 6.65 <sup>e</sup>	7.99 $\pm$ 1.64 <sup>b</sup>	25.71 $\pm$ 1.03 <sup>c</sup>	nd	12.08 $\pm$ 0.28 <sup>d</sup>
MF	Vegetative	108.77 $\pm$ 4.54 <sup>c</sup>	1397.38 $\pm$ 16.75 <sup>c</sup>	nd	32.72 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	nd	10.26 $\pm$ 0.41 <sup>e</sup>
	Reproductive	8.71 $\pm$ 0.17 <sup>e</sup>	90.54 $\pm$ 5.12 <sup>g</sup>	nd	15.39 $\pm$ 1.42 <sup>e</sup>	3.24 $\pm$ 0.37 <sup>c</sup>	11.04 $\pm$ 0.21 <sup>d</sup>
VIT	Vegetative	30.34 $\pm$ 2.30 <sup>d</sup>	138.61 $\pm$ 8.79 <sup>f</sup>	6.64 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	6.71 $\pm$ 0.15 <sup>h</sup>	3.23 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	9.97 $\pm$ 0.50 <sup>e</sup>
	Reproductive	9.39 $\pm$ 0.32 <sup>e</sup>	82.79 $\pm$ 7.07 <sup>g</sup>	nd	8.29 $\pm$ 0.77 <sup>g</sup>	1.74 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>	10.29 $\pm$ 0.12 <sup>e</sup>
COL	Vegetative	8.74 $\pm$ 0.42 <sup>e</sup>	17.02 $\pm$ 0.07 <sup>i</sup>	nd	13.59 $\pm$ 0.88 <sup>f</sup>	4.71 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	8.68 $\pm$ 0.38 <sup>f</sup>
	Reproductive	9.03 $\pm$ 0.05 <sup>e</sup>	63.63 $\pm$ 1.78 <sup>h</sup>	nd	17.09 $\pm$ 0.78 <sup>d</sup>	3.48 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	11.11 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>

Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three replicates. Averages in the columns with different letters are significantly different by Scott-Knott at  $p < 0.05$ . ST: Santa Teresa; VIA: Viana; MF: Muniz Freire; VIT: Vitória; COL: Colatina. nd: not detected.

Figure 1: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) profiles of phenolic compounds in the fractions of *Tithonia diversifolia* extract: (a) profile obtained for chlorogenic acid (peak 1), rutin (peak 2), quercetin (peak 3), luteolin (peak 4); (b) profile obtained for gallic acid and (c) profile obtained for coumarin.

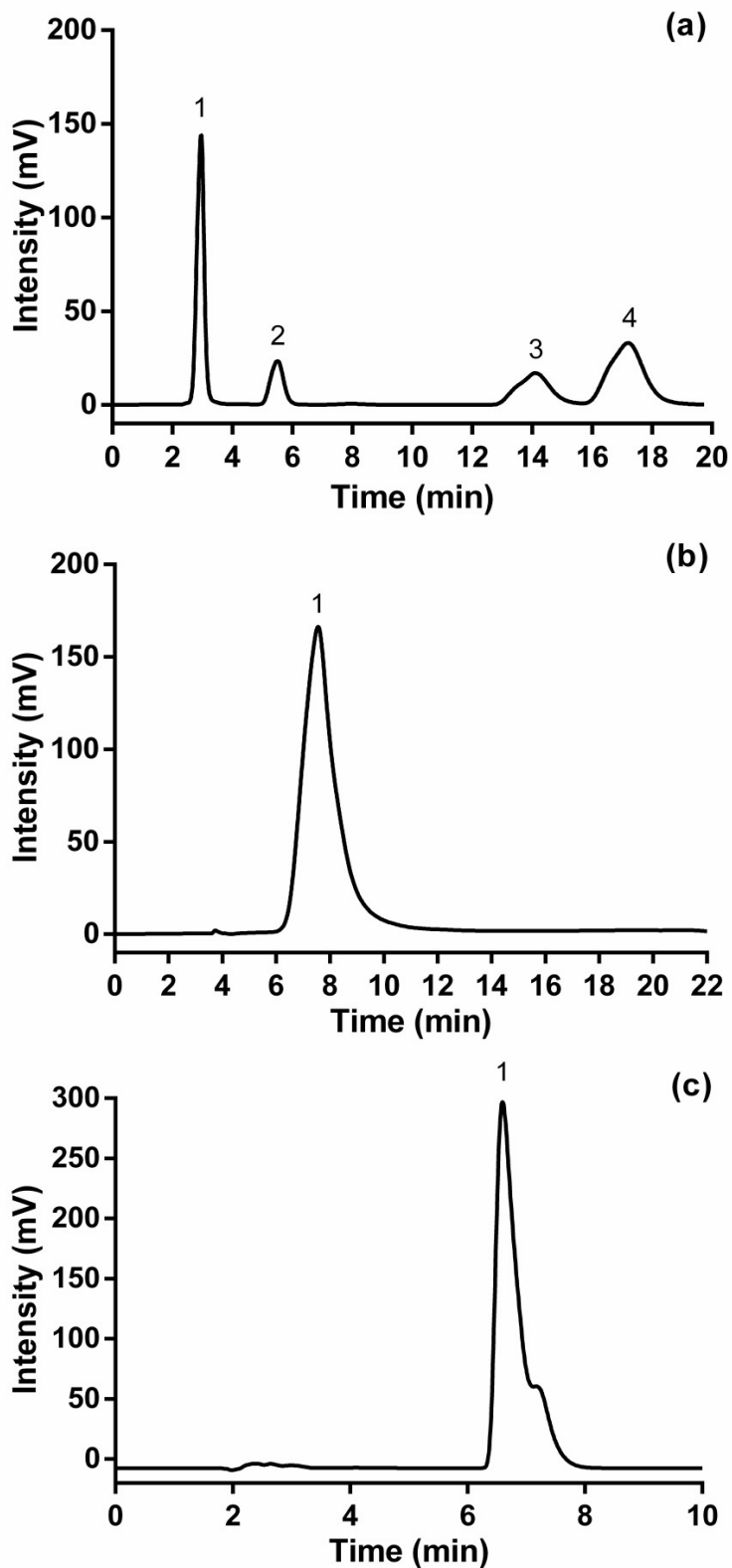


Table 3. Pearson correlation analysis between phenolic compound contents and environmental factors in the vegetative stage.

	Chlor. acid	Rutin	Quercetin	Luteolin	Coumarin	Gallic acid	Altitude	Precipitation	Temperature
Chlor. acid	<b>1</b>								
Rutin	<b>0.974</b>	<b>1</b>							
Quercetin	<b>0.937</b>	0.844	<b>1</b>						
Luteolin	0.801	<b>0.905</b>	0.553	<b>1</b>					
Coumarin	-0.412	-0.568	-0.190	-0.628	<b>1</b>				
Gallic acid	<b>0.978</b>	<b>0.919</b>	<b>0.957</b>	0.680	-0.368	<b>1</b>			
Altitude	0.687	0.817	0.448	<b>0.960</b>	-0.607	0.528	<b>1</b>		
Precipitation	0.559	0.404	0.761	0.137	0.421	0.562	0.134	<b>1</b>	
Temperature	<b>-0.969</b>	<b>-0.962</b>	<b>-0.893</b>	-0.848	0.358	<b>-0.900</b>	-0.793	-0.615	<b>1</b>

Values in bold indicate that the correlation is significant at the 0.05 level.

Table 4. Pearson correlation analysis between phenolic compound contents and environmental factors in the reproductive stage.

	Chlor. acid	Rutin	Quercetin	Luteolin	Coumarin	Gallic acid	Altitude	Precipitation	Temperature
Chlor. acid	<b>1</b>								
Rutin	<b>0.996</b>	<b>1</b>							
Quercetin	-0.241	-0.157	<b>1</b>						
Luteolin	0.484	0.544	0.600	<b>1</b>					
Coumarin	<b>0.954</b>	<b>0.927</b>	-0.486	0.333	<b>1</b>				
Gallic acid	<b>0.989</b>	<b>0.996</b>	-0.121	0.606	0.923	<b>1</b>			
Altitude	0.615	0.601	-0.396	0.265	0.702	0.608	<b>1</b>		
Precipitation	0.365	0.330	-0.621	-0.321	0.467	0.284	0.784	<b>1</b>	
Temperature	<b>-0.948</b>	<b>-0.939</b>	0.338	-0.441	<b>-0.954</b>	<b>-0.937</b>	-0.834	-0.571	<b>1</b>

Values in bold indicate that the correlation is significant at the 0.05 level.



Phenolic compounds have the ability to eliminate free radicals, and plant phenology, genetic and environmental factors can cause variations in their levels and therefore, influence the antioxidant activity of plants. (Mediani et al., 2012). The effects of several ecological factors on the production of secondary metabolites have been investigated in angiosperms (Spitaler et al., 2006; Wang et al., 2017).

Rutin was the predominant phenolic compound in all populations of *T. diversifolia* tested. In the vegetative stage, ST and MF presented the highest amounts of rutin,  $3334.87\mu\text{g.g}^{-1}$  and  $1397.38\mu\text{g.g}^{-1}$ , respectively. In the reproductive stage, there was a significant reduction of the rutin content in almost all the populations compared to the vegetative stage, with ST presenting the highest levels of this flavonoid ( $1520.57\mu\text{g.g}^{-1}$ ) (Table 2).

In the quantification of chlorogenic acid, the ST sample showed a greater amount of this flavonoid in the vegetative stage ( $491.50\mu\text{g.g}^{-1}$ ) as well as in the reproductive stage ( $142.13\mu\text{g.g}^{-1}$ ). The quercetin was detected only in the ST and VIT (vegetative stage) and VIA (vegetative and reproductive stages) samples, being the largest quantity identified in the ST sample ( $26.72\mu\text{g.g}^{-1}$ ), therefore, this flavonoid is not a good chemical marker for the species under study. The highest luteolin content was also found in the ST sample at the vegetative stage ( $39.75\mu\text{g.g}^{-1}$ ). Coumarin was detected in a higher concentration in ST plants in the reproductive stage ( $12.35\mu\text{g.g}^{-1}$ ). The tannin quantification presented the same pattern found for most of the other phenolic compounds tested, with the highest levels in ST plants at the vegetative stage ( $27.06\mu\text{g.g}^{-1}$ ).

The phytochemical composition of the species may vary significantly during the phenological cycle. Therefore, it is very important to identify and select ideal ontogeny stages, to produce the largest quantities of bioactive compounds and guarantee homogeneity of the quality of the raw material. In general, the highest levels of phenolic compounds were found in the plants collected at the vegetative stage. These results are in agreement with those found by Yosr (2013), in which leaves of *Rosmarinus officinalis* at vegetative stage are characterized by high amounts of phenols and tannins when compared to the flowering stage. Mediani et al. (2012) also reported that *C. caudatus* presents the highest content of phenolic compounds at the stage of vegetative development.

One possible explanation is that the energy required to synthesize these metabolites (phenolic) is used for other activities such as flowering, or constituents that were being used in the production of secondary metabolic pathways were required in the primary metabolism route. An example is the conversion of most of these phenolic compounds into other metabolites such as sugars. Moreover, in the vegetative stage the plant is investing raw material and energy in the production of molecules of the secondary metabolism that will be fundamental in the reproductive phase, like the essential oils. Thus, the vegetative stage could be proposed as optimal phenological stage ensuring high levels of bioactive compounds.

Among the analyzed environmental factors, the average temperature of the month of collection showed a strong correlation with the production of phenolic compounds. Pearson correlation analysis demonstrated the high correlation between temperature and chlorogenic acid, rutin, quercetin and gallic acid ( $R^2 =$

-0.969, -0.962, -0.893 and -0.900, respectively) in the vegetative stage. In addition, in this same stage there was a strong correlation between altitude and luteolin production ( $R^2 = 0.960$ ) (Table 3). In the reproductive stage, high correlation was demonstrated between temperature and chlorogenic acid, rutin, coumarin and gallic acid ( $R^2 = -0.948, -0.939, -0.954$  and  $-0.937$ , respectively) (Table 4). Altitude and temperature, ecological factors, could affect phenolics content. The highest content of phenolic compounds of *Tithonia diversifolia* was observed in populations at higher altitudes. Commonly, the average temperature tends to decrease with increasing altitude and, in the present study, was the factor that presented the highest correlation with phenolic compounds contents in the two phenological stages evaluated, suggesting that temperature, among other environmental factors, had a significant influence on the control of the biosynthesis of these active compounds of *T. diversifolia*.

In several studies, lower temperatures were also associated with an increase in antioxidative secondary metabolites, mainly phenolics. Albert and collaborators (2009) submitted *Arnica montana* L. to different temperature regimes and UV-B radiation, and observed that the increase of UV-B radiation did not trigger any change in phenolic metabolite content in *Arnica*. In contrast, there was an increase in flavonoid synthesis resulting from a decrease in temperature by 5°C. The concentration of antioxidant metabolites, such as tannins and flavonoids, in *Lafoensia pacari* leaves were also altered by environmental factors, with an increase in the production of these compounds with decreasing temperature (Sampaio et al., 2011). In addition, the increase in phenolic compound levels may be related to the increased activity of Phenylalanine ammonia lyase (PAL), at warmer temperatures, since PAL is an important enzyme in the

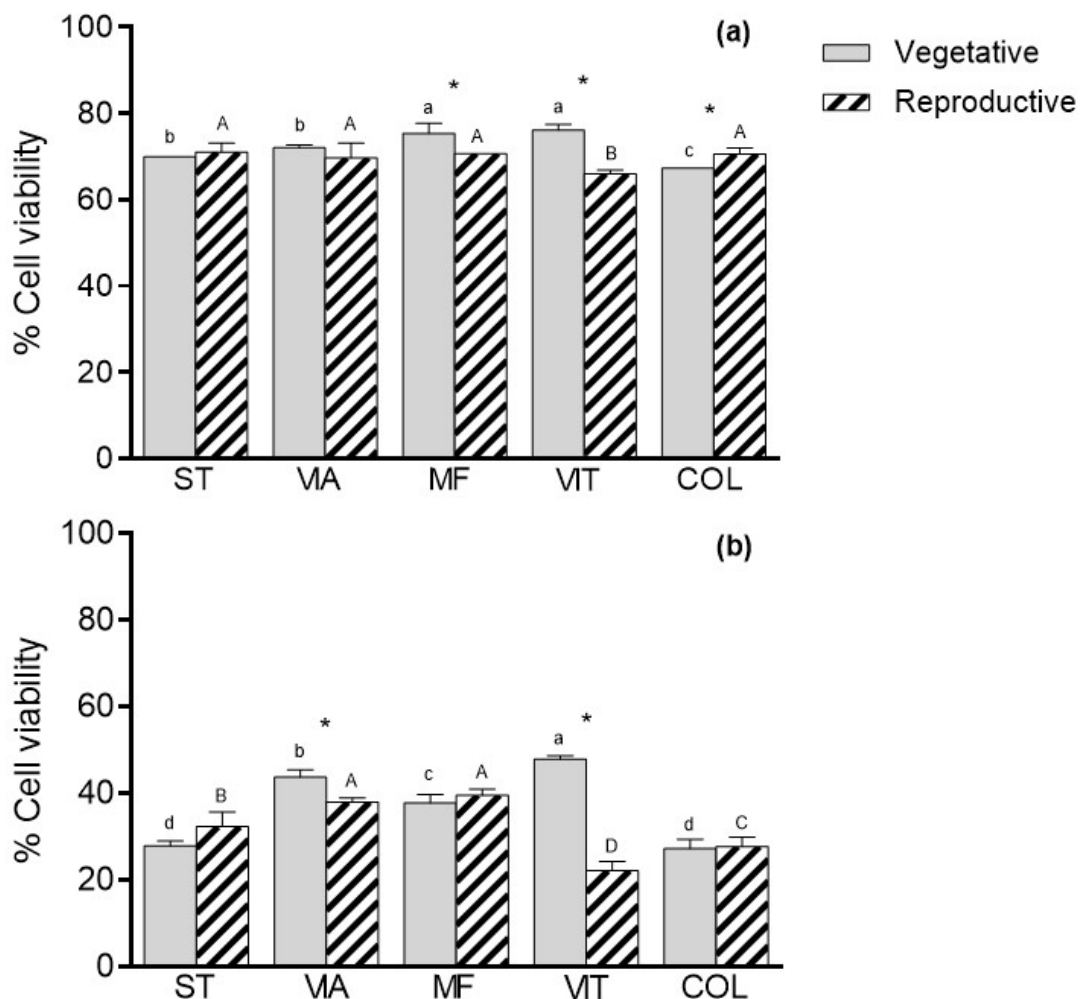
phenylpropanoid pathway involved in phenolic synthesis (Padda and Picha, 2008). Rivero et al. (2001) investigated the accumulation of phenolic compounds in watermelon plants (*Citrullus lanatus*) and concluded that the treatment with the lower temperature (15°C) induced higher activity of the PAL and consequently higher total phenol content.

### 3.2 MTT

The *in vitro* cytotoxicity of *T. diversifolia* was investigated by MTT assay in human lymphocytes and S180 cells in this study. For this, both cell lines were exposed to the hydroalcoholic extract of *T. diversifolia* 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for 48h. The enzymatic reduction of tetrazolium salts (MTT) is related to the survival of cells that are metabolically active after exposure to the test substance. For human lymphocytes, MTT results indicate that there were no significant changes in cell viability when *T. diversifolia* extracts from different locality were added. For this cell line, viability remained around 70% (Figure 2a). The same treatment applied to S180 cells showed that all extracts of *T. diversifolia* induced significant cytotoxicity, with emphasis on ST and COL. Gu et al. (2002) tested the chemotherapeutic potential of sesquiterpenes isolated from *T. diversifolia* and found that compounds displayed significant antiproliferative activity. The cytotoxic effect of the aqueous and ethanolic extracts of *T. diversifolia* using *Artemia salina* was investigated by Mayara et al. (2016) and it was verified that both extracts were not toxic for that organism. The cytotoxic effect of the aqueous extract of *T. diversifolia* was determined by Hiransai et al. (2016), using cancer cells (RAW264.7) from rats and human peripheral blood mononuclear cells by the mitochondrial method of respiration.

In the present study, the extract of *Tithonia diversifolia* presented greater cytotoxic activity on the cancer cell line (S180), which shows that the extract acts differentially in the two cell lines evaluated here. Other works also point to differential selectivity between cancerous and healthy strains when incubated with the phenolic compounds (Das et al., 2010; Vijayarathna and Sasidharan, 2012). The sensitivity presented by cancer cells seems to be related to flavonoids, since these compounds can trigger apoptosis through modulation of a number of key elements in cellular signal transduction pathways linked to apoptosis (Ramos, 2008).

Figure 2: The effect of HAE of *T. diversifolia* on the viability in lymphocytes human (a) and S180 cells (b) at  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for 48h. The values were expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Bars with different lowercase letters are significantly different and bars with different capital letters are significantly different. \* Indicates statistical difference between the vegetative and reproductive stages. Post-test applied: *Test t* at  $p < 0.05$ . ST: Santa Teresa; VIA: Viana; MF: Muniz Freire; VIT: Vitória; COL: Colatina.



### 3.3 Micronucleus assay on peripheral blood of mice

The micronucleus assay is one of the most widely used mutagenicity tests *in vivo* studies (Hayashi, 2016). Micronuclei appear in daughter cells as a result of damage induced in parental cells. The origin of micronuclei can also result from loss of an entire chromosome, when damage occurs to the mitotic apparatus of the cell, or in the chromosome (Ribeiro, 2003).

Table 5 shows the results of the micronucleus assay in peripheral blood of

mice. There were not significant difference between the CN and the three groups treated with *T. diversifolia* extract ( $p < 0.05$ ) in frequency of micronucleated normochromatic erythrocytes (MNNCE). However, animals treated with cisplatin had a significant increase in the frequency of MNNCE, indicating that the circulating blood cells maintained the micronucleated erythrocytes after exiting the bone marrow. The extracts used in the treatments had very different levels of flavonoids and antioxidant activity (data not showed), however there was no difference in micronuclei frequency between the treated groups. This may be related to a poor bioavailability and extensive metabolism in the digestion process of phenolic compounds (Hollman et al., 2011). Belcavello et al. (2012) found that treatment with an isolated flavonoid, ipriflavone did not induce an increase in the frequency of micronuclei in peripheral blood of mice, also attributed to the low availability of the test substance.

Table 5. Frequency of micronucleated normochromatic erythrocytes (MNNCE) in 1000 NCE of peripheral blood of Swiss albino mice treated with *T. diversifolia* extract and controls.

Treatment	MNNCE/1000 NCE $\pm$ SD
CN	0.27 $\pm$ 0.19
CP	3.73 $\pm$ 0.90 *
COL 50 mg.kg <sup>-1</sup>	1.91 $\pm$ 0.80
100 mg.kg <sup>-1</sup>	0.64 $\pm$ 0.27
150 mg.kg <sup>-1</sup>	0.73 $\pm$ 0.45
ST 50 mg.kg <sup>-1</sup>	0.36 $\pm$ 0.19
100 mg.kg <sup>-1</sup>	0.54 $\pm$ 0.20
150 mg.kg <sup>-1</sup>	0.18 $\pm$ 0.12

\*  $p < 0.05$  (Scott-Knott test). ST: Santa Teresa; COL: Colatina. SD: standard deviation.

## Conclusion

This research has demonstrated secondary metabolites levels and antiproliferative activity of *T. diversifolia* are influenced by factors of the environment, and among these, the temperature seems to act more significantly in the production of the phenolic compounds investigated. Plants with the highest levels of these metabolites also showed a higher cytotoxic effect on the cancer cells. The vegetative stage could be proposed as the optimal phenological stage ensuring high levels of bioactive compounds considering the environmental conditions and biological actions evaluated in the present study. Studies that quantify secondary compounds of medicinal plants are of great importance in the identification of growth conditions and intrinsic factors of the plant that contribute to the increase in the production of phenolic compounds. The results suggest that *T. diversifolia* presents great therapeutic potential and can be used for the development of new drugs.

## Acknowledgments

This work is an integral part of the project financed by FAPES. The authors thank for the doctoral scholarship granted by FAPES. We acknowledge the Laboratory of Biomolecular Analysis (LABIOM) at Health Sciences Center from Federal University of Espírito Santo, Vitória-ES, Brazil for their support with the use of HPLC system.

## References

- Albert, A., Sareedenchai, V., Heller, W., Seidlitz, H.K., Zidorn, C., 2009. Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. *Oecologia* 160, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1277-1>



- Bacanli, M., Başaran, A.A., Başaran, N., 2015. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food Chem. Toxicol.* 81, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.015>
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Belcavello, L., Vencioneck Dutra, J.C., de Freitas, J.V., Aranha, I.P., Batitucci, M. do C.P., 2012. Mutagenicity of ipriflavone in vivo and in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 50, 996–1000. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.013>
- Celeghini, R.M.S., Vilegas, J.H.Y., Lanças, F.M., Química, I. De, Carlos, D.S., Paulo, U.D.S., Sp, S.C., 2001. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng . (“ guaco ”) Leaves. *J. Braz. Chem. Soc.* 12, 706–709.
- Chagas-Paula, D.A., Oliveira, R.B., Rocha, B.A., Da Costa, F.B., 2012. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chem. Biodivers.* 9, 210–235. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100019>
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., Campos, D., 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and / or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Ind. Crops Prod.* 47, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025>
- Das, A., Banik, N.L., Ray, S.K., 2010. NIH Public Access. *Cancer* 116, 164–176. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1256>. Functional
- Djerrad, Z., Kadik, L., Djouahri, A., 2015. Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Ind. Crops Prod.* 74, 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.049>
- Dorman, H.J.D., Hiltunen, R., 2004. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chem.* 88, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.12.039>
- Ghasemi Pirbalouti, A., Firoznejhad, M., Craker, L., Akbarzadeh, M., 2013. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of

- Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. *Brazilian J. Pharmacogn.* 23, 861–869. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000600002>
- Gu, J.Q., Gills, J.J., Park, E.J., Mata-Greenwood, E., Hawthorne, M.E., Axelrod, F., Chavez, P.I., Fong, H.H.S., Mehta, R.G., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 2002. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. *J. Nat. Prod.* 65, 532–536. <https://doi.org/10.1021/np010545m>
- Hayashi, M., 2016. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes Environ.* 38, 4–9. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>
- Hiransai, P., Tangpong, J., Kumbuar, C., Hoonheang, N., Rodpech, O., Sangsuk, P., Kajklangdon, U., Inkaow, W., 2016. Anti-nitric oxide production, anti-proliferation and antioxidant effects of the aqueous extract from *Tithonia diversifolia*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 950–956. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.02.002>
- Hollman, P.C.H., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Ric, M., 2011. The Biological Relevance of Direct Antioxidant Effects of Polyphenols for Cardiovascular Health in Humans Is Not Established. *J. Nutr.* 989–1009. <https://doi.org/10.3945/jn.110.131490.989S>
- Kuroda, M., Yokosuka, A., Kobayashi, R., Jitsuno, M., Kando, H., Nosaka, K., Ishii, H., Yamori, T., Mimaki, Y., 2007. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 1240–1244. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.1240>
- Mayara, T., Castilo B, D. Del, Serrão P, C.D., Lobato R, A.B., Silva R, R., Oliveira P, F. De, Ferreira S, P.S., Priscila, N., Távora, L., Susan, S., 2016. Antioxidant effect of plant extracts of the leaves of *Tithonia diversifolia* ( Hemsl .) A . Gray on the free radical DPPH. *J. Chem. Pharm. Res.* 8, 1182–1189.
- Mediani, A., Abas, F., Ping, T.C., 2012. Influence of Growth Stage and Season on the Antioxidant Constituents of *Cosmos caudatus*. *Plant Foods Hum. Nutr.* 67, 344–350. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0317-x>
- Miranda, M.A.F.M., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M.G., Gualtieri, S.C.J., Macías, F.A., 2015. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *J. Nat. Prod.* 78, 1083–1092. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00040>

- Padda, M.S., Picha, D.H., 2008. Effect of low temperature storage on phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.014>
- Ramos, S., 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 507–526. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700326>
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., García, P.C., López-Lefebvre, L.R., Sánchez, E., Romero, L., 2001. Resistance to cold and heat stress: Accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 160, 315–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00395-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2)
- Ross, K.A., Beta, T., Arntfield, S.D., 2009. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chem.* 113, 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.064>
- Šamec, D., Durgo, K., Grúz, J., Kremer, D., Kosalec, I., Piljac-Žegarac, J., Salopek-Sondi, B., 2015. Genetic and phytochemical variability of six *Teucrium arduini* L. populations and their antioxidant/prooxidant behaviour examined by biochemical, macromolecule- and cell-based approaches. *Food Chem.* 186, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.135>
- Sampaio, B.L., Bara, M.T.F., Ferri, P.H., da Costa Santos, S., de Paula, J.R., 2011. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. *Brazilian J. Pharmacogn.* 21, 1127–1137. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000177>
- Sampaio, B.L., Edrada-Ebel, R., Da Costa, F.B., 2016. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: A model for environmental metabolomics of plants. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep29265>
- Silva, C.G., Herdeiro, R.S., Mathias, C.J., Panek, A.D., Silveira, C.S., Falc, D.Q., Cerqueira, D.M., Menezes, F.S., Eleutherio, E.C.A., 2005. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacol. Res.* 52, 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.03.008>
- Silva, L.R., Martins, L. V., Calou, I.B.F., Meireles de Deus, M.S., Ferreira, P.M.P.,

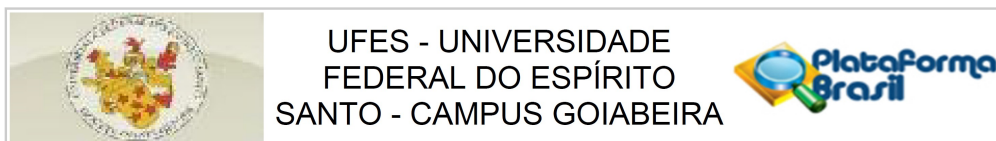
- Peron, A.P., 2015. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. *Acta Toxicol. Argent.* 23, 36–43.
- Spitaler, R., Schlorhauser, P.D., Ellmerer, E.P., Merfort, I., Bortenschlager, S., Stuppner, H., Zidorn, C., 2006. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv . ARBO. *Phytochemistry* 67, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.018>
- Tlili, N., Mejri, H., Yahia, Y., Saadaoui, E., Rejeb, S., Khaldi, A., Nasri, N., 2014. Phytochemicals and antioxidant activities of *Rhus tripartitum* (Ucria) fruits depending on locality and different stages of maturity. *Food Chem.* 160, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.030>
- Valdez-Morales, M., Espinosa-Alonso, L.G., Espinoza-Torres, L.C., Delgado-Vargas, F., Medina-Godoy, S., 2014. Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5281–5289. <https://doi.org/10.1021/jf5012374>
- Vijayarathna, S., Sasidharan, S., 2012. Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 826–829. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60237-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60237-8)
- Wahyuningsih, S.H., Wijayanti, M.A., Budiyanto, A., Hanafi, M., 2015. Isolation , identification and antibacterial activity of flavonoid compound from kembang bulan [*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A Gray] leaves. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 7, 298–301.
- Wang, X., Wang, M., Cao, J., Wu, Y., Xiao, J., Wang, Q., 2017. Analysis of flavonoids and antioxidants in extracts of ferns from Tianmu Mountain in Zhejiang Province (China). *Ind. Crops Prod.* 97, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.013>
- Yao, X.H., Zhang, Z. Bin, Song, P., Hao, J.Y., Zhang, D.Y., Zhang, Y.F., 2016. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. *Ind. Crops Prod.* 94, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.033>
- Yesil-Celiktas, O., Girgin, G., Orhan, H., Wichers, H.J., Bedir, E., Vardar-Sukan, F., 2007. Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of

*Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. Eur. Food Res. Technol. 224, 443–451. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0306-0>

Yosr, Z., Hnia, C., Rim, T., Mohamed, B., 2013. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. Ind. Crops Prod. 43, 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.044>

Zhao, G., Xi, Z., Chen, W., Li, X., Sun, L., Sun, L., 2012. Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. Biochem. Syst. Ecol. 44, 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.06.019>

## ANEXO I



**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,

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

Página 02 de 04



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_BÁSICAS_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:**

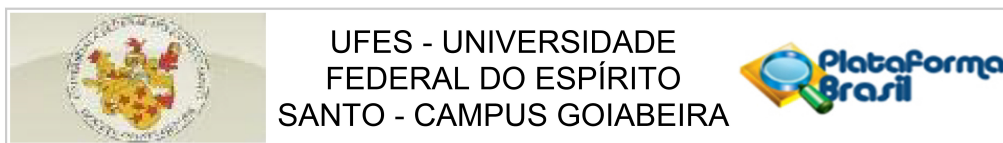
Aprovado

**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)**



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.

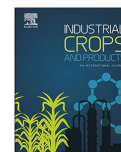
## ANEXO III

Industrial Crops &amp; Products 121 (2018) 241–249



Contents lists available at ScienceDirect

## Industrial Crops &amp; Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)

## Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Tithonia diversifolia* Hemsl. (Asteraceae) populations



Irany Rodrigues Pretti<sup>a,\*</sup>, Anny Carolyne da Luz<sup>a</sup>, Claudia Masrouah Jamal<sup>b</sup>,  
Maria do Carmo Pimentel Batitucci<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Biological Sciences, Center for Human and Natural Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Genetic variability  
RAPD  
Phytochemical analysis  
Phenology  
Phenolic compounds

## ABSTRACT

*Tithonia diversifolia* is a medicinal plant traditionally used in the treatment of diabetes, diarrhea, menstrual cramps, malaria, hematomas, hepatitis, hepatomas and wounds. This work investigated the influence of environmental factors, phenological stage and genetic variability on the secondary metabolite profile and its antioxidant actions. Leaves were collected at the vegetative stage and in the reproductive stage, in five regions of southeastern Brazil. Phytochemical analyses, antioxidant activity and genetic markers as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) were used to evaluate the variability between populations and to generate clusters. The highest contents of phenols, flavonoids and tannins were observed in ST (Santa Teresa) samples, as well as displayed great antioxidant activity. ST showed low genetic similarity to other populations (0.12), indicating high levels of genetic diversity and that clustering it is not positively correlated with the proximity of geographical locations. This analysis indicates that phytochemical and antioxidant variations between populations are influenced by genetic factors as well as environmental conditions.

\* O artigo publicado no periódico *Industrial Crops and Products* não foi disponibilizado integralmente devido ao cumprimento do período de embargo.